



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ELIANA MARA OLIVEIRA LIPPE

“Efeito da hipóxia e das deleções dos genes
IL15 e PLP-A na vascularização do útero
gestante mediada pelas células uNK”

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

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

Orientador: Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada

Co-Orientador: Prof. Dr. Michael Joseph Soares

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

L664e

Lippe, Eliana Mara Oliveira
Efeito da hipóxia e deleções dos genes IL15 e PLP-A na
vascularização do útero gestante mediada pelas células
uNK / Eliana Mara Oliveira Lippe. – Campinas, SP: [s.n.],
2011.

Orientador: Aureo Tatsumi Yamada.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Gravidez. 2. Vascularização. 3. Células uNK. 4.
Citocinas. 5. Gene IL-15. 6. Gene PLP-A. I. Yamada,
Aureo Tatsumi, 1957-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/fib)

Título em inglês: Effect of hypoxia and depletion of IL15 and PLP-A genes in the vasculature of
pregnant uterus mediated by uNK cells.

Palavras-chave em inglês: Pregnancy; Blood vessels; uNK cells; Cytokines; IL-15 gene; PLP-A
gene.

Área de concentração: Histologia.

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Aureo Tatsumi Yamada, Selma Giorgio, Valdemar Antonio Paffaro-Junior,
Marcia Cristina Bizinotto, Rosiane Mattar.

Data da defesa: 28/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 28 de Fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aureo Tatsumi Yamada (Orientador)



Assinatura

Profª. Dra. Selma Giorgio



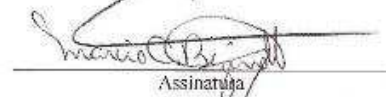
Assinatura

Prof. Dr. Waldemar Antonio Paffaro Junior



Assinatura

Profª. Dra. Márcia Cristina Bizinotto



Assinatura

Profª. Dra. Débora Damasceno



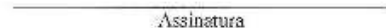
Assinatura

Profª. Dra. Rosiane Mattar



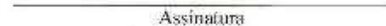
Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Barini



Assinatura

Profª. Dra. Lucia Elvira Álvares



Assinatura

*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.

Ao meu querido marido,

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 eterno...

Aos meus irmãos,

Edwaldo, Eloiza e Eliza, aos meus
sobrinhos **Pedro e João** e minha cunhada **Sirlene**
e meu cunhado Fábio,

Pela amizade, carinho e incentivo nos
momentos mais difíceis da minha vida.

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.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Michael J Soares pela excelente orientação, apoio e incentivo dedicada a mim no momento do doutorado sanduíche.

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

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 e Profa. Dra. Lucia Elvira Alvares, pelo constante apoio para a finalização deste trabalho.

A Profa. Dra. Selma Giorgio, pelo apoio nos conhecimentos científicos e pelas avaliações criteriosas no momento da pré-banca e banca desde o mestrado.

A Profa. Dra. Márcia Cristina Bizinotto, ao Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro-Jr e a Profa. Dra. Roseane Mattar pela contribuição científica desde o primeiro momento da realização desta tese e pelas avaliações e valiosas sugestões no momento da pré-banca e banca.

Ao Prof. Dr. Ricardo Barini, pelas valiosas considerações 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.

Ao Departamento de Pathology (Kansas City/KS- USA), especialmente ao Dr. Michael Soares pelo constante apoio e dedicação ao meu trabalho, por me ensinar novas maneiras de estudar ciência. Aos queridos amigos conquistados durante a experiência no exterior, Stacy McClure, Mayshell, Damayanti, Steve, Kazuo, Rumi, Alam, Pengli, Amanda, Diana, Lindsey and Dong Soo pelos valiosos conhecimentos, risadas e dedicação em todos os momentos no EUA...

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

Ao Silvio, pelo companherismo em todas as etapas deste doutorado, pela amizade e carinho.

À Renata, por todo carinho e atenção desde os primeiros momentos no laboratório e pelo incentivo constante principalmente após nossa vivência nos EUA.

Aos meus amigos, Juares, Marlúcia, Patrícia, Petra, Patrick, Cláudia, Débora, e Lucimara pelo constante apoio, risadas, choros... Muito obrigada pela paciência que vocês tiveram comigo.

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

Um agradecimento especial a secretária Lílían do Programa de Pós-Graduação pela constante colaboração e incentivo à realização deste trabalho. Não há palavras para descrever o obrigado.

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

SUMÁRIO

Resumo	3
Abstract	4
1- Introdução	5
2- Objetivos	15
2.1- Objetivos específicos.....	15
3- Materiais e Métodos	19
3.1- Animais e condições experimentais.....	20
3.2- Influência da hipóxia no sucesso reprodutivo.....	21
3.3- Reações citoquímicas e imunocitoquímicas.....	21
3.3.1- Citoquímica de lectina DBA.....	21
3.3.2- Imunocitoquímica para perforina.....	22
3.3.3- Imunocitoquímica para TROMA-I.....	23
3.3.4- Imunocitoquímica para endoglin.....	24
3.4- ELISA – quantificação de VEGF e IFN γ	25
3.5- Extração de RNAm e obtenção de cDNA.....	26
3.5.1- RT-PCR e qRT-PCR.....	26
3.6- Hibridação in situ para os genes de VEGFA e VEGFC.....	27
3.6.1- Obtenção da sonda de RNA marcada com digoxigenina.....	27
3.6.2- Procedimento para hibridação <i>in situ</i>	27
4- Resultados	31
4.1- Avaliação da performance reprodutiva dos animais CD1, <i>IL15</i> ^{-/-} , <i>PLPA</i> ^{-/-} e <i>IL15</i> ^{-/-} / <i>PLPA</i> ^{-/-}	32
4.2- Caracterização das células uNK dos animais CD1, <i>PLPA</i> ^{-/-} , <i>IL15</i> ^{-/-} , <i>IL15</i> ^{-/-} / <i>PLPA</i> ^{-/-}	32
4.2.1- Quantificação das células uNK-DBA positivas.....	32
4.2.2- Quantificação das células uNK-perforina positivas.....	33
4.3- Identificação das células trofoblásticas TROMA-I positivas.....	34
4.4- Identificação e distribuição das células endoteliais-endoglin positivas	35
4.5- Expressão de fatores moduladores da vascularização na interface materno-fetal nos animais CD1, <i>IL15</i> ^{-/-} , <i>PLPA</i> ^{-/-} e <i>IL15</i> ^{-/-} / <i>PLPA</i> ^{-/-}	36
4.5.1- Expressão de VEGF na interface materno-fetal dos animais CD1,	36

<i>PLPA^{-/-}, IL15^{-/-} e IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}</i>	
4.5.2- Expressão de IFN γ no compartimento mesometrial dos animais CD1, <i>PLPA^{-/-}, IL15^{-/-} e IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}</i>	38
4.5.3- Expressão de iNOS e eNOS na interface materno-fetal dos animais CD1, <i>PLPA^{-/-}, IL15^{-/-} e IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}</i>	39
4.6- Expressão de mediadores citotóxicos das células uNK na interface materno-fetal dos animais CD1, <i>PLPA^{-/-}, IL15^{-/-} e IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}</i>	39
4.6.1- Expressão de perforina na interface materno-fetal dos animais	40
4.6.2- Expressão de TNF α e seus receptores TNFR1 e TNFR2 no endométrio mesometrial dos animais CD1, <i>PLPA^{-/-}, IL15^{-/-} e IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}</i>	40
4.6.3- Expressão dos receptores TNFR1 e TNFR2 na interface materno-fetal dos animais CD1, <i>PLPA^{-/-}, IL15^{-/-} e IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}</i>	40
5- Discussão	43
6- Documentação fotográfica e gráficos	61
7- Tabelas e anexos	87
8- Referências Bibliográficas	91

Resumo

Um processo de remodelação progressiva da vascularização uterina precede a placentação em humanos e roedores para prover o suprimento sanguíneo adequado na interface materno-fetal, tendo as células NK um papel modulador através da produção de citocinas como o IFN γ , fatores de crescimento como o VEGF e radicais livres como o óxido nítrico (NO). A regulação das células uNK nesta atividade tem sido atribuída à influência de fatores exógenos como a hipóxia e parácrinos como a *prolactin-like protein-A* (PLP-A). Contudo, como estes mecanismos são integrados no controle da angiogênese e vasculogênese da interface materno-fetal envolvendo as células uNK não são plenamente compreendidos. No presente trabalho, foram investigadas experimentalmente a resposta das células uNK relacionadas com os mecanismos de regulação dos fatores angiogênicos sob influência da hipóxia no período pré-placentário. Para tanto, foram avaliados camundongos CD1 e geneticamente modificados *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} gestantes no 8º dia de gestação (dg), mantidos em hipóxia (420 Torr – 11%O₂) durante 48 horas. Em comparação com os animais mantidos em normóxia (760 Torr – 21%O₂) a quantidade de sítios anormais apresentou incremento estatisticamente significativo sob hipóxia nos animais CD1, porém este índice era substancialmente maior nos animais depletados dos genes *IL15* e *PLPA*. As amostras dos sítios uterinos de desenvolvimento embrionários coletados foram processados para obtenção de criocortes destinados às reações citoquímicas, imunocitoquímicas e hibridização *in situ*, e homogeneizados teciduais para extração do RNA ou proteínas. Conforme esperado, os resultados da citoquímica com lectina DBA e imunocitoquímica de perforina comprovam a ausência de células uNK nos animais *IL15*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-}, enquanto nos animais *PLPA*^{-/-}, a incidência das células uNK perforina positivas não difere dos CD1 em normóxia ou hipóxia. A concentração protéica de VEGF e dos genes das isoformas VEGFA, VEGFB e VEGFC, assim como do IFN γ e das isoformas iNOS e eNOS, o do TNF α e seus receptores TNFR1 e TNFR2 não apresentaram variações em suas concentrações ou níveis de expressões com padrões definidas de regulação negativa ou positiva entre os animais avaliados. Contudo a imunocitoquímica demonstrou redução de marcação de células endoteliais endoglin-positivas no endométrio e aumento no potencial invasivo de células trofoblásticas TROMA-I positivas dos animais *IL15*^{-/-}. O conjunto destes resultados confirma que a ausência das células uNK afeta a vascularização normal do endométrio, a qual pode resultar em perdas gestacionais e induz a hipertrofia placentária, sem a participação direta da atividade citotóxica destas células. Comprovam também que os mecanismos de controle da expressão de fatores angiogênicos no útero gestante são multifatoriais, não sendo dependente de uma via única como o da *PLPA/VEGF*, ou exclusivamente das células uNK como fontes de fatores que modulam a angiogênese na interface materno-fetal do útero gestante.

Abstract

A gradual process of remodeling of uterine vasculature precedes placentation in humans and rodents to provide adequate blood supply in maternal-fetal interface, where NK cells producing cytokines like growth factor (VEGF) and IFN γ and free radical as nitric oxide (NO). Regulation of this uNK cells activity seems to be under influence of exogenous and endogenous factors such as hypoxia as paracrine effects of prolactin-like protein-A (PLP-A). Nevertheless, how these mechanisms are integrated in the control of maternal-fetal interface angiogenesis and vasculogenesis involving uNK cells are not fully understood. In this study, we investigated experimentally the uNK cells response related to the mechanisms of regulation of angiogenic factor under hypoxia influence in pre-placental period. Thus, we evaluated genetically modified mice and CD1-*IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} and *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} pregnant on the 8th day of gestation (dg), maintained in hypoxia (420Torr-11%O₂) for 48h. When compared to the control animals in normoxia (760Torr-21%O₂) the amount of abnormal embryo developing sites showed statistically significant increase under hypoxia in CD1 animals, but this rate was substantially higher in the PLPA and IL15 gene depleted animals. Uterine samples were processed to obtain cryosection for cytochemical, immunocytochemical and in situ hybridization reactions and extraction of mRNA or protein for PCR or ELISA reactions, respectively. As expected, the results of cytochemistry and immunocytochemistry with DBA lectin and perforin prove the absence of uNK cells in *IL15*^{-/-} and *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} animals, while in *PLPA*^{-/-} animals, the incidence of uNK cells perforin-positive did not differ from CD1 animals in normoxia or hypoxia. The concentration of protein VEGF and the gene isoforms expression of VEGF (A, B and C), as well as, IFN γ , iNOS and eNOS, TNF α and their receptors TNFR1 and TNFR2 did not show constancy in the pattern of variations. However, the immunocytochemistry showed reduced staining of endoglin-positive endothelial cells in the endometrium and increase in invasive potential of trophoblast cells by TROMA-I positive in *IL15*^{-/-} animals. This set of results confirms that the absence of uNK cells affects the normal vasculature of the endometrium which may increased intrauterine growth restriction (IUGR) or pregnancy failure rates and induces placental hypertrophy. This abnormality at the maternal-fetal interface does not seem to be involves direct participation of cytotoxic activity of uNK cells. Furthermore, the control mechanisms of angiogenic factors expression in the pregnant uterus are multifactorial rather than dependent of a single pathway like the PLP-A/VEGF, or limited to uNK cells as a source of factors that modulate angiogenesis in the maternal-fetal interface of pregnant uterus.

INTRODUÇÃO

1-INTRODUÇÃO

Placentação do tipo hemocorial ocorre em humanos, primatas não humanos e roedores (ratos e camundongos) envolvendo a remodelação progressiva da vascularização uterina (Davies & Glasser, 1968; Enders & Welsh, 1993; Georgiades et al., 2002). Concomitantemente, o sucesso da gestação em humanos e roedores decorre da íntima interação entre o organismo materno e o embrião em desenvolvimento, com modificações profundas no ambiente uterino, como a transformação das células do estroma endometrial em decídua, a remodelação da artéria espiralada, o acúmulo de linfócitos *Natural killer* (NK) e a invasão das células trofoblásticas gigantes no endométrio decidualizado (Davies & Glasser, 1968; Enders & Welsh, 1993; Georgiades et al., 2002; Croy et al., 2003; Saito et al., 2005; Lin et al., 2006). Nesta interação atuam também uma série de mediadores químicos que modulam a homeostasia da interface materno-fetal (Al-Hijji et al., 2003; Zenclussen et al., 2005; Saito et al., 2007). Anomalias na placentação podem desencadear complicações gestacionais conhecidas como preeclâmpsia, que corresponde a cerca de 5-7% de todos os casos de complicações gestacionais, e retardo de crescimento fetal (*intrauterine growth restriction – IUGR*) (Hladunewich et al., 2007; Maynard et al., 2008).

A vascularização arterial uterina é suprida pelos ramos da artéria uterina que se inserem na parede mesometrial do órgão através do ligamento mesometrial em cada um dos sítios de desenvolvimento embrionário, constituindo os ramos da artéria espiralada que se dirigem para o interior do endométrio. Estes vasos mesometriais são responsáveis por manter o fluxo de nutrientes para a placenta e o feto em desenvolvimento. Na região do miométrio e do endométrio onde se encontram as artérias espiraladas, ocorre um acúmulo de células NK organizando o agregado linfóide do mesométrio associado à

gestação (MLAp) (Croy et al., 1997, Paffaro Jr et al., 2003). Esta região do MLAP juntamente com o endométrio mesometrial decidualizado onde se concentra esta sub-população de células NK específicas da gestação (uNK) constituem o triângulo mesometrial (Peel et al., 1983; Peel, 1989; Zheng et al., 1991; Croy, 2001; Ain & Soares, 2004).

Em camundongos prenhes, a circulação placentária é estabelecida por volta do 9º ao 10º dia de gestação (dg) com a formação de uma elaborada rede arterial-venosa responsável em prover a nutrição e oxigenação do feto em desenvolvimento (Croy et al., 1993). Com o avanço gestacional, as artérias espiraladas que suprem o fluxo sanguíneo para a placenta são modificadas assegurando um sistema de baixa resistência ao fluxo sanguíneo (Takemori et al., 1984; Takemori et al., 1985; Christofferson, 1993; Adamson et al., 2002; Pijnenborg et al., 2006).

A hipóxia ocorre naturalmente no ambiente uterino durante a formação da placenta e a sua influência na remodelação vascular e angiogênese tem sido comprovada em ratos e camundongos (Soares, 2004; Alam et al., 2007). Distúrbios nos níveis de oxigenação são associados ao desenvolvimento anormal da placenta (Schaffer et al., 2006). Embora os mecanismos relacionados com a baixa tensão de oxigênio e a sua ação sobre os vasos sanguíneos da interface materno-fetal no útero gestante não sejam totalmente conhecidos, o envolvimento do VEGF (Schaffer et al., 2005) e do NO (Hunt et al., 1997) tem sido comprovado em diversos experimentos (Schaffer et al., 2005).

Células *Natural Killer* uterinas (uNK) e o trofoblasto invasivo têm sido apontados como dois modulares chaves na remodelação vascular da interface materno-fetal (Croy et al., 2000; Moffett and Loke, 2006a; Moffett and Loke, 2006b; Pijnenborg et al., 2006).

Em humanos, as células NK do ambiente uterino gestante são identificadas como CD56^{bright}/CD16^{dim} (Koopman et al., 2003), cujo fenótipo coincide com as células NK do sangue circulante produtoras de citocinas e de baixa atividade citotóxica (Colonna et al., 2000). Em camundongos, as células uNK são identificadas pela expressão de glicoconjugados contendo *N-acetil-D galactosamina* terminal presentes na superfície celular e nos grânulos citoplasmáticos que tem afinidade pela lectina DBA (*Dolichos biflorus agglutinin*) (Paffaro Jr et al., 2003; Yadi et al., 2009; Croy et al., 2010).

O envolvimento das células uNK na remodelação vascular do útero gestante tem sido demonstrado indiretamente em camundongos deficientes de célula uNK (camundongo transgênico expressando gene humano de *CD3ε*, *Tgε26*, *RAG-2 null/common cytokine receptor chain γ null double mutant mice*, *IL-15 null mice*), nos quais, a ausência destas resulta na deficiência do remodelamento da artéria espiralada mantendo a parede vascular espessa e o lúmen estreito (Guimond et al., 1997; Ashkar & Croy, 2001; Croy et al., 2002; Barber & Pollard, 2003).

De acordo com Croy e colaboradores (1997), os camundongos depletados de células uNK (conhecidos como deficientes de IL15) apresentam como característica principal hipocelularidade estromal e excessivo retardo de crescimento fetal.

Efeito mediado pelas células uNK na vascularização uterina pode ser atribuído a produção de fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Wang et al., 2000; Li et al., 2001; Hanna et al., 2006; Lash et al., 2006b), óxido nítrico (NO) (Hunt et al., 1997; Burnett & Hunt, 2000; Hunt et al., 2000; Burnett et al., 2002; Ain & Soares, 2004) e interferon-gama (IFN γ) (Ashkar et al., 2000; Ashkar et al., 2003; Monk et al., 2005; Murphy et al., 2009).

