

Eliana Mara Oliveira Lippe

**“AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DA
ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NAS CÉLULAS DA INTERFACE
MATERNO FETAL NA GESTAÇÃO NORMAL E COM
LESÃO EMBRIONÁRIA”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Eliana Mara Oliveira Lippe
Juan Carlos
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada

Campinas, 2007

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CESAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA:	T/UNICAMP
	L664a
V. _____ Ed.	
TOMBO BCI	2121
PROC.	16.145-07
C ☐ D ☒	
PREÇO	1100
DATA	25/04/07
BIB-ID	409352

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

L664a

Lippe, Eliana Mara Oliveira

Avaliação da expressão das isoformas da óxido nítrico sintase nas células da interface materno-fetal na gestação normal e com lesão embrionária / Eliana Mara Oliveira Lippe. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Áureo Tatsumi Yamada.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Células natural killer uterinas. 2. Óxido nítrico sintase. 3. Útero. 4. Prenhez. 5. Camundongo. I. Yamada Áureo Tatsumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Evaluation of nitric oxide synthase isoforms expression in the cells of maternal foetal interface in the normal pregnancy and with embryo lesion.

Palavras-chave em inglês: Uterine natural killer cells; Nitric oxide synthase; Uterus; Pregnancy; Mouse.

Área de concentração: Histologia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Áureo Tatsumi Yamada, Selma Giorgio, Andrea Mollica Amarante-Paffaro.

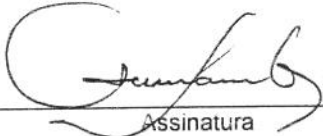
Data da defesa: 22/02/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

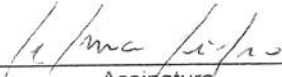
Campinas, 22 de fevereiro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Selma Giorgio


Assinatura

Profa. Dra. Andréa Mollica Amarante Paffaro


Assinatura

Prof. Dr. Luis Antônio Violin Dias Pereira

Assinatura

Profa. Dra. Estela Maris Forell Bevilacqua

Assinatura

200718154

*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)

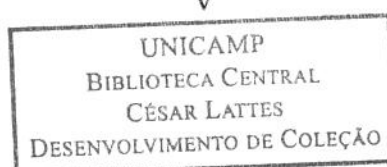
Aos meus pais,

Nelson e Verginia,

Pelo carinho e oportunidade de permitir que eu
realizasse este sonho e apoio constante em todos os
momentos da minha vida.

Por terem me mostrado o verdadeiro significado
de família.

v



Aos meus irmãos,

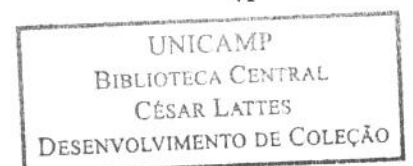
Edwaldo, Eloiza e Eliza, aos meus sobrinhos

Pedro e João e minha cunhada Sirlene,

Pela amizade, carinho e incentivo nos momentos

mais difíceis da minha vida.

vi



Ao querido,

Gustavo,

Por me fazer acreditar que a vida não falhará
enquanto houver amor. Por estar sempre ao meu lado
nos momentos mais difíceis e principalmente por ter
paciência, cumplicidade e amor...

vii

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL CÉSAR LATTES DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, UNICAMP, por possibilitar a realização do meu mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, pela orientação e dedicação, por todo apoio e incentivo, e por sempre ser um exemplo para mim de conduta profissional, honestidade, e ser humano.

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

Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, pelo constante apoio, incentivo, atenção e contribuição científica aos meus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Luis Antônio Violin Dias Pereira, pela colaboração neste trabalho e pelas avaliações e atenção dispensada no momento da pré-banca.

A Profa. Dra. Selma Giorgio, pelo apoio nos conhecimentos científicos sobre a biologia do óxido nítrico e pelas avaliações criteriosas no momento da pré-banca.

A Profa. Dra. Andréa Mollica Amarante Paffaro, pela contribuição científica desde o primeiro momento da realização desta tese e pelas avaliações e valiosas sugestões no momento da pré-banca.

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

À dona Lúcia, seu Valdomiro, Daniel e Marcelo pelo apoio constante em todos os momentos da minha vida.

À Cecília, por todo carinho e atenção desde os primeiros momentos no laboratório e pelo incentivo constante.

À Aline, pelo companherismo em todas as etapas deste mestrado, pela amizade e carinho.

Aos meus amigos, Marlúcia, Juarez, Patrícia, Thalita, Karina, Márcia, Patrick, Carol, Juliana, Priscila e Petra, pelo constante apoio, risadas, choros... Muito obrigada pela paciência que vocês tiveram comigo.

À Ana Deckman, do Laboratório de Genômica e Proteômica, pelo constante apoio e conhecimento científico sobre PCR.

À minha grande amiga Camila, pela convivência durante todos estes anos, pelas risadas e baladas...

Às amigas, Cristiane, Diana e Maíra pela grande amizade durante todos estes anos em todos os momentos da minha vida.

As amigas Sheley, Carol, Letícia e Dulcinéia, do Hemocentro/UNICAMP, pelo apoio e dedicação durante a realização da técnica de RT-PCR.

Aos meus amigos de pós-graduação, Juliana Lessa, Ana Gabriela (Gabi), Paulo e Fernanda Losi, pela eterna amizade, carinho, atenção e paciência.

Aos docentes do Departamento de Histologia e Embriologia, IB/UNICAMP, por me auxiliarem no aprimoramento das atividades acadêmicas e científicas.

Aos funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia, Rita, Beatriz, Baltazar e Juvani e à secretária Lílian do Programa de Pós-Graduação pela colaboração e incentivo à realização deste trabalho.

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

Aos meus familiares e amigos pela compreensão e incentivo oferecidos de maneira direta ou indireta.

ÍNDICE

Agradecimento.....	v
Resumo.....	1
Abstract.....	3
1- INTRODUÇÃO.....	6
1.1- Células <i>Natural Killer</i> uterinas (Unk).....	7
1.2- Células dendríticas do ambiente uterino.....	9
1.3- Óxido nítrico sintase (NOS).....	12
1.4- Modelo experimental de gestação anormal	17
2- OBJETIVOS.....	21
2.1- Objetivos gerais.....	21
2.2- Objetivos específicos.....	21
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1- Animais.....	24
3.2- Indução da lesão embrionária.....	24
3.3- Inoculação por LPS.....	24
3.4- Coleta de material.....	25
3.4.1- Processamento histológico.....	25
3.4.2- Obtenção de homogeneizado tecidual	25
3.5- Citoquímica de Lectina DBA	26
3.6- Imunocitoquímica	26
3.7- Western Blot/ SDS-PAGE	27
3.7.1- SDS-PAGE.....	27
3.7.2- <i>Western blot</i>	28
4- RESULTADOS.....	30
4.1- Análise macroscópica.....	30
4.2- Avaliação morfológica através da citoquímica de lectina DBA	30
4.2.2- Animais submetidos à lesão embrionária.....	31
4.2.3- Animais submetidos à inoculação por LPS.....	33
4.3- Imunocitoquímica.....	33
4.3.1- Óxido nítrico sintase induzida (iNOS).....	33
4.3.2- Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).....	34

4.3.3- Óxido nítrico sintase neuronal (nNOS).....	34
4.3.4- Interferon- α	35
4.4- Western blot das isoformas das NOS.....	37
5- DISCUSSÃO.....	39
6- CONCLUSÕES.....	51
7- DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	54
8- ANEXO.....	68
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

RESUMO

O sucesso da implantação e do desenvolvimento embrionário no útero de humanos e roedores decorre de interações íntimas entre as células de origem materna e fetal, com a intermediação de citocinas e mediadores químicos em fino balanço estabelecendo um diálogo entre as diferentes populações celulares da interface materno-fetal. Este diálogo envolve do lado fetal as células trofoblásticas e do lado materno o estroma decidualizado, vasos sanguíneos e células leucocitárias do endométrio, numa complexa rede de sinalizações cujos mecanismos são apenas parcialmente conhecidos. Desequilíbrios neste balanço de sinalizações podem resultar na interrupção da gravidez sendo particularmente intrigante a participação das células *natural killer* uterinas (uNK) que constituem uma população linfocitária que estão presentes em grande quantidade no ambiente uterino exclusivamente durante a gestação. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a expressão e participação das isoformas das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) como potencial indutor do desequilíbrio da homeostasia do microambiente uterino na interface materno-fetal envolvendo a produção do óxido nítrico (NO). Foram utilizados camundongos no 8º e 10º dia de gestação (dg) normal e grupos de animais cujos embriões foram lesionados mecanicamente por intervenção cirúrgica ou inoculados com lipopolissacarídeos (LPS). Amostras uterinas de sítios embrionários foram coletadas nos períodos de 1, 2 e 6 horas pós-lesão mecânica, ou, 6 horas após inoculação com LPS e processados de acordo com as técnicas rotineiras para embebição em parafina, assim como, processados para obtenção de homogeneizados teciduais da região mesometrial destes sítios embrionários. Cortes de parafina foram submetidos à reação citoquímica com a lectina *Dolichos biflorus* (DBA) e às reações imunocitoquímicas para as isoformas iNOS, eNOS e nNOS e, para IFN- α . Foram realizadas SDS-PAGE dos homogeneizados teciduais e *Western-blot* com os anticorpos anti-iNOS, anti-eNOS e anti-nNOS. A região mesometrial dos sítios embrionários lesionados mecanicamente apresentou hiperemia após 1 hora de lesão que evoluiu para um quadro de hemorragia nos períodos posteriores. No grupo submetido ao tratamento com LPS foi observado um quadro de hiperemia no período de 6 horas. Pela citoquímica com a lectina DBA constataram-se alterações na morfologia das células uNK destes sítios, sendo notória a perda de reatividade no conteúdo dos grânulos lisosomo-secretóres. As avaliações imunocitoquímica para iNOS indicaram que as células uNK, as células deciduais e as células trofoblásticas gigantes expressam iNOS constitutivamente na gestação normal, o mesmo ocorrendo com as isoformas eNOS e nNOS. Nos sítios de lesão embrionária, as células uNK

apresentam acentuada redução na marcação pela imunocitoquímica para a iNOS e nNOS nos períodos de 1 e 2 horas, com recuperação parcial após 6 horas. Estas variações não foram constatadas em outras células da interface materno-fetal. A eNOS apresentou marcações constantes nas células uNK e nas células musculares lisas, sem variações nos grupos experimentais de lesão embrionária. Pelo *Western-blot* foi constatada uma redução significativa para a iNOS e nNOS nos períodos de 1 e 2 horas pós-lesão mecânica. Estes resultados demonstraram que as células uNK respondem às alterações do ambiente uterino induzido pela lesão embrionária ou pelo LPS, com rápida mobilização das isoformas iNOS e nNOS possivelmente na produção do NO. O NO liberado por estas células pode ser a causa da alteração da permeabilidade ou lesão vascular da região mesometrial provocando a hiperemia e hemorragia. A mobilização da atividade da iNOS nas células uNK não parece ser dependente do IFN- α e portanto não ocorre o envolvimento das células dendríticas nesta via de sinalização.

ABSTRACT

The successful embryo implantation and development in human and rodents uteri is dependent of intimate interaction between maternal and fetal cells, with intervening of fine balance of cytokines and chemical mediators on cross-talks between cells in the maternal-fetal interface. This dialogue involves the cells of decidualized stroma, blood vessels and leukocytes from endometrium of maternal side and the trophoblast cells from embryo in a complex signaling network which mechanism is only partially understood. Unbalance of these signals could outcome in miscarriage being intriguing the participation of uterine natural killer cells (uNK) that compose lymphocyte population accumulate in the uterine environment specifically during pregnancy. The aim of this work was to evaluated the participation of nitric oxide synthase (NOS) enzymes isoforms which arise in nitric oxide (NO) production, as potential inducer of unbalance of homeostasis in the uterine environment. It was used normal pregnant mice on 8^o and 10^o gestational days and groups of animals which embryos were surgically lesioned or inoculated with lipopolysaccharide (LPS). Uterine samples were collected after 1, 2 and 6 hs of embryo lesion or 6hs after LPS inoculation and processed for conventional paraffin embedding, as so as, for tissue homogenates of mesometrial region from this uterine sites. Paraffin sections were processed for Dolichos biflorus (DBA) lectin cytochemistry and immunocytochemistry for iNOS, eNOS, nNOS and IFN- α . SDS-PAGE and Western blot were performed with tissue homogenates using anti-iNOS, anti-eNOS and anti-nNOS. The mesometrial region of embryo lesioned uterine sites showed hyperemia after 1 hr lesion and increased to hemorrhage after that. In the LPS treated animals was seen hyperemia after 6hr. The DBA cytochemistry showed morphological changes in the uNK cells found in this embryo lesioned sites being noticeable the lost of reactivity in the secretory-lysosome granules contents. The immunocytochemical for iNOS pointed out the uNK, decidual and trophoblast cells expressing iNOS constitutively in the normal pregnancy, as did the eNOS and nNOS. In the embryo damaged sites the uNK cells showed remarkable reduction in the iNOS and nNOS labeling after 1 and 2 hr with partial recuperation after 6 hr. These variations were not seen in other cells. The eNOS showed constant labelling on uNK cells and smooth muscle cells without changes in the experimental groups of embryo lesion or treated with LPS. By Western blot, it was noted significant lowering for iNOS and nNOS in the periods of 1and 2 hr after lesion. These results showed acute response of uNK cells against the changes of uterine environment induced by embryo lesion and LPS treatment, with fast mobilization of iNOS and nNOS isoforms possibly in the production of NO. The NO

released from these cells could be the cause of changes on vascular permeability or even lesion of blood vessels localized in the mesometrial region wich results in hyperemia and hemorrhage. The iNOS activation of uNK cells does not seem dependent of IFN- α and therefore without commitment of dendritic cells in this signaling pathway.

1- INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

O sucesso da implantação e do desenvolvimento embrionário em humanos e roedores decorre da íntima interação entre o organismo materno e o embrião em desenvolvimento, envolvendo modificações profundas nesta interface no ambiente uterino, dentre as quais se destacam, as transformações das células do estroma endometrial em células decidualizadas, neo-angiogênese e organogênese da placenta (Saito, et al, 2005; Lin, et al, 2006). Nesta interação também está presente uma série de mediadores químicos produzidos por células leucocitárias e células pertencentes ao sistema imune, presentes no endométrio que atuam na imunomodulação uterina (Zenclussen, et al, 2005).

No ambiente uterino de camundongos gestantes ocorre a migração de células linfocitárias oriundas da medula óssea e de órgãos linfopoéticos periféricos, como baço e timo (Raulet & Vance, 2006), que se acumulam transitoriamente em uma região denominada de glândula metrial (Peel & Stewart, 1983; Zheng, et al, 1991), ou, agregado linfocitário da região mesometrial associado à prenhez – MLAp (Croy, et al, 1983). Estas células, inicialmente denominadas de células granulosas da glândula metrial (CGM) pertencem à linhagem de linfócitos Natural Killer – NK (Zheng, et al, 1991; Croy, et al, 1985), porém, apesar das semelhanças fenotípicas, estas células NK do ambiente uterino (uNK), presentes exclusivamente durante a gestação apresentam peculiaridades que as distinguem das demais células NK (Askhar & Croy, et al, 1999).

As células *Natural Killer* (NK) atuam na imunidade inata com destacada atividade citolítica e citotóxica contra células transformadas, tais como, células infectadas por vírus e células tumorais, lisando-as ou também atuando na produção de citocinas, como, por exemplo, o IFN- γ (Trinchieri, 1989; Abbas, et al, 2002). A interação das células NK com outras populações celulares ocorre através de receptores de membrana, classificados como ativadores ou inibidores, dependendo se a atividade lítica é disparada ou não após a ligação ao receptor. Em camundongos, o principal receptor inibitório é Ly49 e CD94-NKG2, sendo expresso nas NK maduras, enquanto os receptores de ativação são: NKRP1A e NKRP1C (NK1.1), DX5, CD2, 2B4, CD69, Ly49D, Ly49H, NKp46 e NKG2D (Caraux, et al, 2006).

Apesar dos extensos estudos objetivando compreender as razões que levam ao acúmulo destas células atuantes na resposta imune inata no ambiente uterino de roedores e humanos, os mecanismos envolvidos na migração, diferenciação e as funções exercidas por estas células na gestação são ainda pouco esclarecidas.

Em relação ao conteúdo granular, nas células NK circulantes (cNK) está diretamente relacionado com a atividade citolítica que reconhecem como alvos células cujas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) apresentam alterações decorrentes de malignização ou infecções virais (Colonna, et al, 2000). Estas células cNK compreendem cerca de 5 a 20% das células totais residentes no fígado, baço, sangue periférico e apresentam baixa frequência nos órgãos linfóides como linfonodo, timo e medula óssea (Andoniou, et al, 2006).

1.1- Células Natural killer uterinas (uNK)

A similitude entre as células NK uterinas (uNK) e as células NK circulante (cNK) de camundongos tem sido verificada através de imunofenotipagem, que comprovam as expressões de: asialo-GM1, Ly-49G₂ (LGL-1), NK1.1, Thy-1, FcR, 4H12 e CD45 (Mukhtar, et al, 1989; Redline & Lu, 1989, Linnemeyer & Hamilton, 1990; Parr, et al, 1990). Porém, as uNK de humanos, são distintas das cNK pela expressão do CD56^{bright} CD16^{dim} e apresentam ausência de L-selectina e marcadores CD69 (Koopman, et al, 2003; Wu, et al, 2006) enquanto as cNK são CD56^{dim} (Croy, et al, 1993). Pela avaliação do perfil da expressão gênica, verifica-se diferenças na expressão de alguns genes (Koopman, et al, 2003).

Em humanos, são encontradas as células uNK na segunda metade do ciclo ovariano e estas ocorrem em um número bastante elevado (Koopman, et al, 2003; Van der Meer, et al, 2004). Em camundongos, as células uNK aparecem por volta do 5º dia de gestação (dg) coincidindo com o período de implantação do blastocisto e aumentam gradualmente em número até atingirem o pico de cerca de 70% dos linfócitos residentes, por volta do 12º dg na decídua basal e, tornam-se escassas próximo ao período do parto (Stewart & Peel, 1980; Croy, et al, 1997; Paffaro-Jr, et al, 2003, Wu, et al, 2006). Segundo Chantakru e colaboradores (2002), o acúmulo de células uNK deve-se ao recrutamento de células precursoras (pré-uNK) provenientes de órgãos linfóides como baço e linfonodos, que devem migrar ao útero provavelmente em diferentes estágios de diferenciação. As células uNK são encontradas no útero gestante de camundongos somente na região mesometrial na decídua basal, também denominada de região do agregado linfóide do mesométrio associado à prenhez (MLAp) (Croy & Xie, 2006).

A característica principal de uma célula uNK madura de camundongos é apresentar um citoplasma amplo, núcleo com nucléolo evidente e vários grânulos citoplasmáticos que são PAS positivo amilase resistentes (Paffaro-Jr, et al, 2003). Há quatro subtipos

morfológicos descritos por Paffaro-Jr e colaboradores (2003) baseados no padrão de reatividade à lectina-DBA na membrana e nos grânulos citoplasmáticos, e estes subtipos correspondem aos estágios de maturação desta população celular, quais sejam: *subtipo 1*: são as menores ($9 \pm 3\mu\text{m}$) e não apresentam grânulos com forte reatividade na membrana; *subtipo 2*: exibem poucos grânulos em seu citoplasma ($13 \pm 2\mu\text{m}$); *subtipo 3*: são as células mais diferenciadas, apresentando muitos grânulos ($26 \pm 7\mu\text{m}$) e; *subtipo 4*: o citoplasma apresenta vacúolo, com muitos grânulos e as que apresentam núcleo com cromatina irregular corresponderiam as células que estão iniciando o processo de apoptose ($30 \pm 2\mu\text{m}$). Segundo este mesmo autor há um gradiente de distribuição destes subtipos de uNK na região mesometrial do sítio de implantação que varia de acordo com o período gestacional, sendo que a maior incidência de uNK tipo 1 e 2 encontra-se no endométrio próximo ao miométrio enquanto os subtipos 3 e 4 encontra-se no endométrio próximo ao embrião (Paffaro-Jr, et al, 2003).

As células uNK produzem inúmeras citocinas que atuam como moduladores da resposta imune, com ações peculiares na gestação (Schafer-Somi, 2003; Wu, et al, 2006). Exemplos de algumas citocinas produzidas pela uNK e que atuam na gestação são: IL-1, fator inibidor de leucemia (LIF), fator estimulador de colônia (CSF-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ) (Croy, et al, 1997).

De acordo com Croy e colaboradores (2003), a profusão de citocinas que as uNK podem produzir permite atribuir diversas funções para estas células na gestação, como por exemplo, atuando sobre as células do estroma decidualizado colaborando para o seu crescimento, além de desencadear eventos que culminam na modificação das artérias espiraladas durante o desenvolvimento normal da gestação. Experimentos realizados com camundongos mutantes imunodeficientes, tais como SCID^{-/-} (Croy, et al, 2001) e RAG^{-/-} (Croy, et al, 2003), demonstram que as uNK não são imprescindíveis para a gestação. Porém, o IFN- γ produzido por estas células constitui um importante mediador para o desenvolvimento da placenta, manutenção da decídua e a modulação da angiogênese na interface materno-fetal (Ashkar & Croy, 1999; Croy, et al, 2001). As principais anomalias que podem ser observadas em camundongos depletados de uNK são: ausência de desenvolvimento do agregado linfóide mesometrial, hipocelularidade e edema de decídua basal e persistência de células musculares lisas nas artérias espiraladas acompanhada de dilatação limitada da luz vascular assim como, do crescimento dos vasos (Guimond, et al, 1998; Ashkar & Croy, 1999).

