



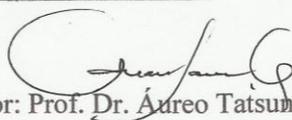
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PATRÍCIA DANIELE AZEVEDO DE LIMA

**“DUALIDADE FUNCIONAL DAS CÉLULAS uNK DE
CAMUNDONGOS DURANTE A GESTAÇÃO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Patrícia Daniele Azevedo de Lima
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. Aúreo Tatsumi Yamada

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

L628d

Lima, Patricia Daniele Azevedo, 1984-
Dualidade funcional das células uNK de
camundongos durante a gestão / Patricia Daniele
Azevedo Lima. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

1. Prenhez. 2. Células uNK. 3.
Neovascularização. 4. Atividade lítica. 5. Lisossomo
secretor. I. Yamada, Áureo Tatsumi, 1957-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Dual capacities of mice uNK cells

Palavras-chave em Inglês:

Animal pregnancy

uNK cells

Angiogenesis

Lytic activity

Secretory lysosome granules

Área de concentração: Histologia

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Áureo Tatsumi Yamada [Orientador]

Maria Terezinha Serrão Peraçoli

Valdemar Antonio Paffaro Junior

Luís Antônio Violin Dias Pereira

Paulo Pinto Joazeiro

Barbara Anne Croy

Data da defesa: 29-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

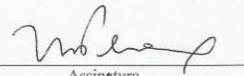
Campinas, 29 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada (Orientador)


Assinatura

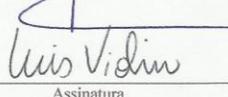
Profª. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli


Assinatura

Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior


Assinatura

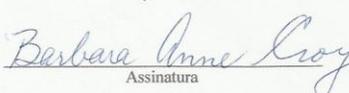
Prof. Dr. Luís Antônio Violin Dias Pereira


Assinatura

Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro


Assinatura

Profª. Dra. Bárbara Anne Croy (Convidada)


Assinatura

Profª. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Assinatura

Profª. Dra. Cristina Pontes Vicente

Assinatura

Dedico esta tese:

Aos meus pais, responsáveis por meu carácter e personalidade. Por me ensinarem que os desafios existem para serem superados, e que não se deve ter medo do trabalho.

Aos meus irmãos, Lari, Jacqui e Buiu, por mesmo longe, estarem tão próximos do meu coração.

À minha amiga Karina, irmã de coração!

Ao Matt, meu pela paciência e amor.

Ao Aurco, meu professor e amigo, pelos ensinamentos e por acreditar no meu potencial. Pelos incentivos e dedicação a mim.

"Most people say that it is the intellect which makes a great scientist. They are wrong: it is character."

Albert Einstein

Agradecimentos

À Deus, meu guia que nunca me desampara.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da UNICAMP e a Capes pela oportunidade para a realização do meu Doutorado.

Ao CNPq, pelo financiamento técnico durante meu doutoramento e pela concessão da bolsa SWE, a qual me proporcionou a oportunidade da experiência científica no exterior.

À secretária do programa de pós-graduação em Biologia Celular e estrutural, Lillian, pelo imenso carinho e atenção.

Ao Professor Dr. Áureo Yamada, por todos os ensinamentos técnicos e discussões intelectuais. Pela disposição, paciência e amor pelo o que faz.

Ao Professor Dr. Paulo Joazeiro, pelas conversas intelectuais e tempo em escutar minha idéias e dúvidas. À Professora Dr. Célia da Universidade Estadual de Londrina, pela disponibilidade e ajuda.

À Professora Dra. Anne Croy, pela hospitalidade e contribuição científica, e principalmente pelo incentivo e paixão pela pesquisa. Ao Professor Dr. Chandra Taydade pela ajuda técnica durante meu estágio na *Queen's University*, Canadá. Aos colegas de laboratório da *Queen's University*, pela ajuda técnica e paciência.

Aos professores e técnicos do Departamento de Histologia e Embriologia da Unicamp.

Aos membros da banca: Prof.Dra. Maria Terezinha Peraçoli, Prof.Dr. Valdemar Antônio Paffaro Junior, Prof.Dr. Luis Antônio Violin, Prof.Dr. Paulo Joazeiro e à Prof.Dra. Anne B. Croy.

Aos amigos de laboratório, os que se foram, pelas trocas de conhecimento e pelas risadas, e aos presentes, pelo apoio e incentivo.

À Karina Degaki (e família). Por me tratarem com alguém especial. Pelo incansável apoio. Pelos ouvidos, que me escutaram, pelos braços que me abraçaram, pelas palavras dóceis e, às vezes duras, pelas mãos que me ajudaram, e principalmente pela “BIG” cumplicidade!

À minha família, pela compreensão da minha ausência, pelo apoio ao meu sonho e pelas alegrias na minha vida!

A todos que de alguma forma participaram nestes quatro anos da minha vida. Pelos momentos bons e ruins, pelo amor e pelas lágrimas, tudo parte do meu crescimento de vida.

RESUMO

Células *Natural Killer* uterina (uNK) produzem moléculas angiogênicas e citocinas críticas ao sucesso da gestação, assim como proteínas citolíticas relacionadas à resposta imune inata. Contudo, se as capacidades angiogênicas e citolíticas são provenientes de diferentes subpopulações de células uNK não é conhecido; da mesma forma, estes fenótipos ainda não são estabelecidos. Assim, a proposta inicial deste trabalho foi avaliar, nas células uNK DBA⁺, a expressão de Vegfa (*Vascular endothelial growth factor*), como marcador angiogênico, de Perforina (Prf) e Granzima A (Gzma) como marcadores citolíticos. Este trabalho também propôs identificar os compartimentos intracelulares de estocagem de Vegfa, Prf e Gzma, e a capacidade das células uNK DBA⁺ em secretar estes fatores sob estímulo externo. Assim, úteros gestantes de camundongos (Balb/6 e Swiss) ao 7º, 9º e 14º dia de gestação (dg) foram processados para parafina, e para as resinas LR-white e Epon. Microscopia de fluorescência confocal e convencional, assim com microscopia eletrônica foram utilizadas para avaliar a heterogeneidade de expressão entre as células uNK DBA⁺ que expressam Vegfa, Prf e Gzma, assim como a heterogeneidade dos grânulos destas mesmas células. Catepsina D (Ctsd), um marcador de grânulos lisossomo-secretórios, e Serglycin (Srgn), um marcador de grânulos secretórios, foram utilizados para identificar os compartimentos celulares que continham Prf, Gzma e Vegfa. A frequência de células uNK DBA⁺ que expressaram Vegfa, Prf e Gzma foi determinada em cada dia de gestação. E o teste de Coeficiente de Pearson (CP) foi realizado para verificar o nível de co-localização entre Vegfa, Prf, Gzma, Srgn e Ctsd nos grânulos das células uNK DBA⁺, e os seus respectivos tamanhos através do programa *Image Proplus*. Todos os resultados foram estatisticamente analisados. Em adição, nós avaliamos a expressão dos genes relacionados às vias de secreção constitutiva e regulada dos grânulos e vesículas nas células uNK DBA⁺ e células NK NK1.1⁺, isoladas do útero de camundongo ao 9ºdg e do baço, respectivamente. O ensaio de liberação das proteínas líticas foi realizado através do procedimento de eutanásia cirúrgica do embrião (ECE). Vegfa foi positivo nas células uNK DBA⁺ agranulares do 7ºdg e nas células granulares do 9ºdg. Prf e Gzma foram expressos nas células uNK DBA⁺ granulares do 9ºe 14ºdg, e as células uNK DBA⁺Prf⁺