O VEGF (*vascular endothelial growth factor*) foi descrito originalmente como uma glicoproteína secretada por células tumorais capaz de desencadear aumento da permeabilidade vascular para passagem de macromoléculas circulantes nas vênulas e pequenas veias (Senger et al., 1983; Senger et al., 1990). É uma família com mais de dez membros, que podem atuar em várias etapas do processo angiogênico, incluindo vasodilatação, proliferação endotelial, migração e formação do tubo vascular (Distler et al., 2003), ligando-se aos receptores tirosina quinase, VEGF-R1 (Flt-1), VEGF-R2 (KDR em humanos ou Flk-1 em camundongo) e VEGFR-3 (Flt-4) (Ferrara et al., 2005, Roy et al., 2006).

No útero gestante a expressão de VEGF foi detectada nos estágios bem iniciais e tem sido sugerida sua atuação no aumento da permeabilidade vascular necessária para implantação do blastocisto em humanos e camundongos (Halder et al., 2000). O ambiente hipóxico aumenta a expressão de VEGF em trofoblastos, o que auxilia no início da placentação (Nagamatsu et al., 2004), e pode contribuir com a angiogênese placentária e embrionária. Após a implantação, ocorre a expressão de VEGF nas células gigantes do trofoblasto de camundongos, sugerindo que este fator pode estar diretamente ligado ao crescimento vascular na decídua e placenta (Jakeman et al., 1993).

A isoforma VEGF-A é conhecida por atuar na permeabilidade vascular, proliferação, migração e produção de citocinas pelas células endoteliais (Jakeman et al., 1993). No útero humano com 12 a 14 semanas de gestação, a imunolocalização detectou VEGFA nas células endoteliais e trofoblasto extraviloso e em menor escala nas células uNK (Lash et al., 2006b).

O VEGF-C liga a receptor VEGFR2 e este foi detectado em células endoteliais que migram e proliferam nos vasos linfáticos e no útero foram ressaltados nos tecidos

placentários (Semenza et al., 2007; Kalkunte et al., 2010) e nas células uNK endometriais de humanos (Kalkunte et al., 2008)

Estes relatos evidenciam a importante participação do VEGF na vascularização da interface materno-fetal tanto do lado materno quanto da placenta, onde as células uNK despontam como fonte deste fator angiogênico e modulador vascular durante a gestação.

Uma das possíveis vias de ativação das células uNK na produção do VEGF ocorre através da ação dos membros da família do hormônio prolactina (PRL). A superfamília da PRL contém muitos membros e os principais foram identificados como sendo PLP-A, PLP-B, PLP-C, PLP-D e PLP-F (Deb et al., 1989; Muller et al., 1999; Ain et al., 2003; Ain et al., 2004; Ho-Chen et al., 2007). Esta família de PRL foi identificada no trato reprodutivo, fígado, células endoteliais, células imunes e células inflamatórias (Soares & Linzer, 2001). Enquanto o hormônio PRL está envolvido na regulação do comportamento, homeostase óssea, fertilidade masculina, metabolismo e fertilidade feminina (Alam et al., 2006), no ambiente uterino foi identificada a *prolactin-like protein-A* (PLP-A) produzidas pelas células trofoblásticas (Soares et al., 1998; Soares & Linzer, 2001; Ain et al., 2003, 2004).

O PLP-A é um polipeptídeo de 23 KDa, membro pertencente à via não clássica, pois não atua via receptores e são compostas por 26 genes em camundongos e 19 genes em ratos que apresentam homologias entre si (Ain et al., 2003; Ain et al., 2004; Alam et al., 2006). A expressão do PLP-A no útero coincide com o início do processo de decidualização e aumenta após a implantação com pico em 20-25 semanas de gestação em humanos e declina próximo ao parto (Duckworth et al., 1986; Ben-Jonathan et al., 1996). Em camundongos o PLP-A inicia sua expressão por volta do 8º dg e aumenta com o avançar da gestação (Ain et al., 2003; Ain et al., 2004; Alam et al., 2007). Camundongo nocaute para PLP-A não formam a placenta adequadamente, a invasividade das células

trofoblásticas é limitada e, sob condições de hipóxia experimental, o epitélio uterino degenera e apresentam retardo de crescimento fetal e a angiogênese na região materna aumenta (Ain et al., 2003; 2004). Tais relatos ressaltam a importância do PLP-A na modulação do ambiente uterino, porém, pouco se conhece ainda sobre os mecanismos que ativam ou inibem as atividades das potenciais células alvos que afetam o desenvolvimento adequado da gestação.

De acordo com Ain e colaboradores (2003) a mutação ou deleção no gene PLP-A influencia a expressão de outros genes reguladores, dentre os quais relata-se o aumento de produção de IFN γ como sendo inversamente proporcional à diminuição de PLP-A, (Ain et al., 2003).

O IFN γ é uma citocina pleiotrópica envolvida em respostas anti-proliferativas, anti-virais, fagocitose, resposta imune e supressão de tumor (El-Hashemite et al., 2004). Esta citocina exerce efeitos nas células pela interação com seus receptores (IFN γ -R α e IFN γ -R β), o qual induz 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 sua atividade transcricional (Darnell et al., 1994, 1998). Embora muitos tipos celulares apresentem receptor para IFN γ e respondam a esta citocina desencadeando diferentes processos celulares ou síntese de produtos específicos, a sua ação como citocina pro-inflamatória está relacionada com a produção da isoforma induzível da NOS (iNOS) associada à indução de apoptose e expressão de antígenos de histocompatibilidade nos mecanismos de defesa inata (Maiuri et al., 2003; Miller et al., 2004).

A expressão do IFN γ no útero gestante de humanos e camundongos têm sido relacionada com a remodelação da artéria espiralada, crescimento normal da placenta e

do feto e, manutenção da reação decidual (Croy et al., 2003; Croy et al., 2006). Experimentos realizados com camundongos *knockout* de IFN γ comprovam a sua produção principalmente pelas células uNK no útero gestante e a sua relação com a manutenção da integridade da decídua, modificação das artérias espiraladas e no desenvolvimento da placenta (Ashkar & Croy, 1999; Croy et al., 2003). Contudo, o mecanismo de ação desta citocina pró-inflamatória na modulação da interface materno-fetal não é totalmente conhecido, sendo até o momento ressaltado apenas o efeito deletério da ausência ou pouca expressão no útero durante a gestação.

No útero gestante de camundongos tem sido relatada a expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS) com a expressão da isoforma induzida (iNOS) localizada nas células uNK (Burnett et al., 2002; Lippe, 2007). A geração do óxido nítrico (NO) no ambiente uterino gestante tem sido relacionado com alterações na permeabilidade vascular e na remodelação da parede da artéria espiralada envolvendo as células uNK (Burnett et al., 2002). Porém, a relação entre a geração do NO pelas uNK e a sua ação na vascularização uterina é especulativa e sem comprovação experimental, uma vez que, o NO sendo um radical livre, a sua geração via iNOS pode estar também relacionada com o potencial citotóxico das células uNK (Lippe, 2007).

De fato, assim como a capacidade das células uNK em gerar NO através da expressão da iNOS pode estar relacionada com o potencial da sua resposta imune inata, a produção de IFN γ ao lado do TNF α sugere a sua capacidade citotóxica latente.

O TNF α é um tipo de citocina pleiotrópica, pró-inflamatória cuja forma ativa é um trímero de 52kDa que pode ser clivada em uma forma solúvel de 17kDa (Baldwin, 1995; MacEwan, 2002). São produzidos por diferentes tipos celulares, destacando macrófagos ativados, linfócitos, células uNK e células dendríticas durante a gestação entre outros

(Ashkar et al., 2006). Os membros da família do $\text{TNF}\alpha$ participam do crescimento celular, diferenciação e ativação de populações celulares desencadeando processos relacionados com apoptose, inflamação e resposta a estresse e são importantes na homeostase imune (Landemann et al., 2001; Kajiwarra et al., 2004). Esta citocina pode desempenhar papel imunomodulatório, visto que a célula pode produzi-la e ser o seu próprio alvo.

A expressão do $\text{TNF}\alpha$ no útero gestante tem sido relatada em humanos e camundongos, sendo as células uNK uma das fontes de produção. O $\text{TNF}\alpha$ atua via receptores TNFR1 e TNFR2 nas células alvo, sendo ambos proteínas transmembranas tipo 1, mas o receptor TNFR1 apresenta domínio de morte (*death domain* - DD) em sua cauda citoplasmática (Kawamura et al., 2007), enquanto o TNFR2 não apresenta este DD. Ativação do TNFR1 por $\text{TNF}\alpha$ desencadeia o recrutamento do DD para ativação da cascata de cisteína-protease caspase e resulta na indução da apoptose (Vantanabeele et al., 1995, Sanchez et al., 2000; Hirsch et al., 2006; Kawamura et al., 2007). Portanto a ação do $\text{TNF}\alpha$ depende do receptor expresso pelas células alvo e no útero gestante, não há relatos de estudos sobre a distribuição destes receptores que podem modular de forma distinta a resposta celular sobre o efeito desta citocina pró-inflamatória gerada pelas células uNK.

Desta forma, as células uNK atuam promovendo a homeostasia da interface materno-fetal do útero gestante utilizando como mediadores $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ e NO e moléculas efetoras da resposta imune inata. Sob estímulos específicos, estes mesmos mediadores produzidos constitutivamente pelas células NK poderiam promover danos celulares relacionados com a defesa imunológica, porém, na gestação normal não são evidenciadas nas células uNK. Por outro lado, distúrbios que possam promover alterações no comportamento das células uNK podem provocar desequilíbrios na resposta delas

envolvendo a produção de IFN- γ , TNF- α e NO, que podem protagonizar perdas gestacionais ou comprometimentos no desenvolvimento fetal normal. Por outro lado, o VEGF junto com o IFN- γ e NO podem ser produzidos pelas células uNK, com um papel crucial na remodelação vascular uterina e placentária, via modulação pelo PLP-A, que por sua vez parece depender dos níveis de oxigênio do ambiente uterino (Ain et al., 2003).

De fato, a hipóxia dependendo do tempo, da duração e da magnitude de exposição é o estímulo necessário para induzir o remodelamento dos vasos sanguíneos para manter a gestação viável e os fetos saudáveis (Ain et al., 2004; Alam et al., 2007). Porém, a hipóxia está também associada com preeclâmpsia e retardo de crescimento fetal (IUGR) envolvendo a regulação positiva e negativa da expressão gênica de inúmeras citocinas sob influência do PLP-A (Ain et al., 2003, 2004).

Tais relatos ressaltam a importância do PLP-A na modulação do ambiente uterino, porém, pouco se conhece ainda sobre os mecanismos que ativam ou inibem as atividades das potenciais células alvos que afetam o desenvolvimento adequado da gestação. Neste mecanismo, presume-se a intermediação das células uNK, porém, o seu envolvimento não tem sido ainda experimentalmente comprovado. Neste sentido, camundongos geneticamente modificados podem auxiliar na compreensão de mecanismos envolvendo a resposta das células uNK na modulação da vascularização uterina e placentária, sob condições experimentais de estresse induzido pela hipóxia.

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS GERAIS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da hipóxia mediado pelas células uNK na interface materno-fetal no útero gestante de camundongos CD1 e geneticamente modificados para o gene *IL15*, *PLPA* e duplo nocaute – *IL15/PLPA*.

2.1- Objetivos específicos

- A) Avaliação da influência da hipóxia no sucesso reprodutivo de camundongos CD1 e nocautes para *IL15*, *PLPA* e *IL15/PLPA*;
- B) Identificação e localização das células uNK, trofoblásticas e endoteliais através de métodos imunocitoquímicos no útero gestante de animais CD1 e geneticamente modificados para *IL15*, *PLPA* e *IL15/PLPA* mantidos em condições ambientais e submetidos à hipóxia;
- C) Avaliação da expressão de perforina através da imunocitoquímica e do seu RNAm através de qRT-PCR, no útero gestante de animais CD1 e geneticamente modificados para *IL15*, *PLPA* e *IL15/PLPA* mantidos em condições ambientais e submetidos à hipóxia;
- D) Avaliação da influência da hipóxia sobre a atividade funcional das células uNK relacionados com as expressões dos genes *iNOS*, *eNOS*, *TNF-α* e seus receptores, *TNFR1* e *TNFR2*;

E) Avaliação da expressão das isoformas VEGFA, B e C no útero gestante de animais CD1 e geneticamente modificados para *IL15*, *PLPA* e *IL15/PLPA* submetidos à hipóxia, pelos métodos de ELISA e dos respectivos genes através de RT-PCR, qRT-PCR e hibridização *in situ*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais e condições experimentais

Os camundongos da linhagem CD1 e geneticamente depletados para *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}*, e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* foram adquiridos do Charles River e mantidos com 18 horas de luz, e livre acesso à alimentação e água. As fêmeas foram acasaladas com machos do mesmo genótipo e na manhã em que foi constatado o tampão vaginal foi considerado 1º dia de gestação (dg).

Para a hipóxia, fêmeas gestantes no 8º dg foram mantidas durante 48 horas em câmaras hipobáricas (*Billups-rothenberg*) ajustadas com pressão de aproximadamente 420 Torr, resultando em um ar inspirado de 78 Torr, equivalente a 11% do nível de oxigênio do mar de acordo com Ho-Chen e colaboradores (2006). As câmaras foram abertas diariamente durante 30 segundos para reposição de água e alimentação.

Como normóxia, as fêmeas gestantes no 8º dg foram mantidas na mesma câmara, porém ajustada em condições ambientais normais com pressão barométrica de 760 Torr e ar inspirado de 149 Torr equivalente a 21% do nível de oxigênio do mar.

Os animais dos grupos experimentais submetidos às condições de hipóxia e normóxia foram sacrificados no 10º dg por deslocamento cervical e os sítios uterinos com desenvolvimento embrionário foram dissecados e imediatamente congelados em heptano (*Fisher Scientific*, USA) com gelo seco e estocados à temperatura de -80°C até o momento dos processamentos subsequentes. Todos os procedimentos e cuidados com o animal foram aprovados pela **University of Kansas Medical Center Animal Care and Use Committee** (protocolo n. 2007-1647) e pelo **Comitê de Ética em Experimentação**

Animal (CEUA/CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (protocolo n. 2111-2).

3.2- Influência da hipóxia no sucesso reprodutivo

O índice de comprometimento gestacional foi estabelecido pela proporção entre o número de sítios de desenvolvimento embrionários em estado de reabsorção e os saudáveis nas fêmeas sacrificadas no 10º dg das linhagens CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* mantidas em condições de normóxia e hipóxia conforme descrito em 3.1

3.3- Reações citoquímicas e imunocitoquímicas

Criocortes com 10µm de espessura dos sítios de desenvolvimento embrionário coletados em 3.1 dos animais das linhagens CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* foram processados em lâminas histológicas silanizadas, secas ao ar e fixadas com solução de paraformaldeído (PFA) 4% em tampão fosfato-salina (PBS) 100mM pH 7,4 durante 30 minutos à temperatura de 4°C.

3.3.1- Citoquímica de Lectina DBA

Citoquímica com lectina *Dolichos biflorus* (DBA) foi realizada de acordo com Paffaro Jr e colaboradores (2003) para identificar e localizar as células uNK em animais pertencentes as linhagens CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*, em normóxia e hipóxia em criocortes fixados em PFA a 4%, e lavados com PBS 100mM, bloqueados com albumina sérica bovina 1% (BSA tipo V, *Fischer Biotechnology*, USA) em PBS 100mM e incubados com lectina DBA biotinizada (1mg/mL - Sigma Chem. Co., St Louis, USA) diluído 1:400,

durante 12 horas à 4°C. Após lavagens com PBS 100mM, os cortes foram incubados com FITC-AVIDIN (Zymed Laboratories, USA) diluídos 1:200 durante 45 minutos à temperatura ambiente e em seguida incubados com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride*, Invitrogen, Carlsbad, CA) diluído 1:1000 durante 5 minutos e lavados exaustivamente e em seguida montados com DAPI-Fluoromount-G (Southern –Biotech, USA). As análises dos preparados foram realizadas em estereomicroscópio Leica MZFLIII (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) ou microscópio Nikon Eclipse 55i (Nikon Instruments Inc., Melville, NY), acoplados com câmera CCD (Leica).

Como controle negativo da reação foi feita a omissão da incubação da lectina DBA.

A proporção relativa (percentual) das células uNK-DBA positivas presentes na área do MLAP (agregado linfocitário associado à prenhez) e DB (decídua basalis) do útero gestante foi realizada contabilizando a totalidade de núcleos DAPI positivos em 10 campos digitalizados com aumento de 40x . A análise estatística foi realizada com dados coletados de 5 animais experimentais de cada um dos grupos avaliados.

3.3.2- Imunocitoquímica para perforina

Criocortes dos sítios de implantação embrionária dos animais CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* em normóxia e hipóxia fixados em PFA a 4% foram lavados em PBS 100mM e em seguida bloqueados com soro de cabra normal a 10% durante 1 hora à temperatura ambiente e em seguida incubados com anti-perforina (Torrey Pines, Biolabs, Houston, TX) diluída 1:400 durante 12 horas a 4°C. As lâminas após lavadas com PBS 100mM, foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra conjugado com fosfatase alcalina (AP) (Zymed Laboratories, USA) diluído 1:200 por 45

minutos à temperatura ambiente. A fosfatase alcalina (AP) foi revelada com NBT/NCIP (Roche Molecular Biochemical, Indianapolis, IN) diluída 1:500 durante 5 minutos, lavada, desidratada e montada com bálsamo do Canadá (Southern-Blotech, USA). Alternativamente, foram utilizados anticorpo secundário anti-coelho conjugado com TRITC (Sigma Chem. Co., St Louis, USA) diluído 1:200 em PBS 100mM e montagem com Fluoromont-G, para observação ao microscópio de fluorescência e quantificação.

Como controle negativo da reação foi feita a omissão da incubação do anticorpo primário.

A proporção relativa (percentual) de células uNK-perforina positivas presente na área do MLAP e DB do útero gestante foi obtida pela quantificação da totalidade de núcleos DAPI positivos em 10 campos digitalizados com aumento de 40x. Análise estatística (*ANOVA*) foi realizado com os dados obtidos de 5 animais diferentes de cada um dos grupos avaliados.

3.3.3- Imunocitoquímica para TROMA-I

O anticorpo anti-TROMA-I (Developmental Hybridoma, Iowa City, IA) identifica as células trofoblásticas gigantes que se encontram no perímetro da interface materno-fetal (Ain et al., 2004), sendo, portanto apropriado para avaliar o processo invasivo durante a placentação.

Os criocortes fixados com PFA 4% foram lavados em PBS 100mM, bloqueados com soro de cabra normal a 10% durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida foram incubados com anticorpo de rato anti-TROMA-I diluído 1:20 em PBS-tween durante 12 horas a 4°C, lavados com 100mM PBS e então incubados com anticorpo secundário anti-rato produzido em cabra conjugado com FITC (Sigma Chem. CO. ST. Louis) diluído

1:200 durante 45 minutos à temperatura ambiente. Após sucessivas lavagens, foram incubados com DAPI (4',6,-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen, Carlsbad, CA), diluídos 1:1000 durante 5 minutos e lavados abundantemente e em seguida montados com DAPI-Fluoromount-G (Southern –Biotech, USA).

Como controle negativo da reação foi feita a omissão da incubação do anticorpo primário.