As células uNK poderiam atuar como célula efetora na resposta imune inata, além do papel regulador da citotoxicidade, o que demandaria um controle extrínseco e/ou intrínseco da liberação de proteínas solúveis, como perforinas e granzimas contidos nos seus grânulos e, proteínas de membrana como Fas-ligante que podem desencadear a lise de células alvos (Stinchcombe & Griffiths, 1999). Contudo, dentre as funções em potencial que as células uNK apresentam, a liberação do conteúdo dos seus grânulos lisossomo-secretores é ainda uma incógnita e não parece ocorrer no ambiente uterino de gestação normal. Não se conhece também, qual mecanismo regulador poderia desencadear ou modular a atividade citolítica das células uNK. Uma possibilidade envolve a presença de células dendríticas (DC) que se supõe participar da imunoregulação deste ambiente (Dielt, 2006).

1.2- Células dendríticas do ambiente uterino

O sucesso da gestação envolve a interação entre a imunidade inata e a tolerância na decídua materna que é o local de contato entre mãe e feto (Kammerer, et al, 2003). Semelhante ao que ocorre na pele e em outras mucosas, no ambiente uterino também são encontradas células dendríticas (DC), uma população de células acessórias do sistema imune (Blois, et al, 2004). Usualmente, as células dendríticas atuam como elementos chaves nas respostas imune inata e adquirida (Banchereau & Steinman, 1998; Askelund, et al, 2003), regulando, por exemplo, a ativação de linfócitos T responsáveis pela resposta imune adquirida (Liang, et al, 2003; Loza & Perussia, 2004). Estas células dendríticas apresentam duas funções principais, a de atuar como célula apresentadora de antígenos e indução de tolerância periférica (Liang, et al, 2003).

As células dendríticas são populações heterogêneas de células derivadas da medula óssea. Há duas linhagens de células dendríticas, a mielóide e a plasmocitóide que se diferenciam quanto à produção de citocinas (Banchereau, et al, 2003). Loza e Perussia (2004) salientaram que a resposta produzida pela linhagem mielóide é do tipo Th1, enquanto que a resposta produzida pela linhagem plasmocitóide é do tipo Th2. Dielt (2006) descreveu que células dendríticas precursoras (imaturas - iDC) apresentam capacidade altamente endocítica e pobremente imunoestimulatória e desenvolvem-se em células dendríticas maduras (mDC) que apresentam a atividade de células apresentadoras de antígenos (APC) (Liang, et al, 2006). As células DC maduras (mDC) expressam em sua superfície moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80, CD83 e CD86, e apresentam capacidade limitada de

produção de IL-12, sendo esta responsável por induzir atividade citolítica nas células T. (Piccioli, et al, 2002; Kammerer, et al, 2003; Dielt, et al, 2006). Há uma via dupla de interação que ocorre entre as DC e as células NK visando à ativação das células NK e a maturação de células DC concomitantemente (Gerosa, et al, 2002; Ferlazzo, et al, 2004). Estudos demonstram que a DC e NK são co-localizadas e participam de respostas imunes complementares e para isso deve ocorrer o contato entre estas duas populações celulares. Esta interação foi designada *killer* ativadas por células dendríticas (DAK) (Gerosa, et al, 2002; Borg, et al, 2004; Ferlazzo, et al, 2004; Andoniou, et al, 2005).

No útero gestante, concomitantemente à incidência de uNK, verifica-se que as células dendríticas (CD11c) aparecem inicialmente neste ambiente por volta do 5,5º dg e aumentam gradualmente a partir da implantação embrionária atingindo um platô que equivale a 10% das células totais uterinas de camundongos no 8º dg, sendo a localização mais precisa próxima ao local de invasão do trofoblasto (Blois, et al, 2004; Juretic, et al, 2004). É provável que a população de células DC da linhagem plasmocitóide esteja envolvida com o estado dominante Th2 na qual ocorre manutenção da gestação (Piccioli, et al, 2002; Kammerer, et al, 2003; Dielt, et al, 2006).

O esquema da figura 1 ilustra as possíveis interações que ocorrem entre as células dendríticas, as células uNK e as células trofoblásticas, além da participação das células endoteliais presentes no ambiente uterino gestante.

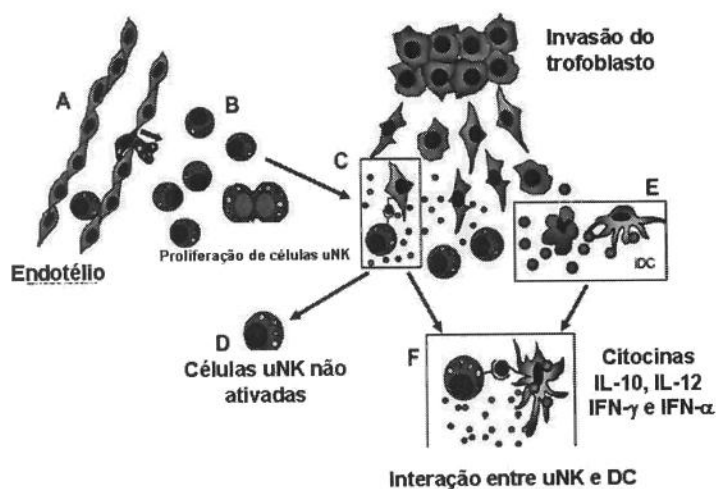


Figura 1: Esquema representando o diálogo que existe entre as células imunomoduladoras presentes no ambiente uterino de roedores, adaptado de Dietil e colaboradores (2006). As células uNK no endométrio (B) provenientes de órgão linfopoéticos periféricos que migram através dos vasos sanguíneos (A), proliferam e diferenciam neste local exclusivamente durante a gestação. As uNK interagem e reconhecem o trofoblasto (C) que expressam MHC-II não clássicos HLA-G e HLA-E em humanos e Ly49 em camundongos. Este reconhecimento induz a supressão da atividade citolítica destas células uNK (C) que permanecem queiscentes no ambiente uterino na gestação normal (D), produzindo citocinas predominantemente do tipo Th2. As células dendríticas (DC) presentes no útero gestante são mantidas imaturas (iDC) e participam da imunomodulação uterina interagindo com o trofoblasto (E). Na gestação normal o reconhecimento do trofoblasto pelas uNK e pelas DC modula a interação entre DC e uNK inibindo tanto a resposta imune inata das uNK quanto a mobilização de linfócitos T. O desequilíbrio nestas interações podem desencadear respostas que resultam na interrupção da gestação com a ativação tanto da uNK quanto da DC através da interação direta e/ou desbalanço da produção de citocinas (F).

De acordo com Dietl e colaboradores (2006), as células imunomoduladoras interagem de forma precisa para que a gestação seja mantida, principalmente através da produção de citocinas Th2. Este diálogo que ocorre entre células dendríticas e células uNK envolvem a produção de inúmeras citocinas que podem desencadear a maturação das células dendríticas concomitantemente a ativação das células NK. A atividade citolítica da célula

cNK é estimulada com IL-2, mas também pode ser induzida por outras citocinas como a IL-12 e IFN- α . As células dendríticas da linhagem plasmocitóide são responsáveis pela produção de interferon-alfa (IFN- α), pertencente à família de IFN tipo I (Askelund, et al, 2003).

O IFN- α é uma citocina com funções pleiotrópicas celulares, incluindo atividades antiviral modulando a resposta imune nas infecções virais ativando resposta citolítica em células NK, antiproliferativa, imunomoduladora e antiangiogênica (Rothfuchs, et al, 2001; Abbas, 2002; Lehtonen, et al, 2003; Liang, et al, 2003; Hansson, et al, 2004).

Muitas citocinas, dentre elas o IFN- α , ativam através de receptores de superfície fatores de transcrição que são membros da família dos transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STATs - Sinal de tradução e ativadores de transcrição). Esta enzima STAT é ativada através da fosforilação de receptores de tirosina modificando sua conformação molecular para se ligar ao DNA (Reich & Liu, 2006). Depois de ativado pela fosforilação, a enzima STAT ativada interage com outras STATs através da interação com pontes de sulfeto e forma dímero com tirosina fosforilada STAT2 e um fator não STAT (fator regulador de interferon - γ / IRF9) e então migra para o núcleo através do tráfego de importinas (Reich & Liu, 2006). As enzimas STAT1 e STAT2 são importantes mediadores da família dos IFNs e apresentam função na imunidade, diferenciação e proliferação celular. A proteína JAK é uma proteína pertencente à família Janus kinase e induz fosforilação de tirosina quinases. Quando esta via está ativa é denominada de JAK-STAT (Reich & Liu, 2006). O IFN- α ativa a via de sinalização JAK/STAT que induz a formação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Uma outra via existente envolve a proteína NF- κ B (Fator de nucleação κ B), que induz fosforilação do complexo I κ B que também culmina na produção da iNOS (óxido nítrico sintase induzida) (Ishimaru, et al, 2006).

Desta forma, uma das possíveis vias da ativação das células uNK no ambiente uterino poderia ser através do IFN- α , uma vez que, as duas vias propostas de sinalização, tanto JAK/STAT como NF κ B, ativam a expressão de alguns genes das células efectoras, entre outros, da enzima óxido nítrico sintase envolvidas na produção do NO.

1.3- Óxido nítrico sintase (NOS) na gestação

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, sintetizado a partir da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), sendo uma molécula de sinalização intracelular, atuando como

mensageiro intracelular (Tranguch, et al; 2003). O NO é envolvido na regulação de diversos mecanismos fisiológicos e patofisiológicos no sistema cardiovascular, nervoso e imunológico. No sistema reprodutor atua em processos como: foliculogênese e remodelação tecidual (Tranguch, et al, 2003). O NO quando em concentrações mínimas apresenta efeito benéfico para as células contribuindo para executar a maioria das funções, porém, quando em excesso apresenta efeito deletério para a célula, pois lesa biomoléculas causando dano celular e tecidual. Concentrações muito baixas do limite fisiológico também comprometem o sistema de defesa do organismo contra microorganismos invasores e alguns processos proliferativos importantes. A atividade do NO não é restrita apenas a seu sítio de formação, pois por ser um gás é facilmente difundido.

O NO é produzido através da oxidação do substrato de L-arginina e do oxigênio molecular utilizando para isto catálises de enzimas como NADPH diaforase como doador de elétrons e usando grupo heme, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), tetrahydropterina (H₄B) como cofator (Al-Hijji, et al, 2003). Esta reação consiste de duas conversões: da L-arginina para NO e L-citrulina via N-hidroxil L-arg como intermediário com monooxigenase I e II. Estas duas reações são catalizadas por enzimas NOS e destas são encontradas três isoformas (Aktan, 2004). O NO não atua somente como vasodilatador, mas também como inibidor de outras proteínas como endotelina-1 e a sua produção é supra-regulada por inibidores endógenos de NOS, tais como, L-NAME (L-nitroarginina) e L-NMMA (N-monometil L-arginina) (Momohara, et al, 2004).

São encontrados três isoformas da enzima NOS que formam o NO a partir da L-arginina. Em comum, a porção C-terminal de todas as isoformas demonstra homologia para enzima NADPH e citocromo P450 redutase (Momohara, et al, 2004). As três enzimas catalizam a mesma reação enzimática, ou seja, a conversão do aminoácido L-arginina e oxigênio molecular em L-citrulina e NO, porém diferem quanto a regulação, a amplitude e a duração da produção de NO, além da sua distribuição no tecido (Bogdan, 2001).

A isoforma óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é uma isoforma solúvel, não é encontrada constitutivamente em qualquer tipo celular, necessitando de estímulo para ser expressada. A iNOS foi a primeira isoforma a ser identificada, clonada e sequenciada a partir de macrófagos de camundongos consistindo de uma proteína com bi-domínio, onde o domínio C-terminal age como redutase e contém o sítio de ligação para NADPH, FAD e FMN e o domínio N-terminal age como oxigenase que contém sítio de ligação do grupo heme, H₄B e L-arg (Aktan, 2004). Esta isoforma está ativa apenas na forma dimérica e sua ativação é condicionada à presença do estímulo, tais como, produtos bacterianos como

lipopolissacarídeos (LPS) que é um sinalizador de problemas inflamatórios e citocinas imunoestimulatórias, mas independente da concentração do complexo cálcio/calmodulina (Bogdan, 2001).

As principais funções da iNOS no útero gestante são manter a resistência vascular baixa e atenuar a ação de vasoconstritores, além disso, pode prevenir a adesão e agregação plaquetária e de neutrófilos na superfície dos trofoblastos e agregação no espaço intervilloso através do fluxo adequado para a placenta (Myatt, et al, 1996). Antes do período de implantação a marcação para iNOS é mais evidente nos leucócitos tipicamente macrófagos, mastócitos e uNK e também nas células musculares miométriais. Com o avançar da implantação a intensidade de marcação pela imunocitoquímica tende a ser mais proeminente. Quando quantificada, verifica-se que a banda da iNOS (130 KDa) apresenta valores elevados no 6º, 7º e 8º dg, com pico no 8º dg, sugerindo que há uma maior expressão da iNOS com a progressão da implantação. Durante o período peri-implantacional a atividade da iNOS passa a ser regulada por receptores celulares (toll-like-CD14) no qual o LPS pode atuar como ligante e iniciar resposta via ativação da sinalização NF κ B. Como o LPS pode induzir resposta em macrófagos, células dendríticas e células decíduais, este torna-se um importante modelo experimental para o estudo das vias de produção do NO (Fantel, et al, 1998).

No sistema imune esta isoforma é produzida por várias populações celulares, dentre elas, as células dendríticas, células NK, mastócitos, macrófagos, eosinófilos, células de Kupffer e neutrófilos. Quando avaliada no tecido placentário observa-se que se encontram distribuídas por todo o tecido, tanto embrionário quanto materno (Kakui, et al, 2003; Aktan, 2004). Além disso, é localizada nas uNK (Hunt, et al, 1997; Burnett & Hunt, 2000; Cifone, et al, 2001; Ogando, et al, 2003), nos macrófagos (Hunt, et al, 1997; Rothfichs, et al, 2001), no epitélio uterino e nas células estromais (Yoshiki, et al, 2000), além do trofoblasto na gestação (Purcell, et al, 1999; Burnett & Hunt, 2000; Kakui, et al, 2003). A citotoxicidade mediada pelas células uNK tem sido correlacionada também com a atividade da iNOS, sendo esta determinada pelo acúmulo de nitrito (Cifone, et al, 2001). Além disso, a expressão de perforina nas células uNK, encontram-se reduzidas em camundongos deficientes para iNOS (Burnett & Hunt, 2000).

A enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é uma isoforma constitutiva que apresenta peso molecular de 140 kDa, sendo ativada pela presença do complexo cálcio/calmodulina e este sítio liga-se ao guanilato ciclase solúvel formando GMPc com marcação localizada na membrana celular (Kakui, et al, 2003) Esta localização é necessária

para suas interações com outras proteínas regulatórias (chaperones, quinases) para um balanço fino dos ciclos de ativação e inativação da eNOS (Sessa, 2005).

A isoforma eNOS foi sequenciada a partir de células endoteliais bovinas (Bredt, et al, 1991; Lowenstein, et al, 1992; Marsden, et al, 1992; Sessa, et al, 1992; Wang & Marsden, 1995) e sabe-se que sob condições basais atua como vasodilatador do sistema cardiovascular (Park, et al, 2000). A isoforma eNOS é localizada no sinciotrofoblasto, endotélio de artérias e veias do cordão umbilical e placa coriônica. A reação para eNOS ocorre no estroma uterino e na zona decidual e ao redor de pequenos vasos (Purcell, et al, 1999; Schonfelder, et al, 2004). Evidências de estudos, *in vivo*, têm sugerido que a proteína caveolina 1 é um potente inibidor (atua como regulador negativo) da eNOS (Sessa, et al, 2005). O NO liberado no lúmen vascular é um potente inibidor de adesão e agregação plaquetária na parede vascular e também inibe a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, inibe a síntese de DNA, a mitogênese e a proliferação de células da musculatura lisa vascular e, também é um dos responsáveis pela regulação da pressão sanguínea e contractilidade do músculo cardíaco (Al-Hijji, et al, 2003). O NO também regula a morte de células por apoptose e mantém ativa a barreira de células endoteliais (Rosselli, et al, 1998; Landmesser, et al, 2005).

Ogando e colaboradores (2003) demonstraram em camunodongos que ocorre aumento da expressão da eNOS durante a fase do estro e proestro e que este aumento é decorrente da interação com os hormônios esteróides como estrógeno e progesterona, além disso, essa progesterona pode interagir de maneira significativa com a isoforma iNOS (Ogando, et al, 2003).

Antes do período de implantação não é encontrada a isoforma eNOS no útero, porém, logo após a implantação embrionária a localização desta isoforma eNOS fica evidente nas células trofoblásticas gigantes (Purcell, et al, 1999; Dotsch, et al, 2001) e, no período final da gestação a eNOS está presente apenas na forma inativa (Sladek, et al, 1998).

Quando são avaliados camunodongos gestantes normais observa-se que não ocorrem variações significativas durante a gestação na expressão da eNOS (Purcell, et al, 1999). No entanto, estudos demonstram que há um aumento da expressão da isoforma eNOS no miométrio e na placenta em mulheres com preeclâmpsia em relação a mulheres com gestação normal. Este fato pode representar um mecanismo compensatório do fluxo sanguíneo útero-placentário prejudicado para produzir continuamente NO promovendo o

aumento do tônus miogênico, aumento da sensibilidade ao estímulo vasoconstritor ou compensar a ausência do fluxo mediado por NO (Purcell, et al, 1999).

Purcell e colaboradores (1999), sugerem que a eNOS sofra uma regulação positiva para compensar a redução do número de vasos sanguíneos e a redução no diâmetro desses, alterados pela preeclâmpsia, com o objetivo de manter o fluxo sanguíneo normal. Por outro lado Orange e colaboradores, (2003) afirmam que a hipóxia da placenta associada à preeclâmpsia não induz um aumento na regulação da eNOS para compensar o fluxo sanguíneo (Orange, et al, 2003).

A enzima nNOS é um tipo constitutivo associado ao complexo cálcio/calmodulina, que foi sequenciado a partir de cerebelo humano e de rato (Bredt, et al, 1991; Lowenstein, et al, 1992; Marsden, et al, 1992; Sessa, et al, 1992; Wang e Marsden, 1995). Está presente em neurônios, células epiteliais, células musculares, célula β -pancreática e outras. O NO produzido por esta isoforma é conhecido por atuar como neurotransmissor e neuromodulador no SNC e SNP (Drazen, et al, 1999; Park, et al, 2000). Atua na regulação da pressão sanguínea, no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação via nervos periféricos. Uma outra função que a isoforma nNOS está envolvida é na regulação do fluxo sanguíneo cerebral local e na formação da memória (Togashi, et al, 1997; Park, et al, 2000; Pereira, 2000; Wang, et al, 2001; Cerqueira e Yoshida, 2002).

A nNOS apresenta-se regulada no útero gestante e mantém a quiescência miometrial, porém, quando próximo do parto ocorre a contração miometrial provocada pelo NO (Momohara, et al, 2004). A isoforma nNOS é encontrada no útero não gestante (Purcell, et al, 1999; Ogando, et al, 2003) produzida pelas células estromais e a sua expressão verificada por *Western blot* não parece flutuar significativamente durante o período de implantação (Purcell, et al, 1999). Quando quantificada a expressão da nNOS detectam-se as expressões de bandas com 155 a 160 kDa a de forma constante durante toda a gestação (Tsumamoto, et al, 2002).

Por conseguinte, no útero gestante são encontradas as três isoformas da NOS e o NO produzido no ambiente uterino contribui para a manutenção da gestação. No entanto, este mesmo NO pode estar envolvido na ação citolítica da resposta imune inata mediada pelas células NK (Cifone, et al, 2001; Burnett, et al, 2002). O envolvimento das células uNK neste processo pode ser crucial, considerando que o IFN- γ produzido predominantemente por estas células no útero durante a gestação (Croy, et al, 1997, Ashkar & Croy, 1999) é um sinalizador para ativação das três isoformas de NOS (Hilkens, et al, 2003). De fato, em elevadas concentrações no tecido, o NO pode produzir efeito tóxico, pois é um radical livre, e

este efeito é mediado pela ação do peroxinitrito (ONOO^-) que é produzido através da reação entre o ânion superóxido (O_2^-) e NO (Ogando, et al, 2003).

Uma característica que pode ocorrer devido à disfunção da vascularização adequada é a preeclâmpsia, sendo esta um tipo de desordem multisistêmica da gestação que acomete cerca de 5 a 20% da população. Este quadro decorre de uma disfunção endotelial e invasão trofoblástica inadequada das artérias espiraladas uterinas, diminuindo a perfusão placentária com o envolvimento do NO na regulação destes vasos arteriais (Loza & Perussia, et al, 2004). Por outro lado, apesar do potencial citotóxico do NO não há comprovações experimentais de que as três isoformas da NOS presentes no ambiente uterino passível de produzirem este radical livre, estejam relacionadas com casos de perdas gestacionais.

1.4- Modelo experimental de gestação anormal

A presença em grande quantidade das células uNK durante o período gestacional levanta dúvidas em relação às função dessas células no ambiente uterino. Considerando-se que apesar de possuírem enzimas citolíticas nos seus grânulos citoplasmáticos e seja cogitada a sua atuação em alguns casos de aborto recorrente de etiologia desconhecida, não há evidências experimentais que comprovem a ativação citolítica das células uNK na gestação.

A lesão mecânica de embriões no útero de camundongos gestantes foi padronizada por Roman (2001) que constatou a ocorrência de hemorragias de intensidade variada observada 1, 6, 12 e 24 horas após a lesão na região mesometrial dos sítios cujos embriões foram lesionados. Interessante ressaltar que a hemorragia na região mesometrial acometia também os sítios vicinais não manipulados, ou mesmo os sítios localizados no corno uterino não manipulado. Nestes animais foram constatados alterações nas células uNK sendo sugestiva a perda do conteúdo dos grânulos lisosomo-secretores destas células. Recentemente, Copi (2006), avaliando a ultraestrutura e através da imunocitoquímica, comprovou a perda do conteúdo destes grânulos tanto no seu compartimento secretor com perda de perforina e proteoglicanos, quanto no compartimento lisosomal pela redução da enzima catepsina D em períodos inferiores há 1 hora pós-lesão mecânica do embrião. Tais resultados demonstraram que as células uNK respondem à alteração da homeostasia do ambiente uterino provocado pela lesão mecânica do embrião.