granulares co-expressaram Vegfa. Assim, as células uNK DBA⁺ agranulares são células produtoras de Vegfa com capacidade angiogênica. A análise de CP e *imunogold* confirmou a co-localização de Ctsd/Prf nos grânulos lisossomo-secretorios (CP>0,5). Surpreendentemente, Gzma não foi co-localizada em compartimento Prf⁺Ctsd⁺ (CP<0,5); sendo esta co-localizada com Srgn (CP>0,5) em grânulos menores, e a localização de Vegfa era independente de grânulos Gzma⁺ ou Prf⁺ (CP<0,5). Células uNK DBA⁺ expressaram genes relacionados ao tráfego de vesículas: *rab11*, *rab27a*, *rab34*, *snap23*, *vamp7* e *vamp8*; em contraste com células NK esplênicas (sNK) NK1.1⁺ que não expressaram *rab34* e *vamp8*, moléculas estas relacionadas com a secreção constitutiva. O modelo *in vivo* ECE ativou a via de secreção reguladas das células uNK DBA⁺ com a mobilização de Prf e Gzma, e não afetou a expressão de Vegfa. Assim, as células uNK DBA⁺ são competentes para ambas as formas de secreção, constitutiva (Vegfa) e regulada (Prf e Gzma). As células uNK DBA⁺ granulares são células diferenciadas produtoras de Vegfa, que também acumulam proteínas líticas, assegurando assim a sua dualidade funcional com o fenótipo de células uNK DBA⁺Vegfa⁺Prf⁺Gzma⁺. Vegfa, Prf e Gzma estão distribuídos em 3 distintos compartimentos intracelulares nas células uNK que controlam as vias de secreção constitutiva e regulada independentemente de acordo com o ensaio de ECE.

Palavras chaves: Gestação/célula uNK/angiogênese/atividade lítica/grânulo lisossomo-secretor.

ABSTRACT

Angiogenic and cytokine molecules produced by uterine natural killer (uNK) cells are critical for successful pregnancy. Cytolytic proteins are also expressed by uNK cells. However, it is unknown whether the angiogenic and cytolytic capacities are from different uNK subsets, or the same cells. Thus, we initially proposed to evaluate the DBA⁺uNK cells expressing vascular endothelial growth factor-A (Vegfa) as an angiogenic, and perforin (Prf) and granzyme-A (Gzma) as cytolytic markers. In addition, we also proposed to identify the intracellular storage compartment for Vegfa, Prf and Gzma, and the DBA⁺uNK secretion ability after external stimuli. The heterogeneity amongst mouse DBA⁺uNK cells expressing Vegfa, Prf and Gzma, as well as the heterogeneity of their granules were evaluated in pregnant mice of gestation day (gd) 7th, 9th and 14th (Balb/6 and Swiss). The pregnant uteri were processed using paraffin, LR-white and Epon resin. Confocal and conventional fluorescence microscopy and electron microscopy were used, and Cathepsin D (CatD), a marker of secretory-lysosome granules, and serglycin (Ser), a marker of secretory granules, were used to identify intracellular storage compartments for Vegfa, Prf and Gzma. The frequency of Vegfa, Prf and Gzma in the DBA⁺uNK cells was quantified in each gd by *manula count* tool, and the correlation levels among Vegfa, Prf, Gzma, Ser and CatD co-localization in the granules of DBA⁺uNK cells were performed by Pearson's Coefficient (PC), both using *Image Proplus software*. All of the data were analyzed statistically. This work also proposed to evaluate vesicles secretion pathway genes expression in the DBA⁺uNK cells and NK1.1⁺ splenic-NK (sNK) cells isolated from gd9 uterus and spleen, respectively. A lytic protein releasing assay was performed *in vivo* through surgical embryo euthanasia (SEE). Our data showed that Vegfa was positive in small agranular DBA⁺uNK cells at gd7 and in large granule-rich DBA⁺uNK cells at gd9, while Prf and Gzma were expressed in granulated DBA⁺uNK cells at gd9 and 14 and granule-rich Prf⁺DBA⁺uNK cells co-expressed Vegfa. Thus, the agranular DBA⁺uNK cells are Vegfa-producing angiogenic cells. Ctsd and Prf are in the secretory-lysosome granules and with co-localization level: (PC>0.5). Surprisingly, Gzma was not co-localized to the

Prf or Ctsd (PC<0.5); it was co-localized to Srgn (PC>0.5) in smaller granules and Vegfa localization was independent of Gzma⁺ or Prf⁺ granules (PC<0.5). DBA⁺uNK cells expressed genes regulating vesicle traffic: *rab11*, *rab27a*, *rab34*, *snap233*, *vamp-7* and *vamp-8*; in contrast, NK1.1⁺ sNK cells did not express *rab34* and *vamp-8* related to constitutive secretion. The model SEE activated DBA⁺uNK cells with Prf and Gzma mobilization and did not affect the release of Vegfa. Thus DBA⁺uNK cells are competent for both constitutive (Vegfa) and regulated secretion (Prf and Gzma). Granular Vefga⁺Prf⁺Gzma⁺DBA⁺ uNK cell phenotype are dual functional cells, that they are Vegfa-producing differentiated cells and also accumulate lytic proteins. The Vefga, Prf and Gzma are distributed in three distinct granular compartments of uNK cells with constitutive and regulated secretory pathways independently according to the SEE functional assay.