A área da placenta em formação foi quantificada tendo como limites as células trofoblásticas gigantes TROMA-I positivas perfazendo a interface com o endométrio decidualizado de um lado e a base da placenta voltada para a membrana corion-amniótica utilizando o software *IMAGE J*. As análises estatísticas foram realizadas com dados de 5 animais diferentes através da ANOVA com aplicação do teste *t* de *Student*.

O índice invasivo de células trofoblásticas gigantes-TROMA positivo dos animais foi estabelecido pela razão entre as áreas da placenta dos animais *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* e do animal CD1 em normóxia.

3.3.4- Imunocitoquímica para endoglin

Criocortes dos animais CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* em normóxia e hipóxia fixados em PFA a 4% foram equilibrados em PBS 100mM e incubados com soro de cabra normal a 10% seguida da incubação com anticorpo de rato anti-endoglin (CD105 – Developmental Hybridoma, Iowa City, IA) diluído 1:50 em PBS 100mM durante 12 horas a 4°C. Após lavados PBS 100mM, os cortes foram incubados com anticorpo secundário anti-rato produzido em cabra conjugado com FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) diluído 1:200 em PBS 100mM durante 45 minutos à temperatura

ambiente. Após sucessivas lavagens foram montados com Fluoromount-G (Southern – Biotech, USA) .

Como controle negativo da reação foi feita a omissão da incubação do anticorpo primário.

3.4- ELISA (*Enzyme- Linked-Immuno-Sorbent-Assay*) para quantificação de VEGF e IFN γ

Para quantificação da proteína de VEGF e IFN γ foram utilizados homogeneizados do endométrio mesometrial dissecados de pelo menos cinco sítios de desenvolvimento embrionário de três a cinco animais diferentes de CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* em normóxia e hipóxia. Os fragmentos da região mesometrial dissecados de cada sítio de implantação embrionária foram homogeneizados mecanicamente (Glass-Col, USA) em tubo de vidro com pistilo de teflon em banho de gelo, na proporção de 30g de tecido/100 mL da solução de extração constituída de tampão (trizma base 10 mM pH 7,4); EDTA 10 mM; Pirofosfato de sódio 10 mM, Fluoreto de sódio 100 mM; Ortovonadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM, Aprotinina 0,1 mg/ml; igepal 1%. A seguir, as amostras foram centrifugadas (10000g) por 30 minutos à 4º C. A dosagem das proteínas totais foi realizada dos sobrenadantes dos homogeneizados pelo método de Bradford (1976) que após aliquotados, foram congelados à -80º C, até o momento do uso.

Para a detecção e quantificação de VEGF nos homogeneizados teciduais por ELISA, foi utilizado o kit de VEGF produzido em camundongo (cat. KMG0112 - Invitrogen, Carlsbad, CA) e, para IFN γ o kit de IFN γ produzido em camundongo (cat. KMC4021 -

Invitrogen, Carlsbad, CA). A leitura e quantificação da reação foram realizadas em $\lambda=450\text{nm}$ no espectrofotômetro Nanodrop 800 (USA).

3.5- Extração de RNAm e obtenção do cDNA.

O endométrio mesometrial dissecado de pelo menos 5 sítios embrionários em desenvolvimento de cada um dos animais CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* em normóxia e hipóxia foi homogeneizado e o RNAm extraído utilizando reagente TRIZOL (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) de acordo com as instruções do fabricante e quantificados à 260nm utilizando espectrofotômetro (Nanodrop 800, USA). Foram processadas amostras de três a cinco animais de cada um dos grupos experimentais. Após eletroforese em gel de agarose 1% para averiguar a integridade do RNA, as amostras de RNAm foram aliquotadas e estocadas à -80°C até o momento da obtenção do cDNA. Para sintetizar cDNA foram utilizados 3µg de RNA com o kit SuperScript III (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) e *Random Primers* (Promega Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.5.1 – RT-PCR e qRT-PCR

Para amplificação dos genes *iNOS*, *eNOS*, *TNF α* , *TNFR1*, *TNFR2*, *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC* e *Perforina* pelo RT-PCR para confirmar a expressão gênica, foram utilizados GoTaq®Flexi DNA Polymerase (Promega Madison, WI, USA) adotando a β -*actin* como controle endógeno (dados não demonstrados). As seqüências sense e anti-sense dos primers estão descritas na **Tabela I**. O peso molecular utilizado como controle

foi BenchTop 100pb DNA Ladder (Promega, Madison, WI, USA). A média dos valores de quatro amostras foi calculada utilizando a *β-actin* como controle endógeno para RT-PCR. Essas análises não foram contempladas na redação da tese.

Para a quantificação dos genes *iNOS*, *eNOS*, *TNFα*, *TNFR1*, *TNFR2*, *VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC* e *Perforina* pelo qRT-PCR (LightCycler, Roche Diagnosis) os respectivos primers (**Tabela II**) foram desenhados utilizando o programa Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

Para amplificação destes primers foram utilizados Kit SYBR Green PCR (Qiagen) com reações utilizando LightCycler de acordo com as instruções do fabricante. As análises quantitativas foram obtidas utilizando o software RelQuant LightCycler e as análises estatísticas foram determinadas através do teste *t* de *Student* de quatro amostras diferentes em experimentos independentes.

3.6- Hibridação *in situ* para os genes de *VEGFA* e *VEGFC*

O protocolo adotado para hibridação *in situ* foi de acordo com Ain e colaboradores (2003) e Wiemers e colaboradores (2003b) como seguem.

3.6.1 - Obtenção da sonda de RNA marcada com digoxigenina

Os genes de *VEGFA* e *VEGFC* foram amplificados através de PCR e as sondas destinadas à hibridação *in situ* foram preparadas com o kit TOPO Clone A (Invitrogen, Carlsbad, CA). Nos genes amplificados pelo PCR foram adicionados 3μl de solução salina, 1μl de TOPO vector e incubados por 5 min. Em seguida, foi adicionada 4μl de reação de TOPO clone no frasco contendo *E. Coli*, misturado gentilmente e incubado

novamente por 5 min. Após este período, foi incubado em placa de ágar à 37° C durante 12 horas. Após este procedimento, foram selecionadas 2 a 3 colônias e adicionados 5ml de meio LB contendo ampicilina e incubados 12 horas a 37° C.

A extração do plasmídio contendo o gene alvo utilizando Miniprep (Qiagen) (QIAfilter Plasmid Mini Kit) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e em seguida estes plasmídios foram seqüenciados e comparados com a sequência do BLAST. Após o seqüenciamento, os plasmídios foram purificados com o kit Midi Prep (QIAfilter Plasmid Midi Kit Cat. No. 12243) de acordo com as instruções do fabricante. Com a sequência de pares de bases do plasmídio e as enzimas de restrições corretas (SP6 – sonda *sense* e T7 – sonda *antisense*), determinadas através do programa Webcutter, os plasmídios foram linearizados. Em seguida foram extraídos utilizando fenol-clorofórmio e solubilizados em água ultrapura, autoclavada e marcadas com digoxigenina (Roche Molecular Biochemical, Indianópolis, IN). O RNA marcado foi precipitado com etanol e estocado à -80° C.

3.6.2- Procedimentos para hibridização *in situ*

Criocortes dos sítios de desenvolvimento embrionário de CD1 e IL15^{-/-} em normóxia e hipóxia fixado em PFA 4% foram lavados duas vezes com PBS 100mM preparado com água DEPC autoclavada. Em seguida, os criocortes foram pré-hibridados durante 2 horas à 55° C com solução de hibridação (di formamida – final 50%; 20x SSC – final 5x; Dextran sulfate - final 10%; 50x reagente de Denhardt – final 1x; água DEPC). A hibridação ocorreu durante 12hs a 55° C na solução de hibridação acrescida de 500ng/ml da sonda de VEGFA ou VEGFC.

Após a hibridação, os criocortes foram lavados com 2xSSC durante 15min à temperatura ambiente e digeridos com RNase A à 37° C durante 20min. Os criocortes foram lavados novamente com 2xSSC e incubados 1h com 2xSSC à 68° C. Após este tempo, os criocortes foram incubados durante 1h à 68° C com 0.1xSSC e, em seguida, incubados com a solução de bloqueio contendo 1% de reagente de bloqueio (Roche Cat#1096176) diluído em TBS 100mM pH 7,4 durante 30min à temperatura ambiente. Os criocortes foram então incubados com anti-DIG conjugados com AP (fosfatase alcalina) *overnight* à 4° C. Os criocortes foram então incubados com tampão AP e revelados com NBT/BCIP por cerca de 4 a 8 horas no escuro. A revelação foi bloqueada com sucessivas lavagens em água, desidratadas e montadas com Bálsamo do Canadá. As análises e documentação dos preparados foram realizadas em estereoscópio Leica MZFLIII (Leica Microsystems GmbH, Welzlar, Germany).

RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1- Avaliação da performance reprodutiva dos animais CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*

A avaliação da proporção de sítios de desenvolvimento anormal (hemorrágicos e atróficos) em relação aos sítios íntegros nos animais CD1 e geneticamente modificados para *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* no 10º dg, demonstraram uma relação de 1 sítio anormal em 30,5 sítios íntegros para os animais CD1 (**tabela III**) mantidos em condições ambientais normais (normóxia), enquanto nas mesmas condições de tensão de oxigênio, os geneticamente modificados para *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*, esta proporção aumentava de 5 a 6 vezes (~1:5), sendo a maior proporção observada para os animais *IL15^{-/-}*. Em condições de hipóxia, verificou-se um aumento substancial de sítios anormais para CD1 (1:16,1), enquanto em animais *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*, os índices permaneceram próximos aos observados em normóxia (**tabela III**).

4.2- Caracterização das células uNK dos animais CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*

4.2.1- Quantificação das células uNK -DBA positivas

A lectina DBA é um marcador seletivo para as células uNK imaturas e diferenciadas presentes no agregado linfóide associado à gestação (MLAp) e decídua basalis (DB) do útero gestante de camundongos (Paffaro Jr et al., 2003). Reação positiva para lectina DBA ocorre também nas células do saco vitelínico e nas células endoteliais

de alguns vasos presentes no miométrio e endométrio (Paffaro Jr et al., 2003), o que pode ser comprovado igualmente em nossas observações. Nos animais CD1 mantidos em ambiente normóxico foram observados cerca de 95% de células uNK-DBA positivas (**Fig. 1a**) na região do MLAP e 55,72% na DB, onde verificou-se aumento significativo (77,35%) de células uNK DBA positivas em hipóxia enquanto no MLAP houve uma redução (81,3%) (**Fig. 1a1; tabela IV**).

Nos animais *PLPA*^{-/-} em normóxia (**Fig. 1c**) a proporção de células uNK-DBA positivas era significativamente menor em relação ao CD1 tanto na região do MLAP (30,95%) quanto na DB (23,6%), porém sob hipóxia, houve um aumento significativo tanto na região do MLAP (77,2%) quanto no endométrio decidualizado (56,97%) (**Fig. 1c1; tabela IV**)

Nos animais *IL15*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} conforme esperado, não apresentaram células uNK-DBA positivas em normóxia ou hipóxia, comprovando completa depleção desta população celular (**Fig. 1b-d; b1-d1**).

4.2.2- Quantificação de células uNK-perforina positivas

A perforina é uma proteína citolítica presente nos grânulos das células uNK (Hunt et al., 1997) e portanto adotado como um marcador específico destas células no útero gestante.

Os animais CD1 mantidos em ambiente normóxico e hipóxico apresentaram células uNK-perforina positivas tanto na região do MLAP quanto na DB (**Fig. 2a,a1**). Pela quantificação (**tabela V**) verificou-se ligeira redução destas células na região do MLAP sob hipóxia (91,7%) em relação à normóxia (98%) enquanto na DB a incidência aumentava sob hipóxia (89,4%) em relação à normóxia (75,7%).

Nos animais *PLPA*^{-/-} as células uNK-perforina positivas foram identificadas igualmente na região do MLAP e DB (**Fig. 2c,c1**), porém com menor diferença na proporção entre estas duas regiões (90% e 83,6%, respectivamente) nos animais em normóxia (**tabela V**). Em hipóxia, a incidência de células uNK-perforina positivas no MLAP não apresentou diferença em relação à normóxia, porém, na DB, houve uma redução significativa (66%) destas células (**tabela V**).

Nos animais *IL15*^{-/-} (**Fig. 2b,b1**) e *IL15*^{-/-}*PLPA*^{-/-} (**Fig. 2d,d1**) tanto mantidos em condição de normóxia quanto de hipóxia, conforme esperado, não apresentaram células uNK ou qualquer outra célula perforina positiva, na região do MLAP ou da DB.

4.3- Identificação das células trofoblásticas TROMA-I positivas

O anticorpo anti-TROMA-I identifica as células trofoblásticas gigantes de camundongos (Ain et al, 2004). A imunomarcação utilizando o anti-TROMA-I apresentou como padrão de marcação, as células trofoblásticas gigantes localizadas no perímetro externo da placenta em formação, em íntima interação com tecido materno no endométrio da região mesometrial (**Fig. 3a,a1**). Estas células TROMA-positivas foram identificadas como sendo populações de células trofoblásticas gigantes, não havendo reação positiva para as células do labirinto em formação, ou mesmo das pequenas células trofoblásticas localizadas na base da placenta voltada para a cavidade amniótica. Este padrão de marcação trofoblasto-TROMA-I positivos não apresentou diferenças entre os animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} em normóxia ou hipóxia.

A avaliação da área da placenta nestes animais demonstram que os animais CD1 e *PLPA*^{-/-} mantidos em normóxia ou hipóxia não apresentam diferenças entre si, (**Fig. 3c,c1; Fig. 4**), assim como, os índices de invasividade do trofoblasto TROMA-I positivo

obtido pela razão entre áreas da placenta, tendo o animal CD1 em normóxia, como referência, não apresentaram diferenças (**Fig. 4**). A área placentária dos animais *IL15^{-/-}* em normóxia mostrou-se hipertrofiada, com as células trofoblásticas TROMA-positivas profundamente inseridas no endométrio mesometrial, sendo ainda mais acentuadas após exposição à hipóxia (**Fig. 3b,b1**), atingindo um índice de invasão três vezes maior do que a observada com os controles CD1 (**Fig. 4**). Nos animais duplo-nocautes *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* em normóxia, observou-se igualmente índice de invasividade trofoblástica aumentada (4x) em relação aos animais CD1 e 5x maior quando em hipóxia (**Fig. 3d,d1; Fig. 4**).

4.4- Identificação e distribuição das células endoteliais–endoglin positivas

Os animais CD1 em normóxia e hipóxia apresentaram padrões de marcações endoglin positivas semelhantes, onde as células endoteliais-endoglin positivas revestiam uniformemente os seios vasculares que contornavam as trabéculas de endométrio decidualizado da região do mesometrial, dos vasos sanguíneos mais calibrosos do endométrio não decidualizado, (**Fig. 5a,a1**), assim como, dos vasos mais calibrosos do miométrio (dados não demonstrados). As células trofoblásticas tanto em contato com o endométrio quanto presentes no interior da placenta em desenvolvimento apresentavam marcação positiva para o endoglin sem diferença significativa entre os animais em normóxia ou hipóxia.

Nos animais *IL15^{-/-}* a presença de células endoteliais-endoglin positivas era substancialmente menor no endométrio tanto em normóxia quanto em hipóxia, sendo mais acentuada nesta última (**Fig. 5b,b1**), enquanto as células trofoblásticas-endoglin positivas ocupavam maior área no interior do endométrio. Os animais *PLPA^{-/-}* em normóxia apresentaram uma rede vascular com endotélio endoglin-positiva na região

mesometrial visivelmente mais desenvolvida em relação aos animais CD1 (**Fig. 5c**) que sob hipóxia apresentava-se menos desenvolvida (**Fig. 5c1**). As células trofoblásticas mantiveram o padrão de marcação, sendo evidente tanto naquelas presentes na interface com o endométrio quanto no interior da placenta em desenvolvimento (dados não mostrados).

Os animais *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* apresentaram rede vascular com células endoteliais endoglin-positivas mais proeminente em relação aos animais *IL15^{-/-}* em normóxia (**Fig. 5d**), enquanto sob hipóxia verificou-se maior incidência de vasos com endotélio-endoglin positivo (**Fig. 5d1**). Contudo, a rede vascular com endotélio endoglin-positiva era menor do que aquela observada nos animais *PLPA^{-/-}* ou CD1.

4.5- Expressão de fatores moduladores da vascularização na interface materno-fetal dos animais CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*

Como potenciais fatores oriundos das células uNK que possam afetar a vascularização e angiogênese na interface materno-fetal, comprometendo o sucesso gestacional, foram avaliados as expressões de VEGF, IFN γ e óxido nítrico sintase induzida e endotelial (iNOS e eNOS).

4.5.1- Expressão de VEGF na interface materno-fetal dos animais CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*

A concentração da proteína VEGF (isoforma A) presente no endométrio mesometrial avaliada pelo método de ELISA demonstrou a expressão desta proteína em todos os animais em normóxia, porém em níveis menores nos animais *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e

IL15^{-/-}/PLPA^{-/-} em relação ao CD1 (**Fig. 6**). Em hipóxia, os animais CD1 não apresentaram diferenças, porém verificou-se um acentuado aumento nos animais *PLPA^{-/-}* e redução nos animais *IL15^{-/-}*. Nos animais *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* que apresentaram menor expressão em normóxia, houve um aumento sob hipóxia, em níveis semelhantes ao observado para os animais *IL15^{-/-}* em hipóxia (**Fig. 6**).

A expressão diferencial dos genes das isoformas de VEGF (A,B,C) foi avaliada por meio de PCR quantitativo com RNAm extraído de homogeneizados teciduais do endométrio mesometrial e da placenta em desenvolvimento dos animais CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* em normóxia e hipóxia.

A expressão do VEGFA na região mesometrial foi constatada em todos os grupos avaliados tanto mantidos em condição de normóxia quanto de hipóxia (**Fig. 7**), sendo a maior expressão observada nos animais *IL15^{-/-}* em normóxia, que em hipóxia é reduzida. Os animais CD1, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* em normóxia apresentaram níveis de expressão semelhantes (**Fig. 7**), porém sob hipóxia, a expressão do VEGFA os animais *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* apresentou queda à semelhança do que foi verificado para os animais *IL15^{-/-}*.

A expressão da isoforma VEGFB no endométrio mesometrial foi semelhante para todos os animais em normóxia (**Fig. 8**), os quais, em hipóxia apresentaram aumento na expressão.

A expressão do gene da isoforma VEGFC foi constante no endométrio mesometrial, sem variações significativas entre os animais mantidos em normóxia (**Fig. 9**). Sob hipóxia, os animais CD1 apresentaram ligeira redução, porém estatisticamente não significativa, enquanto nos demais animais verificaram-se aumentos, sendo estatisticamente significativa nos animais *IL15^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* (**Fig. 9**).

Na avaliação comparativa das expressões das isoformas de VEGF, constatou-se a maior expressão proporcional da isoforma VEGFC no endométrio mesometrial, enquanto a VEGFA apresentou maior variação nos animais *IL15^{-/-}* depletados de células uNK.