Dentre estas evidências encontradas, chamou atenção à ocorrência de hiperemia seguida de hemorragia na região mesometrial, sugerindo um comprometimento da permeabilidade vascular ou mesmo o comprometimento da integridade dos vasos sanguíneos desta região. O efeito localizado da alteração na permeabilidade vascular onde ocorre grande acúmulo das células uNK sugere a participação destas células numa ação citotóxica, cujo mecanismo não foi ainda determinado. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos na permeabilidade vascular decorrente da lesão embrionária há possibilidade de ocorrer a produção de NO pelas células uNK pela ativação das enzimas NOS.

Um mecanismo semelhante com a ativação da iNOS é através da ligação de moléculas exógenas, tais como LPS ao seu receptor LBP que interage com receptor Toll-like-4 (TLR4) que ocorre em células dendríticas e macrófagos (CD14), que podem apresentar internalização destes receptores de LPS e TLR4 para induzir a cascata de sinalização de NF κ B nas células renais ou até mesmo sem sofrer a internalização destes receptores, apresentando apenas interação entre eles que induzirá a cascata de sinalização de NF κ B, como o que ocorre no intestino (Choudhury, et al, 2006). Estas vias de sinalização levam a ativação do complexo I κ B, responsáveis pela fosforilação do complexo NF κ B/I κ B que é degradado e o complexo NF-NF κ B é então translocado ao núcleo e ativa a expressão gênica da iNOS (Aktan 2004).

De fato, durante a gestação a administração intra-peritoneal de LPS na mãe resulta em necrose placentária acompanhada por outras alterações intra-útero como morte fetal ou aborto com expulsão do feto (Casado, et al, 1997). Após tratamento com LPS já ocorre produção elevada de NO após 2h nas células leucocitárias, que são as primeiras a responder a este estímulo, atingindo um pico em 6h e permanecendo elevada até 12h. Quando observado em 24h pós-inoculação, não é possível observar níveis detectáveis de NO (Ogando, et al, 2003). Todos os animais tratados com LPS resultam em 100% de reabsorção embrionária (caracterizada por embrião totalmente necrozado), na decídua há infiltrado de leucócitos e granulócitos, enquanto os animais tratados com aminoguanidina (AG) concomitantemente não ocorrem à reabsorção embrionária. Na mãe o efeito é sistêmico causando diarreia, piloereção e postura rebaixada, porém não é fatal (Ogando, et al, 2003). A expressão da iNOS no útero pode ocorrer em condições não estimuladas, porém, avaliar se o LPS pode aumentar a expressão desta pode melhor esclarecer o envolvimento do NO na perda gestacional.

Presume-se, portanto que a lesão mecânica do embrião que resulta em hemorragia localizada dos sítios de desenvolvimento embrionário pode ser resultante do

comprometimento vascular induzido por fatores liberados localmente, sendo as células uNK as candidatas em potencial pela sua localização coincidente no útero. Estas células apresentam arsenais intracelulares apropriados para desencadear o comprometimento vascular, dentre os quais a de produzir NO, um radical livre com potencial vasoativo que merece ser adequadamente investigado. Da mesma forma, o LPS, um lipopolissacarídeo de origem bacteriana que comprovadamente tem ação indutora na produção da iNOS pode ser utilizado para investigar as alterações destas enzimas com efeito abortivo em camundongos.

2- OBJETIVOS

20

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

2- OBJETIVOS

2.1- OBJETIVOS GERAIS

Investigar o efeito da lesão mecânica do embrião em comparação com a administração de LPS (lipopolissacarídeo) na expressão das isoformas de óxido nítrico sintases (nNOS, iNOS e eNOS) e IFN- α nas células da interface materno-fetal do útero de camundongos gestantes.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estabelecimento dos protocolos para indução da lesão mecânica do embrião e da inoculação de LPS em camundongos no 8º e 10º dias de gestação (dg).
- 2- Avaliação das alterações morfológicas das células uNK encontradas no útero gestante provocadas pela lesão mecânica do embrião e pela inoculação do LPS.
- 3- Imunolocalização das isoformas das NOS: nNOS, iNOS e eNOS nos úteros de gestação normal utilizados como controle e alterados pós-lesão mecânica do embrião e outro grupo submetido ao tratamento pelo LPS.
- 4- Imunolocalização do IFN- α como possível mediador da interação entre células dendríticas e células uNK para expressão das NOS.
- 5- Avaliação das variações nas expressões das isoformas das NOS: nNOS, iNOS, eNOS e de IFN- α através de SDS/PAGE e *Western Blot* nos homogeneizados de úteros de gestação normal e alterados após lesão mecânica do embrião e após tratamento pelo LPS .

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3- MATERIAIS E MÉTODOS

Os grupos de animais utilizados no presente experimento, assim como, os procedimentos gerais de processamentos e análises adotadas estão sumarizados no fluxograma da figura 2.

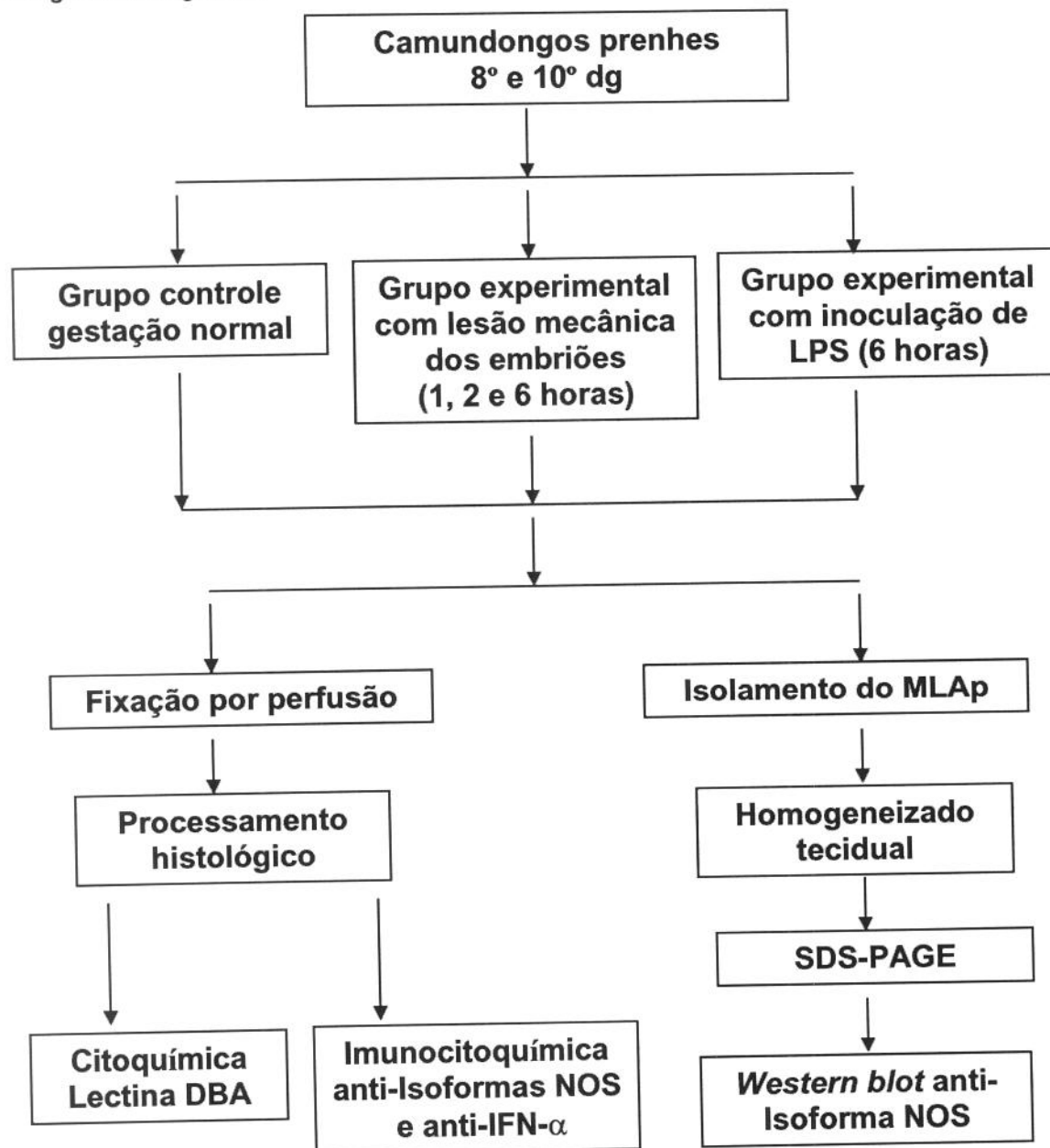


Figura 2: Fluxograma apresentando os grupos experimentais e os procedimentos de processamentos e análises adotados

3.1- Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem ***Mus musculus*** (Swiss) com 8º e 10º dias de gestação (dg) procedentes do Centro de Bioterismo (CEMIB), UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura e iluminação controladas, com acesso à água e alimentação *ad libitum*. Fêmeas virgens foram acasaladas com machos da mesma linhagem e o dia em cuja manhã foi constatado o tampão vaginal foi considerado o 1º dg. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia, UNICAMP (proc. nº. 1144-2) (Anexo).

3.2- Indução da lesão mecânica dos embriões

As fêmeas gestantes no 8º e 10º dg foram anestesiadas com injeção via intraperitoneal de cloridrato de xilazina 2% (Anasedan - Sespo) na concentração de 5-16 mg/Kg de peso do animal e cloridrato de ketamina 1% (Dopalen - Sespo) na concentração de 100-200 mg/Kg de peso do animal diluídos em solução fisiológica estéril na proporção de 1:1:3 e em seguida, laparotomizadas. Após a constatação da presença de sítios de desenvolvimento embrionário ao longo dos cornos uterinos, foram realizadas intervenções cirúrgicas para promover lesões mecânicas nos embriões. Foi introduzido uma agulha hipodérmica (15X5) através da parede uterina do lado anti-mesometrial, tomando-se o cuidado de não atingir a região mesometrial onde se localiza a glândula metrial. Foram realizadas lesões mecânicas em sítios intercalados, sendo no mínimo 2 sítios de um dos cornos uterinos enquanto o corno oposto foi mantido intacto. Após este procedimento, as incisões cutâneas e da fáscia muscular foram suturadas com fio cirúrgico em procedimento duplo. Como controle, um grupo de animais foi manipulado de forma semelhante, exceto quanto à lesão mecânica do embrião.

3.3- Inoculação de Lipopolissacarídio (LPS)

Camundongos no 8º e 10º dg foram injetados intraperitonealmente com uma concentração de 0,5 µg/g de lipopolissacarídio (LPS-*Escherichia coli* 05:B55 - Sigma Chemical Co, USA) por peso corporal diluído em PBS 50 mM pH 7,4 estéril de acordo com o

protocolo utilizado por Ogando, e colaboradores (2003). Como controle, grupos de 3 animais nos 8º e 10º dg foram inoculados com igual volume de tampão fosfato salina estéril (PBS) 50 mM, pH 7,4 e sacrificados após 6 horas de inoculação.

3.4- Coleta do material

3.4.1- Processamento histológico

Foram coletadas amostras dos sítios de implantação embrionária dos animais controles de gestação normal no 8º e 10ºdg e, de cada um dos grupos experimentais submetidos à lesão mecânica dos embriões nos períodos de 1, 2 e 6 horas, assim como, dos animais controles e tratados com LPS nos períodos de 6 horas. Foram anestesiados com a solução de cloridrato de xilazina 2% na concentração de 5-16 mg/Kg de peso do animal e cloridrato de ketamina 1% (Dopalen - Sespo) na concentração de 100-200 mg/Kg de peso do animal diluídos em solução fisiológica estéril na proporção 1:1:3. Após exposição da cavidade torácica, os animais foram perfundidos com 30-50 mL da solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% em tampão fosfato salina (PBS) 50 mM pH 7,4 e sacarose 0,1 M via ventrículo esquerdo, num período de 15 minutos. Após avaliação macroscópica, os cornos uterinos foram então removidos e os sítios de desenvolvimento embrionários foram cuidadosamente dissecados, preservando-se a região mediana de cada sítio e processados de acordo com a técnica rotineira de embebição em parafina. Foram utilizados pelo menos três sítios de três animais de cada um dos grupos experimentais e dos controles correspondentes. Além dos sítios de desenvolvimento embrionário foram coletadas amostras de baço, cérebro e rim dos animais que foram submetidos ao tratamento com LPS.

3.4.2- Obtenção do homogeneizado tecidual

Pelo menos três sítios de três animais dos grupos experimentais de lesão embrionária mecânica nos períodos de 1, 2 e 6 horas, dos grupos tratados com LPS no período de 6 horas e seus respectivos controles foram anestesiados com injeções intraperitoneais de xilazina 2% (ANASEDAN – Sespo) na concentração de 5 -16 mg/kg, cloridrato de ketamina 1% (DOPALEN – Sespo) na concentração de 100-200 mg/kg diluído em solução fisiológica estéril 0,15 M na proporção 1:1:3 e perfundidos com salina 0,15 M via ventrículo esquerdo. Os cornos uterinos foram removidos e as áreas do agregado linfóide da

região mesometrial (MLAp) dos sítios embrionários foram dissecados. Os fragmentos dissecados foram homogenizados mecanicamente (Glass-Col, USA) em tubo de vidro com pistilo de teflon em banho de gelo, na proporção de 30 g de tecido/100 mL da solução de extração constituída de trizma base 10 mM pH 7,4; EDTA 10 mM; Pirofosfato de sódio 10 mM, Fluoreto de sódio 100 mM; Ortofonadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM, Aprotinina 0,1 mg/ml; igeal 1%. A seguir, as amostras foram centrifugadas (3000g) por 10 minutos a 4° C. Foi realizada a dosagem das proteínas totais dos sobrenadantes dos homogeneizados pelo método de Bradford (1976) e após aliquotados foram congelados à -75° C, até o momento do uso.

3.5- Citoquímica de lectina DBA (*Dolichos biflorus*)

Cortes histológicos de 5µm de espessura de úteros com sítios de desenvolvimento embrionários normais, lesionados mecanicamente e submetidos ao tratamento com LPS, foram submetidos à técnica citoquímica com a lectina *Dolichos biflorus* bioitinas (DBA, Sigma Chemical - Co, St. Louis, USA) de acordo com os procedimentos descritos por Paffaro-Jr e colaboradores (2003). Os cortes histológicos desparafinizados e hidratados foram tratados com peróxido de hidrogênio 0,3%, seguido de bloqueio com albumina bovina sérica (BSA tipo V, Sigma, St Louis, USA) a 1% em PBS 50 mM e incubados com a lectina DBA biotinada diluída 1:300 em PBS 100 mM, pH 6,8 durante 12 horas a 4° C. Após a lavagem em PBS 50mM, foram incubados com complexo Avidina-Biotina conjugado com peroxidase (Vectastain Elite, Vector, USA) e em seguida reveladas com diaminobenzidina (DAB – Sigma, St. Louis, USA) 0,5 mg/mL em tampão tris-HCl salina (TBS) 50 mM pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 0,03%. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e após montagem permanente em bálsamo sintético (Entellan, Merck, Br) foram observados e documentados no microscópio Eclipse 800 (Nikon, Japão), acoplado com sistema de captura de imagem (CoolSnap, USA) e tratamento de imagem digital (ImageProPlus, USA).

3.6- Imunocitoquímica

Os cortes histológicos de úteros com sítios de desenvolvimento embrionários normais, lesionados mecanicamente e submetidos ao tratamento com LPS foram desparafinizados, hidratados e equilibrados em PBS 50 mM. Os cortes foram submetidos ao tratamento de recuperação antigênica sob irradiação de microondas (Panasonic do Brasil,

LTDA modelo NN 7809-BH) de 3 ciclos de 3 minutos cada em potência de 800MHz em tampão citrato 100 mM pH 6,0 somente para os anticorpos anti-eNOS e anti-nNOS. Em seguida, foram submetidos ao tratamento com peróxido de hidrogênio 0,3% em PBS durante 30 minutos e bloqueio com solução de BSA 1% (BSA tipo V, Sigma, USA) em PBS 50 mM pH 7,4 durante 1 hora. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários monoclonal de camundongo anti-iNOS (N9657, Sigma Chemical Co, St. Louis, USA), diluição 1:200; - policlonal de coelho anti-nNOS (Santa Cruz Biotechnology), diluição 1:100; - policlonal de coelho anti-eNOS (BioVision, Cedarlane) diluição 1:100 e; policlonal de coelho anti-IFN- α (PBL Biomedical), diluição 1:50 em PBS/BSA durante 12 horas à 4° C. Após lavagem em PBS 50 mM pH 7,4, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase. Para eNOS, nNOS e IFN- α foi utilizado o anticorpo policlonal de cabra anti-coelho (Chemicon, USA) e anti-camundongo de coelho (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) para iNOS diluídos em PBS-BSA. Após incubação durante 1 hora à temperatura ambiente a peroxidase foi revelada com diaminobenzidina (DAB - Sigma St Louis, USA) 0,5% em TBS 50 mM pH 7,2 e peróxido de hidrogênio 0,03%. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e após montagem permante em bálsamo sintético (Entellan, Merck, Br) foram observados no microscópio Eclipse 800 (Nikon, Japão) e documentados com sistema de captura de imagem (CoolSnap, USA) e programa de análise de imagem digital (ImageProPlus, USA)).

3.7- SDS-PAGE e WESTERN BLOT

3.7.1- SDS-PAGE

Foi realizada eletroforese das amostras do homogeneizado tecidual obtido conforme descrito no item 3.4.2. As amostras de homogeneizados foram misturadas na proporção 1:1 com tampão de amostra para eletroforese e levadas ao banho-maria fervente por 3 minutos. Aliquotas de 30 μ g de proteínas de cada uma das amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida-SDS de 7,5 e 15% preparados segundo Laemmli (1970) em mini-placa vertical (8,5 x 7,3 cm) do sistema Mini Protean III (Bio Rad). A corrida eletroforética foi realizada utilizando o padrão de peso molecular com proteínas pré-coradas (Prestained SDS-PAGE Standards High Range, Bio Rad) e empregando uma fonte de corrente contínua (Power pac 300- Bio Rad), ajustada com amperagem constante em 25mA por 25 minutos e 35mA por 1 hora e 30 minutos.

3.7.2- "WESTERN BLOT"

A transferência para membrana de PVDF (Immobilon-P-Transfer Membrane, Millipore Corporation, USA) e nitrocelulose dos géis de SDS-PAGE foi realizada em cuba de transferência (Bio Rad) com a corrente ajustada para 220mA/cm² durante 2 horas em tampão Tris/Glicina/Metanol. Os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue R 250 (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) a 0,25% para conferir padrão de separação eletroforética.

Após a transferência, as membranas foram lavadas com solução composta de TBS 50 mM acrescido de 5mL de Tween 20, seguido do tratamento com esta mesma solução (TBS-T) acrescida de 5% de leite desnatado (Molico - Nestle) durante 12 horas à 4° C, sob agitação constante em agitador orbital (Shaker - Termoline). Em seguida, foram incubados com os anticorpos primários anti-IFN- α policlonal (PBL Biomedical), ou anti-eNOS policlonal (Santa Cruz Biotechnology), ou anti-nNOS policlonal (Transduction Lab., EUA), ou anti-iNOS monoclonal (Sigma Chemical CO, St Louis, Corporation, USA) durante 12 horas (*overnight*) à 4° C, nas diluições de 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:1000, respectivamente em TBS-T. As membranas foram lavadas e em seguida incubadas com os anticorpos secundário conjugado com peroxidase de afinidade específica correspondente ao anticorpo primário. Para eNOS, nNOS e IFN- α foi utilizado o anticorpo anti-coelho de cabra conjugado e, anti-camundongo de coelho para iNOS, diluídos a 1:1000 por 1 hora sob agitação constante. A peroxidase foi revelada com diaminobenzidona (DAB – Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) a 0,5% diluída em Tris HCL 50mM pH 7,4 e 0,03% de peróxido de hidrogênio ou, alternativamente pelo método de quimioluminescência utilizando-se o Kit Luminol (SuperSignal WestPico – Chemiluminescent Substrate – Pierce). O controle negativo foi realizado omitindo-se a incubação com o anticorpo primário.

As membranas foram escaneadas e os valores densitométricos da luminiscência foram determinadas em densidade de pixel usando o programa Um-SCAN-IT versão 5.1 (Silk Scientific Corp., Orem, UT), onde os resultados foram avaliados usando análise de variância (ANOVA), com valor de significância de $P < 0,05$.

4- RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1-Análise macroscópica

Analizando macroscopicamente os cornos uterinos no 8º e 10º dg, submetidos à lesão mecânica dos embriões, identificaram-se áreas hiperêmicas na região mesometrial a partir de 1 hora pós-lesão que se acentuavam evoluindo para hemorragias localizadas nestas regiões no período de 2 e 6 horas. Os sítios do corno contra-lateral (não manipulados), assim como, os sítios embrionários vicinais daqueles manipulados para provocar a lesão mecânica, também apresentaram áreas hiperêmicas desde o período de 1 hora evoluindo em alguns casos para um quadro hemorrágico no período de 6 horas. Também foram observadas áreas com sinais de extravasamento sanguíneo nos locais de constrição lateral dos sítios, sendo este correspondente aos segmentos de inter-implantação do útero. Não foram observadas hemorragias nos locais correspondentes ao da introdução da agulha na região anti-mesometrial de qualquer animal deste grupo experimental.

Os animais tratados com LPS no período de 6 horas pós-inoculação, apresentaram piloereção, tremores, espasmos e postura rebaixada. Foram observadas áreas hiperêmicas na região mesometrial de parte dos sítios embrionários, porém não foram encontradas hemorragias.