Key words: Animal pregnancy; uNK cells; Angiogenesis; Lytic activity; Secretory lysosome granules

Lista de acrônimos e abreviaturas

Ang2 - *Angiopoietin 2*
Ctsd - *Catepsina D*
Ccl - *Chemokine (C-C motif) ligand*
CD - *Cluster of Differentiation*
cNK - *Células Natural Killer* circulantes
CS - *Condroitim Sulfato*
Csf2 - *Colony Stimulating Factor 2*
CTL – *Linfócitos T citotóxicos*
Cxcl - *Chemokine (C-X-C motif) ligand*
DB - *Decídua basal*
DBA - *Dolichos biflorus*
dg - *Dia de gestação*
ECE- *Eutanásia cirúrgica do embrião*
FasL - *Fas ligand*
GAG - *Glicosaminoglicanos*
GalNac - *N-acetil-D galactosamina*
GMG - *Granulated metrial gland*
Gzm - *Granzimas*
Ifny - *Interferon gamma*
Igfbp3 - *Insulin-like growth factor-binding protein 3*
Il - *Interleukin*
Il2r - *Interleukin 1 receptor, type II*
Il2rg^{-/-} - *Interleukin 2 receptor, gamma*
Irf1 - *Interferon regulatory factor 1*
ITIM - *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*
KIR - *Killer cell immunoglobulin-like receptors*
MEC - *Matriz extracelular*
MLAp - *Mesometrial Lymphoid Aggregate of pregnancy*

Mmp - *Matrix metalloproteinases*
MPC - *Magnetic particule concentrator*
MTOC - *Microtubule-organizing center*
MVB - *Multivesicular bodies*
NK - *Células Natural Killer*
NKP - *Células Natural Killer Progenitoras*
NKR - *Natural Killer receptors*
NO - *Óxido Nítrico*
PAS - *Periodic acid Schiff*
PBS - *Phosphate buffered saline*
Pgf - *Placenta growth factor*
PMD - *Placental degranulation*
Prf - *Perforina*
Rab - *GTPases da superfamília Ras*
RAE1 - *RNA export 1 homolog (S. pombe)*
Rag-2^{-/-} - Recombination activating gene 2
Srgn - *Serglicin*
SHP - *small heterodimer partner*
Snap - *Synaptosome-associated protein*
SNARE - *Acrônimo derivado de "SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor*
sNK - *Células Natural Killer Esplênicas*
t-SNARE - *Target SNARE*
Tap1 - *Antigen peptide transporter 1*
Tfap2C - *Transcription factor AP-2 Gamma*
Tge26 - Strain of human CD3ε transgenic mice
uNK – *Células Natural Killer Uterinas*
VAMP - *Vesicle-associated membrane protein*
Vegf - *Vascular endothelial growth factor*
v-SNARE- *vesicle SNARE*

ÍNDICE

Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Lista de Acrônimos.....	xiii
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1-Fenótipos e funções das células uNK (<i>uterine Natural Killer</i>).....	2
1.2-Origem , incidência e desenvolvimento das células uNK.....	6
1.3-Organização funcional dos grânulos lisossomo-secretoreos.....	11
1.3.1-Perforina (Prf).....	12
1.3.2-Catepsina D (Ctsd).....	13
1.3.3-Granzima A (Gzma).....	14
1.3.4-Serglicin (Srgn).....	15
1.4- Vias de secreção das células da Resposta Imune Inata.....	16
1.4.1- Mecanismos de secreção dos grânulos lisossomo-secretoreos.....	18
1.4.2- Moléculas reguladoras do transporte intracelular e vias de secreção.....	19
1.5- Considerações.....	22
2-OBJETIVOS.....	24
2.1-Objetivo Geral.....	25
2.2-Objetivos específicos.....	25
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1-Animais.....	27
3.2-Coleta e processamento dos sítios uterinos.....	27
3.2.1-Parafina.....	27
3.2.2-Resina Epon.....	27
3.2.3-Resina LR-White.....	28
3.3- Identificação das células uNK DBA ⁺ granulares e agranulares com expressões das moléculas PRF, GrzA, VEGF e SER e suas distribuições no útero gestante.....	29
3.3.1-Reações Citoquímicas e Imunocitoquímicas.....	29
3.3.2 Quantificação das células uNK DBA ⁺ , PRF ⁺ , GrzA ⁺ e VEGF ⁺	30

3.3.3-Análises estatísticas.....	31
3.4 - Avaliação dos compartimentos intracelular das vias de secreção de VEGF A e das proteínas citolíticas PRF e GrzA das células uNK DBA ⁺	32
3.4.1- Análise de Co-localização de VEGF, PRF, GrzA e SER nas Células uNK DBA ⁺	32
3.4.2 - Dimensão das vesículas e grânulos das células uNK DBA ⁺	33
3.5- Expressão dos genes de moléculas reguladores da biogênese e tráfico de vesículas intracelulares...	33
3.5.1- Isolamento de células uNK DBA ⁺	34
3.5.2 - Isolamento das células esplência NK/NK1.1.....	34
3.5.3 –Extração de RNAtotal e obtenção do cDNA das células uNK DBA ⁺ e sNK NK1.1 ⁺	35
3.5.4 - Amplificação dos transcritos pelo-PCR.....	36
3.6 - Ativação das células uNK DBA ⁺ <i>in vivo</i>	37
3.6.1- Eutanásia Cirúrgica do Embrião (ECE).....	37
3.6.2 - Reações citoquímicas de lectina DBA e imunocitoquímicas de PRF, GrzA e VEGF em cortes de parafina.....	38
3.6.3 -Análise Ultraestrutural.....	38
3.6.4 - Citoquímica e Imunocitoquímica ultraestrutural.....	38
4-RESULTADOS.....	40
4.1- Aquisição funcional angiogênica e lítica das células uNK DBA ⁺	42
4.2- Compartimentalização dos mediadores angiogênicos e citolíticos nos grânulos da células uNK DBA ⁺	44
4.2.1- Identificação dos grânulos das células uNK DBA ⁺	44
4.2.2-Identificação do conteúdo e classificação dos grânulos.....	45
4.3- Expressão de genes de moléculas envolvidas nas vias de transporte intracelular e secreção dos grânulos.....	46
4.4- Mobilização dos grânulos citolíticos das células uNKDBA ⁺	46
5-DISCUSSÃO.....	49
6-CONCLUSÕES.....	60
7-FIGURAS.....	63
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
9- ANEXO.....	99

1- INTRODUÇÃO

Na gestação de animais com placentação hemocorial, como humanos e camundongos, o útero sofre transformações que são imprescindíveis para a formação da placenta e o adequado suprimento sanguíneo/nutricional do feto. Tais transformações relacionam-se com alterações teciduais locais, como a decidualização (Abrahamsohn e Zorn, 1993; Gellersen *et al.*, 2007; Herington *et al.*, 2009; Ramathal *et al.*, 2010) e a remodelação das artérias espiraladas (Leonard *et al.*, 2006; Sheikhi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008, 2011). Concomitantemente a estas transformações, existe o influxo de células *Natural Killer* (NK), cujas atividades conhecidas no útero gestante remetem à sua capacidade em secretar fatores que modulam as mudanças que ocorrem no útero, principalmente à remodelação das artérias espiraladas. Tais características e importância funcional as identificam como subpopulação de NK específica do útero gestante, pois beneficiam a gestação, ao invés de células NK relacionadas com a resposta imune inata, capazes de lisar células alvos através de mediadores (Trinchieri, 1989; Whiteside *et al.*, 1994; Abbas *et al.*, 2002; Trapani *et al.*, 2002).