A localização da expressão destas duas isoformas foram subsequentemente avaliadas por meio da hibridização *in situ* nos animais CD1 e *IL15^{-/-}*. A hibridização *in situ* evidenciou a expressão do RNAm de VEGFA nas células trofoblásticas gigantes nos animais CD1 mantidos em normóxia e pouca expressão no compartimento mesometrial, não sendo possível evidenciar se houve marcação específica nas células uNK (**Fig. 10a**). Em hipóxia, a expressão de VEGFA era mantida nas células trofoblásticas e considerável aumento na área compartimento mesometrial onde se localizavam as células uNK (**Fig. 10b**). Nos animais *IL15^{-/-}* a expressão era restrita às células trofoblásticas e em algumas células endoteliais presentes no compartimento mesometrial próximas à interface com a placenta (**Fig. 10c**). Em hipóxia, a expressão de VEGFA nas células trofoblásticas gigantes era reduzida no compartimento mesometrial (**Fig. 10d**).

O VEGFC nos animais CD1 estava expresso na placenta, e no compartimento mesometrial, nas células endoteliais e células uNK (**Fig. 10e**). Sob hipóxia, a expressão de VEGFC era mantida no endométrio e na placenta em níveis semelhantes (**Fig. 10f**), enquanto nos animais *IL15^{-/-}* ocorria discreto aumento da expressão de VEGFC no endométrio, aparentemente nas células endoteliais e mantida nas células trofoblásticas da placenta (**Fig. 10g,h**).

4.5.2- Expressão de IFN γ no compartimento mesometrial dos animais CD1, *IL15^{-/-}* *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*

A citocina IFN γ foi detectada no endométrio mesometrial de todos os animais avaliados sendo em níveis mais elevados nos animais *IL15*^{-/-} e *PLPA*^{-/-} em relação ao CD1 na normóxia (**Fig. 11**). Em hipóxia, enquanto os animais CD1 não apresentaram diferenças significativas, verificou-se um acentuado aumento nos animais *PLPA*^{-/-} e redução nos animais *IL15*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} em relação aos animais controles (**Fig. 11**).

4.5.3- Expressão da iNOS e eNOS na interface materno-fetal dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-}

O óxido nítrico (NO) produzido pelas enzimas iNOS (induzida) e eNOS (endotelial) é um importante mediador vasoativo, promovendo a vasodilatação e angiogênese (Hunt et al., 2002).

A expressão gênica da iNOS (óxido nítrico sintase induzida) foi constatada no endométrio mesometrial de todos os grupos avaliados em condição de normóxia, sendo significativamente maior nos animais *PLPA*^{-/-} (**Fig. 12**). Sob hipóxia, não foram constatadas variações significativas nos animais CD1, *IL15*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-}, porém houve uma modulação negativa para os animais *PLPA*^{-/-} (**Fig. 12**).

A expressão gênica da enzima eNOS no endométrio mesometrial de animais *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA* em normóxia eram significativamente maiores em relação aos animais CD1, porém sob hipóxia, enquanto ocorria o aumento significativo nestes últimos, os demais animais apresentaram reduções estatisticamente significativas (**Fig. 13**).

4.6- Expressão de mediadores citotóxicos das células uNK na interface materno-fetal dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-}

4.6.1 – Expressão de perforina na interface materno-fetal dos animais

A avaliação quantitativa da expressão gênica da perforina pelo RT-PCR e qRT-PCR (**Fig. 14**) demonstraram níveis de expressão semelhantes entre os animais CD1 e *PLPA*^{-/-} em normóxia. Embora a hipóxia aparentemente induza ligeiro aumento na expressão deste gene nos animais CD1 e *PLPA*^{-/-}, estes apresentaram diferença estatística significativa. Como esperado, não foram detectadas expressões da perforina nos animais *IL15*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} mantidos em normóxia ou hipóxia, confirmando às células uNK, a expressão da perforina no ambiente uterino gestante de camundongo.

4.6.2 - Expressão de TNF α no endométrio mesometrial dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-}

O TNF α é uma das citocinas efetoras da atividade citotóxica das células uNK relacionadas com as perdas gestacionais (Shimada et al., 2006)

A expressão do transcriptoma do TNF α detectada no endométrio mesometrial foi semelhante entre os animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} em normóxia. Sob hipóxia, verificou-se uma modulação negativa significativa em CD1 e positiva nos animais *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-}, enquanto em *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}, as diferenças não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (**Fig. 15**).

4.6.3 - Expressão dos receptores TNFR1 e TNFR2 na interface materno-fetal dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-}

O TNF α atua via interação com seus receptores, TNFR1 e TNFR2, onde o TNFR1 que é expresso constitutivamente desencadeia a apoptose sob o estímulo do TNF α .

Os níveis de expressão do gene de TNFR1 no endométrio mesometrial dos animais CD1, *PLPA*^{-/-}, e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} foram semelhantes entre si em normóxia exceto nos animais *IL15*^{-/-} que apresentaram níveis significativamente menores (**Fig. 16**). Sob hipóxia, não houve variações significativas em relação à normóxia em relação aos animais controles.

A expressão do gene TNFR2 no endométrio mesometrial dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, e *PLPA*^{-/-} foram semelhantes em normóxia, com exceção dos animais *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} que apresentaram expressão significativamente maior em relação aos animais CD1 (**Fig. 17**). Sob hipóxia, os animais CD1 apresentaram uma queda significativa na expressão do gene TNFR2, enquanto nos animais *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} apresentaram níveis significativamente maiores em relação aos animais CD1 (**Fig. 17**).

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Humanos e roedores apresentam placentação do tipo hemocorial, sendo este tipo caracterizado pela invasão das células trofoblásticas no compartimento uterino e adaptações vasculares deste favorecendo o acesso ao fluxo de nutrientes para o embrião em desenvolvimento (Ain et al., 2003; Pijnenborg et al., 2006). Esta interface materno-fetal que se forma no ambiente uterino é um sítio de interação dinâmica entre tecidos especializados que favorecem a liberação e acesso aos nutrientes via circulação sanguínea para o desenvolvimento e crescimento embrionário (Davies & Glasser, 1968; Enders & Welch, 1993; Georgiades et al., 2002; Sharma et al., 2009).

No útero gestante de camundongos, o leito vascular e a circulação sanguínea sofrem profundas alterações por volta do 10º dg decorrente da hipóxia, que parecem ser determinantes para o desenvolvimento normal da placenta (Schaffer et al., 2006). A dilatação das artérias espiraladas ocorrem segundos após o início da hipóxia e se mantém por horas após o restabelecimento da normóxia (Arnet et al., 1996). A influência da hipóxia no remodelamento dos vasos sanguíneos é dependente da duração e da magnitude de exposição à hipóxia (Ain et al., 2004; Alam et al., 2007), porém os mecanismos de resposta de quais células da interface materno-fetal possam ser afetados diretamente não são claros.

Dentre os fatores conhecidos para ativação da remodelação vascular e angiogênese, o IFN γ (interferon-gama), VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e NO (óxido nítrico) são expressos no ambiente uterino gestante pela atividade das células *Natural Killer*-uterinas (uNK) presentes neste ambiente (Burnett et al., 2002; Croy et al., 2003), o que sugere um papel pivotal destas células na regulação da vascularização da interface materno-fetal. No presente trabalho foram avaliadas comparativamente a

mobilização das células uNK nos mecanismos relacionados com a angiogênese e vasculogênese do útero gestante utilizando animais geneticamente modificados com deleção de células uNK (*IL15^{-/-}*) e/ou de PLP-A (*prolactin-like protein-A*) sob a influência da hipóxia.

A condição de hipóxia adotada no presente experimento para acondicionar os animais durante 48 horas em câmaras hipobáricas ajustadas com pressão de 420 Torr, resultando em um ar inspirado de 78 Torr, equivalente a 11% do nível de oxigênio do mar, baseou-se no protocolo experimental descrito por Ho-Chen e colaboradores (2006), na qual, ratos e camundongos gestantes adaptam-se conduzindo o desenvolvimento fetal a termo. De fato, os nossos resultados demonstraram que o número absoluto de sítios de desenvolvimento embrionário normais nos animais CD1 avaliados no 10º dg após 48hs de hipóxia apresentavam grandes diferenças em relação aos animais em normóxia. Contudo, a análise estatística demonstrou um incremento de 100% em número de sítios embrionários comprometidos nos animais submetidos à hipóxia (1:16) em relação aos animais mantidos em normóxia (1:30). Este dado inicial sugeriu a influência da hipóxia como potencial causa do aumento da interrupção gestacional no período pré-placentário.

Nos animais geneticamente modificados *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* em normóxia, a incidência de sítios de desenvolvimento embrionário anormais era substancialmente maior em relação aos animais CD1, sem que, contudo, a hipóxia tenha alterado significativamente esta incidência. A elevada incidência de sítios de desenvolvimento embrionário anormais nos animais *IL15^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* comprovam que a ausência das células uNK influenciam negativamente no sucesso gestacional.

O IL15 está envolvido na maturação de progenitores das células NK nos órgãos linfóides e no útero está relacionado com a transcrição durante o processo de decidualização capaz de provoca anormalidades gestacionais (Kennedy et al., 2000). Os

nossos resultados comprovam que camundongos depletados de IL15, embora sejam competentes para reprodução, não desenvolvem a região MLAp pela ausência completa das células uNK-DBA e uNK-perforina positivas, com hipocelularidade na decídua e sem remodelação das artérias espiraladas. Estas anormalidades relatadas previamente (Ye et al., 1996; Ashkar et al., 2003) podem ser revertidas pela administração do IL15 recombinante (IL15R) e restauração das células uNK, porém estas em menor quantidade com predomínio de formas imaturas (Ye et al., 1996; Ashkar et al., 2003). A ausência de células uNK no útero de animais *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*, com reflexos no endométrio e índice de sucesso gestacional semelhante ao do animal *IL15^{-/-}* confirmam o papel mandatório da IL15 na proliferação e diferenciação das células uNK, cuja ausência provoca anomalias substanciais na interface materno-fetal que podem estar relacionados com o alto índice de perdas gestacionais.

O índice de sucesso gestacional dos animais *PLPA^{-/-}* foi também significativamente menor em relação aos animais CD1, à semelhança do que se observou para os animais *IL15^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*. A imunomarcagem para perforina, a proteína lítica presente nos grânulos lisossomo secretor das células uNK (Burnett & Hunt, 2000; Hunt et al., 2000), identificou a presença e distribuição de células uNK-perforina positivas no útero gestante destes animais *PLPA^{-/-}* que eram comparáveis aos observados nos animais CD1, confirmando os relatos de Ain e colaboradores (2003). O fato das células uNK estarem presentes nestes animais confirmam a possibilidade de mecanismos distintos daqueles observados nos animais *IL15^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* serem mobilizados para induzirem as perdas gestacionais.

Cabe salientar a menor incidência de células uNK-DBA positivas em relação aos animais CD1 indicando alterações no fenótipo de células uNK pela ausência do PLPA. A lectina DBA através da afinidade específica para com *N-acetil D galactosamina* terminal

presente nos gliconjugados da superfície celular (Paffaro Jr et al., 2003) tem sido adotada como marcador melhor padronizado para células uNK, mais seletivo e de melhor reprodutibilidade (Croy et al, 2010). Contudo, Yadi e colaboradores (2009) relataram a ocorrência de sub-populações de células uNK com fenótipo $DBA^+NKp46^+NK1.1^+DX5^+NKG2D^+$ similar às células NK periféricas, junto com o fenótipo $DBA^+NKp46^+NK1.1^-DX5^+NKG2D^+$, no útero de camundongos gestantes. Igualmente Zhang e colaboradores (2009) sugerem que nem todas as células uNK apresentam marcação positiva para a lectina DBA, dando fortes indícios sobre a incidência de subpopulações fenotípica e funcionalmente distintas de células uNK. O fato das células uNK dos animais $PLPA^{-/-}$ não expressarem o glicoconjugado reativo à lectina DBA, porém mantendo a expressão da perforina, configura a manutenção da sua competência como célula efetora da resposta citotóxica, o qual pode estar associada com a elevada incidência de perdas gestacionais destes animais em relação ao animais CD1.

Quanto aos potenciais mecanismos relacionados com as perdas gestacionais envolvendo as células uNK, de acordo com os nossos resultados, a possível mobilização da atividade citotóxica das células uNK que possa resultar nas perdas gestacionais aparentemente não envolve a mobilização da perforina. A expressão dos transcriptos desta proteína não apresentou diferenças significativas entre os animais CD1 e $PLPA^{-/-}$ em normóxia ou hipóxia, assim como, a incidência de células uNK-perforina positiva determinada pela imunomarcação, não apresentou diferença digna de nota.

Por outro lado, as células uNK, assim como as NK circulantes ativadas expressam diversas citocinas pró-inflamatórias como $IFN\gamma$ (Croy et al., 2003) e $TNF\alpha$ (Vantanabeele et al., 1995) e, mediadores químicos como o óxido nítrico (NO) (Hunt et al., 1997) que podem induzir a morte celular (Purcell et al., 1999)

De acordo com nossos resultados, os animais CD1 expressam o gene e produzem IFN γ constitutivamente, o que corrobora com os relatos da literatura relacionando a produção desta citocina pelas células uNK com ação na gestação auxiliando sobretudo o remodelamento vascular das artérias espiraladas (Croy et al., 2003; Yadi et al., 2009).

Os animais *PLPA*^{-/-} apresentaram concentrações três vezes maiores do que verificado nos animais CD1, à semelhança dos relatos de Ain e colaboradores (2004). Essa elevada concentração de IFN γ retrata um desequilíbrio no balanço de citocinas do ambiente uterino gestante, pendendo para o predomínio do IFN γ , uma citocina Th1. De acordo com Saito e colaboradores (2007), o equilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2 é essencial para o sucesso gestacional e o desequilíbrio com tendência para Th1 induz a perdas gestacionais. Desta forma, os níveis elevados de IFN γ encontrados nos animais *PLPA*^{-/-} pode ser a causa da alta incidência de sítios de desenvolvimento embrionário anormais, onde o PLPA é modulador negativo da expressão do IFN γ (Ain et al., 2004).

Interessante observar que nos animais *IL15*^{-/-} a concentração de IFN γ era significativamente maior do que nos animais CD1, apesar da ausência das células uNK. Este dado sugere que a produção de IFN γ nos animais *IL15*^{-/-} envolve outras populações celulares presentes na interface materno-fetal, possivelmente com a ativação de um mecanismo compensatório que não envolve o PLP-A, uma vez que, nos animais *IL15*^{-/-} /*PLPA*^{-/-} os níveis de IFN γ eram próximos dos animais CD1. Este nível elevado de IFN γ aliado à ausência das células uNK, podem ser fatores determinantes e sinérgicos para a alta incidência de perdas gestacionais observados nos animais *IL15*^{-/-}.

O IFN γ atua em respostas anti-proliferativas, anti-virais, fagocitose, resposta imune e supressão de tumor (El-Hashemite et al., 2004) através da interação com receptores IFN γ -Ra e IFN γ -Rb, o qual induz 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 sua atividade transcricional (Darnell et al., 1994, 1998). Embora muitos tipos celulares apresentem receptor para IFN γ e respondam a esta citocina desencadeando diferentes processos celulares ou síntese de produtos específicos. Entre os mecanismos de ação, o IFN γ pode ativar a expressão da iNOS e consequentemente produção de NO pelas células fagocíticas mediadas pelo IFN γ (Soh et al., 1994). O óxido nítrico é uma molécula vaso-ativa gerada através da catálise enzimática das enzimas 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 & 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 (Burnett & Hunt 2000; Kakui et al., 2003; Gonçalves et al., 2003). No caso, a isoforma iNOS tem sido identificada nas células uNK (Lippe, 2007) e eNOS nas células endoteliais e uNK (Lippe, 2007), onde o NO gerado atua de forma efetiva na modulação da vasculatura uterina (Burnett et al., 2002) e a ação de inibidores da enzima NOS revelou uma severa hipertensão materna e restrição do crescimento do feto. Portanto, o IFN γ presente na interface materno-fetal pode ser o responsável pela regulação da expressão das isoformas de NOS e controle dos níveis de NO nesta interface.

Em nossos experimentos não foram determinadas as concentrações do NO no ambiente uterino, porém os dados da expressão de RNAm da iNOS e eNOS confirmam que ambos são constitutivamente expressos no endométrio mesometrial dos animais CD1, corroborando com os relatos da literatura (Hunt et al., 2002; Lippe, 2007). A expressão semelhante da iNOS e eNOS entre os animais CD1 e os animais *IL15^{-/-}* e *IL15^{-/-}*

/PLPA^{-/-}, ou até mesmo maior nestes últimos, configura o não envolvimento das células uNK na produção desta isoforma, cuja produção pode ser decorrente do estímulo nas células endoteliais e estromais, as quais também são identificadas como competentes em expressar esta molécula (Yoshiki et al., 2000; Kakui et al., 2003; Gaglioti et al., 2003). Por outro lado, o fato de ambas as isoformas sofrerem modulação positiva nos animais *PLPA^{-/-}*, reforçam a hipótese da participação do IFN γ encontrado em níveis elevados no endométrio mesometrial, com conseqüente aumento na geração do NO. Se de um lado o NO pode atuar ativamente na permeabilidade vascular e estimular a angiogênese (Sessa et al., 2005), o mesmo NO pode gerar como sub-produto do nitrito que formará peroxinitrito. O peroxinitrito gerado a partir da reação entre o óxido nítrico e anion superóxido, 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 (Myatt et al., 1996). A sua principal função é atacar a membrana lipídica e/ou grupo sulfidril de proteínas alterando assim a função da população celular atacada (Myatt et al., 1996).

Neste sentido, uma possível geração de NO em excesso modulado pelo IFN γ pode estar relacionada com o elevado índice de perdas gestacionais registrados nos animais *PLPA^{-/-}*.

A expressão da eNOS na região mesometrial dos animais CD1 sofreu modulação positiva sob o efeito da hipóxia, o que poderia ser o indicativo da ativação da angiogênese nesta região, considerando o seu mecanismo de modulação do endoglin via receptor de TGF β R2-SMAD2 que são ativados pela hipóxia (Orange et al., 2003). Contudo, nos animais CD1 não foi constatado aumento da vascularização identificado pelas células endoteliais endoglin positivas, ou aumento da placentação pela identificação de células

trofoblásticas TROMA-I positivas. A expressão maior da eNOS encontrada no endométrio mesometrial dos animais *PLPA*^{-/-} pode estar relacionado com aumento da geração do NO via células uNK, afetando o sucesso gestacional. Porém, o fato dos animais *IL15*^{-/-}, também apresentarem níveis elevados de expressão dos transcriptos da eNOS sugerem mecanismos múltiplos na regulação da expressão da eNOS por outras células do endométrio mesometrial, além das células uNK.

Esses conjunto de resultados permitem concluir que a hipóxia é um estímulo para induzir o aumento na expressão das isoforma eNOS e iNOS no compartimento mesometrial, gerando níveis de NO que podem ser deletérios ao sucesso gestacional. A geração destes radicais livres, não pode ser atribuída exclusivamente, ou predominantemente às células uNK, como se presumia, havendo mecanismos compensatórios envolvendo outras populações celulares que expressam as isoformas iNOS e eNOS passíveis de serem mobilizadas via aumento do IFN γ e outros ainda não conhecidos.