4.2- Análise microscópica através da citoquímica de Lectina DBA

4.2.1- Sítios de implantação embrionária na gestação normal

Os sítios de desenvolvimento embrionário no útero de camundongo tanto do 8º quanto do 10º dg observados em corte transversal eram divididos em duas metades, a anti-mesometrial e a mesometrial. A região anti-mesometrial era facilmente identificada pela presença do embrião envolvido pelo endométrio decidualizado. Na região mesometrial verificou-se a presença de grande quantidade de células uNK lectina DBA positivas em meio ao estroma endometrial decidualizado nas áreas próximas ao embrião e em meio ao estroma não decidualizado nas áreas próximas ao miométrio (Fig. 3). Esta organização histológica e distribuição das células uNK lectina DBA positivas eram comuns tanto nos animais controles de gestação normal quanto nos animais dos diferentes grupos experimentais submetidos à lesão mecânica do embrião e ao tratamento pelo LPS.

As populações de células uNK lectina DBA positivas presentes no útero de camundongos gestantes no 8º dg encontravam-se localizadas apenas na região mesometrial ocupando tanto o estroma endometrial quanto infiltrado no miométrio e apresentaram padrões morfológicos semelhantes àqueles descritos por Paffaro e colaboradores (2003). Os subtipos 3 e 4 distribuíam-se predominantemente no endométrio decidualizado da região mesometrial próximo ao embrião. Já próximo ao miométrio, inclusive em meio a esta camada foi possível observar células uNK do subtipo 1 e 2. O embrião localizado na região antimesometrial estava delimitado pelas células trofoblásticas gigantes em íntimo contato com as células deciduais, e o cone ectoplacentário, localizado na região embrionária voltada para a região mesometrial era formado por um aglomerado de células trofoblásticas pequenas.

No 10º dg o embrião em crescimento ocupava uma grande área do endométrio da região anti-mesometrial, com nítida expansão das células trofoblásticas do cone ectoplacentário. No endométrio localizado em áreas mais próximas ao cone ectoplacentário predominavam as uNK dos subtipos 3 e 4 (Fig. 4). Próximo ao miométrio, no endométrio não decidualizado, predominava o subtipo 2 e algumas células do subtipo 1. Em meio ao miométrio foram identificados os subtipos 1 e algumas células do subtipo 2.

4.2.2- Animais submetidos à lesão mecânica do embrião

As evidências de que a lesão embrionária foi efetiva decorreram da observação do colapso da solução de continuidade da membrana amniótica com infiltração de células sanguíneas no espaço do saco vitelino, acompanhado da desorganização dos tecidos embrionários. Foram constatadas ainda áreas de extravasamento sanguíneo em meio ao estroma endometrial da região mesometrial. Pela reação com a lectina DBA foi possível identificar células uNK cuja morfologia era compatível com aquelas encontradas nos sítios de desenvolvimento gestacional normal, ao lado de outras que apresentavam alterações no padrão de reatividade a partir de 1 hora pós-lesão mecânica do embrião. Os padrões de alterações mais comuns encontrados nestes sítios de lesão embrionária mecânica foram agrupadas em 3 categorias:

- **Categoria I:** células uNK apresentando marcação descontínua na superfície celular pela lectina DBA e ausência de marcação no citoplasma ou nos grânulos (Fig. 5);

- **Categoria II:** células uNK apresentando marcação na superfície celular descontínua e conteúdo granular positivos (Fig. 6);

-**Categoria III:** células uNK apresentando reação positiva à lectina DBA na superfície celular e parcialmente reativa nos grânulos citoplasmáticos (Fig. 7).

No 8º dg, foi identificado na região mesometrial dos sítios de desenvolvimento embrionário lesados, as células uNK apresentando alterações na marcação tanto em sua superfície celular quanto no conteúdo citoplasmático. Nos períodos iniciais de 1 e 2 horas pós-lesão mecânica observaram-se alterações das categorias I, II e III sendo a maior proporção de células com alteração do tipo I presentes no endométrio mais próximo ao cone ectoplacentário. Analisando o período de 6 horas pós-lesão mecânica foram encontradas nas áreas do endométrio próximo ao miométrio, células com alterações tipo II ao lado de células que apresentavam alterações do tipo III. No endométrio próximo ao cone ectoplacentário, a alteração que predominava era da categoria III. Embora fosse evidente a ruptura do embrião, não foram constatadas alterações nas células trofoblásticas gigantes que envolviam o embrião ou mesmo naquelas junto ao cone ectoplacentário. As células do estroma endometrial decidualizado da região antimesometrial não apresentaram alterações em relação àquelas encontradas nos animais controle.

Nos animais do 10º dg, ao lado de células uNK do subtipo 3 normais, a grande maioria das células uNK encontradas nos períodos de 1 e 2 horas pós-lesão mecânica apresentaram alterações das categorias I e III, sendo a maior proporção de células com alteração do tipo I. No período de 6 horas pós-lesão mecânica foi observada predominantemente as alterações da categoria III, onde as células apresentavam grânulos grandes, com um halo periférico claro que os delimitavam do restante do citoplasma. As células uNK encontradas próximas às células trofoblásticas gigantes apresentaram superfície celular positiva e grânulos citoplasmáticos parcialmente reativos, ao lado de, algumas células uNK que apresentaram sinais de degeneração com fragmentação citoplasmática e núcleo com áreas acentuadas de condensação cromatínica. No estroma endometrial da região mesometrial foram encontradas áreas de extravasamento sanguíneo no período de 2 horas pós-lesão mecânica que se acentuava em 6 horas pós-lesão. Junto do embrião foram constatadas infiltrações de hemácias, confirmando a ruptura do saco vitelino provocado pelos procedimentos adotados para a lesão mecânica do embrião. Não foram observadas nenhuma célula uNK na região antimesometrial.

4.2.3-Animais submetidos à inoculação com LPS

Nos animais do 8º dg com 6 horas após a inoculação de LPS, não houve sinais do comprometimento ou de reabsorção embrionária. Pela citoquímica de lectina DBA constataram-se células uNK com alterações no padrão de marcação das categorias I, II e III à semelhança daquelas descritas nos sítios submetidos à lesão embrionária mecânica ao lado de células com morfologia compatível aos subtipos 1, 2 e 3 normais.

No 10º dg, após 6 horas da inoculação foram igualmente constatadas alterações nas células uNK das categorias I e III, sendo verificadas raras células do subtipo 1 e 2 normais. Os animais controles do 8º e 10º que foram submetidos à inoculação da solução salina apresentaram o mesmo padrão de reatividade para a lectina DBA encontrada nos animais com gestação normal.

4.3- Imunocitoquímica

4.3.1- Óxido nítrico sintase induzida (iNOS)

Nos sítios de desenvolvimento embrionário de 8º e 10º dg dos animais controles foram observadas reações positivas intensas para iNOS no citoplasma das células uNK dos subtipos 3 e 4 constantemente (Fig. 8), no citoplasma das células trofoblásticas gigantes localizadas na região ab-embrionária e nas células decíduais da região antimesometrial (tabela 1). Tanto os animais submetidos à lesão mecânica do embrião no 8º dg como no 10º dg nos períodos analisados, apresentaram padrão de marcação para anti-iNOS semelhante ao da gestação normal para as células trofoblásticas gigantes e nas células decíduais da região anti-mesometrial (tabela 1). Nas células uNK, foram observadas alterações quanto ao padrão de marcação para iNOS no período de 1 hora pós-lesão mecânica, sendo observada expressão reduzida no citoplasma de algumas células uNK, principalmente dos subtipos 3 e 4. No período de 2 horas pós-lesão mecânica foi observada a ausência de marcação para as uNK presentes em áreas próximas ao embrião, o mesmo ocorrendo com os subtipos 1 e 2 encontrados no endométrio não decidualizado próximo ao miométrio ou no próprio miométrio (Fig. 9). No período de 6 horas pós-lesão mecânica houve marcação positiva em parte das células uNK pertencentes ao subtipo 2, 3 e 4 (Fig. 10).

Os animais que foram submetidos à inoculação com LPS no 8º e 10º dg apresentaram marcação para iNOS difusa no citoplasma em algumas células uNK (Fig. 11).

As demais células da interface materno-fetal apresentaram marcações semelhantes ao da gestação normal.

As células trofoblásticas gigantes pertencentes ao cone ectoplacentário não foi observada marcação para iNOS, enquanto as células trofoblásticas gigantes próximas ao embrião apresentaram marcação para iNOS constante durante a gestação normal (Fig. 12). Independente do período experimental analisado, as células trofoblásticas gigantes apresentaram marcação constante (Fig. 13). As células decíduais e miométriais da região antimesometrial apresentaram reatividade fraca no seu citoplasma.

Cortes histológicos de baço utilizados como controle positivo da reação para iNOS apresentaram marcações difusas no citoplasma dos macrófagos e células dendríticas (Fig.14).

4.3.2- Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS)

Nos sítios de desenvolvimento embrionário de 8º e 10º dg dos animais controles foram observadas reações positivas intensas para eNOS no citoplasma próximo à periferia celular das células uNK de todos os subtipos (Fig. 15) Em 1 hora pós-lesão mecânica a marcação observada foi intensa no citoplasma das células uNK do subtipo 3 (Fig. 16) que se mantinham após 6 horas de lesão mecânica (Fig 17). Os padrões de marcações nos animais lesionados foram semelhantes aos da gestação normal (tabela 1) para as células trofoblásticas gigantes, células decíduais e do miométrio que estavam intensamente marcadas (Figs. 18 e 19).

O controle positivo realizado no rim apresentou marcação intensa no citoplasma das células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais e distais (Fig. 20).

4.3.3- Óxido nítrico sintase neuronal (nNOS)

Nos sítios de desenvolvimento embrionário de 8º e 10º dg dos animais controles foram observadas reações positivas intensas para nNOS (tabela 1) no citoplasma das células uNK de todos os estágios de maturação (Fig. 21). Nos sítios lesionados mecanicamente as marcações positivas após 1 hora estavam restritas ao citoplasma de parte das células uNK dos subtipos 3 e 4 (Fig. 22). Em 2 horas pós-lesão mecânica, observou-se redução na marcação nas células uNK pertencentes ao subtipo 3 (Fig. 23) e no

período de 6 pós-lesão verificou-se marcação intensa nas células uNK principalmente do subtipo 3 (Fig. 24).

As marcações nas células trofoblásticas gigantes (Fig 25), nas células decíduais e nas células miometriais foram constantemente positivas tanto nos animais de gestação normal quanto nos submetidos à lesão mecânica do embrião (tabela 1).

Não foram observadas a presença de células dendríticas no ambiente uterino em nenhum dos períodos analisados.

O controle positivo realizado em cortes do diencéfalo de camundongo mostrou marcação positiva nos neurônios e nos prolongamentos neuronais (Fig 26).

4.3.4- Interferon- α

Não foram constatadas reações positivas nas células uNK , nas células decíduais, nas células miometriais ou nas células trofoblásticas gigantes dos animais de gestação normal do 8º e 10º dg (Fig. 27), assim como, nos animais submetidos à lesão mecânica dos embriões (Fig 28).

Cortes histológicos de baço utilizados como controle positivo apresentaram marcações positiva para IFN- α nas células dendríticas e macrófagos (Figs. 29 e 30).

Tabela 1: Tabela comparativa entre a incidência de marcação para as isoformas da NOS nas células da interface materno-fetal dos animais com gestação normal no 8º e 10º dg e submetido à lesão mecânica do embrião e tratamento com LPS.

	CÉLULAS UNK				CÉLULA CTG				CÉLULA DECIDUAL				CÉLULA MIOMETRIAL			
	N	1h/2hs	6h	LPS	N	1/2h	6h	LPS	N	1h/2h	6h	LPS	N	1h/2h	6h	LPS
iNOS	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
eNOS	+	+	+	/	+	+	+	/	+	+	+	/	+	+	+	/
nNOS	+	-	+/-	/	+	+	+	/	+	+	+	/	+	+	+	/

Descrição dos períodos experimentais analisados: N- gestação normal; 1h/2hs – gestação com lesão mecânica do embrião durante 1 e 2 horas; 6hs – gestação com lesão mecânica do embrião durante 6 horas; LPS – inoculação com LPS durante 6 horas. Os animais tratados com LPS não foram avaliados os parâmetros de marcação para eNOS e nNOS – representados por /.

4.4- Western Blot das isoformas das NOS

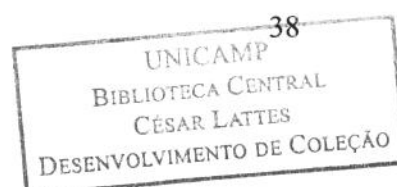
Os homogeneizados teciduais da região mesometrial do útero de camundongos gestante normais no 8º e 10º dg submetidos à reação imunoquímica pelo *Western blot* mostraram bandas reativas com peso molecular correspondente à 130, 140 e 160 kDa para iNOS, eNOS e nNOS, respectivamente (Figs. 31, 32 e 33).

Para iNOS, a banda de 130 kDa foi detectada em todos os grupos analisados, sendo que, nos animais submetidos à lesão mecânica do embrião a reação nas bandas para esta isoforma apresentaram, pela análise densitométrica, menor intensidade em 1 e 2 horas pós-lesão e recuperação próxima ao do controle após 6 horas. Os animais submetidos ao tratamento por LPS apresentaram intensidade semelhante aos dos animais de 6 horas pós-lesão mecânica (Fig 31).

Para eNOS, a análise densitométrica não apresentou variação significativa entre os grupos experimentais analisados quando comparado ao do grupo controle (Fig 32).

Para a nNOS, verificaram-se menor intensidade de reação nos grupos de 1 e 2 horas pós-lesão mecânica, enquanto nos animais de 6 horas pós-lesão mecânica apresentou aumento da intensidade de reação aproximando-se da intensidade dos animais controles (Figura 33).

5-DISSCUSSÃO



5- DISCUSSÃO

As relações de causas e efeitos que resultam na interrupção da gestação são ainda pouco compreendidos em grande parte, pela falta de modelos experimentais que possam ser adotados para estudos sistemáticos dos mecanismos envolvidos no complexo diálogo, estabelecido entre as células da interface materno-fetal no útero gestante.

A lesão do embrião induzida mecanicamente como modelo experimental para estudos de alterações do ambiente uterino gestante em camundongos foi adotada inicialmente por Roman (2001) e posteriormente por Copi (2006) que relataram alterações substanciais neste ambiente. Dentre as alterações descritas eram notórias a ocorrência de hiperemia que evoluía para hemorragia com o avanço do período pós-lesão e, alterações no padrão de reatividade das células uNK frente à citoquímica com a lectina DBA. Como a hiperemia e as alterações nas células uNK foram observadas em períodos inferiores a 1 hora pós-lesão, configurou-se um efeito agudo da lesão embrionária que se acentua no período mais adiantado da lesão, tendendo a um quadro hemorrágico localizado (Copi, 2006). O fato de não serem constatadas áreas de hemorragia na região anti-mesometrial onde era feita a lesão mecânica, Roman (2001) sugeriu que a hiperemia e hemorragia verificada na região mesometrial não seria decorrente do trauma mecânico da própria lesão, mas que poderia ser decorrente de uma resposta primária provocada pelo trauma do embrião, com o provável envolvimento das células uNK. Dois indícios corroboram com a alusão do envolvimento das células uNK neste fenômeno, quais sejam: - a localização destas células ocupando exclusivamente a região do agregado linfocitário do mesométrio na prenhez (MLAP) definido por Croy e colaboradores (2001) e, - as alterações morfológicas que sugerem a ativação do seu potencial citolítico através da degranulação do conteúdo dos grânulos lisosomo-secretores (Copi, 2006).

Os resultados do presente trabalho utilizando o modelo de lesão mecânica em embriões de camundongos no 8º e 10º dg, confirmam a ocorrência da hiperemia no intervalo de 1 hora pós-lesão que se acentua para hemorragia nos períodos posteriores.

Da mesma forma, alterações nos padrões de reatividade e morfologia das células uNK foram constatadas através da citoquímica com a lectina DBA à semelhança dos relatos de Copi (2006). As alterações mais evidentes estavam relacionadas com a perda de reatividade à lectina DBA na superfície celular caracterizando marcação descontínua em toda superfície e no conteúdo dos grânulos citolíticos. A ausência de marcação nos grânulos lisosomo-secretores confirmam que ocorreu a liberação do conteúdo destes pelas células

uNK em resposta à alteração da homeostasia do ambiente uterino gestante submetido à lesão embrionária mecânica.

A distribuição das células uNK alteradas nos sítios pós-lesão mecânica do embrião sugerem que a rápida mobilização das células uNK envolvem inicialmente os subtipos 3 e 4 que correspondem às formas mais diferenciadas das células uNK. Estas, respondam primeiro aos estímulos causados pela alteração da homeostasia do microambiente uterino gestante, pois seriam as células uNK que possuem a competência necessária para reconhecer e responder imediatamente ao estímulo liberando inclusive o conteúdo dos grânulos citolíticos. A lesão mecânica irreversível dos embriões constitui um estímulo contínuo e prolongado de anomalia neste ambiente e sugere-se que as células dos subtipos 1 e 2 sejam mobilizadas a se diferenciarem adquirindo gradual e rapidamente a competência para responder ao estímulo do ambiente uterino de uma gestação anômala.

A lesão do embrião não necessariamente decorrente de uma agressão mecânica parece ser o fator determinante para a ocorrência da hiperemia no mesométrio com alteração das células uNK, uma vez que, a inoculação do LPS também induziu a ocorrência da hiperemia com alterações morfológicas das células uNK. Neste experimento não se pode determinar a ação direta do LPS sobre as células uNK, contudo os resultados demonstram de forma inédita que estas células sofrem a influência das alterações do ambiente uterino induzido pelo LPS. De acordo com os relatos de Casado e colaboradores (1997), dentre os efeitos da administração intraperitoneal de LPS durante a gestação, verifica-se ocorrência de necrose placentária acompanhada por outras alterações intra-útero como morte fetal ou aborto com expulsão do feto. Segundo Ogando e colaboradores (2003), tratamento com LPS em camundongos gestantes não são fatais para as mesmas, mas resultam em 100% de morte e reabsorção embrionária com infiltrados de leucócitos e granulócitos na decídua.

Inúmeros são os fatores que podem contribuir para alteração da permeabilidade e integridade vascular levando a ocorrência da hiperemia com evolução para um quadro hemorrágico no ambiente uterino gestante, sendo o óxido nítrico (NO) um candidato em potencial. O NO pode ser formado a partir da catálise de enzimas de óxido nítrico sintases (NOS) presentes em diversas células do ambiente uterino gestante, tais como células endoteliais (Forstermann, et al, 1993), células uNK (Hunt, et al, 1997; Burnett e Hunt, 2000; Cifone, et al, 2001; Ogando, et al, 2003), macrófagos (Hunt, et al, 1997; Rothfichs, et al, 2001), células do epitélio uterino e estroma (Yoshiki, et al, 2000) e, também células trofoblásticas gigantes (Purcell, et al, 1999; Burnett e Hunt 2000; Kakui, et al, 2003; Gonçalves, et al, 2003). A ação de inibidores da enzima NOS revelou uma severa

hipertensão materna e restrição do crescimento do feto, confirmando que o NO atua de forma efetiva na vasculatura uterina (Burnett, et al, 2002).

Os resultados das reações imunocitoquímicas do presente trabalho realizadas no útero de gestação normal no 8º e 10º dg para as três isoformas das NOS detectaram marcações positivas para óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em todos os subtipos de células uNK, nas células decíduais da região anti-mesometrial e nas células trofoblásticas gigantes. O óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) foi constatado nas células decíduais, células uNK, células trofoblásticas gigantes e células miometriais. Para a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) a expressão desta, assim como, com nas demais isoformas ocorre no citoplasma das células uNK, células trofoblásticas gigantes, células decíduais, células miometriais e no epitélio das glândulas presentes no ambiente uterino. Estes resultados confirmam a presença de meios necessários para a produção de NO de forma constante em diversas populações celulares.

A produção de NO na interface materno-fetal, proveniente de diferentes isoformas da NOS presente em diferentes tipos celulares maternos e fetais sugerem um papel funcional do NO tanto nas fases iniciais da implantação embrionária, quanto nas fases mais adiantadas do processo de placentação e no parto (Lyall, et al, 1998; Gaglioti, et al, 2000; Kakui, et al, 2003), contribuindo para um ambiente favorável para o sucesso da gestação. A importância do NO na gestação pode ser evidenciada nos camundongos deficientes na codificação da iNOS que apresentaram deficiências na formação da decídua e no desenvolvimento da vascularização placentária, comprometendo a sobrevivência do embrião (Burnett, et al, 2002). Porém, Hunt e colaboradores (2000) observaram que não ocorre variação na quantidade de células uNK indicando que a migração ou proliferação deste tipo celular não é dependente da iNOS.

O NO por ser um potente vasodilatador, podem atuar nos vasos sanguíneos fetais e seria responsável por manter o fluxo basal e acentuar a atuação de vasoconstritores (Myatt, et al, 1997). Paralelamente, o NO pode estar relacionado, com a ação citotóxica mediada por várias populações celulares presentes no ambiente uterino, entre elas, as células uNK. Segundo Burnett e Hunt (2000) a expressão da molécula citolítica de perforina está reduzida em camundongos que não possuem iNOS, indicando que há uma correlação entre o conteúdo dos grânulos citolíticos e a produção de NO e, alterações nos níveis do NO tem sido relacionados com perdas gestacionais (Cifone, et al, 2001; Burnett, et al, 2002).

Cumprе salientar que na região mesometrial dos animais submetidos à lesão mecânica do embrião, onde ocorre a hiperemia e hemorragia, coincide com a área do

acúmulo das células uNK no útero gestante. Estas células, conforme observado em nossos resultados apresentam alterações morfológicas que sugerem a liberação dos conteúdos citolíticos dos grânulos lisosomo-secretórios após a lesão embrionária, sugerindo a participação destas células nas alterações vasculares verificadas nesta região. De fato, quando avaliado o período pós-lesão mecânica e considerando a reatividade nas células uNK observa-se que estas apresentaram marcação reduzida para iNOS na maioria destas células no intervalo de 1 hora pós-lesão e totalmente ausente no período de 2 horas pós-lesão mecânica. No entanto no período de 6 horas pós-lesão mecânica houve recuperação da marcação para a iNOS na maioria das células uNK, exceto para o subtipo 4. Padrão semelhante de imunomarcação foi constatada também para a isoforma nNOS. Embora nas demais células da interface materno-fetal não tenham sido constatadas alterações da reação imunocitoquímica para as isoformas iNOS e nNOS, verificaram-se reduções significativas na expressão destas enzimas também nos homogeneizados teciduais dos animais submetidos à lesão embrionária mecânica nos períodos de 1 e 2 horas avaliados pelo *Western-blot*, quando comparados com os animais de gestação normal. Estes resultados demonstram a elevada proporção relativa da iNOS e da nNOS produzidas pelas células uNK e consequentemente pode-se deduzir a importância dos níveis relativos de NO produzido pelas células uNK na manutenção da homeostasia do microambiente uterino durante a gestação.