1.1- Fenótipos e funções das células *Natural Killer* uterinas (uNK)

Em humanos, as células NK uterinas (uNK) são identificadas como CD56^{bright}CD16^{dim}, produtoras de citocinas e fatores de crescimento que auxiliam na modulação da homeostasia da interface materno-fetal (Leonard *et al.*, 2006; Hanna *et al.*, 2003; Barrientos *et al.*, 2009; Blois *et al.*, 2010).

As células uNK em humano estão representadas por duas populações, as quais 10% são uNK CD56^{bright}CD16⁺ enquanto 90% são uNK CD56^{bright}CD16⁻ ou CD56^{bright}CD16^{dim}, funcionalmente distintas. Aquelas uNK CD16⁺ são citolíticas, enquanto as CD16⁻ são secretoras de citocinas e quimiocinas (Saito *et al.*, 1993; Moffet-King, 2002; Laird *et al.*, 2003; Tuckerman *et al.*, 2010). Mesmo entre as populações de células uNK CD56^{bright}CD16⁻ do útero e células NK do sangue circulante (cNK) CD56^{bright}CD16⁻ há diferenças no perfil de receptores, sendo as uNK KIR⁺, CD69⁺ e CD62⁻, enquanto nas cNK são KIR⁻, CD69⁻ e CD62⁺ (Dosiou *et al.*, 2005). Cumpre salientar ainda que na distinção

fenotípica as células cNK CD56^{bright} são agranulares, enquanto as uNK CD56^{bright} na decídua são na sua grande maioria semelhantes aos linfócitos granulares (King e Loke., 1991), o que pode caracterizar diferenças morfológicas e funcionais entre as células cNK e uNK. Porém não há na literatura recente outras considerações sobre a distinção funcional entre as células uNK CD56^{bright}CD16⁻ granulares e agranulares presentes no útero gestante humano.

Em camundongos, as células cNK do sangue ou as uNK do útero gestante não apresentam as moléculas CD56 ou seu homólogo. As células NK de camundongos são reconhecidas pela expressão da molécula de superfície CD122 (IL-2R β /15R⁻) (Rosmaraki *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2011), e que para distinguir dos linfócitos T que também expressam o CD122, o fenótipo das células NK em geral é considerado CD3⁻CD122⁺ (Colucci *et al.*, 2003).

As células uNK CD3⁻CD122⁺ podem ser distinguidas das demais células NK pela expressão de glicoconjugados contendo N-acetil-D galactosamina (GalNAc) reconhecidas pela lectina DBA (*Dolichos biflorus*) não compartilhado pelas células cNK ou das células NK do baço (Paffaro *et al.*, 2003, Yadi *et al.*, 2008). Embora a caracterização do glicoconjugado reativo à lectina DBA não tenha sido determinado e não esteja presente em NK de humanos, esta lectina tem sido amplamente usada na identificação e localização das células uNK no útero de camundongos através do método citoquímico (Paffaro Jr *et al.*, 2003, Croy *et al.*, 2010), quanto em suspensões celulares do útero de camundongos pela citometria de fluxo (Yadi *et al.*, 2008; Croy *et al.*, 2010).

A função comprovada das células uNK durante a gestação é a sua participação na remodelação das artérias espiraladas do útero gestante, tanto em humanos como em camundongos. Em humanos, as células uNK CD56^{bright} CD16^{dim} nas primeiras semanas de gestação são as maiores produtores de VEGF C (*Vascular endothelial growth factor C*), PGF (*Placenta growth factor*) e angiopoietina 2, proteínas relacionadas com a angiogênese (Lash *et al.*, 2011). Além destes fatores, as células uNK de humanos expressam metaloproteinases (MMP) 7 e MMP9 que auxiliam na infiltração na túnica muscular das

artérias espiraladas e desempenham o papel primordial na remodelação destes vasos (Smith *et al.*, 2009).

As células uNK são as principais produtoras de *Interferon-gamma* (IFN γ) tanto em humanos (Saito *et al.*, 1993), quanto em camundongos (Ashkar *et al.*, 2000; 2003), fator o qual regula positivamente a produção de quimiocinas (CXCL9, CXCL10, CCL8 e CCL5), enzimas (TAP1, SOD2 e CASP1) e fatores de transcrição (TFAP2C e IRF1), porém regula negativamente citocinas como CSF2, IL1R2 e IGFBP3 (Kitaya *et al.*, 2007). O controle na expressão destes genes pela produção de IFN γ é capaz de modular a invasão do trofoblasto, além de promover a angiogênese fisiológica da placenta (Moffet-King, 2002; Wang *et al.*, 2009). Insuficiência na ativação da função angiogênica das células uNK acarreta na inadequada remodelação da decídua, frequentemente relacionada com doenças como pré-eclampsia e restrição do crescimento fetal (Hiby *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009).

A participação das células uNK na remodelação das artérias uterinas durante a gestação em humanos foi comprovada experimentalmente em camundongos imunodeficientes: *Rag-2^{-/-} Il2rg^{-/-}*, *Tg ϵ 26*, *γ c/RAG2* e *knockout* de *Il15* (*Il15^{-/-}*), ausentes de células cNK e uNK na gestação (Ashkar e Croy 1999; Guimond *et al.*, 1999; Croy *et al.*, 2002; Ashkar *et al.*, 2003; Croy *et al.*, 2003a); e em camundongos *knockout* para *Ifn γ* (Ashkar *et al.*, 2000). O conjunto de experimentos realizados por Croy e colaboradores nos últimos 5 anos com os camundongos alinfóides *Rag-2^{-/-} Il2rg^{-/-}*, comprovam que nestes animais há a remodelação inadequada das artérias espiraladas sem que aconteça a dilatação do calibre e o adelgaçamento da parede destas. Através do transplante de células da medula óssea de animais normais, a normalidade na remodelação das artérias espiraladas foi restabelecida, devido a presença de células uNK no útero gestante após esta intervenção (Chantakru *et al.*, 2002; Monk, *et al.*, 2005; Leonard *et al.*, 2006; Croy *et al.*, 2000).

Na função de remodelação das artérias espiraladas e angiogênese durante a gestação, as células uNK em camundongos também são as principais produtoras de fatores angiogênicos e vasculogênicos, tais como o *Vegf* (*Vascular endothelial growth factor*), *Pgf*, angiotensina I/II, óxido nítrico (NO) e interferon-gama (*Ifn γ*) (Ashkar *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2006; Barrientos *et al.*, 2009; Blois, *et al.*, 2011; Hatta, *et al.*, 2010).

Zhang e colaboradores (2011) sugerem que nem todas as células uNK são produtoras de Ifn γ , sendo esta função exercida pelas células uNK localizadas próximas aos vasos uterinos. Assim, como Ifn γ , Pgf é diferencialmente expresso nas células uNK, as quais, àquelas desprovidas de grânulos, são as que maior detêm a produção de transcritos do fator (Tayade *et al.*, 2007). Estas evidências sugerem a ocorrência de subpopulações funcionais dentre as células uNK, porém sem correlação direta ou caracterização do fenótipo correspondente.