O TNF α , ao lado do IFN- γ , é outra citocina relacionada com a atividade citotóxica das células NK, que também é encontrada nas células uNK (Croy et al., 1997; Van der Meer et al., 2004; Ashkar et al., 2006; Wu et al., 2006). O TNF α é uma citocina pleiotrópica, pró-inflamatória cuja forma ativa é um trímero de 52kDa que pode ser clivada em uma forma solúvel de 17kDa (MacEwan, 2002; Baldwin, 1995). À semelhança do IFN γ , pode potencialmente atuar na gestação como resposta do tipo Th1, desencadeando inúmeros efeitos sobre diferentes populações celulares incluindo apoptose, inflamação e resposta a estresse (Landemann et al., 2001; Ashkar et al., 2006). Níveis elevados de TNF α no útero gestante tem sido relacionado com a pre-eclâmpsia (Van der Goot et al.,

1999; Serin et al., 2002; Hirsch et al., 2006), porém o mecanismo preciso da sua ação neste ambiente não foi ainda completamente estabelecido.

De acordo com os nossos dados da expressão quantitativa de transcritos do TNF α , não apresentou diferenças entre os animais CD1 e os geneticamente modificados *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* ou *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*. O fato dos níveis de expressão do TNF α no endométrio mesometrial não sofrerem redução nos animais *IL15^{-/-}* depletados de células uNK, indica que outras células do endométrio são mobilizadas para manter os níveis desta citocina na interface materno-fetal. Estes dados confirmam que outras células presentes neste compartimento podem ser mobilizadas para a produção do TNF α , possivelmente como mecanismo de suprir o déficit de células uNK e manter o equilíbrio no balanço de citocinas. A manutenção da expressão de TNF α nos animais *IL15^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* é um indicativo que, as perdas fetais observadas nestes animais não envolvam diretamente as células uNK via produção do TNF α , além de sugerir que as células uNK não são na realidade a principal produtora de TNF α como tem sido atribuído até o momento.

A redução da expressão de TNF α no endométrio dos animais CD1 sob hipóxia configura igualmente a menor relevância dos níveis desta citocina no ambiente uterino como potencial mediador no incremento das perdas fetais sob o estresse da baixa tensão de oxigenação da interface materno-fetal.

Por outro lado, nos animais *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* ou *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*, os níveis de TNF α não sofrem alterações em relação à normóxia ou tendem para aumento, como no caso dos animais *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* e, todos apresentam níveis significativamente elevados em relação ao animal CD1 em hipóxia. Na compreensão da ação do TNF α , é importante salientar que além da concentração da citocina em si na ação parácrina, é necessário considerar a expressão dos dois receptores TNFR1 e TNFR2 nas células alvo. Isto é, as células que expressam o receptor TNFR1 sob o efeito do TNF α solúvel são induzidas a

apoptose celular via domínio de morte (*death domain* - DD) (Hirsch et al., 2006; Sanchez et al., 2000; Vantanabeele et al., 1995). Por outro lado, o TNFR2 é a forma de receptor induzível encontrado em células do sistema imune e células endoteliais, liga-se principalmente às moléculas de TNF α presentes na membrana plasmática e medeiam mecanismos de proteção celular. De acordo com os nossos resultados da expressão de RNAm do receptor TNFR1, estes estavam expressas no endométrio mesometrial dos animais CD1 em normóxia e hipóxia, com ligeiro aumento neste último, à semelhança do observado para os animais *IL15*^{-/-}, e sem variações significativas para os demais animais. Este perfil indica que o TNF α não atua de forma efetiva na indução da morte das células do endométrio mesometrial via receptor TNFR1. A expressão do TNFR2 foi constatada no endométrio mesometrial de todos os animais na normóxia e hipóxia, sendo notório um perfil de aumento de expressão do RNAm deste receptores nos animais *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} ou *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} sob hipóxia, mas com uma queda acentuada no animal CD1. Considerando o mecanismo citoprotetor do receptor TNFR2, a acentuada regulação negativa observada nos animais CD1 em hipóxia, pode estar relacionada com o aumento das perdas gestacionais sob influência da hipóxia. Isto é, mesmo não havendo variações nos níveis da citocina TNF α no ambiente, a repressão da expressão do receptor citoprotetor TNFR2 pode favorecer a interação com o receptor TNFR1 induzindo a ativação da morte celular por apoptose nas células da interface materno-fetal, resultando em última instância em resposta tipo Th1 com efeito deletério no desenvolvimento da gestação.

Ao lado da ação mediada por citocinas citotóxicas, as células uNK atuam como importante fonte de mediadores químicos e fatores de crescimento que modulam a homeostasia, em especial, modulando a vascularização da interface materno fetal.

A avaliação da rede vascular do endométrio mesometrial através da identificação das células endoteliais endoglin positivas e das células trofoblásticas gigantes TROMA-I

positivas para delinear o limite do desenvolvimento placentário, demonstraram que a extensão e magnitude da hipóxia induzida experimentalmente afetaram a vascularização ou o desenvolvimento placentário dos animais CD1. Contudo, os animais *IL15^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* apresentaram hipertrofia no desenvolvimento placentário e reduzida marcação de endotélio-endoglin positivo tanto em normóxia quanto em hipóxia, comprovando a importância das células uNK na modulação da vascularização uterina e na regulação do desenvolvimento placentário. Nos animais *PLPA^{-/-}*, não foi encontrado aumento da área placentária ou incremento da invasividade do trofoblasto sob hipóxia ou normóxia, porém a rede vascular com células endoglin positivas era substancialmente mais desenvolvida nestes animais. O PLPA é um indutor da expressão do VEGF (Ain et al., 2003; Weimers et al., 2003), assim como um modulador negativo da expressão do IFN γ (Ain et al., 2004), ambas expressas pelas células uNK na gestação (Colonna et al., 2000).

O VEGF é uma proteína homodimérica ligada à ponte dissulfeto e apresenta três isoformas. O VEGFA é o mais conhecido, genericamente designado apenas como VEGF, é um vasodilatador, atua na permeabilidade vascular e migração celular e são produzidos principalmente pelas células endoteliais e células NK (Monk et al., 2005). No útero gestante, está presente na membrana corioalantóica e em grande quantidade nas células glandulares maternas, sendo responsável por promover proliferação das células endoteliais. O VEGFB foi inicialmente isolado dos embriões de camundongos, possui efeito mitogênico nas células endoteliais, sua expressão é mais proeminente nos músculos, particularmente esquelético e cardíaco (Kato et al., 2006). O VEGFC atua principalmente nos vasos linfáticos e tem sido encontrado em células endoteliais que migram e proliferam (Semenza et al., 2007) e são encontrados também nos tecidos placentários (Kalkunte et al., 2010). A distribuição destas três isoformas presentes no ambiente uterino variam de acordo com período de gestação avaliado (Valdes et al.,

2009), onde o VEGF produzidos pelas células uNK tem sido sugerido participar do processo de neovascularização do útero (Wang et al., 2001).

O PLP-A é capaz de modular a vascularização placentária através da produção de VEGFA (Muller et al., 1999; Ain et al., 2004) interagindo com as células uNK via não-clássica sem a intermediação de receptores (Ain et al., 2004) e portanto, o PLP-A é um candidato em potencial para regular um dos fenótipos funcionais das células uNK durante a gestação (Muller et al., 1999).

Os níveis protéicos do VEGF foram identificados em todos os animais experimentais em normóxia, sendo notória a menor expressão nos animais *IL15^{-/-}* e *PLPA^{-/-}* e principalmente nos animais *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* comprovando a modulação necessária pela PLP-A e a sua produção predominantemente, porém não exclusiva pelas células uNK. Estes resultados corroboram com o relato de que o PLP-A é um indutor de VEGF (Ain et al., 2003; Weimers et al 2003) e que na ausência das células uNK que apresentam ligantes para PLP-A, é notório que a produção do VEGF sofra uma regulação negativa.

Na avaliação de quais isoformas do VEGF são expressas e moduladas no endométrio mesometrial sob diferentes tensões de oxigênio, constatou-se que a isoforma VEGFA não sofre alterações nos animais CD1, porém, o incremento na expressão de VEGFA nos animais *IL15^{-/-}* mantidos em ambiente normóxico foi inesperado, considerando que as uNK seriam as principais fontes produtoras deste fator vasculogênio. Pela hibridação *in situ*, a expressão desta isoforma nos animais CD1 estava distribuída entre as células uNK e endoteliais do endométrio mesometrial, enquanto nos animais *IL15^{-/-}* estavam distribuídas também nas células estromais. A expressão gênica destas isoformas nos animais *PLPA^{-/-}* foi semelhante ao dos animais CD1 e não apresentaram diferenças entre normóxia e hipóxia. Pelo mecanismo conhecido da regulação pelo PLP-A, a isoforma VEGFA seria aquela modulada positivamente. Contudo, pelo perfil de

resposta da expressão do VEGFA nos animais experimentais avaliados, conclui-se que há um mecanismo compensatório na produção de VEGFA promovido pelas demais populações celulares presentes neste ambiente, não sendo as células uNK sob o efeito do PLP-A, as principais produtoras.

O VEGFB foi à isoforma que apresentou menor variação entre os animais em normóxia, porém foi a isoforma que sofreu modulação positiva sob hipóxia em todos os grupos de animais, demonstrando ser esta a isoforma mais sensível para alterações na tensão de oxigênio. Esta é a isoforma menos estudada no ambiente uterino devido a sua pequena expressão, porém, a sua sensibilidade à hipóxia sugere uma participação que merece atenção futura com estudos específicos com esta isoforma.

Comparativamente os níveis de expressão da isoforma VEGFC foi a mais elevada entre as outras duas isoformas nos animais CD1 e nos animais *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}*. Esta isoforma apresentou modulação negativa sob hipóxia somente nos animais CD1, enquanto nos demais ocorria à modulação positiva, sugerindo mecanismos distintos na regulação da expressão do VEGFC no endométrio mesometrial. A hibridação *in situ* demonstra forte expressão desta isoforma nas células uNK, o que está de acordo com os relatos de Kalkunte e colaboradores (2008). Estes autores relatam ainda que o VEGFC ocorre também nas células uNK presentes nas fases iniciais e secretória do ciclo uterino contribuindo na remodelação vascular do endométrio.

O conjunto dos nossos resultados demonstra que a principal isoforma do VEGF envolvido na manutenção da gestação é o VEGFC e não o VEGFA, inclusive participando do processo angiogênico, sendo estes dados confirmados através dos animais *PLPA^{-/-}*. Esta manutenção envolve primariamente a remodelação vascular e desenvolvimento placentário, que tem ainda a importante participação de outros mediadores vasoativos como o óxido nítrico. A vascularização endometrial adequada parece ser determinante

para o sucesso gestacional, e a sua deficiência, como as observadas nos animais *IL15^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* pode ser o fator crítico que causa o aumento nas perdas gestacionais.

No sucesso gestacional, o balanço adequado das citocinas tem sido apontado como fator determinante (Saito et al., 2005), e de acordo com os nossos resultados, os animais geneticamente modificados apresentam desequilíbrios ou susceptibilidade na expressão de citocinas tais como IFN γ e TNF α , que em níveis inadequados podem ser os mediadores da condução das perdas ou interrupções da gestação. Neste desequilíbrio, as células uNK aparecem como protagonistas principais, uma vez que, são consideradas as principais produtoras destas citocinas que embora essenciais para a manutenção da homeostasia da gestação, quando em desequilíbrio podem assumir o seu papel na produção de citocinas proinflamatórias. O conjunto de resultados obtidos neste experimento sugere ainda que a capacidade citotóxica das células uNK é multifatorial envolvendo não apenas citocinas pró-inflamatórias, mas também a repressão da expressão de fatores de crescimento como o VEGF, ou mesmo a geração do NO, ambas necessárias para a remodelação vascular podendo resultar indiretamente na falência da homeostasia da interface materno-fetal induzindo às perdas gestacionais.

- CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos no presente experimento, pode-se concluir que

- 1) A ausência de células uNK no útero gestante em decorrência da deleção do gene IL15 acarreta no aumento de sítios de desenvolvimento embrionário anormal no período pré-placentário contrariando os dados utilizando os animais provenientes da linhagem C57/Bl6, sugerindo a importância da participação das células uNK no sucesso gestacional;
- 2) A rede vascular do endométrio mesometrial dos animais depletados de células uNK apresentava na vasculogênese local menor proporção de células endoglin-positivas decorrente possivelmente da modelação exercida por estas células através de mediadores angiogênicos produzidos temporal e espacialmente;
- 3) A hipóxia pode contribuir como fator exógeno que aumenta perdas gestacionais nos animais CD1 e depletados do gene IL15 e PLP-A, porém esta não é decorrente da ativação dos mediadores citotóxicos como a perforina, TNF- α elevado e parece ser controlada pelo incremento do receptor citoprotetor TNFR2;
- 4) A expressão das isoformas de VEGFA, VEGFB e VEGFC sugere mecanismos de controle múltiplo por este fator de crescimento vascular e angiogênico, podendo ocorrer mecanismos compensatórios na

produção destes, mesmo na ausência de células uNK considerada a principal produtora das isoformas A e C;

- 5) As células da interface materno-fetal do útero gestante no período pré-placentário suportam a hipóxia de 48hs, respondendo com mecanismos regulatórios integrados que sustentam adequadamente o sucesso gestacional;
- 6) O gene PLP-A é um dos responsáveis pela produção de VEGF, porém aparentemente outras vias estão envolvidas, pois nos animais depletados de PLP-A houve produção contínua de VEGF;
- 7) A expressão de VEGF (3 isoformas), do IFN- γ e do NO, gerado pelas isoformas iNOS e eNOS, nos animais depletados de células uNK e do gene PLP-A configuram a extraordinária capacidade compensatória das células da interface materno-fetal no controle da homeostasia para assegurar o sucesso gestacional.

DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA E GRÁFICOS

6- DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

DBA LECTIN

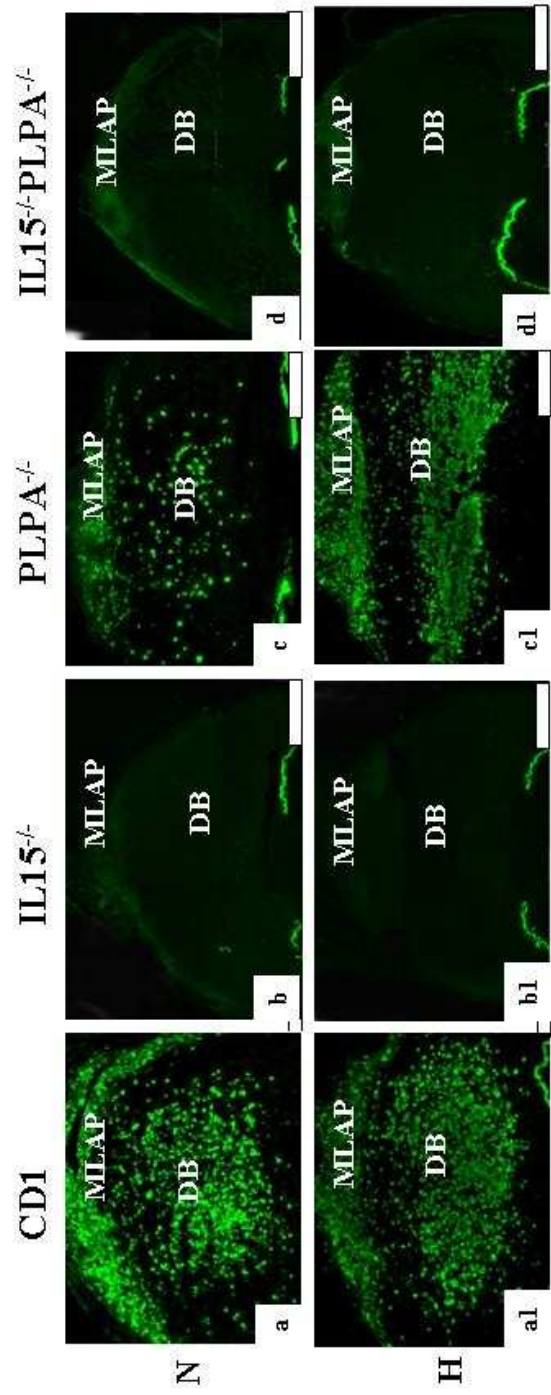


Figura 1

Figura 1a-d: Fotomicrografias da citoquímica de lectina DBA em microscopia de fluorescência evidenciando a incidência e distribuição das células uNK na região do MLAP (M) e endométrio decidualizado (E) do útero gestante (10 dg) de camundongos CD1, *PLPA*^{-/-}, *IL15*^{-/-} e *IL15*^{-/-}*PLPA*^{-/-} em normóxia (a-b) e hipóxia (a1-d1), respectivamente. Notar a menor incidência de células uNK DBA positivas nos animais *PLPA*^{-/-} (b) e ausência completa nos animais *IL15*^{-/-} (c,c1) e *IL15*^{-/-}*PLPA*^{-/-} (d,d1). Limite da placenta representado pela linha pontilhada. Barra: 70µm.

PERFORIN

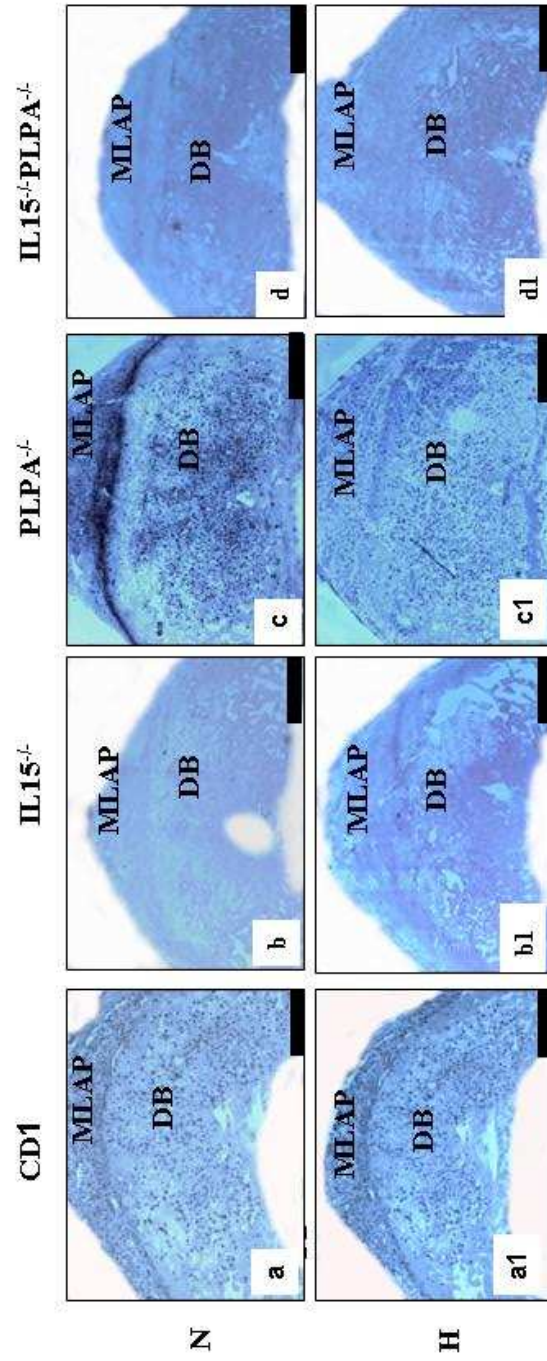


Figura 2

Figuras 2a-d: Fotomicrografias demonstrando a distribuição e incidências de células perforina positivas no útero gestante (10dg) de animais CD1, $PLPA^{-/-}$, $IL15^{-/-}$, $IL15^{-/-} PLPA^{-/-}$, em normóxia (a,b,c,d) e hipóxia (a1,b1,c1,d1). Células perforina positivas foram encontradas distribuídas na região do MLAP (M) e endométrio decidualizado (E) dos animais CD1 (a,a1) e $PLPA^{-/-}$ (b,b1) normóxicos e hipóxicos, porém ausentes nos animais $IL15^{-/-}$ (c,c1) e $IL15^{-/-} PLPA^{-/-}$ (d,d1). Limite da placenta é representada pelas linhas pontilhadas. Barra: 70 μ m.