Isto é, a lesão embrionária mecânica nos períodos analisados demonstra ter um efeito agudo na rede vascular da região mesometrial aumentando a sua permeabilidade, pode ser resultante de um rápido incremento nos níveis do NO produzido nesta área pelas células uNK em resposta ao estresse da lesão embrionária. É plausível supor que este processo seja decorrente da iNOS e nNOS presentes constitutivamente nas células uNK, sendo rapidamente mobilizadas e consumidas nesta via metabólica, o que pode explicar a redução dos seus níveis detectados nos períodos de 1 e 2 horas pós-lesão mecânica. No presente estudo não se pode determinar qual fator do ambiente uterino é capaz de induzir a expressão da iNOS de forma constitutiva nas células uNK ou nas demais células do útero de camundongos gestantes. Porém este mecanismo é atuante e capaz de induzir a recuperação da expressão destas enzimas, como foi constatado no período de 6 horas pós-lesão, tanto pela imunocitoquímica quanto pela reação imunoquímica pelo *Western-blot*.

O protocolo de inoculação do LPS adotado neste trabalho demonstrou o efeito esperado após 6 horas de inoculação nos animais, demonstrando uma forte reação positiva para iNOS nos macrófagos do baço utilizado como controle positivo, o que está de acordo

com os relatos de Lin, e colaboradores (2006). De acordo com Casado e colaboradores (1997) dentre os efeitos da administração intra-peritoneal de LPS durante a gestação, foram verificados ocorrências de necrose placentária acompanhadas por outras alterações intra-útero como morte fetal ou aborto com expulsão do feto. Nos animais observados neste estudo, após 6 horas da inoculação do LPS constataram-se ligeira hiperemia na região mesometrial, sem a ocorrência de hemorragias. Não foram avaliados parâmetros de morte embrionária, porém foram evidentes as alterações na reatividade das células uNK pela citotóxica de lectina DBA com destituição dos conteúdos dos grânulos lisosomo-secretores e redução na imunomarcação pela iNOS, à semelhança do que se verificava no útero de animais após 6 horas da lesão embrionária mecânica.

A isoforma iNOS está ativa apenas na forma dimérica e de acordo com Bogdan (2001) a sua ativação é condicionada a presença do estímulo, tais como, produtos bacterianos (LPS) e citocinas imunoestimulatórias. Baseado neste mecanismo, o LPS é amplamente adotado experimentalmente para estimular a expressão da iNOS em diversos órgãos e usualmente, o pico da expressão ocorre após 6 horas da inoculação nos animais. O LPS liga-se a receptores como o CD14 de macrófagos e células dendríticas, ativando o complexo $\text{I}\kappa\beta$, responsáveis pela fosforilação do complexo $\text{NF}\kappa\beta/\text{I}\kappa\beta$ que é então degradado e, o complexo $\text{NF}\kappa\beta$ é translocado ao núcleo ativando a expressão gênica da iNOS (Aktan, 2004). Concentrações elevadas de LPS podem apresentar efeito tóxico geral, levando a morte de vários tipos celulares (Gayle, et al, 2002).

Neste trabalho, não se pode determinar qual o mecanismo de ação do LPS que induz as alterações no útero gestante e que de acordo com Casado, e colaboradores, (1997) pode culminar na morte e reabsorção embrionária. Da mesma forma, não se pode comprovar se as células uNK são capazes de responder diretamente a este produto bacteriano com a ativação do seu mecanismo imunológico de resposta citotóxica, uma vez que, as células trofoblásticas gigantes e as células decíduais também expressam iNOS em todos os períodos de gestação analisados. O principal mecanismo de ação do LPS envolve a associação com o seu receptor LBP presente nas células dendríticas e macrófagos (CD14) que podem internalizar os receptores de LPS e TLR4 e, induzir a cascata de sinalização de $\text{NF}\kappa\beta$ nas células renais. Porém, um outro mecanismo de ação do LPS não envolve a internalização ou envolvimento destes receptores, sendo internalizado por algumas células e induzindo diretamente a cascata de sinalização de $\text{NF}\kappa\beta$, como o que ocorre no intestino (Choudhury, et al, 2006). De acordo com estes mecanismos é possível que as células uNK e outras células da interface materno-fetal do útero gestante de camundongos, mesmo não

apresentando receptores de membrana para o LPS possam desencadear a cascata de sinalização intracelular do $\text{NF}\kappa\beta$.

Por outro lado, como o LPS atua sistemicamente é provável que inúmeras citocinas, principalmente inflamatórias, sejam produzidas em resposta ao quadro endotoxêmico estabelecido e desencadeie os efeitos neurotóxicos que determinam as ocorrências de espasmos, piloereção, tremores e postura rebaixada. O efeito tóxico do NO é atribuído às reações com radicais superóxido para formar peroxinitrito, que desencadeia a perda de processos importantes para a vitalidade celular incluindo, proteínas não específicas, peroxidação lipídica, prejuízo do DNA e inibição da cadeia respiratória mitocondrial (Gayle, et al, 2002).

Experimentalmente, as células dendríticas sob ação de lipopolissacarídeos (LPS) podem intermediar a indução de aborto em camundongos através do desencadeamento da cascata $\text{NF}\kappa\beta$ (Munn, et al, 2002). Porém, cumpre destacar as diferenças entre os perfis de expressão da isoforma iNOS no ambiente uterino após a lesão mecânica do embrião e sob o efeito do LPS. Enquanto as células uNK apresentam queda nos primeiros momentos após a lesão mecânica e posteriormente apresentam tendência de recuperação na sua expressão, as outras células como as células trofoblásticas gigantes, as células decíduais e as células miometriais não apresentaram estas variações, o que sugere mecanismos distintos de controle e ativação desta enzima, em relação as células uNK.

A expressão da iNOS nas células trofoblásticas gigantes de gestação normal e a manutenção desta nos animais com embriões lesionados mecanicamente, configuram a produção contínua do NO nestas células, que pode estar relacionada a atividade fagocitária desta população celular (Purcell, et al, 1999; Gaglioti, et al, 2000; Park, et al, 2000; Amarante-Paffaro, et al, 2004). Funcionalmente, as células trofoblásticas gigantes apresentam uma alta capacidade fagocitária durante a primeira metade da gestação e poderiam desta forma, utilizar o recurso da produção de NO para alterar o destino das células-alvo a serem fagocitadas durante o processo de implantação (Gaglioti, et al, 2000), ou em condições específicas onde esta produção de NO pode estar associada à defesa contra patógenos presentes na interface materno-fetal (Amarante-Paffaro, et al, 2004). Por outro lado, não podemos excluir que o NO produzido pelas células trofoblásticas esta relacionado também, ao controle destas células sobre a manutenção do suprimento sanguíneo placentário adequado para sobrevivência do próprio embrião.

A expressão da isoforma iNOS nas células decíduais de forma constante na gestação merece investigação específica considerando que esta população celular sofre

intensas modificações morfológicas e funcionais, sendo hormônio dependentes, promovendo o suporte ao desenvolvimento embrionário e controlando a placentação. Neste estroma endometrial estão presentes outras populações celulares do sistema imune, dentre as quais, podemos citar as células dendríticas que são apontadas como importante efetora da imunomodulação do ambiente uterino gestante (Dietl, et al, 2006).

Um dos potenciais mecanismos de sinalização para produção das isoformas das enzimas que formam o NO é o IFN- α que pode ser produzido pelas células dendríticas. No ambiente uterino a interação entre as células dendríticas e as células uNK via IFN- α podem estar relacionadas com a ativação destas últimas na produção do NO (Gardner & Moffet, 2003). O IFN- α é uma citocina pleiotrópica que possui atividade antiviral, imunomodulatória e supressora de tumores (El-Hashemite, et al, 2004). Este IFN- α é produzido em maior quantidade pela célula dendrítica plasmocitóide (pDC) e em menor quantidade pela célula dendrítica mielóide. O tratamento com esta citocina aumenta a secreção de citocinas do tipo Th1 (McKendricke & Radomski, 1998; Sladek, et al, 1998; Schiffman, et al, 2000; Yoshiki, et al, 2000; Burnett, et al, 2002; Hilkens, et al, 2003; Nakamura, et al, 2004; Ronco, et al, 2004; Tassiulas, et al, 2004). Esta citocina exerce efeito nas células pela interação com seus receptores (IFNAR1 e IFNAR2), os quais induzem a ativação de quinases do tipo Janus (JAK1 e JAK2), que associadas ao receptor levam a fosforilação de STAT1 na tirosina 701 e 727, aumentando a sua atividade transcricional. Embora muitos tipos celulares apresentem receptor para IFN- α e respondam a esta citocina desencadeando diferentes processos celulares ou síntese de produtos específicos, é a produção da isoforma iNOS associada à inibição de replicação viral, indução de apoptose, expressão de antígenos de histocompatibilidade e a mecanismos de defesa inata, que tem sido alvo de atenção de estudos nos últimos anos (Blanchette, et al, 2003; Myatt & Cui, 2004). De acordo com Gardner e colaboradores (2003), as células dendríticas podem ativar as células uNK na presença do trofoblasto e podem ser alteradas na presença de estresse da placenta por sinais derivados do trofoblasto, sendo que para isso o fator determinante é o estado de maturação da célula dendrítica e quantidade das células uNK no ambiente.

Contudo, de acordo com os resultados do presente trabalho não foi observado expressão significativa do IFN- α em gestação normal ou qualquer alteração no útero pós-lesão mecânica determinado pelas avaliações por imunocitoquímica. Nos animais tratados com o LPS, não ocorreu a mobilização esperada do IFN- α através da ativação das células dendríticas como via de maior expressão da iNOS nas células da interface materno-fetal.

Desta forma, os dados do presente trabalho indicam que este mecanismo envolvendo a intermediação das células dendríticas via produção do IFN- α aparentemente não é utilizado no ambiente uterino e nem seria mobilizado frente à lesão embrionária ou sob a ação do LPS.

Por outro lado, segundo Myatt & Cui (2004) o estresse oxidativo é um estado de desbalanço entre produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a habilidade da defesa pelos antioxidantes produzidos pelas próprias células do ambiente afetado. Este desbalanço pode ser devido à produção excessiva do radical livre peroxinitrito, gerado a partir da reação entre óxido nítrico e ânion superóxido. O peroxinitrito é responsável direto pela inibição da cadeia transportadora de elétrons, oxidação do grupo sulfidril de proteínas, início da peroxidação lipídica e nitração de aminoácidos aromáticos como a tirosina. Quando ocorre a nitração de resíduos de tirosina, o mecanismo pode ser inibitório, pois o peroxinitrito é capaz de inibir a atividade da xantina oxidase e iNOS, sendo este efeito exacerbado pelo estresse oxidativo, atuando como um *feed-back* negativo modulador para a iNOS. O peroxinitrito é capaz de difundir por um diâmetro muito maior do que o ânion superóxido, atacando a membrana lipídica e/ou grupo sulfidril de proteínas alterando assim a função celular da população de célula alvo (Myatt, et al, 1996). A regulação da iNOS é complexa envolvendo não somente a interação do aminoácido L-arginina com a enzima e sim requerendo a presença de inúmeros co-fatores. Como o peroxinitrito pode nitrar inúmeros aminoácidos, o número de seqüências protéicas afetadas pode ser alterado incluindo as seqüências que envolvem a atividade da iNOS. O *feed-back* negativo que ocorre, por exemplo, em sítios inflamatórios gerando ânion superóxido atenua a atividade da iNOS *in vivo* (Aulak, et al, 2001) e pode ser um dos mecanismos de controle da atividade da iNOS no ambiente uterino gestante. Assim sendo, não podemos descartar a possibilidade do estresse da lesão embrionária mecânica afetar o balanço da via de produção de radicais livres como o peroxinitrito que por sua vez, seria capaz de inibir a atividade da iNOS ou suprimir a sua expressão, como o fenômeno encontrado nos períodos de 1 e 2 horas pós-lesão embrionária.

Quanto à expressão da nNOS no ambiente uterino, esta isoforma também foi encontrada de forma constitutiva nas células uNK, além das células decíduais e no miométrio, nos períodos gestacionais analisados. A presença da nNOS no útero gestante tem sido descrita por Momohara e colaboradores (2004) sendo atribuído um papel importante ao NO na contração do miométrio nos períodos próximo ao parto. No útero não gestante a nNOS é encontrada nas células estromais e a sua expressão avaliada pelo

Western blot não parece flutuar significativamente durante o período de implantação (Telfer, et al, 1995; Purcell, et al, 1999; Ogando, et al, 2003). Esta isoforma é encontrada constitutivamente no sistema nervoso central e em diversas outras células, e tem como característica ser cálcio-calmodulina dependente regulando além da transmissão sináptica no sistema nervoso central, pressão sanguínea, relaxamento do músculo liso e vasodilatação via nervos periféricos (Drazen, et al, 1999; Park, et al, 2000; Cerqueira e Yoshida, 2002).

Não há relatos anteriores sobre a expressão da isoforma nNOS nas células uNK, mas o fato desta isoforma também sofrer a influência da lesão embrionária mecânica em padrão semelhante ao da iNOS sugere uma co-participação desta enzima na produção do NO no ambiente uterino gestante. Se esta co-expressão e coincidência no perfil da resposta entre iNOS e nNOS frente à lesão embrionária mecânica envolve mecanismos de controle comuns nas células uNK e as razões que levam esta célula a expressar as duas isoformas passíveis de serem moduladas simultaneamente, são questões que devem ter as investigações aprofundadas no futuro.

Quando avaliada a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pela imunocitoquímica, observa-se marcação positiva no citoplasma das células decíduais, das células uNK, das células trofoblásticas gigantes e das células miometriais, porém em intensidade menor que as duas outras isoformas. Interessante observar que mesmo as células endoteliais da região mesometrial do útero gestante normal ou nas amostras do útero pós-lesão embrionária mecânica não apresentaram variações de marcação expressiva, o que está de acordo com os relatos anteriores que caracterizam esta isoforma como sendo constitutiva e independente de fatores de estresse ambiental (Purcell, et al, 1999; Chwalisz e Garfield, 2000; Schonfelder, et al, 2004). A quantificação desta isoforma (eNOS) encontrada por Purcell (1999) demonstrou que há um pico de expressão no 6º e 7º dg e, após o 8º dg ocorre um declínio de sua expressão. Sladek e colaboradores (1998) sugeriram que a expressão da eNOS pode estar relacionada com a dilatação das artérias durante os períodos iniciais da gestação, enquanto no período final da gestação a eNOS está presente na forma inativa. Nos resultados do presente estudo não foram observadas alterações de expressão da eNOS entre a gestação normal e quaisquer dos períodos de pós-lesão mecânica analisados, sendo esta a única isoforma que não sofreu alteração decorrente da lesão embrionária mecânica evidenciada tanto pela intensidade de marcação imunocitoquímica quanto pela semi-quantificação realizada no *Western-blot*.

Uma possível atuação do NO quando produzido pela isoforma eNOS seria a de regular a formação de novos capilares na angiogênese da placenta materna e fetal, auxiliando no aumento do fluxo sanguíneo para o embrião, além disso, desempenharia um papel na remodelação da matriz extra-celular para estabilizar a interface materno-fetal (Sladek, et al, 1998; Telfer, et al, 1997; Purcell, et al, 1999; Ogando, et al, 2003). Os relatos de Kakui e colaboradores (2004), demonstraram o aumento da expressão da isoforma eNOS no miométrio e na placenta nas mulheres que apresentaram preeclâmpsia, em relação às de gestação normal. Este fato sugere um mecanismo regulador para compensar o fluxo sanguíneo útero-placentário prejudicado pela produção de NO. Contudo, o efeito da lesão embrionária mecânica que afeta a expressão das isoformas iNOS e nNOS seria um mecanismo distinto que não envolve ou afeta diretamente a participação da eNOS, pelo menos no que se relaciona à alteração da permeabilidade e fluxo sanguíneo nos vasos da região mesometrial que resultaria na hiperemia e hemorragia.

A biossíntese do NO é regulada através de dois mecanismos sendo eles pós-transcricionais e pós-traducionais. Essa regulação é feita a partir de proteínas $\text{NF}\kappa\text{B}$ que estão presentes no citosol em estado inativo, pois está formando complexo com $\text{I}\kappa\text{B}$ - $\text{NF}\kappa\text{B}$. Este complexo é fosforilado por $\text{I}\kappa\text{B}$ quinase ativado pelo LPS e $\text{IFN-}\gamma/\text{TNF-}\alpha$, são translocados para o núcleo e induzem a expressão gênica da iNOS (Aktan, 2004). O mecanismo responsável por formar NO via eNOS ocorre também via proteína $\text{NF}\kappa\text{B}$ e de acordo com Grumbach e colaboradores (2005), o fator de transcrição nuclear $\text{NF}\kappa\text{B}$ é responsável por aumentar a transcrição da isoforma eNOS em resposta ao estresse no endotélio. Considerando a capacidade inibitória do NO sobre a ativação do fator $\text{NF}\kappa\text{B}$ através de *feedback* negativo na expressão da eNOS, nem mesmo este parece ser diretamente afetado na lesão embrionária mecânica no controle da expressão desta isoforma. Outra via pós-transcricional de ativação da iNOS é pela JAK-STAT, onde células expostas a $\text{IFN-}\gamma$ ativam JAK 1 e 2 que quando fosforiladas ativam a STAT1. A STAT então transloca para o núcleo e aumenta os níveis de IRF-1 que resultam em indução de expressão gênica da iNOS (Aktan, 2004).

A hipóxia do microambiente uterino gestante pode ser um dos fatores que induzem a geração do NO (Fantel, et al, 1998), o que explica a exigência da expressão constitutiva das três isoformas das enzimas NOS no ambiente uterino. De acordo com Horton (2003), os níveis basais de arginina diminuem nos casos como o de trauma por queimadura e comprometem a habilidade da eNOS em manter os níveis de NO, porém quando produzido

por iNOS são supra-regulados e pode exceder o nível basal de produção de radicais livres. Desta forma, no ambiente uterino, a isoforma iNOS e possivelmente também a nNOS presentes nas células uNK seriam rapidamente mobilizadas na produção do NO frente às alterações da homeostasia da interface materno-fetal decorrente do sofrimento embrionário, que resultaria no aumento localizado da permeabilidade vascular. Nestes mecanismos não pode ser descartada a bioatividade do NO limitada pela interação com o ânion superóxido que causa sua inativação, mas cuja atividade pode ser prolongada com a presença da enzima superóxido dismutase (SOD) que remove o ânion superóxido (Touyz, et al, 2004).

Constata-se, portanto que, os mecanismos que controlam a ativação e inibição destas enzimas e, os processos fisiológicos comuns da gestação envolvendo estas enzimas e seus produtos, permanecem por ser esclarecidos, uma vez que, a ausência do IFN- α que poderia intermediar via células dendríticas a ativação das células uNK na produção da iNOS, preconiza a existência de outras vias de regulação no útero gestante. Estas variações que ocorrem no ambiente uterino sugerem que as funções precisas que o NO exerce neste local também permanecem por ser mais bem compreendido.

O modelo da lesão mecânica do embrião e mesmo o tratamento com o LPS mostram uma dinâmica de resposta do ambiente uterino que envolve a participação das células uNK em mecanismos ainda pouco esclarecidos. Se de um lado a confirmação da expressão simultânea das três isoformas de NOS no útero gestante apontam para importância do NO como um elemento essencial na homeostasia da interface materno-fetal e no desenvolvimento pleno da gestação, por outro lado, a mobilização incomum da iNOS e nNOS apenas pelas células uNK em resposta às anomalias da gestação, constituem um importante parâmetro para diagnosticar um quadro agudo de sofrimento embrionário.

6- CONCLUSÕES

6-Conclusões

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

- 1- A lesão mecânica do embrião na região antimesometrial provoca a hiperemia e hemorragia na região mesometrial dos sítios de desenvolvimento embrionário, acompanhado de alterações na morfologia das células uNK presentes nesta região, notadamente pela perda do conteúdo dos grânulos lisosomo-secretóres.
- 2- O LPS induz alterações no útero gestante semelhante ao encontrado após lesão mecânica do embrião, sendo notório o envolvimento das células uNK.
- 3- As três isoformas das NOS estão presentes constitutivamente nos diversos tecidos uterinos da interface materno-fetal em camundongos prenhes, sendo que, as células uNK expressam simultaneamente as três isoformas.
- 4- O fato da variação de intensidade das isoformas iNOS e nNOS não ocorrerem em outras populações celulares da interface materno-fetal indica a importância das células uNK na produção do óxido nítrico na gestação e o desbalanço deste pode ser a causa da hiperemia e hemorragia encontrado nos sítios submetidos à lesão embrionária.
- 5- A constância na expressão da isoforma eNOS e, as variações encontradas para o iNOS e nNOS entre as populações celulares, em especial as células uNK, presentes no útero gestante normal em relação àqueles submetidos à lesão mecânica do embrião, indicam mecanismos distintos no controle da ativação e inibição na biogênese do NO.
- 6- Neste mecanismo de controle aparentemente não há a intermediação do IFN- α e, portanto, exclui uma das potenciais vias de intermediação envolvendo as células dendríticas no reconhecimento do estresse provocado pela lesão ou morte embrionária na ativação das células uNK para produção do NO.

7- DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

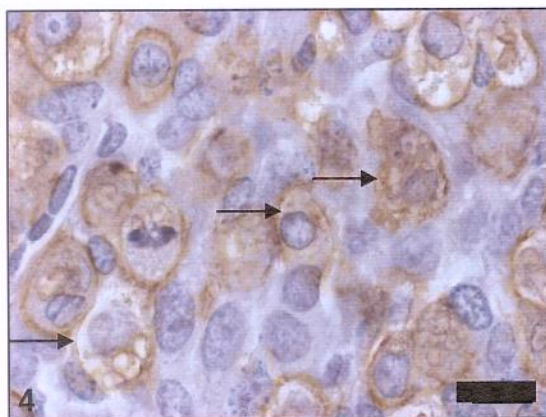
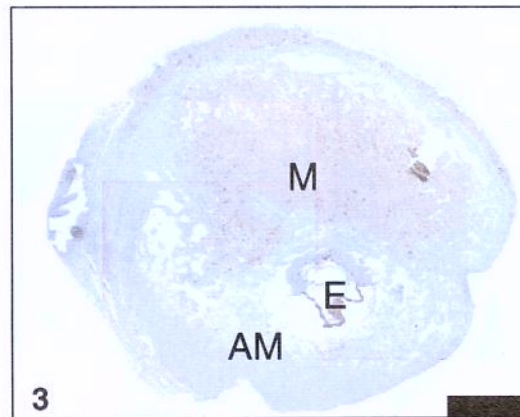
Figura 3: Fotomicrografia de um corte transversal do sítio de implantação embrionária normal no 10º dg. Notar a área acastanhada correspondente à distribuição de células uNK lectina DBA positivas na região mesometrial (M). Embrião (E) ocupando a região anti-mesometrial (AM). Barra = 70µm

Figura 4: Fotomicrografia de útero com 10º dg normal evidenciando detalhe das células uNK lectina DBA positivas (setas) do subtipo 3 em meio ao endométrio decidualizado. Notar a marcação positiva na superfície celular e nos grânulos citoplasmáticos. Barra = 10µm

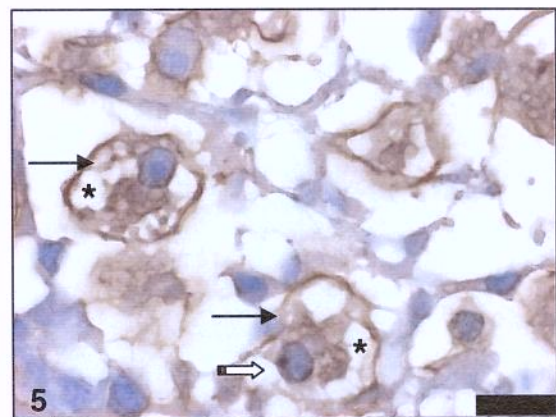
Figura 5: Fotomicrografia de útero com 10º dg evidenciando células uNK lectina DBA positivas (setas) pertencente a categoria I após lesão mecânica do embrião. Notar ausência de marcação no conteúdo granular (*) e marcação descontínua na superfície celular (seta branca). Barra = 10µm

Figura 6: Fotomicrografia de útero com 10º dg evidenciando células uNK lectina DBA positivas (setas) pertencente a categoria II após lesão mecânica do embrião. Notar marcação positiva nos grânulos citolíticos (*) e marcação descontínua na superfície celular (seta branca). Barra = 10µm

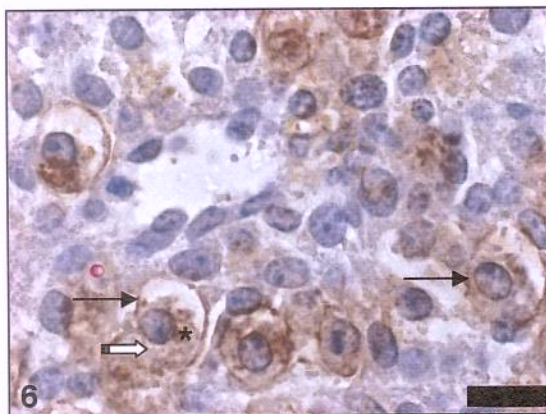
Figura 7: Fotomicrografia de útero com 10º dg evidenciando células uNK (setas) pertencentes a categoria III após lesão mecânica do embrião, apresentando marcação positiva na superfície celular (seta branca) e parcialmente reativa nos grânulos citolíticos (*). Barra = 10µm



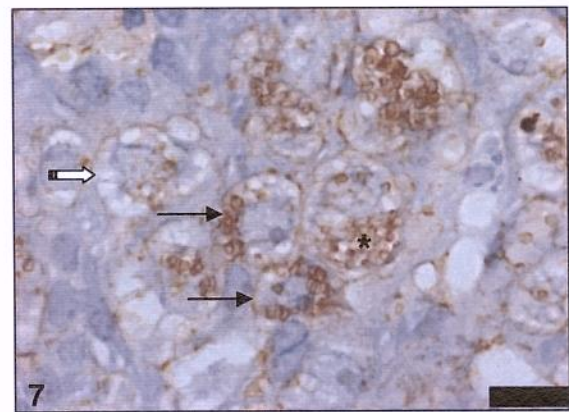
Células uNK normal



Células uNK alteradas –
Categoria I



Células uNK alteradas –
Categoria II



Células uNK alteradas –
Categoria III

Figura 8: Fotomicrografia de útero com 10^o dg normal evidenciando reação imunocitoquímica para iNOS no citoplasma das células uNK (setas). Barra 30µm.

Figura 9: Fotomicrografia de útero com 10^o dg evidenciando reação imunocitoquímica para iNOS nos animais após 2 horas da lesão mecânica do embrião. Notar marcações fracas (seta) ou ausentes (cabeça de seta) na grande maioria das células uNK e células sanguíneas estagnadas nos vasos sanguíneos (*) mesmo após a fixação por perfusão vascular. Barra = 30µm.

Figura 10: Fotomicrografia de útero com 10^o dg evidenciando reação imunocitoquímica para iNOS nos animais após 6 horas da lesão mecânica do embrião.. Notar a recuperação parcial com marcações fracas nas células uNK (seta) ou ausente (cabeça de seta). Barra = 30µm.

Figura11: Fotomicrografia de útero com 10^o dg evidenciando reação imunocitoquímica para iNOS nos animais após 6 horas de inoculação com LPS. Observar reações positivas irregulares no citoplasma das células uNK (seta) e sangue estagnado nos pequenos vasos (*). Barra = 30 µm.

Figura12: Fotomicrografia de útero com 10^o dg normal evidenciando reação imunocitoquímica para iNOS no citoplasma de uma célula trofoblástica gigante (seta branca) da região embrionária. Barra = 5 µm.

Figura13: Fotomicrografia de útero com 10^o dg evidenciando reação imunocitoquímica para iNOS no citoplasma de células trofoblásticas gigantes (seta branca) presente nos animais após 2 horas da lesão mecânica do embrião em íntimo contato com células decíduais (#). Barra = 5 µm.

Figura 14: Fotomicrografia de baço de camundongo com 10^o dg submetido à inoculação com LPS evidenciando reação imunocitoquímica para iNOS no citoplasma de macrófagos (seta branca). Barra 50µm.

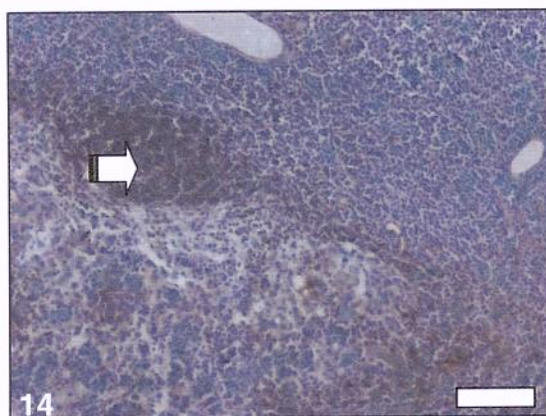
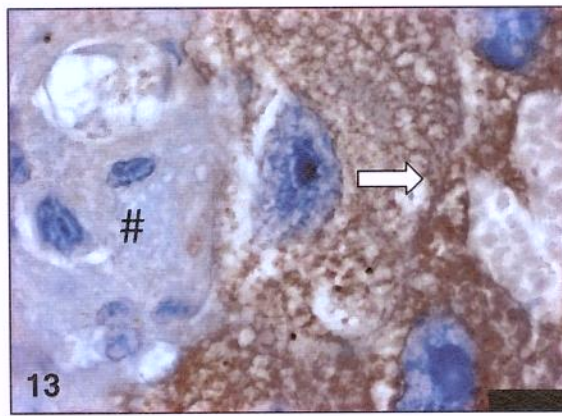
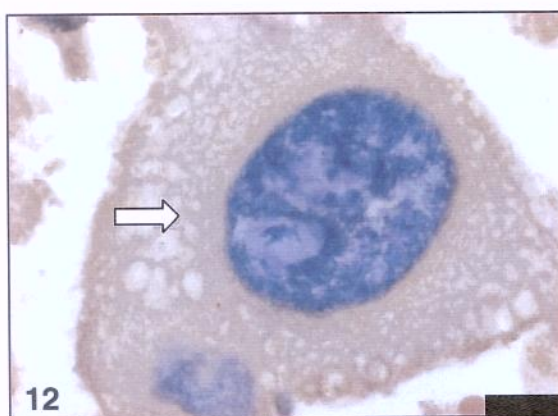
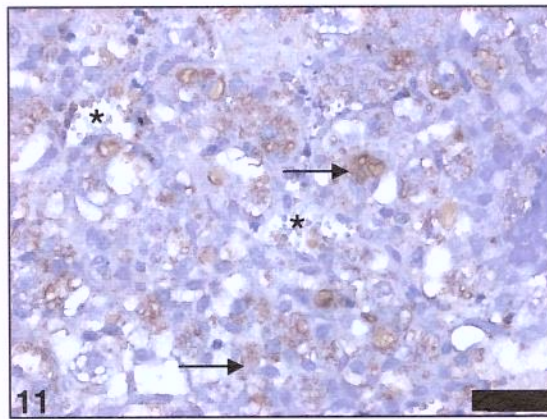
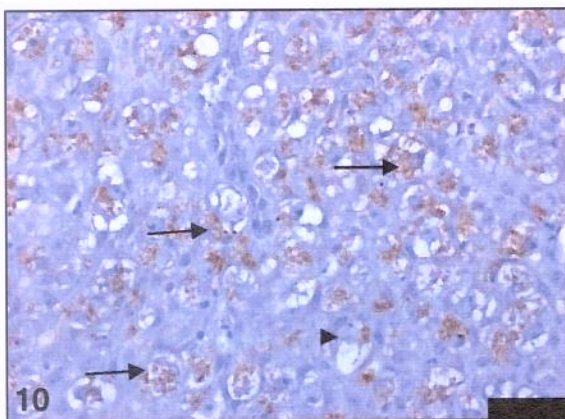
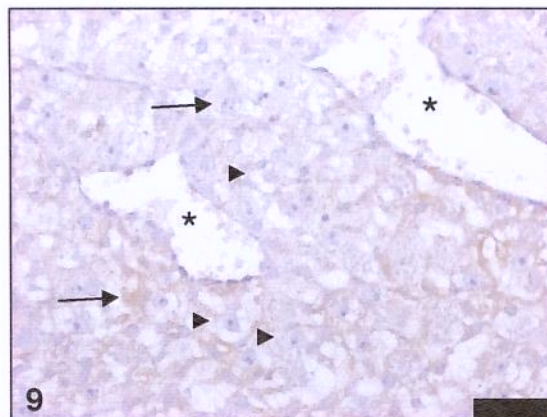
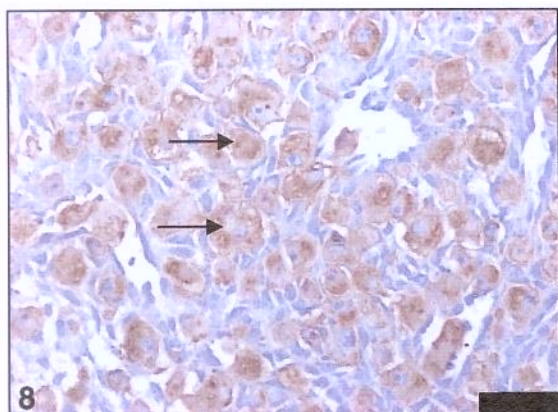


Figura 15: Fotomicrografia de útero com 10^o dg normal evidenciando reação imunocitoquímica para eNOS, evidenciando marcação citoplasmática nas células uNK (seta). Barra = 10 μ m.

Figura 16: Fotomicrografia de útero com 10^o dg evidenciando reação imunocitoquímica para eNOS nos animais após 1 hora de lesão mecânica do embrião apresentando marcação contínua no citoplasma das células uNK (seta). Barra= 5 μ m.

Figura 17: Fotomicrografia de útero com 10^o dg evidenciando reação imunocitoquímica para eNOS nos animais após 6 horas de lesão mecânica do embrião apresentando marcação contínua nas células uNK (seta). Barra: 10 μ m.

Figura 18: Fotomicrografia de útero com 10^o dg evidenciando reação imunocitoquímica para eNOS nos animais com gestação normal mostrando marcações positivas no citoplasma das células decíduais (*). Barra =10 μ m.

Figura 19: Fotomicrografia de útero com 10^o dg evidenciando reação imunocitoquímica para eNOS nos animais com gestação normal mostrando marcações positivas nas células musculares lisas do miométrio (seta). Barra =30 μ m.

Figura. 20: Fotomicrografia de útero com 10^o dg normal evidenciando reação imunocitoquímica para eNOS no citoplasma das células epiteliais dos túbulos renais. Barra = 50 μ m.

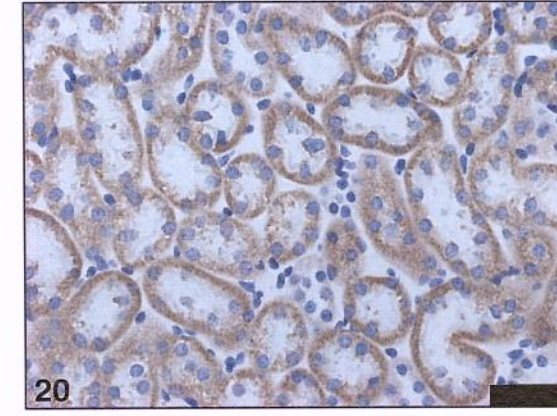
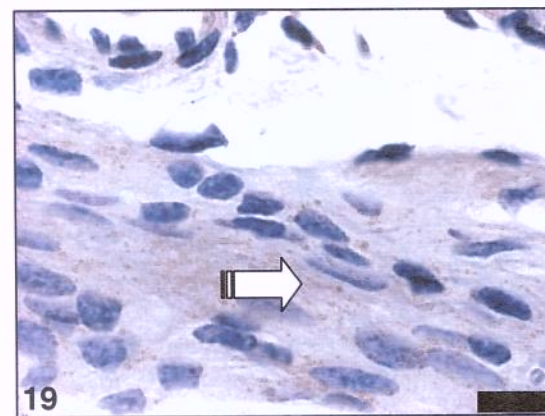
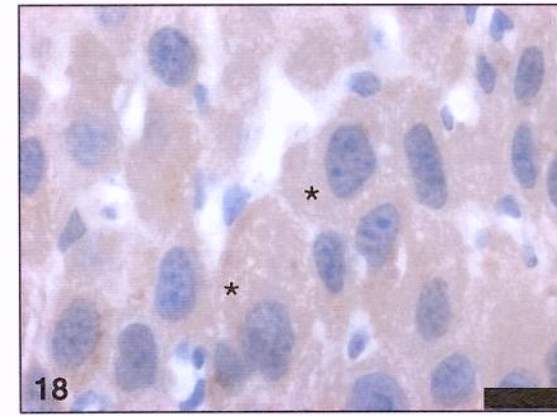
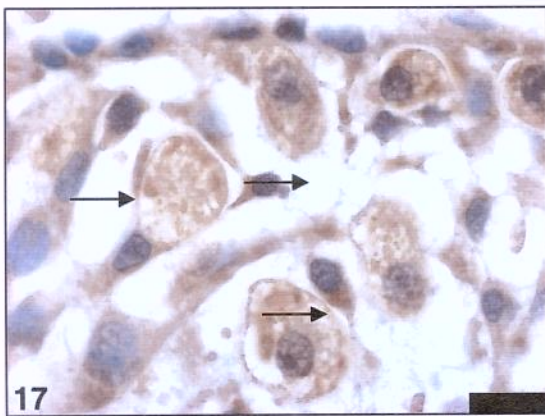
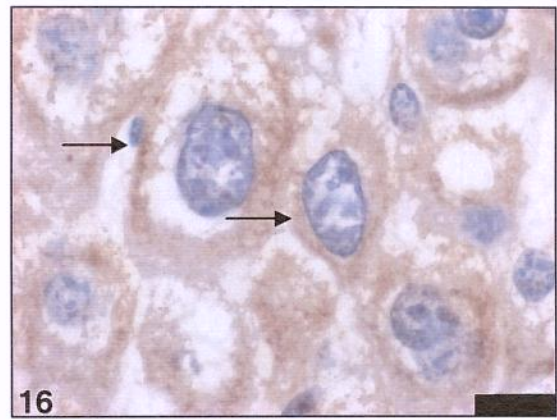
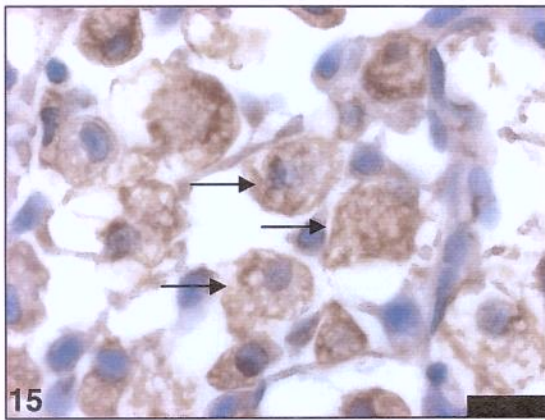


Figura 21: Fotomicrografia de útero com 10º dg normal evidenciando reação imunocitoquímica para nNOS, mostrando marcação positiva no citoplasma das células uNK (setas) e nas células do estroma endometrial (cabeça de seta). Barra = 10 µm.

Figura 22: Fotomicrografia de útero com 10º dg evidenciando reação imunocitoquímica para nNOS nos animais após 1 hora da lesão mecânica do embrião, mostrando marcação positiva porém fraca no citoplasma das células uNK (setas). Células do estroma endometrial (cabeça de setas). Barra = 10 µm.

Figura 23: Fotomicrografia de útero com 10º dg evidenciando reação imunocitoquímica para nNOS nos animais após 2 horas da lesão mecânica do embrião. Notar a marcação irregular e fraca no citoplasma das células uNK (setas) e mantida constante nas células do estroma (cabeça de setas). Barra= 10 µm.

Figura 24: Fotomicrografia de útero com 10º dg evidenciando reação imunocitoquímica para nNOS nos animais após 6 horas da lesão mecânica do embrião. Notar a marcação irregular e fraca no citoplasma das células uNK (setas) e mantida constante nas células do estroma (cabeça de setas). Barra= 30 µm.

Figura 25: Fotomicrografia de útero com 10º dg normal evidenciando reação imunocitoquímica para nNOS marcação intensa nas células trofoblásticas gigantes (CTG) em íntimo contato com as células decidualizadas (cabeça de setas). Barra: 10µm.

Figura 26: Fotomicrografia de útero com 10º dg normal evidenciando reação imunocitoquímica para nNOS mostrando em detalhe a marcação nos neurônios do sistema nervoso central. Barra= 10µm.