À semelhança das células uNK CD56^{bright} da decídua humana que apresentam grânulos (King e Loke., 1991), as células uNK DBA⁺ apresentam profusão de grânulos citoplasmáticos (Paffaro Jr *et al.*, 2003). Esta grande quantidade de grânulos citoplasmáticos floxina positivas e PAS (*Periodic Acid Schiff*) positivas identificaram as células uNK no útero gestante de roedores (ratos e camundongos) como células secretoras, e o local do seu acúmulo como uma estrutura glandular transitória da gestação. Portanto, estas células foram denominadas inicialmente como células granulosas da glândula metrial (GMG- *Granulated metrial gland cells*) (Selye e McKeown, 1935; Smith, 1966; Stewart e Peel, 1977).

A presença do grânulo citoplasmático é a característica morfológica marcante das células uNK e a sua fácil marcação pela citoquímica de PAS e lectina DBA (Stewart e Peel, 1977; Paffaro Jr *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009) permite a identificação e localização destas células no útero de camundongos ao longo da gestação (Paffaro Jr *et al.*, 2003). Em analogia com o processo de aquisição de competência funcional das células cNK, células efetoras da resposta imune inata que acumulam as proteínas líticas como a perforina (Prf) e granzimas (Gzm) nos seus grânulos lisossomo-secretorios de duplo compartimento (Fehninger *et al.*, 2007; Meade *et al.*, 2009), as células uNK que apresentam grânulos perforina positivos são consideradas a forma diferenciada e madura (Parr *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1991; King e Loke., 1991).

Os grânulos das células uNK são igualmente lisossomo-secretorios de duplo compartimento e o seu conteúdo é também reativo à lectina DBA (Paffaro Jr *et al.*, 2003). Pelas características ultraestruturais e pela proporção dos grânulos no citoplasma das

células uNK, Paffaro Jr e colaboradores (2003) classificaram estas células ao longo da gestação em subtipos morfológicos relacionados com o grau de diferenciação. De acordo com estes autores, as células uNK DBA⁺ pequenas e sem grânulos que predominam no período de implantação embrionária de 5^o-7^o dia de gestação (dg) seriam as formas imaturas ou indiferenciadas. Estas, gradualmente aumentariam de volume e acumulariam grânulos no citoplasma no decorrer da gestação, sendo consideradas as formas maduras ou diferenciadas de maior incidência entre 9^o-12^o dg. No terço final da gestação (15^o-20^o dg) a proporção de células uNK DBA⁺ gradualmente diminuem, sendo neste período encontrado as maiores células (30 a 50µm de diâmetro) com núcleo apoptótico e grânulos pequenos e compactos, consideradas as formas senescentes.

De acordo com este critério de identificação morfológico, as células uNK DBA⁺ diferenciadas seriam aquelas que apresentam grânulos citoplasmáticos com conteúdo citolítico, e portanto uma célula efetora da resposta imune inata, enquanto as células uNK DBA⁺ pequenas e agranulares seriam funcionalmente inaptas ou imaturas. Porém, neste critério de classificação das células uNK DBA⁺ não foram consideradas as funções desempenhadas por elas, tais como a produção de citocinas e fatores angiogênicos. Igualmente, a competência funcional das células uNK na resposta imune inata como célula citolítica efetora, permanece especulativa e não comprovada experimentalmente.

1.2 - Origem, incidência e desenvolvimento das células uNK

As células uNK são populações específicas do útero gestante e originam-se, assim como as demais células NK, a partir de células hematopoiéticas precursoras da medula óssea (Galy *et al.*, 1995; Kondo *et al.*, 1997; Santoni *et al.*, 2008). As células hematopoiéticas da linhagem linfóide presentes na medula óssea possuem duplo potencial para serem NK e/ou células T (células T/NKP), sendo que a aquisição da subunidade CD122 marca a transição entre as células T/NKP em células NKP (*Natural Killer progenitors*) (Ikawa *et al.*, 1999; Rosmaraki *et al.*, 2001). As células NKP são consideradas CD3⁻CD122⁺ e migram para os órgãos linfóides secundários ou outros tecidos onde

adquirem outros marcadores (receptores). Nos próximos estágios de maturação ocorre a aquisição sequencial dos receptores NK1.1, CD94/NKG2 e da integrina alfa V. Posteriormente, as células NK adquirem receptores Ly49 e c-Kit (CD117), seguido pelo estágio de expansão caracterizado pela regulação positiva de DX-5 e a regulação negativa da integrina alfa V. No estágio final de maturação das células NK nos órgãos periféricos, estas expressam CD11b e CD43, adquirindo a função efetora controlado pelo CD27, produzindo altos níveis de $\text{Ifn}\gamma$ e exercendo ação citotóxica (Kim, *et al.*, 2002; Colucci *et al.*, 2003; Hayakawa e Smyth, 2006).

De acordo ainda com o padrão de expressão de receptores de superfície CD11b e CD27, as células NK podem ser subdivididas em 3 grupos: $\text{CD11b}^{\text{low}}\text{CD27}^{\text{high}}$, $\text{CD11b}^{\text{high}}\text{CD27}^{\text{high}}$ e $\text{CD11b}^{\text{high}}\text{CD27}^{\text{low}}$ e quanto a proporção de expressão de moléculas como as da família Ly49 e CD94/NKG2. Neste sentido, as células NKP são células CD11b^- e CD27^+ , passando a ser CD11b^+ CD27^+ e as células mais maduras passam a apresentar $\text{CD11b}^+\text{CD27}^-$. Interessante é que as células duplamente positivas e $\text{CD11b}^+\text{CD27}^{\text{low}}$ demonstram a capacidade de lisar células alvo e secretar $\text{Ifn}\gamma$, em condições de estímulo *in vitro* (Hayakawa e Smyth, 2006). Os três subgrupos de células NK diferem amplamente quanto à distribuição nos tecidos (Hayakawa e Smyth, 2006). $\text{CD11}^{\text{low}}\text{CD27}^+$ são predominantemente encontradas na medula óssea e linfonodos, enquanto $\text{CD11b}^+\text{CD27}^{\text{low}}$ são mais abundantes no sangue, baço, pulmão e fígado. Já as células duplamente positivas são mais homoganeamente distribuídas (Vivier *et al.*, 2008).

As células uNK de camundongos comprovadamente não são células residentes do útero e assim como as demais células NK, são derivadas de células progenitoras linfóides da medula óssea (Santoni *et al.*, 2008). Após diferenciação em órgãos linfóides secundários, durante a gestação, células NK migram para o útero, onde sofrem maturação tornando-se grandes células granulares (Bianco *et al.*, 2008; Bilinski *et al.*, 2008; Carlino *et al.*, 2008; Santoni *et al.*, 2008). Presume-se que tal diferenciação e maturação sejam estimuladas pelas citocinas, como IL15 , e a aquisição de receptores de superfície (Ye *et al.*, 1996; Carlino *et al.*, 2008) irão determinar sua função.