TROMA-I

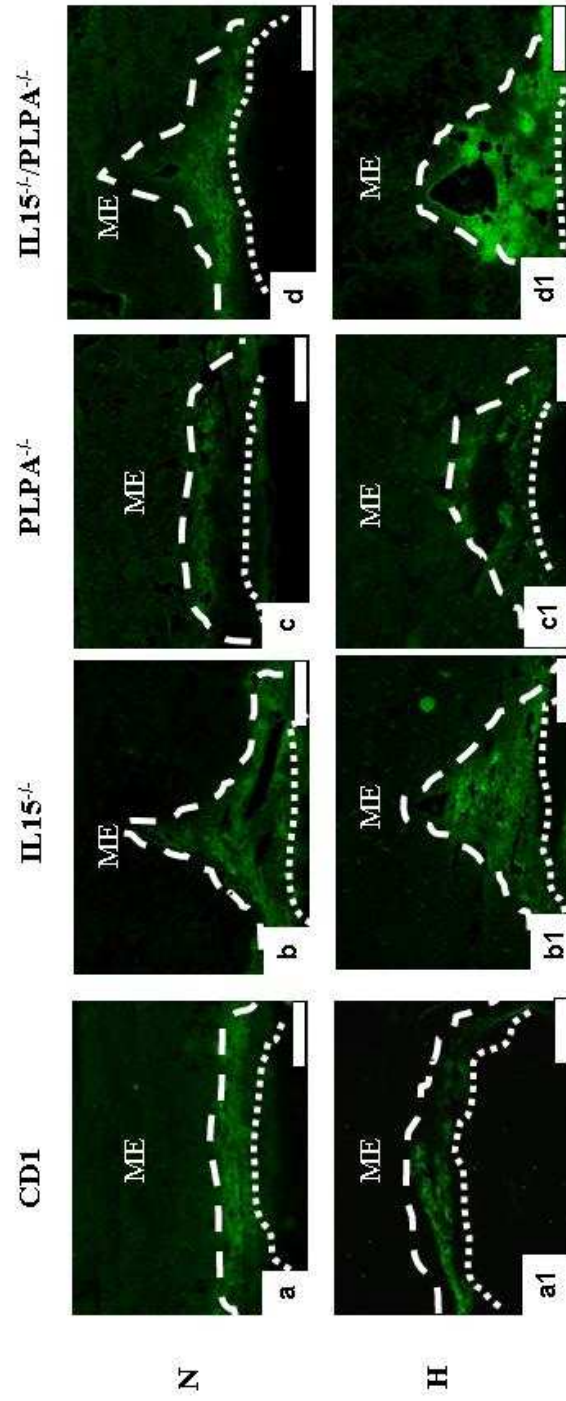


Figura 3

Figuras 3a-d: Fotomicrografias demonstrando a distribuição de células trofoblásticas positivas para TROMA-I no útero gestante (10dg) de animais CD1, *PLPA*^{-/-}, *IL15*^{-/-}, *IL15*^{-/-}*PLPA*^{-/-}, em normóxia (a,b,c,d) e hipóxia (a1,b1,c1,d1). Linha pontilhada – base da frente de invasão das células trofoblásticas gigantes e linha esparsa representa ponto final da frente de invasão das células trofoblásticas gigantes Barra: 50µm.

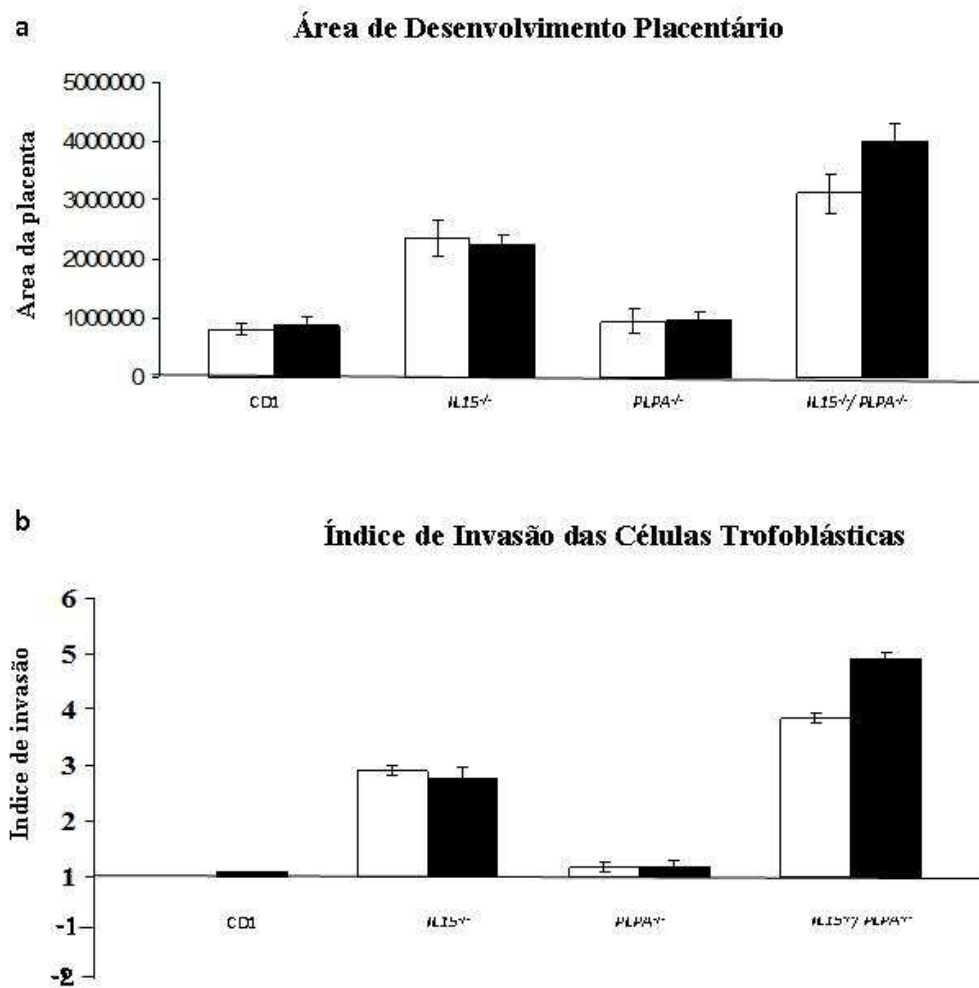


Figura 4

Figura 4: A) Histograma representativo da quantificação da área da placenta em formação, assim como o índice de invasão destas (B) dos animais gestantes no 10º dg mantidos em ambiente normóxico (coluna branca) e hipóxico (coluna preta). Confirma-se que houve diferença estatística na quantidade de células trofoblásticas que invadiram o compartimento mesometrial apenas nos animais IL15^{-/-} e IL15^{-/-}/PLPA^{-/-} tanto mantidos em ambiente normóxico como hipóxico.

ENDOGLIN

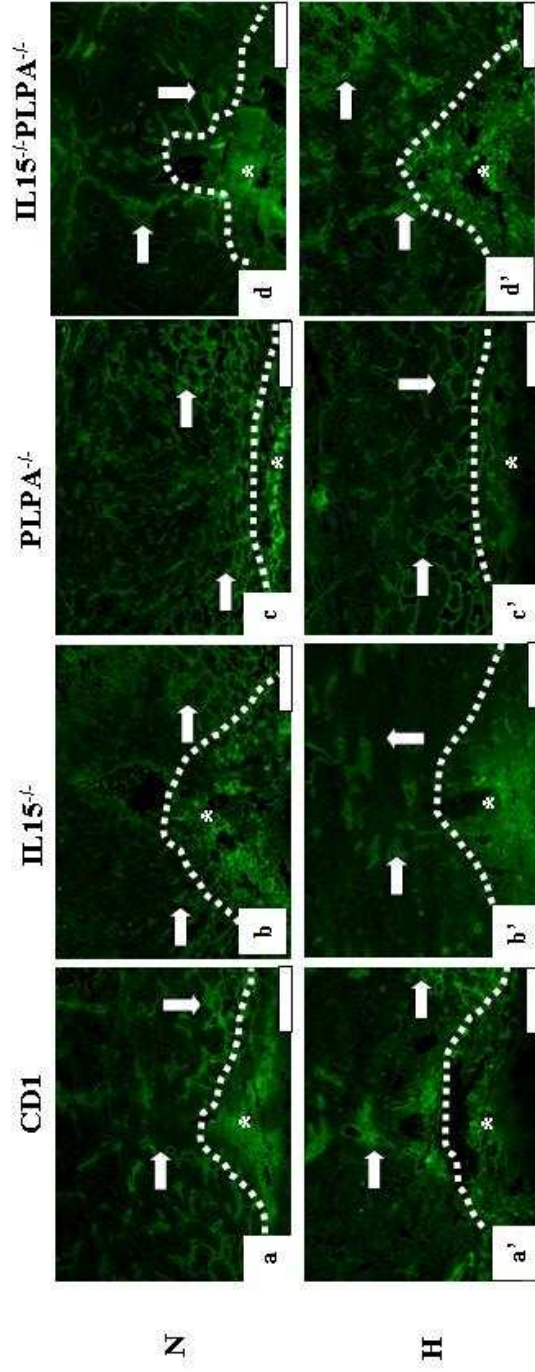


Figura 4

Figura 5a-d: Fotomicrografia da imunofluorescência para anti-endoglin evidenciando a área da região mesometrial dos animais CD1, $IL15^{-/-}$, $PLPA^{-/-}$ e $IL15^{-/-}PLPA^{-/-}$ no 10 dg em normóxia (a,b,c,d) e hipóxia (a1,b1,c1,d1) respectivamente. A reação positiva evidencia células endoteliais (setas) revestindo vasos que contornam as trabéculas de células deciduais e as células trofoblásticas do cone ectoplacentário (*). Notar a menor reatividade nos vasos dos animais CD1 submetido a hipóxia (a1) em relação à normóxia (a) e a menor incidência de vasos endoglin positivos nos animais $IL15^{-/-}$ em normóxia e hipoxia (b,b1). O endométrio decidualizado dos animais $PLPA^{-/-}$ (c,c1) apresenta maior profusão de células endoteliais-endoglin positivas (setas), assim como, o maior avanço de células trofoblásticas para o interior do endométrio, enquanto animais $IL15^{-/-}PLPA^{-/-}$ apresentam poucas células endoglin positivas em normóxia (d) e maior profusão sob o efeito da hipóxia (d1). Limite da placenta representado pelas linhas pontilhadas. Barra: 10µm.

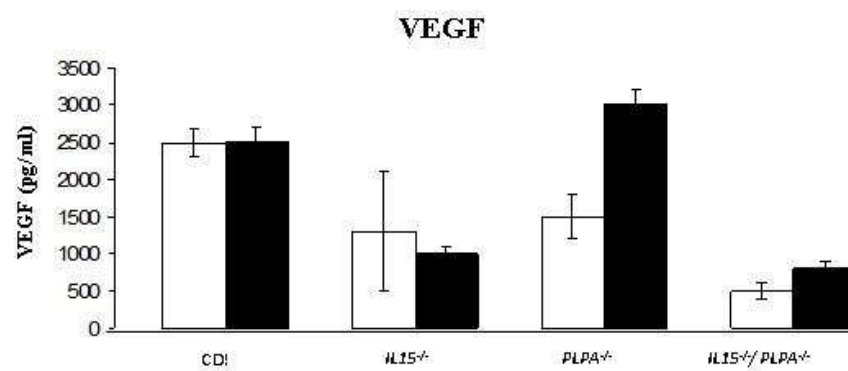


Figura 6

Figura 6: Quantificação pelo método de ELISA da expressão proteica de IFN γ na região mesometrial de animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} mantidos em condição de normóxia (coluna branca) e hipóxia (coluna preta). Valores obtidos da média de 4 experimentos independentes ($p < 0.05$).

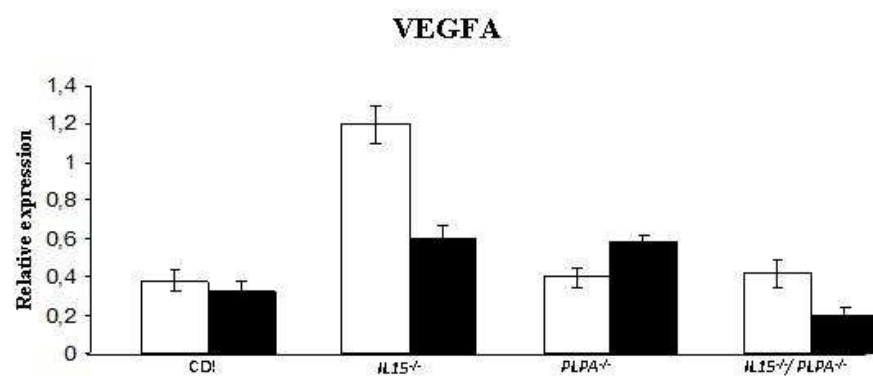


Figura 7

Figura 7: Histograma dos valores obtidos em qRT-PCR normalizada com o gene endógeno 18S da expressão do RNAm de VEGFA na região mesometrial dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} mantidos em condição de normóxia (coluna branca) e hipóxia (coluna preta). Valores obtidos da média de 4 experimentos independentes ($p < 0.05$).

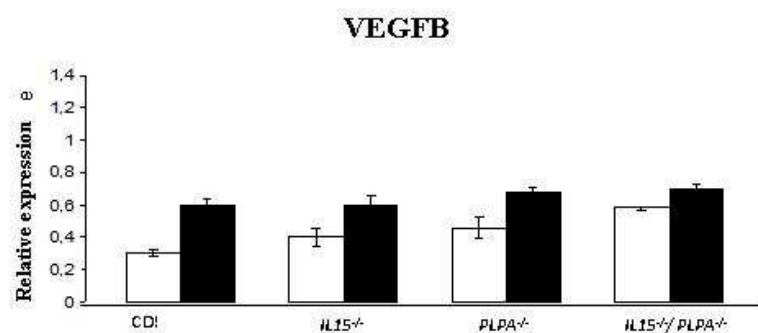


Figura 8

Figura 8: Histograma dos valores obtidos em qRT-PCR normalizada com o gene endógeno 18S da expressão do RNAm de VEGFB na região mesometrial dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} mantidos em condição de normóxia (coluna branca) e hipóxia (coluna preta). Valores obtidos da média de 4 experimentos independentes ($p < 0.05$).

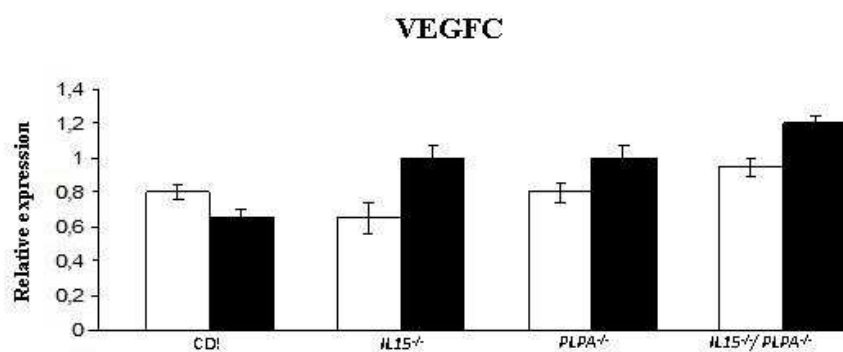
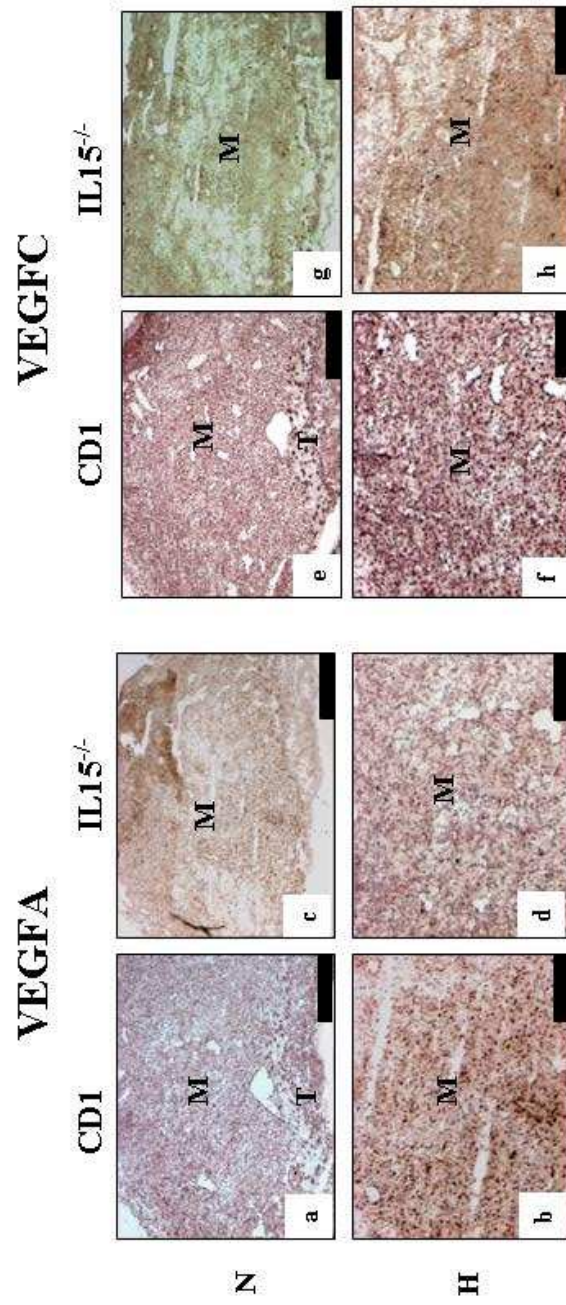


Figura 9

Figura 9: Histograma dos valores obtidos em qRT-PCR normalizada com o gene endógeno 18S da expressão do RNAm de VEGFC na região mesometrial dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} mantidos em condição de normóxia (coluna branca) e hipóxia (coluna preta). Valores obtidos da média de 4 experimentos independentes ($p < 0.05$).