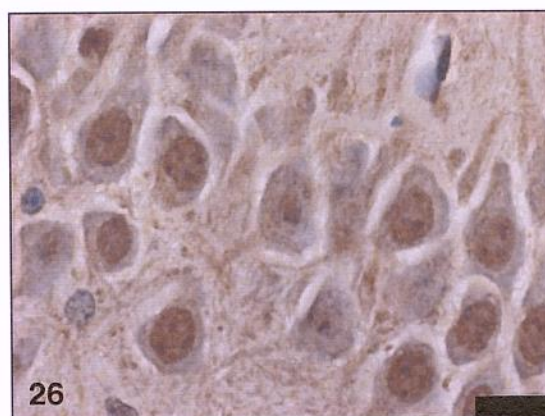
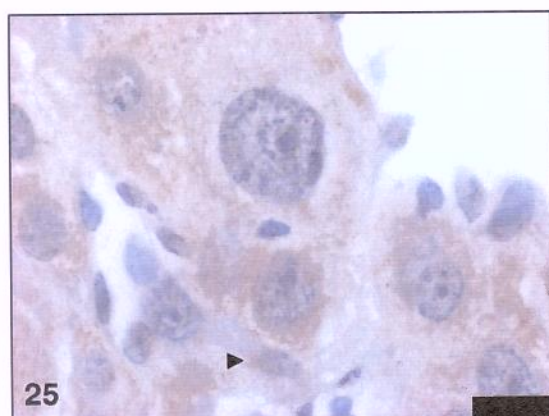
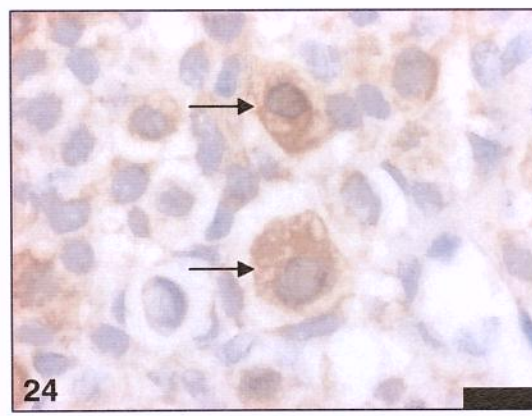
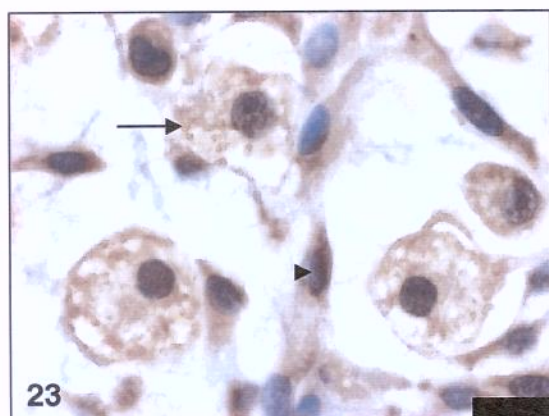
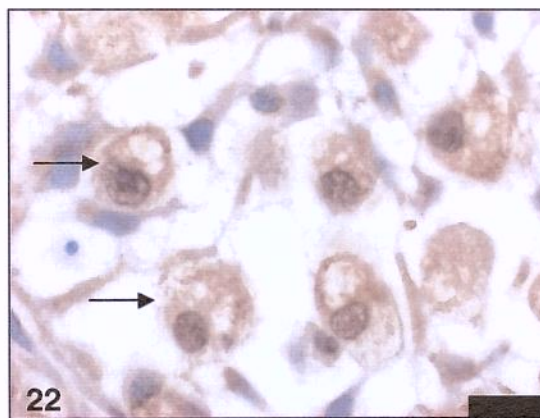
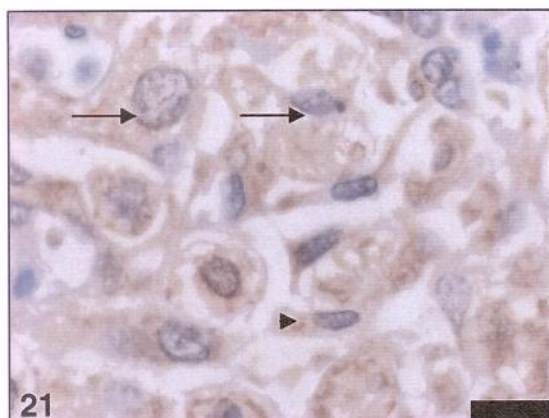
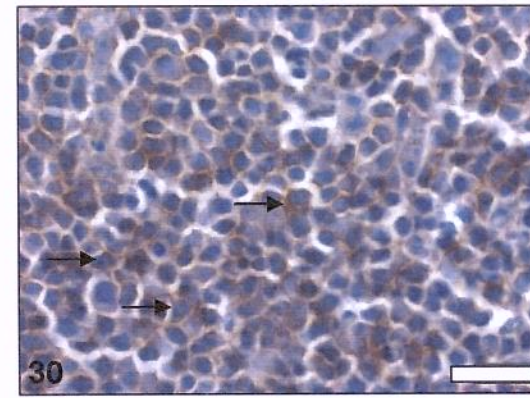
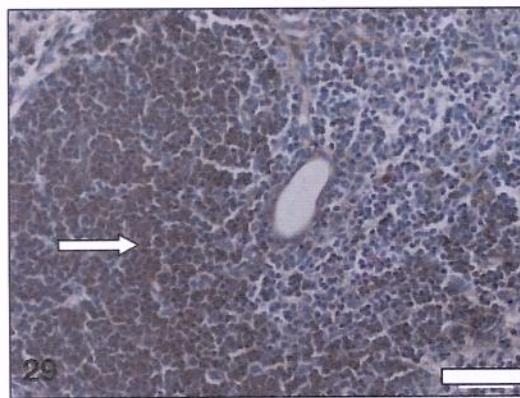
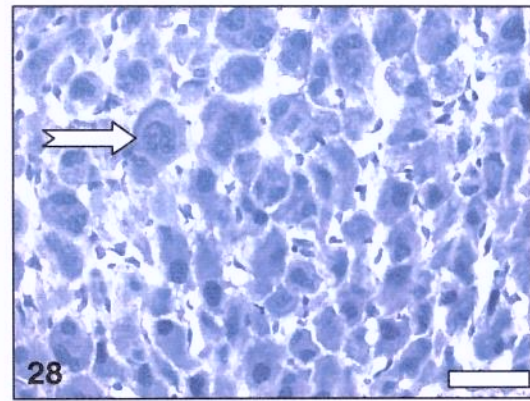
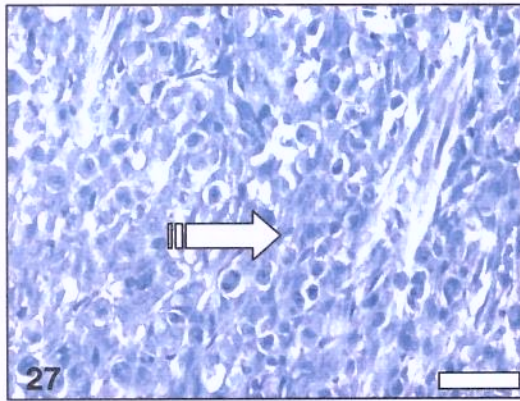


Figura 27: Reação imunocitoquímica para IFN- α no útero de animais no 8º dg normal. Notar a ausência de marcação nas células presentes na região mesometrial (seta branca). Barra = 50 μ m.

Figura 28: Reação imunocitoquímica para IFN- α no útero de animais no 8º dg após 2 horas da lesão mecânica do embrião, mostrando as células do estroma endometrial sem qualquer marcação positiva (seta branca). Barra = 50 μ m.

Figura 29 e 30: Imunohistoquímica para IFN- α no baço apresentando marcação positiva nas células reticulares e macrófagos (seta branca). Barra = 50 μ m.



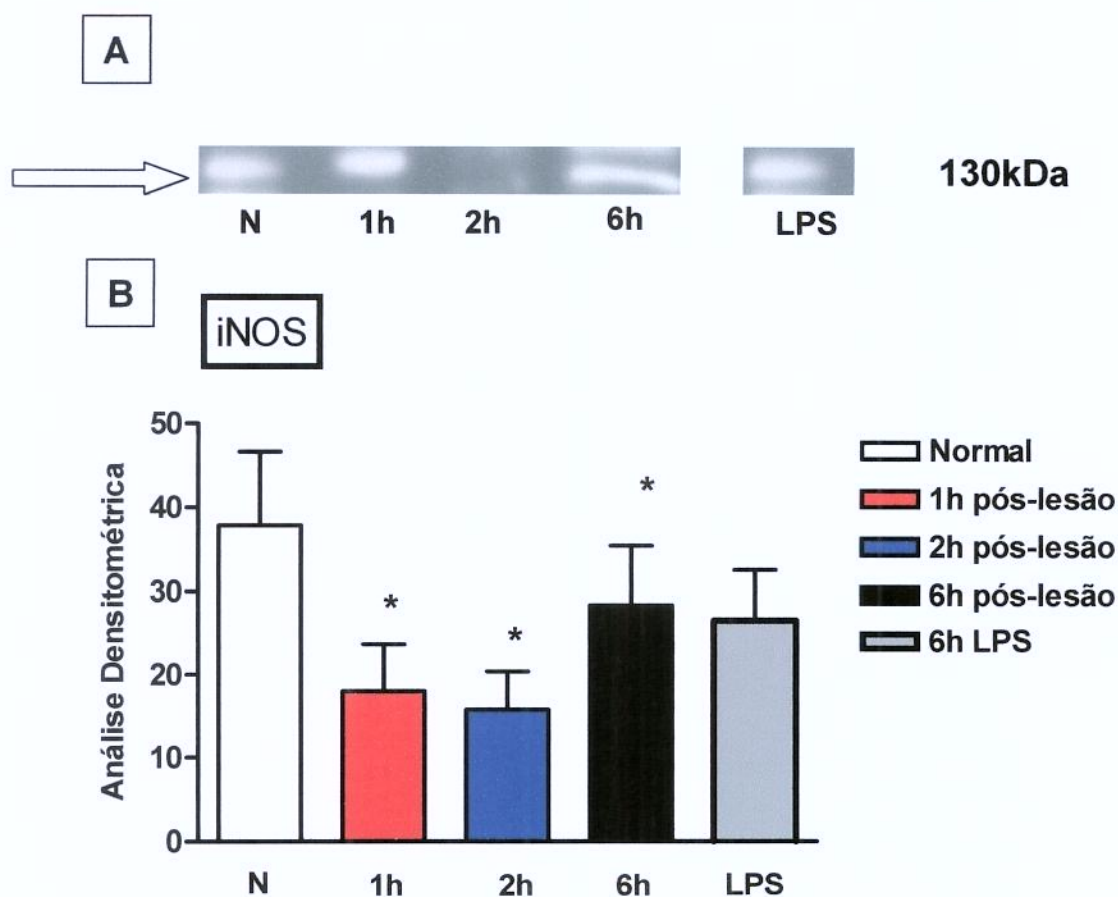


Figura 31: (A) Expressão da isoforma iNOS avaliada em SDS-PAGE e *Western-blot* e revelado por quimioluminescência dos homogeneizados do útero de animais de gestação normal (N), pós-lesão mecânica embrionária nos períodos de 1, 2 e 6 hs e com LPS após 6 hs.

(B) Histograma da densitometria da quimioluminescência mostra que houve diferença significativa entre os grupos experimentais, com notada redução nos períodos de 1 e 2 horas pós-lesão mecânica em relação ao controle ($P < 0,05$). Os níveis da iNOS são semelhantes entre as amostras de 6 horas pós-lesão embrionária e tratados pelo LPS.

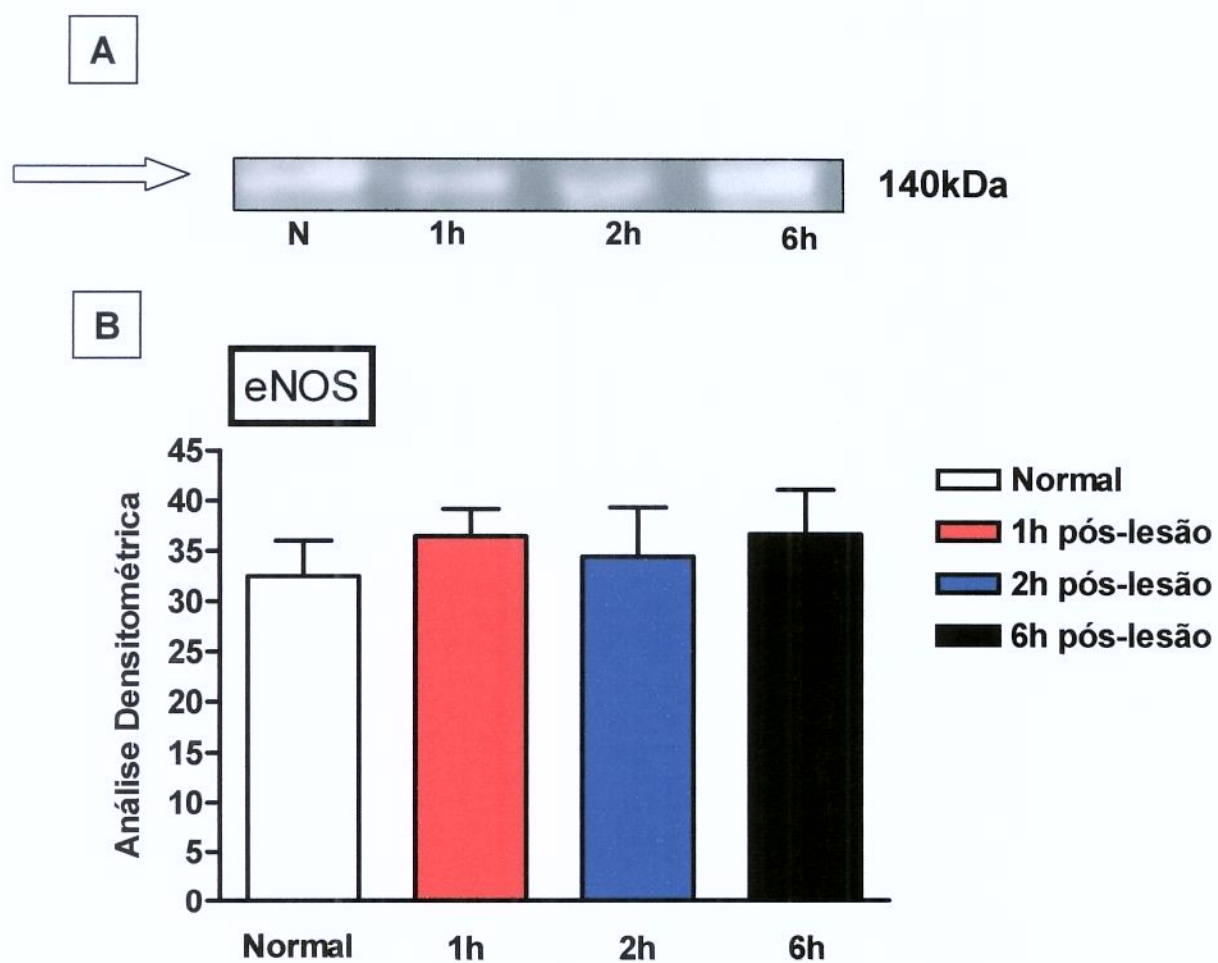


Figura 32: (A) Expressão da isoforma eNOS avaliado em SDS-PAGE e *Western-blot*, revelado por quimioluminescência dos homogeneizados do útero de animais de gestação normal (N), pós-lesão mecânica embrionária nos períodos de 1, 2 e 6 hs.

(B) Histograma da densitometria da quimioluminescência mostra que não houve diferenças ($P < 0,05$), entre os grupos experimentais ou em relação ao controle.

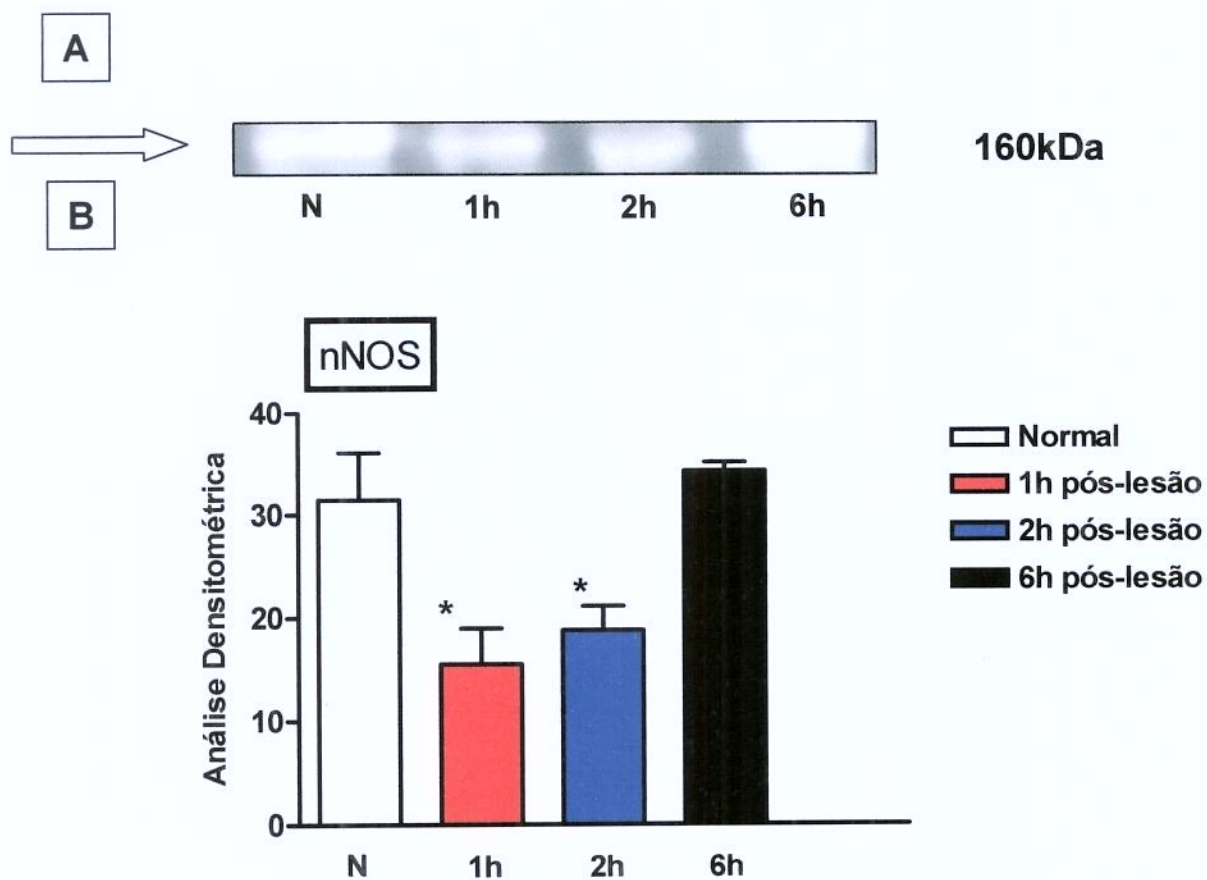


Figura. 33: (A) Expressão da isoforma nNOS avaliado em SDS-PAGE e *Western-blot*, revelado por quimioluminescência dos homogeneizados do útero de animais de gestação normal (N) e pós-lesão embrionária nos períodos de 1, 2 e 6 hs.

(B) Histograma da densitometria da quimioluminescência mostra que houve diferenças significativas entre os grupos experimentais, com acentuada redução nos períodos de 1 e 2 horas pós-lesão mecânica em relação ao controle e, recuperação aos níveis iniciais após 6 horas ($P < 0,05$).

8-ANEXO

66

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEa-IB-UNICAMP

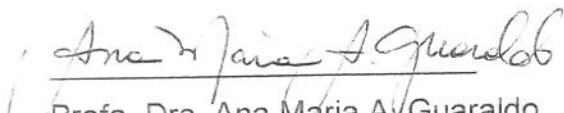
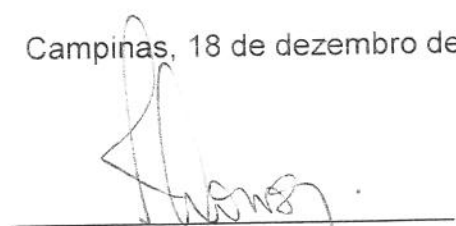
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1144-2, sobre "Expressão de isoformas NOS e Interferon-a em células imunomoduladoras uterinas na gestação anormal de camundongos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada / Eliana Mara Oliveira Lippe, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)-IB-UNICAMP em 18 de dezembro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1144-2, entitled "Expression of NOS isoforms and IFN-a in the uterine immuno-modulating cells of abnormal pregnancy in mice", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 18, 2006.

Campinas, 18 de dezembro de 2006.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente
Fátima Alonso
Secretária Executiva

9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J. S, *Imunologia Celular e Molecular*, tradução de Raymundo Martagão Gesteira, 4º ed., Rio de Janeiro: Livraria e editora Revinter Ltda, 544p, 2002.
- 2- AL-HIJJI,J., ANDOLF,E.,LAURINI,R. AND BATRA, S., Nitric oxide synthetase activity In human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium, **Reprod. Bio. and Endocrin.**, 1:1-7, 2003
- 3- AKTAN, F., iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation – Minireview, **Life Science**, 75, 639-653, 2004.
- 4- AMARANTE-PAFFARO, A., QUEIROZ, G.S., CORREA, S.T., SPIRA, B., BEVILACQUA, E., Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells, **Reproduction**, 28, 207-218, 2004.
- 5- ANDONIOU, C., DOMMELEN, S.H., VOIGT, V., ANDREWS, D., BRIZARD, G., ASSELIN-PATUREL, C., DELALE, T., STACEY, K., TRINCHIERI, G., DEGLI-ESPOSTI, M.A., Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity, **Nat. Immunol.**, 6 , 1011-1019, 2005.
- 6- ANDONIOU C.E., ANDREWS D.M., DEGLI-ESPOSTI M.A., Natural killer cells in viral infection: more than just killers,**Immunol. Rev.**,214, 239-50, 2006.
- 7- ASHKAR A.A., CROY B.A., Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy, **Biol Reprod.**, 61,493-502, 1999.
- 8- ASKELUND K., LIDDELL H.S., ZANDERIGO A.M., FERNANDO N.S., KHONG T.Y., STONE P.R., CHAMLEY L.W., CD83(+)dendritic cells in the decidua of women with recurrent miscarriage and normal pregnancy, **Placenta**, 25, 140-5, 2003.
- 9- AULAK K.S., MIYAGI M.,YAN L.,WEST K.A., MASSILLON D., CRABB J.W.,STUEHR D.J., Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge, **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 98,12056-61, 2001.
- 10- BANCHEREAU J.; STEINMAN R.M.; Dendritic cells and the control of immunity, **Nature**, 392, 245-52, 1998.
- 11- BANCHEREAU J., FAY J., PASCUAL V., PALUCKA A.K., Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy., **Novartis Found Symp**,252, 226-35, 2003.

- 12- BLANCHETTE J., JARAMILLO M., OLIVIER M., Signalling events involved in interferon-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation, **Immunol.**, 108, 513-22, 2003.
- 13- BLOIS, S.M., ALBA SOTO C.D., TOMETTEN M., KLAPP B.F., MARGNI R.A., ARCK P.C., Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy, **Biol Reprod.**, 70, 1018-23, 2004.
- 14- BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Anal. Biochem.**, 72, 248-254, 1976.
- 15- BREDT, D.S., HWANG, P.M., GLATT, C.E., REED, R.R., SNYDER, S.H., Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase, **Nature**, 351:714-718, 1991.
- 16- BOGDAN, C.; Nitric oxide and the immune response, **Nat Immunol.**, 2, 907-16. 2001.
- 17- BORG, C., JALIL, A., LADERACH, D., MARUYAMA, K.; WAKASUGI, H., CHARRIER, S., RYFFLEL CAMBI, A., FIGDOR, C., VAINCHENKER, W., GALY, A., CAIGNARD, A., ZITVOGEL, L., NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs, **Blood**, 104, 3267-3275, 2004.
- 18- BURNETT T.G., HUNT J.S., Nitric oxide synthase-2 and expression of perforin in uterine NK cells, **J Immunol.**, 164, 5245-50, 2000.
- 19- BURNETT, T.G., TASH, J.S., HUNT, J.S., Investigation of the role of nitric oxide synthase 2 in pregnancy using mutant mice, **Reproduction**, 124, 49-57, 2002.
- 20- CARAUX, A., LU, Q., FERNANDEZ, N., RIOU, S., SANTO, J., RAULET, D., LEMKE, G., ROTH, C., Natural Killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinase, **Nature Immunol.**, 7, 747-754, 2006.
- 21- CASADO M., DIAZ-GUERRA M.J., BOSCA L., MARTIN-SANZ P., Differential regulation of nitric oxide synthase mRNA expression by lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines in fetal hepatocytes treated with cycloheximide. **Biochem J.**, 327, 819-23, 1997.
- 22- CERQUEIRA, N.F.; YOSHIDA, W.B., Óxido nítrico – revisão, **Acta Cirúrgica Brasileira**, 17, 2002-2017, 2002.