Não se conhece em que estágio do processo de diferenciação as células uNK de camundongos começam a expressar o glicoconjugado reativo à lectina DBA, porém estas

células são identificadas *in situ*, entre 5° e 6° dg, isto é, concomitante ao processo de implantação do blastocisto (Paffaro *et al.*, 2003).

No início da gestação, as células uNK são pequenas, agranulares e reduzidas em número. Com a progressão da gestação o número das células uNK aumenta rapidamente e são observadas células maiores com o citoplasma repleto de grânulos, atingindo o pico de incidência entre o 9° e 12° dg. No útero de camundongos, as células uNK estão localizadas exclusivamente na região mesometrial de cada sítio de implantação embrionária, na decídua basal (DB) e no Agregado Linfoide Mesometrial da gestação (MLAp- *Mesometrial Lymphoide Agreggate of pregancy*), como demonstrado na figura 1. No terço final da gestação, com o desenvolvimento do feto que passa a ocupar a maior parte do útero, a parede uterina torna-se delgada e as áreas do MLAp e DB, ficam restritas, e com a presença reduzida das células uNK (Paffaro *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011).

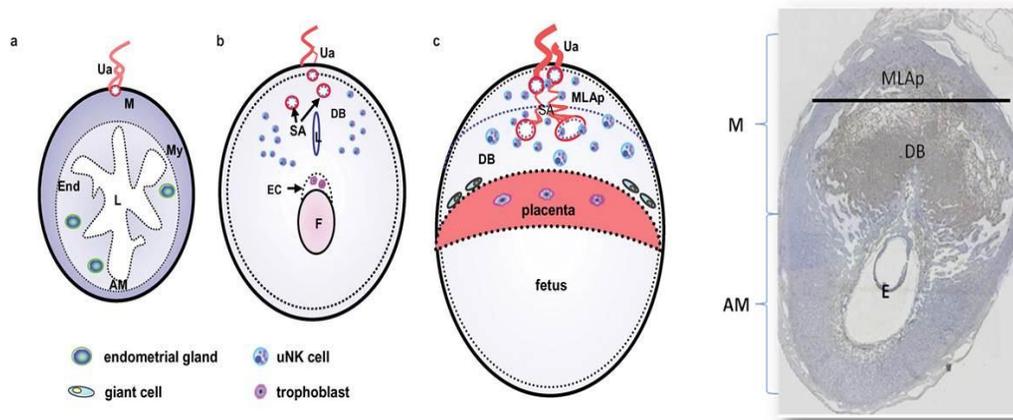


Figura 1: Esquema adaptado de Zhang *et al.*, (2011). A figura demonstra o útero de camundongo não gestante, no 6° e 10°dg, ao lado de um corte histológico de 9°dg (dado próprio). Nota-se a ausência de células uNK no útero não grávido (a) e o influxo das células uNK após a gestação ao 6°dg (b) e 10°dg (c) e sua íntima relação com as artérias espiraladas. Nota-se que em (c) a separação entre DB e MLAp torna-se mais evidente. No corte histológico (d) são evidenciadas a região das células uNK reativas à lectina DBA e a sua predominância na região mesometrial .

In vitro, as células uNK de camundongos podem ser identificadas com o fenótipo de superfície $CD3^-CD122^+NK1.1^+DX5^-DBA^+$, sendo $CD11b^+CD27^-$, um padrão ainda não

compreendido principalmente, pois estas também expressam CD117, um marcador de células precursoras, mas perdem a expressão de NK1.1 e DX-5 (Rosmaraki *et al.*, 2001; Yadi *et al.*, 2008).

As funções das células NK não são controladas por um conjunto único e simples de receptores, mas sim pelo balanço de sinais determinados por diferentes receptores (Lanier, 2005; Moretta *et al.*, 2004; Viviér e Anfossi, 2004). Como as células NK são células pertencentes ao sistema imune inato, elas não requerem rearranjo somático para gerar diversidade e especificidade de receptores. Sendo assim, a função das células NK é supostamente controlada pela combinação dos receptores ativatórios e inibitórios (NKR-*Natural Killer Receptors*), muitos dos quais são expressos aleatoriamente, em um padrão de variedade, resultando em diferentes subpopulações funcionais de células NK (Symons *et al.*, 2010).

Alguns NKR são amplamente expressos pela maioria das células NK (i.e. NKG2D, NKp30, NKp46), enquanto outros (i.e. KIR, NKG2A, NKG2C, LILRB1) são seletivamente expressos em alguns subgrupos de células NK (Martinez-Rodríguez *et al.*, 2010).

Podem ser distinguidas três classes de receptores NKR inibitórios. As primeiras são membros da família Ly49, as quais reconhecem moléculas de MHC, presente em roedores (Yokoyama e Seaman, 1993). A segunda família são receptores relacionados à Imunoglobulinas- *Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR)*, os quais parecem ser apenas funcionais em primatas, mas não em roedores (Long *et al.*, 1997; Brooks, *et al.*, 2000). A terceira família de receptores reconhecida é funcional em ambos, primatas e roedores, e consistem em heterodímeros CD94/NKG2 (Carretero *et al.*, 1997; Brooks *et al.*, 1997). Muitas isoformas de NKG2 podem parrear com CD94, porém somente CD94/NKG2A é conhecido como sendo inibitório (Vance, *et al.*, 1998).

As três famílias de receptores inibitórios possuem domínios citoplasmáticos chamados de regiões inibitórias baseados em imunoreceptores tirosina- *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs (ITIM)* (Burshtyn *et al.*, 1997). Quando há a ocupação dos receptores inibitórios, as tirosinas da região ITIM são fosforiladas e recrutam proteínas

tirosinas fosfatases, como SHP-1 e SHP-2 (Vély *et al.*, 1997). Estas fosfatases interferem nas etapas iniciais de ativação das células NK (Lanier, 2003; Raulet *et al.*, 2001), inibindo a sua citotoxicidade.

Já os receptores de ativação podem ser divididos entre aqueles que reconhecem ou não as moléculas de MHC. Ligantes para muitos destes receptores ainda não são conhecidos, porém alguns exemplos são MICA/B, Rae1, H60 (os quais se ligam com NKG2D) (Diefenbach *et al.*, 2000) e CD48 (o qual se liga com 2B4 e CD2) (Tangye *et al.*, 2000).

Receptores ativatórios geralmente estão associados com moléculas adaptadoras transmembranas que transmitem os sinais de ativação, incluindo KARAP/DAP12 (Tomasello *et al.*, 2000) e DAP10/KAP10 (Wu *et al.*, 2000). Acredita-se que cada um destes adaptadores é expresso pelas células NK, tanto de camundongos como humanos (Tomasello *et al.*, 2000; Raulet *et al.*, 2001).