HIBRIDAÇÃO IN SITU



Figuras 10a-d: Hibridização *in situ* dos genes VEGFA (a-d) e VEGFC (e-h) na região mesometrial do útero gestante (10dg) de animais CD1 e *IL15*^{-/-} mantidos em normóxia e hipóxia. (a-d) - VEGFA está expressa nas células trofoblásticas do cone ectoplacentário (T) e em algumas células do endométrio decidualizado dos animais CD1 em normóxia (a), as quais aumentam em condições de hipóxia (b). Nos animais *IL15*^{-/-} a expressão ocorre nas células trofoblásticas e em algumas células endoteliais do endométrio em normóxia (c) que aumenta sob hipóxia (d). (e-h) - expressão de VEGFC nas células trofoblásticas e em algumas células distribuídas no endométrio decidualizado de CD1 (e), as quais aumentam significativamente sob hipóxia (f), enquanto nos animais *IL15*^{-/-} a expressão é pouco evidente nas células trofoblásticas e compartimento endometrial tanto em normóxia (g) quando em hipóxia (h). Limite da placenta representado pelas linhas pontilhadas.

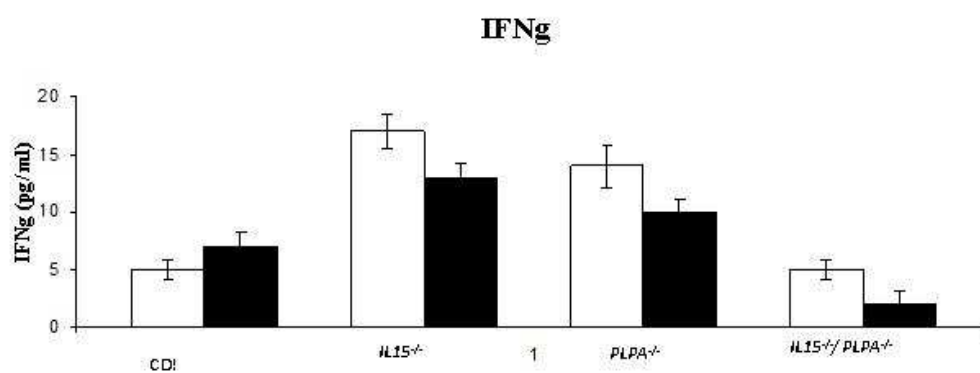


Figura 11

Figura 11: Quantificação pelo método de ELISA da expressão proteica de IFN γ na região mesometrial de animais CD1, IL15^{-/-}, PLPA^{-/-} e IL15^{-/-}/PLPA^{-/-} mantidos em condição de normóxia (coluna branca) e hipóxia (coluna preta). Valores obtidos da média de 4 experimentos independentes ($p < 0.05$).

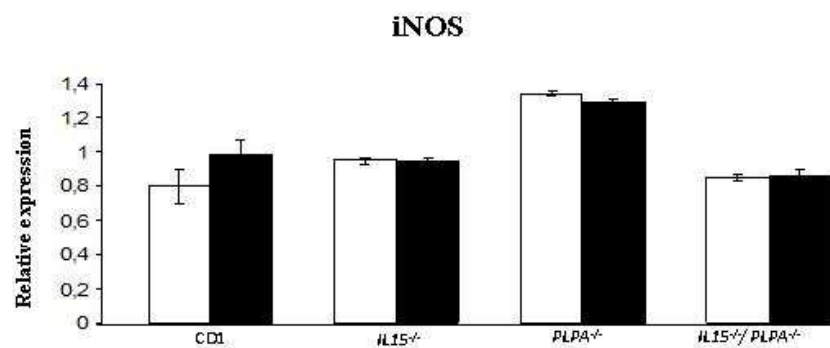


Figura 12

Figura 12: Histograma dos valores obtidos em qRT-PCR normalizada com o gene endógeno 18S da expressão do RNAm da iNOS na região mesometrial dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} mantidos em condição de normóxia (coluna branca) e hipóxia (coluna preta). Valores obtidos da média de 4 experimentos independentes ($p < 0.05$).

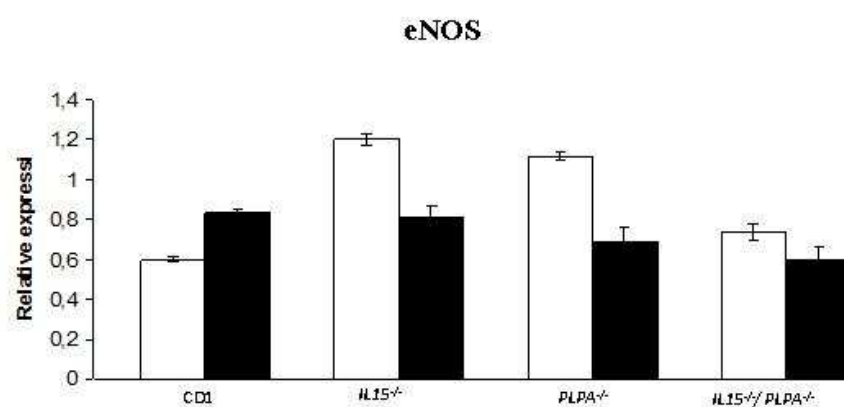


Figura 13

Figura 13: Histograma dos valores obtidos em qRT-PCR normalizada com o gene endógeno 18S da expressão do RNAm da eNOS na região mesometrial dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} mantidos em condição de normóxia (coluna branca) e hipóxia (coluna preta). Valores obtidos da média de 4 experimentos independentes ($p < 0.05$).

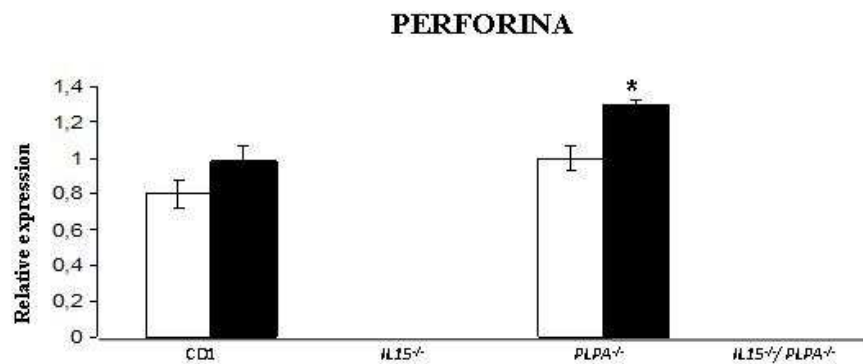


Figure 14

Figura 14: Histograma dos valores obtidos em qRT-PCR normalizada com o gene endógeno 18S da expressão do RNAm da perforina na região mesometrial dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} mantidos em condição de normóxia (coluna branca) e hipóxia (coluna preta). Valores obtidos da média de 4 experimentos independentes (p<0.05).

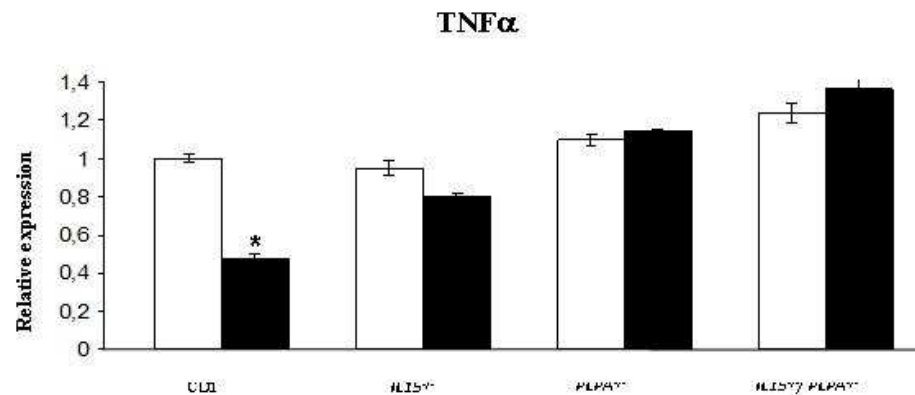


Figura 15

Figura 15: Histograma dos valores obtidos em qRT-PCR normalizada com o gene endógeno 18S da expressão do RNAm do TNF α na região mesometrial dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} mantidos em condição de normóxia (coluna branca) e hipóxia (coluna preta). Valores obtidos da média de 4 experimentos independentes ($p < 0.05$).

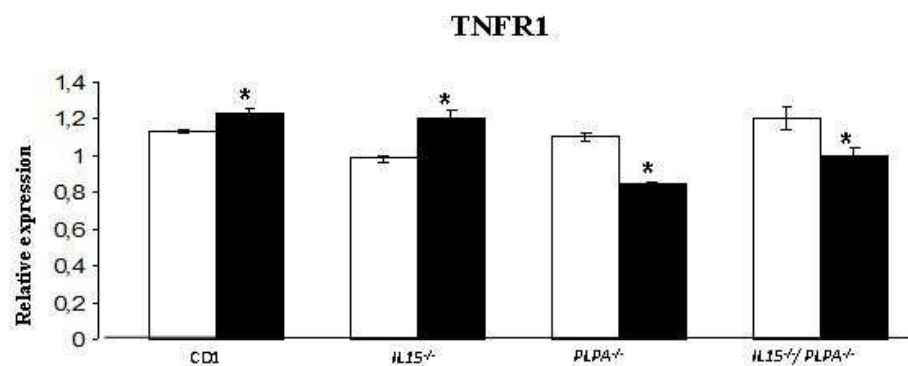


Figure 16

Figura 16: Histograma dos valores obtidos em qRT-PCR normalizada com o gene endógeno 18S da expressão do RNAm do TNFR1 na região mesometrial dos animais CD1, *IL15^{-/-}*, *PLPA^{-/-}* e *IL15^{-/-}/PLPA^{-/-}* mantidos em condição de normóxia (coluna branca) e hipóxia (coluna preta). Valores obtidos da média de 4 experimentos independentes ($p < 0.05$).

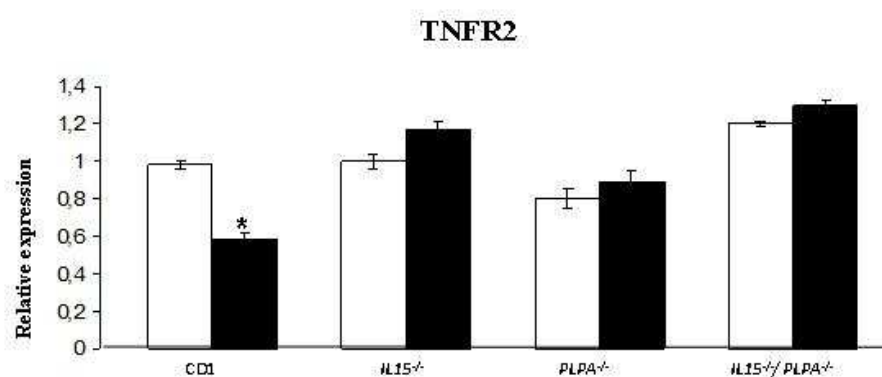


Figure 17

Figura 17: Histograma dos valores obtidos em qRT-PCR normalizada com o gene endógeno 18S da expressão do RNAm do TNFR2 na região mesometrial dos animais CD1, *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-} e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} mantidos em condição de normóxia (coluna branca) e hipóxia (coluna preta). Valores obtidos da média de 4 experimentos independentes ($p < 0.05$).

TABELAS E ANEXOS

7- ANEXOS

Tabela I: Sequência *sense* e *anti-sense* de primers utilizados para PCR e suas respectivas temperaturas de anelamento e tamanhos dos transcritos.

Gene	Sense primer	Anti-sense primer	Amplicon (pb)	Temp. anelamento
VEGF-A	ACTGGACCCTGGCTTTTCATG	CTATGTGCTGGCTTTGGTGA	323	56
VEGF-B	CCTGGAAGAACACAGCCAA	CTGGAAAGCAGCTTGTCCT	338	53
VEGF-C	ACCTCCATGTGTGTCCGTCT	GTCTTCACTCAGCTCCTTGT	409	55
Perforina	GATGTGAACCAAGGCCAG	AGGGCTGTAAGGACCGAGA	316	55
iNOS	AAAGGAGAACGTTGGATTG	CATCCAGAGTGAGCTGGTAGG	578	55
eNOS	AGAACCTGTGGCTGTGGAAC	GCAGGGCAAGTTAGGATGAG	555	57
TNF-α	CCGATGGGTTGTACCTTGTC	TTGGACCCTGAGCCATAATC	452	58
TNFR1	GGAGGACCGTACCCTGATCT	GTTCTTTGGACTTGGTTAG	372	55
TNFR2	GCCCACTTGTTAAGGCGCTG	CAGCCATTGTTACATCCAC	484	56
b-actin	CAGCTTCTTTGCAGCTCCTT	CCATCACAATGCCTGTGG	432	56

Tabela II: Sequências *sense* e *anti-sense* de primers usados para qRT-PCR e seus respectivos tamanho dos transcritos.

Gene	Sense primer	Anti-sense primer	Amplicon (pb)
VEGF-A	CACGACAGAAGGAGAGCAGAA	CTATGTGCTGGCTTTGGTGA	265
VEGF-B	ATTCGATTACGGAATGCCGTAA	ATTCGCTAGGAACCTTAGGA	243
VEGF-C	ACCTCCATGTGTGTCCGTCTAG	GCCTGACACTGTGGTAATGT	255
Perforina	ATTACGGTGATATTGATTACG	AATCGGTAGCGGTAAGTTAC	257
iNOS	AAAGGAGAACGTTGGATTG	GTGGCCTTGTGGTGAAGAGT	339
eNOS	AGAACCTGTGGCTGTGGAAC	GTGCGTAGCAGTCGAAGGA	164
TNF-α	CCGATGGGTTGTACCTTGTC	TGGCGTACAAGTGACGGTAC	232
TNFR1	GGAGGACCGTACCCTGATCT	GTTCTTTGGACTTGGTTAG	233
TNFR2	GCCCACTTGTTAAGGCGCTG	CAGCCATTGTTACATCCAC	241
18S	GCAATTATTCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA	122

Tabela III: Proporção de sítios de desenvolvimento embrionário anormais em relação ao número de sítios totais encontrados no 10^o dg. em animais CD1 e geneticamente modificados para *IL15*^{-/-}, *PLPA*^{-/-}; e *IL15*^{-/-}/*PLPA*^{-/-} mantidos em normóxia e em hipóxia

	CD1	<i>IL15</i>^{-/-}	<i>PLPA</i>^{-/-}	<i>IL15</i>^{-/-}/<i>PLPA</i>^{-/-}
Normoxia	1:30,5 (n=15)	1;5,0 (n=8)	1:6,6 (n=13)	1:5,8 (n=8)
Hipóxia	1;16,1 (n=13)	1;4,6 (n=5)	1;8,1 (n=8)	1:7,4 (n=8)

(n) – número de animais

Tabela IV: Densidade de **células uNK-lectina DBA positivas** presentes na região MLAP e endométrio decidualizado do útero de camundongos CD1 e *PLPA*^{-/-} em normóxia e hipóxia no 10^o dg.

	Animais CD1		Animais <i>PLPA</i>^{-/-}	
Regiões do útero	Normóxia	Hipóxia	Normóxia	Hipóxia
MLAP	95% ± 5,0	81,3% ± 9,7	30,95% ± 10	77,2% ± 7,69
Endométrio	55,72% ± 2,46	77,35% ± 4,67	23,6% ± 2,84	56,97% ± 5,84

MLAP – Agregado linfóide mesometrial associado à gestação (*Mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy*).

Tabela V: Densidade de **células uNK-perforina positivas** presentes na região MLAP e endométrio decidualizado do útero de camundongos CD1 e *PLPA*^{-/-} no 10^odg mantidos em normóxia e hipóxia.

	Animais CD1		Animais <i>PLPA</i>^{-/-}	
Regiões do útero	Normóxia	Hipóxia	Normóxia	Hipóxia
MLAP	98% ± 2,0	91,7% ± 1,0	90 % ± 1,2	87,9% ± 6,79
Endométrio	75,7% ± 3,9	89,4% ± 5,37	83,6% ± 4,84	66% ± 5,34

MLAP – Agregado linfóide mesometrial associado à gestação (*Mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamson S L, Lu Y, Whiteley K J, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C, Cross J C. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. **Dev Biol.** 250, 358-73, 2002.

AIN R, CANHAM LN, SOARES MJ. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. **Dev Biol**, 260, 176-190, 2003.

AIN R, DAI G, DUNMORE JH, GODWIN AR, SOARES MJ. A prolactin family paralog regulates reproductive adaptations to a physiological stressor; **Proc Natl Acad Sci U S A**; 16543-8; 2004.

ALAM SM, AIN R, KONNO T, HO-CHEN JK, SOARES MJ. The rat prolactin gene family locus: species-specific gene family expansion. **Mamm Genome**; 858-77; 2006.

ALAM SM, KONNO T, DAI G, LU L, WANG D, DUNMORE JH, GODWIN AR, SOARES MJ. A uterine decidual cell cytokine ensures pregnancy-dependent adaptations to a physiological stressor; **Development**; 407-15; 2007.

AL-HIJJI J, ANDOLF E, LAURINI R, BATRA S. Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium. **Reprod Biol Endocrinol.** 1, 1-7, 2003.

ARNET UA, MCMILLIAN A, DINERMAN JL, BALLERMANN B, LOWENSTEIN CJ. Regulation of endothelial nitric oxide synthase during hypoxia. **J Biol Chem**, 21, 15069-15073, 1996.

ASHKAR AA, CROY BA. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. **Biol Reprod.**;61(2):493-502, 2000.

ASHKAR, AA; SANTO, JD; CROY, BA, Interferon- γ contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine Natural killer cell maturation during normal murine pregnancy, **J. Exp. Med**, 192, 259-269, 2001.

ASHKAR, A. A., BLACK, G. P., WEI, Q., HE, H., LIANG, L., HEAD, J. R., CROY, B. A. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. **J Immunol**. 171, 2937-44, 2003.

BALDWIN RL, STOLOWITZ ML, HOOD, L, WISNIESKI BJ. Structural changes of tumor necrosis factor- α associated with membrane insertion and channel formation. **Proc Natl Acad Sci, USA**, 93, 1021-1026, 1995.

BARBER EM, POLLARD JW; The uterine NK cell population requires IL-15 but these cells are not required for pregnancy nor the resolution of a *Listeria monocytogenes* infection; **J Immunol**; 37-46; 2003.

BEN-JONATHAN N. Dopamine and prolactin--an imperfect duo in circadian rhythmicity. **Endocrinology**. 137, 3619-20, 1996.

BURNETT TG, HUNT JS. Nitric oxide synthase-2 and expression of perforin in uNK cells. **J Immunol**. 164, 5245-5250, 2000.