- 23- CHANTAKRU, S., MILLER, C., ROACH, L.E., ZUZIEL, W.A., MAEDA, N., WANG, W.C, EVANS, S.S. and CROY, B.A., Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cells population of early pregnancy, **The J. of Immunol.**, 168, 22-28, 2002.
- 24- CHWALISZ, K.; GARFIELD, R.E., Role of nitric oxide in implantation and menstruation, **Hum. Reprod**, 5, 96-111, 2000.
- 25- CHOWDHURY, P.; SACKS, S.H.; SHEERIN, N.S., Toll-like receptors TLR2 and TLR4 initiate the innate immune response of the renal tubular epithelium to bacterial products, **Clin. and Exper. Immunol.**, 145, 346-356, 2006.
- 26- CIFONE, M.G., ULISSE, S., SANTONI. A., Natural killer cells and nitric oxide, **Int Immunopharmacol.**, 8, 1513-24, 2001.
- 27- COLONNA, M., MORETTA, A., VELY, F., VIVIER, E., A high-resolution view of NK-cell receptors: structure and function, **Immunol Today**, 21, 428-31, 2000.
- 28- COPI, C., Efeito da lesão embrionária nos grânulos lisossomos-secretores das células Natural Killer uterinas de camundongos, UNICAMP, 2006.
- 29- CROY, R.G., PARDEE, A.B., Enhanced synthesis and stabilization of Mr 68,000 protein in transformed BALB/c-3T3 cells: candidate for restriction point control of cell growth, **PROC NATL ACAD SCI U S A.**, 80, 4699-703, 1983.
- 30- CROY, B.A., GAMBEL, P., ROSSANT, J., WEGMANN, T.G., Characterization of murine decidual natural killer cells and their relevance to the success of pregnancy, **Cellular immunology**, 93, 315-326, 1985.
- 31- CROY, B.A., WOOD, W., KING, G.J., Evaluation of intrauterine immune suppression during pregnancy in a species with epitheliochorial placentation. **J Immunol.** 139, 1088-95, 1987.
- 32- CROY, B.A., KISO, Y., Granulated metrial gland cells: a natural killer cell subset of the pregnant murine uterus, **Microsc Res Tech.**, 25, 189-200, 1993.
- 33- CROY, B.A., ASHKAR, A.A., FOSTER, R.A., DISANTO, J.P., MAGRAM, J., CARSON, D., GENDLER, S.J., GRUSBY, M.J., WAGNER, N., MULLER, W., 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, 111-33, 1997.

- 34- CROY, B.A., LINDER, K.E., YAGER, J.A., Primer for non-immunologists on immune-deficient mice and their applications in research, **Comp Med.**, 51, 300-13, 2001.
- 35- CROY B.A., HE H., ESADEG S., WEI Q., MCCARTNEY D., ZHANG J., BORZYCHOWSKI A., ASHKAR A.A., BLACK G.P., EVANS S.S., CHANTAKRU S., VAN DEN HEUVEL M., PAFFARO-JR V.A. , YAMADA A.T., Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling, **Reproduction**, 126, 149-60, 2003.
- 36- CROY, B.A., XIE, X., In vivo models for studying homing and function of murine uterine natural killer cells, **Methods Mol Med.**, 122, 77-92, 2006.
- 37- DIELT, J., HONIG, A., KAMMERER, U., RIEGER, L., Natural Killer cells and dendritic cells at the human feto-maternal interface: an effective cooperation, **Placenta**, 27, 341-7, 2006.
- 38- DOTSCH J., HOGEN N., NYUL Z., HANZE J., KNERR I., KIRSCHBAUM M., RASCHER W., Increase of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 mRNA expression in human placenta during gestation, **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.**, 97, 163-7, 2001.
- 39- DRAZEN DL, KLEIN SL, BURNETT AL, WALLACH EE, CRONE JK, HUANG PL, AND NELSON RJ., Reproductive function in female mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase, **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, 3, 366-374, 1999.
- 40- EL-HASHEMITE N, ZHANG H, WALKER V, HOFFMEISTER KM, KWIATKOWSKI DJ., Perturbed IFN-gamma-Jak-signal transducers and activators of transcription signaling in tuberous sclerosis mouse models: synergistic effects of rapamycin-IFN-gamma treatment, **Cancer Res.**, 64, 3436-43, 2004.
- 41- FANTEL AG, MACKLER B, STAMPS LD, TRAN TT, PERSON RE., Reactive oxygen species and DNA oxidation in fetal rat tissues, **Free Radic Biol Med.**, 25, 95-103, 1998.
- 42- FERLAZZO, G; PACK, M; THOMAS, D; PALUDAN, C; SCHMID, D; STROWIG, D; BOUGRAS, G; MULLER, WA; MORETTA, L; MUNZ, C, Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human Natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs, **PNAS**, 101, 16606-16611, 2004.
- 43- FORSTERMANN, U; POLLOCK, J.S, NAKANE, M; Nitric oxide synthases in the cardiovascular system, **Trends Cardiovasc. Med.**, 3, 104-110, 1993.

- 44- GAGIOTI S, SCAVONE C, BEVILACQUA E., Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy, **Biol Reprod.**, 62, 260-8, 2000.
- 45- GARDNER, L., MOFFET, A., Dendritic cells in the human decidua, **Biology of Reproduction**, 69, 1438-1446, 2003.
- 46- GAYLE DA, LING Z, TONG C, LANDERS T, LIPTON JW, CARVEY PM., Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide, **Brain Res Dev Brain Res.**, 133, 27-35, 2002.
- 47- GEROSA, F., BALDANI-GUERRA, B., NISII, C., MARCHESINI, V., CARRA, TRINCHIERI, G., Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells, **J. Exp. Med.**, 195, 327-333, 2002.
- 48- GONCALVES A, VIRET F, CICCOLINI J, GENRE D, GRAVIS G, GIOVANINI M, CAMERLO J, CATALIN J, MARANINCHI D, VIENS P., Phase I and pharmacokinetic study of escalating dose of docetaxel administered with granulocyte colony-stimulating factor support in adult advanced solid tumors, **Clin Cancer Res.**, 9, 102-8, 2003.
- 49- GRUMBACH I.M., CHEN W., MERTENS S.A., HARRISON D.G., A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial nitric oxide synthase transcription, **J. Mol. Cell. Cardiol.**, 39, 595-603, 2005.
- 50- GUIMOND, M., WANG, B. and CROY, B.A., Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficient tg ϵ 26 mice, **J. of Exper. Med.**, 187, 217-223, 1998.
- 51- HASSON, E., ARBEL D, VERSTANDIG A, SHIMONI Y, MITRANI E. A cell-based multifactorial approach to angiogenesis, **J Vasc Res.**, 42, 29-37, 2004.
- 52- HILKENS CM, SCHLAAK JF, KERR IM., Differential responses to IFN-alpha subtypes in human T cells and dendritic cells, **J Immunol.**, 171, 5255-63, 2003.
- 53- HORTON, J.W., Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy, **Toxico**, 189, 75-88, 2003.
- 54- HUNT J.S., MILLER L., VASSMER D., CROY BA., Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in mouse uterine leukocytes and potential relationships with uterine function during pregnancy, **Biol Reprod.**, 57, 827-36, 1997.

- 55- HUNT J.S.,PETROFF M.G.,MORALES P.,SEDLMAYR P.,GERAGHTY D.E.,OBER C., HLA-G in reproduction: studies on the maternal-fetal interface, **Hum Immunol.**, 61, 1113-7, 2000.
- 56- ISHIMARU, N., KISHIMOTO, H., HAYASHI, Y., SPRENT, J., Regulation of naive T cell function by the NF- κ B2 pathway, **Nature Immunology**, 7, 763-772, 2006.
- 57- KAKUI, K., SAGAWA, N., ITOH, H., YURA, S., KORITA, D., TAKEMURA, M., NUAMAH, M.A., FUJII, S., Expression of nitric oxide synthase isoforms in the human placenta is not altered by labor, **Endocr J.**, 50, 535-44, 2003.
- 58- KAMMERER U, RIEGER L, KAPP M, DIETL J, RUCK P., Immunocompetent cells in the endometrium of fetuses and children, **Hum Reprod.**, 18, 969-75, 2003.
- 59- KOOPMAN M, CAMBI A, DE BAKKER BI, JOOSTEN B, FIGDOR CG, VAN HULST NF, GARCIA-PARAJO MF, Near-field scanning optical microscopy in liquid for high resolution single molecule detection on dendritic cells, **FEBS Lett.**, 27; 573, 6-10, 2003.
- 60- JURETIC, K., STRBO, N., BOGOVIC, C.T, LASKARIN, G., RUKAVINA, D., Na insight into the dendritic cells at the maternal-fetal interface, **Am J Reprod Immunol**, 52, 350-355, 2004.
- 61- LANDMESSER U., DREXLER H., The clinical significance of endothelial dysfunction, **Curr Opin Cardiol**, 20,547-51, 2005.
- 62- LAEMMLI, U.K., Cleavage os structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T, **Nature**, 227, 680-685, 1970.
- 63- LEHTONEN, A., LUND, R., LABESMAA, R., JUKUMEN,I., SARAVERNA, T., MATKAINEN, S., IFN-alpha and IL-12 activate IFN regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-4, and IRF-8 gene expression in human NK and T cells, **Cytokine.**, 24, 81-90, 2003.
- 64- LIANG, S., HORUZSKO, A., Mobilizing dendritic cells for tolerance by engagement of immune inhibitory receptors for HLA-G, **Hum Immunol.**, 64, 1025-32, 2003.
- 65- LIANG, S., WEI, H., SUN, R., TIAN, Z., IFN-alpha regulates NK cell cytotoxicity through STAT1 pathway, **Cytokine**, 23, 190-199, 2003.
- 66- LIANG J,SUN L, WANG Q, HOU Y., Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation, **Int Immunopharmacol.**, 6, 830-8, 2006.
- 67- LIN, N.T., YANG, F.L., LEE, R.P., PENG, T.C., CHEN, H.I., Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: the time course in conscious and septic rats **Life Sci.**;78, 1038-43, 2006.

- 68- LINNEMEYER PA, HAMILTON MS., A monoclonal antibody, 4H12, recognizes a surface antigen found on granulated metrial gland cells in the murine decidua, **J Reprod Immunol.**, 17, 279-94, 1990.
- 69- LOWENSTEIN, C.J., GLATT, C.S., BREDET, D.S., SNYDER, S.H., Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme, **Proc.Natl.Acad.**, 89, 6711-6715,1992.
- 70- LOZA, M.J., PERUSSIA, B., Differential regulation of NK cell proliferation by type I and type II IFN, **Int Immunol.**, 16, 23-32, 2004.
- 71- LYALL F,GIBSON JL, GREER IA, BROCKMAN DE, EIS AL, MYATT L., Increased nitrotyrosine in the diabetic placenta: evidence for oxidative stress, **Diabetes Care**, 21, 1753-8, 1998.
- 72- MARSDEN, P.A, SCHAPPERT, K.T., CHEN, H.S., FLOERS, M., SUNDELL, C.L., WILCOX, J.N., LAMAS , S., MICHEL, T., Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase, **FEBS** , 307, 287-293,1992.
- 73- MCKENDRICK, J.D., SALAS, E., DUBE, G.P., MURAT, J., RUSSELL, J.C., RADOMSKI, M.W.,Inhibition of nitric oxide generation unmasks vascular dysfunction in insulin-resistant, obese JCR:LA-cp rats, **Br J Pharmacol.**,124, 361-9, 1998.
- 74- MYATT L, ROSENFELD RB, EIS AL, BROCKMAN DE, GREER I, LYALL F Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action, **Hypertension.**, 28, 488-93, 1996.
- 75- MYATT L, EIS AL, BROCKMAN DE, KOSSENJANS W, GREER IA, LYALL F. Differential localization of superoxide dismutase isoforms in placental villous tissue of normotensive, pre-eclamptic, and intrauterine growth-restricted pregnancies, **J Histochem Cytochem.**, 45, 1433-8, 1997.
- 76- MYATT, L., CUI, X., Oxidative stress in the placenta, **Histochem Cell Biol.**, 122, 369-82, 2004.
- 77- MOMOHARA Y, SAKAMOTO S, OBAYASHI S, ASO T, GOTO M, AZUMA H. Roles of endogenous nitric oxide synthase inhibitors and endothelin-1 for regulating myometrial contractions during gestation in the rat, **Mol Hum Reprod.**, 10, 505-12, 2004.
- 78- MUKHTAR H, BIK DP, RUZICKA T, MERK HF, BICKERS DR. Cytochrome P-450-dependent omega-oxidation of leukotriene B4 in rodent and human epidermis, **J Invest Dermatol.**, 93, 231-5, 1989.

- 79- MUNN DH, SHARMA MD, LEE JR, JHAVER KG, JOHNSON TS, KESKIN DB, MARSHALL B, CHANDLER P, ANTONIA SJ, BURGESS R, SLINGLUFF CL JR, MELLOR A, Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase, **Science**, 297, 1867-70, 2002.
- 80- NAKAMURA, H., KIMURA, T., OGITA, K., NAKAMURA, T., TAKEMURA, M., M SCIMOYA, K., KOYAMAS., TSUJIE, T., KOYAMA, M., MURATA, Y., NF κ B activation at implantation window of the mouse uterus, **Am J Reprod Immun**, 51, 16-21, 2004.
- 81- OGANDO DG, PAZ D, CELLA M, FRANCHI AM. The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice, **Reproduction**, 125, 95-110, 2003.
- 82- ORANGE, DE SOUZA DURAO M JR, RAZVICKAS CV, GONCALVES EA, OKANO IR, CAMARGO SM, MONTE JC, DOS SANTOS F., The role of growth factors on renal tubular cells submitted to hypoxia and deprived of glucose, **Ren Fail.**, 25, 341-53, 2003.
- 83- PAFFARO VA JR, BIZINOTTO MC, JOAZEIRO PP, YAMADA A Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity, **Placenta**, 24, 479-88, 2003.
- 84- PARK, C, KRISHNA, G., AHN, M., KANG, J., CHUNG, W., KIM, D., HWANG, H., LEE, J., PAIK, S., CHA, Y., Differential and constitutive expression of neuronal, inducible and endothelial nitric oxide synthase mRNAs and proteins in pathologically normal human tissues, **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, 4, 459-471, 2000.
- 85- PARR EL, YOUNG LH, PARR MB, YOUNG JD. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases, **J Immunol.**, 145, 2365-72, 1990.
- 86- PEEL, S., STEWART, I.J., Natural cytotoxic and antibody-dependent cellular cytotoxic activity of cells in the decidua basales and metrial glands of pseudopregnant rats with deciduomata, **Immunol Cell Biol.**, 77, 127-30, 1983.
- 87- PEREIRA, E.C.T., Distribuição da óxido nítrico sintase neuronal na junção neuromuscular de camundongos distróficos da linhagem mdx. Dissertação (Mestrado), Unicamp, Instituto de Biologia, 2000.

- 88- PICCIOLI, D; SBRANA, S; MELANDRI, E; VALIANTE, M, Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by Natural killer cells, **J. Exp. Med**, 195, 335-341, 2002.
- 89- PURCELL TL, GIVEN R, CHWALISZ K, GARFIELD RE. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse, **Mol Hum Reprod.**, 5, 467-75, 1999.
- 90- RAULET DH,VANCE RE. Self-tolerance of natural killer cells., **Nat Rev Immunol.**, 6, 520-31, 2006.
- 91- REDLINE RW, LU CY., Localization of fetal major histocompatibility complex antigens and maternal leukocytes in murine placenta. Implications for maternal-fetal immunological relationship, **Lab Invest.**, 61, 27-36, 1989.
- 92- REICH, N; LIU, L; Tracking STAT nuclear traffic, **Nat Rev Immunol.**, 6, 602-12, 2006.
- 93- ROMAN, S.S., Caracterização morfológica e comportamento das células uNK em camundongos após lesão embrionária em diferentes períodos gestacionais, UNICAMP, 2001.
- 94- RONCO, M.T., ALVAREZ, M.L., MONTI, J.A., CARRILLO, M.C., PISANI, G.B., LUGANO, M.C., CARNOVALE, C.E., Role of nitric oxide increase on induced programmed cell death during early stages of liver regeneration, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1690, 70-76, 2004.
- 95- ROSSELLI M, KELLER PJ, AND DUBEY RK., Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction, **Human Reproduction Update**, 4, 3-24, 1998.
- 96- ROTHFUCHS, A.G., GIGLIOTTI, D., PALMBLAD, K., ANDERSSON, U., WIGZELL, H., ROTTENBERG, M.E., IFN-alpha beta-dependent, IFN-gamma secretion by bone marrow-derived macrophages controls an intracellular bacterial infection, **J Immunol.**, 167, 6453-61, 2001.
- 97- SAITO Sasaki Y, Sakai M., CD4(+)CD25 high regulatory T cells in human pregnancy, **J Reprod Immunol**, 65, 111-20, 2005.
- 98- SCHAFER-SOMI S.Cytokines during early pregnancy of mammals: a review, **Anim Reprod Sci**, 75, 73-94, 2000.
- 99- SCHIFFMAN, M.L., VERBEKE, S.B., KIMBALL, P.M., Alpha interferon combined with ribavirin potentiates proliferative suppression but not cytokine production in mitogenically stimulated human lymphocytes, **Antiviral Research**, 91-99, 2000

- 100- SCHONFELDER, G., FUHR, N., HADZIDIAKOS, D., JOHN, M., HOPP, H., PAUL, M., Preeclampsia is associated with loss of neuronal nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells of the human umbilical cord, **Histopathology**, 44, 116-128, 2004.
- 101- SESSA, W.C., HORNSON, J.K., BARBER, C.M., ZENG, D., DURIEUX, M.E., D'ANGELO, D.D., LYNCH, K.R., PEACH, M.J., Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase, **J. Biol. Chem.**, 267, 15274-15276, 1992.
- 102- SESSA, W.C., Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 100, 15-18, 2005.
- 103- SLADEK SM, REGENSTEIN AC, LYKINS D, ROBERTS JM., Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy, **Am J Obstet Gynecol.**, 169, 1285-91, 1998.
- 104- STEWART, I., PEEL, S.; Granulet metrial gland cells at implantation sites of the mouse uterus, **Anat. Embryol**, 160, 227-238, 1980.
- 105- STINCHOMBE, J.C., GRIFFITHS, G.M., Regulated secretion from hemopoietic cells, **J. Cell Biol**, 147, 1-5, 1999.
- 106- TASSIULAS, I., HU, X., HO, H., KASHYAP, Y., PAIK, P., HU, Y., LOWELL, C., IVASHKIV, L.B. Amplification of IFN-alpha induced STAT-1 activation and inflammatory function by Syk and ITAM-containing adaptors, **Nat. Immunol.**, 5, 1181-1189, 2004.
- 107- TELFER, J.F., IRVINE, G.A., KOHNEN, G., CAMPBELL, S. and CAMERON, I.T., Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in non-pregnant decidualized human endometrium, **Mol. Hum. Endometrium**, 3, 69-75, 1995.
- 108- TOGASHI H, SASAKI M, FROHMAN E, TAIRA E, RATAN RR, DAWSON TM, DAWSON VL., Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 94, 2676-80, 1997.
- 109- TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L., Reactive oxygen species in vascular biology: implication in hypertension, **Histochem Cell Biol**, 122, 339-352, 2004.
- 110- TRINCHIERI, G. Biology of Natural Killer cells, **Adv. Immunol.**, 47, 187-376, 1989.

- 111- TRANGUCH, S., STEUERWALD, N., HUET-HUDSON, H., Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development, **Biology of Reproduction**, 68, 1538-1544, 2003.
- 112- TSUMAMOTO Y, YAMASHITA K, TAKUMIDA M, OKADA K, MUKAI S, SHINYA M, YAMASHITA H, MISHIMA HK. In situ localization of nitric oxide synthase and direct evidence of NO production in rat retinal ganglion cells, **Brain Res**, 933, 118-29, 2002.
- 113- VAN DER MEER, A; LUKASSEN, HGM; LIEROP, MJC; WIJNANDS, F; MOSSELMAN, S; BRAAT, DDM; JOOSTEN, I, Membrane-bound HLA-G activates proliferation and IFN- γ production by uNK cells, **Molecular Human Reproduction**, 10, 189-195, 2004.
- 114- WANG,Y & MARSDEN,P.A. ,Nitric oxide synthases: gene structure and regulation, **Adv.Pharmacol.**, 34, 71-90, 1995.
- 115- WANG MX, MURRELL DF, SZABO C, WARREN RF, SARRIS M, and MURRELL, GAC, Nitric oxide in skeletal muscle: Inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats, **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, 5, 219-232, 2001.
- 116- WU, X; WEI, H; ZHANG, J; TIAN, Z, Increased uterine NK-derived IFN- γ and TNF- α in C57BL/6J mice during early pregnancy, **Cellular & Molecular Immunology**, 3, 131-137, 2006.
- 117- YOSHIKI, N., KUBOTA, T., ASO, T. Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in human non-pregnant and early pregnant endometrium, **Molecular Human Reproduction**, 6 , 283-287, 2000.
- 118- ZENCLUSSEN, AC., SOLLWEDEL, A, BERTOJA, A.B., GERLOF, K., ZENCLUSSEN, M.L., WOICIECHOWSKY, C., VOLK, H., Heme oxygenase as a therapeutic target in immunological pregnancy complication, **International Immunopharmacological**, 41-51, 2005.
- 119- ZHENG, L.M., OJCIUS, D.M., YOUNG, J.D., Role of granulated metrial gland cells in the immunology of pregnancy, **Am. J Reprod. Immunol.**, 25, 72-6, 1991.