O fato de serem encontrados tanto receptores inibitórios (Ly49A, Ly49C/I, Ly49G2), como ativatórios (Ly49D e Ly49H) nas células uNK (Yadi *et al.*, 2008) torna-se ainda mais difícil atribuir um grau de diferenciação, ou funcionalidade à elas a partir dos conjuntos de receptores conhecidos até o momento. A compreensão funcional das peculiaridades dos receptores expressos pelas células uNK e a sua importância na gestação são ainda desafios que necessitam ser comprovados.

Se por um lado, as células NK plenamente diferenciadas são melhores caracterizadas pela capacidade de lisar células tumorais e células infectadas (Caligiuri *et al.*, 2008), e pela secreção de variadas citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Sivori *et al.*, 2004; Caligiuri *et al.*, 2008; Moretta *et al.*, 2008), por outro lado, as células uNK no útero gestante não se tem relatos sobre sua atividade citotóxica, tendo como função primordial a produção de fatores angiogênicos. Por sua vez, as células NK periféricas não produzem Vegf e outros fatores angiogênicos (Kalkunte *et al.*, 2009).

Desta forma, as razões pelas quais as células uNK desenvolvem uma complexa organela como o grânulo lisossomo-secretor, que contém um conjunto de mediadores

líticas, são desconhecidas, tornando-se uma incógnita a ser esclarecida na biologia da reprodução.

Os grânulos citoplasmáticos das células uNK, em camundongos e humanos, são reconhecidos como grânulos lisossomo-secretóres (Stewart e Peel, 1977; Paffaro Jr *et al.*, 2003), que contêm perforina (Parr *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1991), cuja correlação funcional na gestação através das células uNK é pouco conhecida.

1.3 - Organização funcional dos grânulos Lisossomo-Secretóres

Conceitualmente, grânulos lisossomo-secretóres são lisossomos modificados sujeitos à secreção regulada em resposta a estímulos externos (Stinchcombe *et al.*, 2004). Nestas organelas, a co-localização de hidrolases lisossomais e proteínas destinadas à secreção é do ponto de vista bioquímico e funcional bastante interessante: hidrolases lisossomais requerem um compartimento intracelular de pH ácido, enquanto as proteínas líticas, presentes no compartimento secretor, funcionam apenas sob pH neutro. Possivelmente o pH ácido é um mecanismo de inibição para as proteínas líticas armazenadas pela célula e a condição de pH neutro para sua ativação seria obtida presumidamente após a degranulação para o meio extra-celular (Stinchcombe *et al.*, 2004). Esta organela peculiar tem sido identificada em outros tipos celulares, como por exemplo, as células T citotóxicas (CTL) (Peters *et al.*, 1991) e cNK (Burkhardt *et al.*, 1990), e a sua presença denota habilidade citotóxica.

Pela ultraestrutura, os grânulos lisossomo-secretóres das células uNK, assim como das cNK e CTL, exibem uma porção central eletrondensa considerado o domínio secretor com conteúdo de proteínas líticas como a Prf, Gzm e granulísina e, as áreas corticais de capuz eletrondenso contendo microvesículas membranosas de domínio lisossomal contendo enzimas hidrolíticas além de proteínas lisossomais transmembrana como: CD63, Lamp1 e Lamp2 (Stewart e Peel, 1977; Bulmer *et al.*, 1984; Burkhardt *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1991; Griffiths, 1997; Metkar *et al.*, 2002; Clarck e Griffiths 2003, Paffaro Jr *et al.*, 2003, Copi 2006).

De acordo com Paffaro Jr e colaboradores (2003), as células uNK DBA⁺ aumentam gradualmente o conteúdo destes grânulos durante o seu processo maturação, além de apresentarem todo o conjunto de organelas membranosas relacionadas com a biogênese dos grânulos, como o retículo endoplasmático rugoso e um centro celular organizado pelo par de centríolos e profusão de cisternas de complexo de Golgi junto com inúmeras vesículas membranosas com conteúdos de diferentes eletrondensidades.

O primeiro estágio de desenvolvimento do grânulo lisossomo-secretor é a formação de uma estrutura intermediária multivesicular que incorpora vesículas continuamente. Um core denso aparece na organela multivesicular intermediária, como sendo acúmulo de novas proteínas líticas, passando a ficar mais eletrondenso, enquanto que as vesículas internas tendem a diminuir em número. Os corpos multivesiculares (MVB) das estruturas intermediárias que contêm pequenos “core”s densos podem se fundir com lisossomo-secretores maduros (Bossi e Griffiths, 2005). Quando maduros, os lisossomo-secretores possuem duplo compartimentos: uma porção lisossomal e outro contendo moléculas de secreção com atividade degradativa e proteoglicanos associadas à compactação e inativação destas proteínas líticas (Metkar *et al.*, 2002, Clarck e Griffith, 2003). Perforina e granzimas são os maiores componentes líticos do core denso juntamente com proteoglicanos (Burkhardt *et al.*, 1989, 1990; Peter *et al.*, 1991; Griffiths, 1993). Além da compartimentalização por diferentes domínios de pH, a estocagem de moléculas citolíticas nestes grânulos é regulado pela associação com proteoglicanos (Clarck e Griffith, 2003).

1.3.1-Perforina (Prf)

A Prf é o principal mediador citolítico dos CTLs e das células NK (Liu *et al.*, 1995) e atuam na regulação imune em eventos, tais como: a indução da ativação da morte celular, o controle da produção de anticorpos, o controle da autoimunidade e a regulação da resposta citotóxica a algumas infecções virais e células tumorais (Liu *et al.*, 1995). Tanto em humanos quanto em camundongos, a ausência funcional da Prf pode causar severas

deficiências imunes e alterações da homeostase linfóide e mielóide (Menashe *et al.*, 2005; Voskoboinik *et al.*, 2006).

A Prf é estocada como uma proteína ativa em grânulos líticos, onde está complexada com proteoglicanos que deixam a proteína inativa em pH ácido nos lisossomo-secretores (Masson *et al.*, 1990). Sob estímulo, há a liberação de monômeros de PRF que se inserem na membrana plasmática das células alvo, polimerizam e formam agregados de poros. Os poros de Prf levam a lise osmótica, seguido do influxo de granzimas que induzem a apoptose (Stepp *et al.*, 2000).

A Prf é crucial para o funcionamento de outros fatores presentes no grânulo. Granzimas, por exemplo, possuem funções extracelulares que podem ocorrer na ausência de Prf, porém sua capacidade de induzir a morte celular na célula alvo pela clivagem do substrato intracelular é dependente da PRF (Sutton *et al.*, 2000). Bossi e Griffiths (1999) demonstraram também a co-localização de FasL com Prf e granzima B em lisossomo-secretores de células cNK e CD8⁺ de humanos e, a “entrega” de FasL na superfície celular depois da degranulação dos lisossomo-secretores, sugerindo uma inter-relação entre estas duas moléculas.