BURNETT TG, TASH JS, HUNT, JS. Investigation of the role of nitric oxide synthase-2 in pregnancy using mutant mice. **Reprod**, 124, 49-57, 2002.

COLONNA, M, MORETTA A, VELY F, VIVIER E. A high-resolution view of NK cell receptors: structure and function. **Immunol Today**, 21, 428-431, 2000.

CHRISTOFFERSON RH. Comments on the direction of blood flow in the central placental vessel in the rat. **Teratology**. 47, 1-9, 1993.

CIFONE MG, ULISSE S, SANTONI A. Natural killer cells and nitric oxide. **Int Immunopharmacol**, 8, 1513-1524, 2001.

CROY BA, KISO Y. Granulated metrial gland cells: a natural killer cell subset of the pregnant murine uterus. **Microsc Res Tech**.25, 189-200, 1993.

CROY BA, ASHKAR AA, FOSTER RA, DISANTO JP, MAGRAM J, CARSON D, GENDLER SJ, GRUSBY MJ, WAGNER N, MULLER W, GUIMOND MJ. 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.

CROY BA, LINDER KE, YAGER JA. Primer for non-immunologists on immune-deficient mice and their applications in research. **Comp Med.**51, 300-13, 2001.

CROY BA. Interferon gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. **Biol Reprod**, 61, 493-502, 2000.

CROY BA, CHANTAKRU S, ESADEG S, ASHKAR AA, WEI Q. Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). **J Reprod Immunol.** 57, 151-68, 2002.

CROY BA, HE H, ESADEG S, WEI Q, MCCARTNEY D, ZHANG J, BORZYZCHOWSKI A, ASHKAR AA, BLACK GP, EVANS SS, CHANTAKRU S, VAN DEN HEUVEL M, PAFFARO VA JR, YAMADA AT. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction.**126, 149-60, 2003.

CROY BA, VAN DEN HEUVEL MJ, BORZYZCHOWSKI AM, TAYADE C. Uterine Natural Killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. **Immunol Rev**, 214, 161-185, 2006

CROY BA, ZHANG J, TAYADE C, COLUCCI F, YADI H, YAMADA AT. Analysis of uterine natural killer cells in mice. **Methods Mol Biol**.612:465-503, 2010.

DARNELL JE, JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, 1415-1421, 1994.

DARNELL JE, Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the JAK-STAT pathway. **J Interf Cytokie Res**, 18, 549-554, 1998.

DAVIES J, GLASSER SR. Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. **Acta Anat (Basel)**. 69, 542-608, 1968.

DEB S, YOUNGBLOOD T, RAWITCH AB, SOARES MJ. Placental prolactin-like protein A. Identification and characterization of two major glycoprotein species with antipeptide antibodies. **J Biol Chem**, 25, 14348-14353, 1989.

DUCKWORTH ML, PEDEN LM, FRIESEN HG; Isolation of a novel prolactin-like cDNA clone from developing rat placenta; **J Biol Chem**; 10879-84; 1986.

EL-HASHEMITE N, ZHANG H, WALKER V, HOFFMEISTER KM, KWIATKOWSKI DJ. Perturbed IFN γ - JAK signal transducers and activators of transcription signaling in tuberous sclerosis mouse models: synergistics effects of rapamycin-IFN γ treatment. **Cancer Res**, 64, 3436-3443, 2004.

ENDERS, A. C., WELSH, A. O., Structural interactions of trophoblast and uterus during hemochorial placenta formation. **J Exp Zool.** 266, 578-87, 1993.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. **Recent Prog. Horm. Res.**, 55, 15-35, 2000.

GAGIOTI S, SCAVONE C, BEVILACQUA E. Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. **Biol Reprod**, 62, 260-268, 2003.

GEORGIADES P, FERGUSON-SMITH A C, BURTON G J. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. **Placenta** 23, 3-19. 2002. Review.

GONÇALVES A, VIRET F, CICCOLI J, GENRE D, GRAVIS G, GIOVANNI M, CARMELO 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 adults advances solid tumors. **Clin Cancer Res**, 9, 102-108, 2003.

GUIMOND MJ, LUROSS JA, WANG B, TERHORST C, DANIAL S, CROY BA; Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in TgE26 mice; **Biol Reprod**; 169-79; 1997.

HALDER JB, ZHAO X, SOKER S, PARIA BC, KLAGSBRUN M, DAS SK, DEY SK. Differential expression of VEGF isoforms and VEGF(164)-specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for VEGF(164) in vascular permeability and angiogenesis during implantation. **Genesis**. 26, 213-24, 2000.

HANNA, J, MANDELBOIM, O. When killers become helpers. **Trends Immunol**. 28, 201-6, 2006.

HIRSH, E; FILIPOVICH, Y; MAHENDROO, M, Signaling via the type I IL-1 and TNF receptors is necessary for bacterially induced preterm labor in a murine model, **Am. J. Obst. And Gynecol**, 194, 1334-1340, 2006.

HLADUNEWICH M, KARUMANCHI SA, LAFAYETTE R; Pathophysiology of the clinical manifestations of preeclampsia; **Clin J Am Soc Nephrol**; 543-9; 2007.

HO-CHEN JK, AIN R, ALT AR, WOOD JG, GONZALEZ NC, SOARES MJ. Hypobaric hypoxia as a tool to study pregnancy-dependent responses at the maternal-fetal interface. **Methods Mol Med**, 122, 427-434, 2006.

HO-CHEN JK, BUSTAMANTE JJ, SOARES MJ. Prolactin-like protein F subfamily of placental hormones/cytokines: responsiveness to maternal hypoxia. *Endocrinol*, 148, 559-565, 2006.

HUNT JS, MILLER L, CASSMER D, CROY BA. Expression of iNOS gene in mouse uterine leukocyte and potential relationships with uterine function during pregnancy. **Biol Reprod**. 57, 827-836, 1997.

JAKEMAN LB, ARMANINI M, PHILLIPS HS, FERRARA N. Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. **Endocrinology**. 133, 848-59, 1993.

KAJIWARA, K; SAITO, A; OGATA, S; TANIHARA, M, Synthetic peptides corresponding to ligand-binding region of death receptors, DR5, Fas, and TNFR, specifically inhibit cell death mediated by the death ligands, respectively, **Biochemica et Biophysica Acta**, 1699, 131-137, 2004.

KAKUI K, SAGAWA N, ITOH H, YURA S, KORITA D, TAKEMURA M, NUAMAH MA, FUJII S. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the human placenta is not altered by labor. **Endocrinol J**, 50, 535-544, 2003.

KALKUNTE S, LAI Z, TEWARI N, CHICHESTER C, ROMERO R, PADBURY J, SHARMA S; In vitro and in vivo evidence for lack of endovascular remodeling by third trimester trophoblasts; **Placenta**; 871-8; 2008.

KALKUNTE S, BOIJ R, NORRIS W, FRIEDMAN J, LAI Z, KURTIS J, LIM KH, PADBURY JF, MATTHIESEN L, SHARMA S. Sera from preeclampsia patients elicit symptoms of human disease in mice and provide a basis for an in vitro predictive assay. **Am J Pathol.**, 177, 2387-98, 2010.

KATOH Y, KATOH M. Comparative integromics on VEGF family members. *Int J Oncol*, 28, 1585-1589, 2006.

KAWAMURA K, KAWAMURA N, KUMAGAI J, FUKUDA J, TANAKA T; Tumor necrosis factor regulation of apoptosis in mouse preimplantation embryos and its antagonism by transforming growth factor alpha/phosphatidylinositol 3-kinase signaling system; **Biol Reprod**; 611-8; 2007.

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, 6-10, 2003.

LANDEMANN, U; KALLUNK, T;JAATEELLA, M; A20 zinc finger protein inhibits TNF-induced apoptosis and stress response early in the signaling cascades and independently of binding to TRAF2 or 14-3-3 protein, **Cell death and Differentiation**, 8, 265-272, 2001.

LASH GE, OTUN HA, INNES BA, PERCIVAL K, SEARLE RF, ROBSON SC, BULMER JN. Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine Natural Killer cells is dependent on gestational age. **Hum Reprod**, 25, 1137-1145, 2006.

LIN, NT, YANG, FL, LEE, RP, PENG, TC, CHEN, HI; Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: the time course in conscious and septic rats; **Life Sci**;1038-43; 2006.

LIPPE, EMO; Avaliação da expressão das isoformas da óxido nítrico sintase nas células da interface materno fetal na gestação normal e com lesão embrionária, UNICAMP, 2007.

MacEWAN, The receptor subtypes signaling: Differences and cellular consequences, **Cellular Signalling**, 14, 477-492, 2002.

MAIURI MC, SE ESTEFANO D, MELE G, IOVINE B, BEVILACQUA MA, GRECO L, AURICCHIO S, CARNUCCIO R. Gliadin increases iNOS gene expression in IFNg stimulated RAW 264.7 cells through a mechanism involving NF-kappa B. **Naunyn Schimiedebergs Arch Pharmacol**, 368, 153-161, 2003.

MAYNARD S, EPSTEIN FH, KARUMANCHI SA; Preeclampsia and angiogenic imbalance; **Annu Rev Med**; 61-78; 2008.

MILLER BH, FRATTI RA, POSCHET JF, TIMMINIS GS, MASTER SS, BURGOS M, MARLETTA MA, DERETIC . Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. **Infect Immunol**, 72, 2872-2878, 2004.

MOFFETT, A, LOKE, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. **Nat Rev Immunol.** 6, 584-94, 2006a.

MOFFETT, A, LOKE, C. Implantation, embryo-maternal interactions, immunology and modulation of the uterine environment -- a workshop report. **Placenta.** 27 Suppl A, S54-5, 2006b.

MONK JM, LEONARD S, MCBEY BA, CROY BA. Induction of murine spiral artery modification by recombinant human interferon-gamma. **Placenta.** 26, 835-8, 2005.

MURPHY SP, HANNA NN, FAST LD, SHAW SK, BERG G, PADBURY JF, ROMERO R, SHARMA S. Evidence for participation of uterine natural killer cells in the mechanisms responsible for spontaneous preterm labor and delivery. **Am J Obstet Gynecol.** 200, 308.1-9, 2009.

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-clamptic and IUGR pregnancies. **J Histochem Cytochem,** 45, 1433-1438, 1997.

NAGAMATSU, T., FUJII, T., KUSUMI, M., ZOU, L., YAMASHITA, T., OSUGA, Y., MOMOEDA, M., KOZUMA, S., TAKETANI, Y. Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental

vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. **Endocrinology**, 145, 4838-45, 2004.

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.

ORANGE SJ, PAINTER D, HORVATH J, YU B, TRENT R, HENNESSY A. Placental eNOS localization and expression in normal human pregnancy and preeclampsia. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 30, 376-381, 2003.

PAFFARO VA JR, BIZINOTTO MC, JOAZEIRO PP, YAMADA AT. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. **Placenta**.24, 479-88, 2003.

PEEL, S, STEWART, IJ; 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**; 127-30, 1983.

PEEL S, STEWART IJ. 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, 1989.

PIJNENBORG, R, VERCRUYSSSE, L, HANSSENS, M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. **Placenta**. 27, 939-58, 2006.

PURCELL TL, GIVEN R, CHAWALIZ K, GARFIELD RE. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. **Mol Hum Reprod**, 5, 467-475, 1999.

ROTHFUCHS AG, GIGLIOTTI D, PALMBLAD K, ANDERSON U, WIGZELL H, ROTTENBERG ME. IFN- α dependent, ifng secretion by bone marrow-derived macrophages controls an intracellular bacterial infection. **J IMMUNOL**, 167, 6453-6461, 2001

ROY, H., SHALINI, B., YLA-HERTTUALA, S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS**, 580, 2879-2887, 2006.

SAITO SY, SAKAI M; CD4(+)CD25 high regulatory T cells in human pregnancy; **J Reprod Immunol**; 111-20; 2005.

SAITO S, SAKAI M, SASAKI Y, NAKASHIMA A, SHIOZAKI A., Inadequate tolerance induction may induce pre-eclampsia. **J Reprod Immunol**. 76, 30-9, 2007.

SANCHEZ, SE; ZHANG, C; WILLIAMS, MA; WARE-JAUREGUI, S; LARRABURE, G; BAZUL, V; FARRAND, A; Tumor necrosis factor- α soluble receptor p55 (sTNFp55) and risk of preeclampsia in Peruvian women, **Journal of Reproductive Immunology**, 47, 49-63, 2000.

SCHÄFFER L, VOGEL J, BREYMANN C, GASSMANN M, MARTI HH. Preserved placental oxygenation and development during severe systemic hypoxia. **Endocrinology**. 146, 4682-9, 2005.

SCHÄFFER L, VOGEL J, BREYMANN C, GASSMANN M, MARTI HH; Preserved placental oxygenation and development during severe systemic hypoxia; **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**; 844-51; 2006.

SEMENZA GL; Hypoxia and human disease-and the Journal of Molecular Medicine; **J Mol Med**; 1293-4; 2007.

SENGER DR, CONNOLLY DT, VAN DE WATER L, FEDER J, DVORAK HF Purification of guinea pig tumor secreted vascular permeability factor. **Cancer Res**. 50, 1774-1778, 1990.

SENGER DR, GALLI SJ, DVORAK AM, PERRUZZI CA, HARVEY VS, DVORAK HF Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science**, 219, 983-5, 1983.

SERIN IS, OZCELIK B, BASBUG M, KILIC H, OKUR D, EREZ R. Predictive value of TNF in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 100, 143-145, 2002.

SESSA WC. Regulation of eNOS derived nitric oxide in healthy and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. RJ, 100, 15-18, 2005.

SHARMA S, MURPHY AJ, SOTO-QUIROS ME, AVILA L, KLANDERMAN NJ, SYLVIA JS, CELEDON JC, RABY BA, WEISS, ST. Association of VEGF polymorphisms with childhood asthma, lung function and airway responsiveness. **Eur Respir J**, 33, 1287-1294, 2009.

SHIMADA S, NISHIDA R, TAKEDA M, IWABUCHI K, KISHI R, ONOÉ K, MINAKAMI H, YAMADA H. Natural Killer, Natural Killer T, helper and cytotoxic T cells in the decidua from sporadic miscarriage. **Am J Reprod Immunol**, 56, 193-200, 2006.

SHIMIZU, T; TOMITA, Y; SON, K; NISHINARITA, S; SAWADA, S; HORIE, T, Elevation of serum soluble TNF receptor in patients with polymyositis and dermatomyositis, **Clin Reumatol**, 19, 352-359, 2000.

SOARES MJ, MÜLLER H, ORWIG KE, PETERS TJ, DAI G; The uteroplacental prolactin family and pregnancy; **Biol Reprod**; 273-84; 1998.

SOARES MJ. The prolactin and growth hormones families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. **Reprod Biol Endocrinol**, 5, 51, 2004.

SOARES MJ & LINZER DI. A standardized nomenclature or the mouse and rat prolactin superfamilies. **Mamm Genome**, 18, 154-156, 2001.

SOH J, DONNELLY RJ, KOTENKO S, MARIANO TM, COOK JR, WANG N, EMANUEL S, SCHWATRZ B, MIKI T, PETSKA, S. Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor. **Cell**, 76, 793-802, 1994.

TAKEMORI K, OKAMURA H, KANZAKI H, KOSHIDA M, KONISHI I. Scanning electron microscopy study on corrosion cast of rat uterine vasculature during the first half of pregnancy. **J Anat**. 138,163-731984.

TAKEMORI K, OKAMURA H, KANZAKI H, KOSHIDA M, KONISHI I, MORI T. Scanning electron microscopy study on corrosion casts of rat uterine vasculature during the second half of pregnancy and post partum. **J Anat**. 142, 21-31, 1985.

VALDES G, KAUFMANN P, CORTHON J, ERICES R, BROSNIHAN KB, JOYNER-GRANTHAM J. Vasodilatador factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. **Reprod Biol Endocrinol**, 31, 77-79, 2009.

VANDENABEELE, P; DECLERCQ, W; BEYAERT, R; FIERIS, W, Two tumor necrosis factor receptors: structure and function, **Trend in Cell Biology**, 5, 392-399, 1995.

VAN DER MEER A, LUKASSEN HGM, LIEROP MJC, WIJNADS F, MOSSELMAN S, BRAAT DDM, JOOSTEN I. Membrane-bound HLA-G activates proliferation and IFN γ production by uNK cells. **Mol Hum Reprod**, 10, 189-195, 2004.

VAN DER GOOT FG, PUGIN J, HRIBAR M, FRANSEN L, DUNANT Y, DE BAESTSELLIER P, BLOC A, LUCAS R. Membrane interaction of TNF is not sufficient to trigger increase in membrane conductance in mammalian cells. **FEBS Lett**, 460, 107-111, 1999.

WANG MX, MURREL FD, SZABO C, WARREN RF, SARRIS M, MURREL GAC. Nitric oxide in skeletal muscle: Inhibition of nitric oxide synthase inhibit walking speed in rats. **Nitric Oxide: Biol and Chemistry**, 5, 219-232, 2000.

WIEMERS DO, SHAO LJ, AIN R, DAI G, SOARES MJ. The mouse prolactin gene family locus. **Endocrinol**, 144, 313-325, 2003.

WU X, WEI H, ZHANG J, TIAN Z. Increased uNK –derived IFN γ and TNF α in C57Bl6 mice during early pregnancy. **Cell & Mol Immunol**, 3, 131-137, 2006.

YADI H, BURKE S, MADEJA Z, HEMBERGER M, MOFFETT A, COLUCCI F. Unique receptor repertoire in mouse uterine NK cells. **J Immunol**. 181,6140-7, 2009.

YE W, ZHENG LM, YOUNG JD, LIU CC. The involvement of IL15 in regulation the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. **J Exp Med**, 184, 2406-2410, 1996.

YOSHIKI N, KUBOTA T, ASO T. Expression and localization od iNOS in human non-pregnant and early pregnant endometrium. **Mol Hum Reprod**, 6, 283-287, 2000.

ZENCLUSSEN AC, SOLLWEDEL A, BERTOAB, GERLOF K, ZENCLUSSEN ML, WOICIECHOWSKY C, VOLK H, Heme oxigenase as a therapeutic target in immunological pregnancy complication. **Internat Immunopathol**, 41-51, 2005.

ZHANG JH, YAMADA AT, CROY BA. DBA-lectin reactivity defines Natural Killer cells that have homed to mouse decidua. **Placenta**, 30, 968-973, 2009.

ZHENG LM, OJCIUS DM, YOUNG JD. Role of granulated metrial gland in the immunology of pregnancy. **Am J Reprod Immunol**, 25, 72-76, 1991.



CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 2111-2, sobre "Avaliação do diálogo entre células imunomoduladoras através do TNF- α e TNFR no útero gestante de camundongos normais e submetidos à lesão mecânica do embrião", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Áureo T. 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 no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em 28 de junho de 2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 2111-2, entitled "Evaluation of dialogue between immunomodulate cells through TNF- α and TNFR in the pregnancy uterus of normal mice and submitted embryo lesion", 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 June 28, 2010.

Campinas, 28 de junho de 2010.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>