A expressão de Prf nos grânulos das células uNK DBA⁺ de camundongos foi comprovada por Copi (2006) e nos seus estudos de alteração da homeostasia da interface materno-fetal induzida pela lesão embrionária de camundongos, demonstra o esvaziamento do seu conteúdo, entre elas a perda da imunomarcagem para Prf. Desta evidência, Copi (2006) sugere a possível ativação da resposta citolítica das células uNK no útero gestante.

1.3.2- Catepsina D (Ctsd)

A Ctsd é um membro da família de proteases aspárticas envolvidas na degradação de proteínas presente nos lisossomos (Liaudet-Coopman *et al.*, 2006; Benes *et al.*, 2008). Além da via degradativa, a Ctsd possui o papel na ativação e inativação de algumas

moléculas, como enzimas, hormônios e peptídeos biologicamente ativos (Beckman *et al.*, 2009).

A biossíntese da Ctsd envolve uma série de modificações pós traducionais (Zaidi *et al.*, 2008). Inicialmente a Ctsd é sintetizada como pré-pro-enzima de 412 aminoácidos e tem seu peptídeo sinal removido ainda dentro do retículo endoplasmático. É então transportada como pro-enzima para um compartimento ácido, onde é ativada proteoliticamente pela remoção de 44 aminoácidos. Sua forma madura pode possuir uma ou duas cadeias, ambas com igual atividade (Erickson, 1989). A forma que possui duas cadeias é originada pela excisão de 7 aminoácidos no domínio N-terminal, resultando na associação não covalente da cadeia pesada C-terminal de 34kDa com a região N-terminal de 14 kDa (Zaidi *et al.*, 2008).

Ctsd é distribuída em vesículas intracelulares incluindo lisossomos, fagossomos e endossomos (Rochefort *et al.*, 2000) e necessita de uma microambiente ácido (pH5,5) tanto para sua maturação, quanto para sua atividade proteolítica (Rochefort *et al.*, 2000; Cruz-Soto *et al.*, 2009).

1.3.3-Granzima A (Gzma)

Gzm compreendem cerca de 90% da massa dos grânulos lisossomo-secretores em células T e NK (Jenne, 1988; Trapani, 2001). Um total de 8 Gzm (A-G e M) tem sido identificadas em camundongos e 5 em humanos (A, B, H, M e a triptase 2). Considerando a natureza destrutiva destas enzimas, elas são produzidas e, na maioria das vezes, estocadas como zimogênios inativos. Para serem ativadas, as Gzm necessitam ser clivadas (Kummer *et al.*, 1995; Meade *et al.*, 2006).

Gzma é uma serina protease presente nos grânulos das células T e NK, responsável por induzir apoptose independente de caspases (Griffiths, 2002; Lieberman, 2003), sendo esta caracterizada por danos no DNA. Gzma é capaz de clivar múltiplos componentes do complexo SET, resultando na ativação de endonucleases NM23-H1 e exonucleases TREX1 (Chowdhury *et al.*, 2006).

Adicionalmente, Gzma tem sido reportada a induzir espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a perda do potencial mitocondrial (Martinvalet *et al.*, 2008). Adicionalmente, outros estudos sugerem que a perda de expressão de Gzma e Prf, mas não de Gzmb é suficiente para promover a morte celular (Metkar *et al.*, 2008; Kaiserman and Bird, 2010). De fato, em contraste com Gzmb, Gzma não está correlacionada com a citotoxicidade das células T CD8+ (Harari *et al.*, 2009), enquanto pode ser encontrada amplamente expressa em CTL e em outros subgrupo de células T não citotóxicas sugerindo um envolvimento da protease em processos alternativos.

Recentemente, atenções têm sido dadas às funções das Gzm no meio extracelular. Estes estudos sustentam que as Gzm podem influenciar na remodelação da matriz extracelular (MEC) e na resposta inflamatória (Froelich *et al.*, 2009; Romero e Andrade, 2008). A MEC é composta de glicosaminoglicanos, colágenos, fibronectina, elastina e laminina (Alberts *et al.*, 2002) que são substratos para as Gzm. A capacidade de clivagem da MEC sugere que as granzimas, em especial a Gzma, exercem influência na migração de células imunes nos tecidos e nos leito vasculares (Choy *et al.*, 2004).

As Gzm são estocadas em grânulos ligados aos proteoglicanos, prevenindo o contato com o citoplasma e o pH ácido nos grânulos são requisitos para manter a enzima inativa. Como mecanismos de controle adicional, as Gzm possuem inibidores naturais, as serpinas, que limitam a sua atividade (Izuhara *et al.*, 2008; Kaiserman e Bird, 2010).

Supostamente a Gzma poderia ser expressa nos grânulos das células uNK de camundongos, porém não há relatos que comprovem a presença das mesmas até o momento.

1.3.4- Serglicin (Srgn)

Srgn é um proteoglicano intracelular encontrado principalmente em células hematopoiéticas e endoteliais (Kolset *et al.*, 2004) participando da retenção de mediadores inflamatórios em grânulos de estocagem e na formação dos mesmos (Kolset e Tveit, 2008). Em diferentes tipos de células leucocitárias, o Srgn pode apresentar diferenças quanto à composição de glicosaminoglicanos (GAG), sendo as principais: Condroitim Sulfato 4 (CS-4), condroitim Sulfato -6 (CS-6), Condroitim dissulfato 4,6 (CS-E), Condroitim Sulfato B

(CS-B) e heparina . A sulfatação do Srgn é importante, pois de acordo com o tipo e grau de sulfatação tem-se diferentes componentes que são armazenados (Uhlin-Hansen *et al.*, 1989).

Animais deficientes para Srgn apresentam drástico comprometimento na formação de grânulos em mastócitos, com redução na expressão de proteases e histamina, essenciais ao processo de granulopoiese em geral (Grujic *et al.*, 2005). Embora não pertencente à linhagem granulocítica, importante notar que grânulos citotóxicos de linfócitos T também são comprometidos pela ausência de Srgn (Grujic *et al.*, 2005). Srgn também está envolvido na retenção de proteases em grânulos de estocagem (Whitaker-Menezes *et al.*, 1995). Esta interação é dependente da estrutura e propriedades das proteases e de outros componentes que interagem com Srgn (Sali *et al.*, 1993; Grujic *et al.*, 2005).

Presume-se que o Srgn possa ter uma importante função na composição dos grânulos lisossomo-secretoras das células uNK, porém, até o presente momento, não há relatos que faça a correlação da presença deste proteoglicano nos grânulos lisossomo-secretoras ou outro compartimento das células uNK.

1.4 - Vias de secreção das células da resposta imune inata

A atividade funcional de muitas células derivadas da linhagem mielóide é através da liberação de moléculas efetoras específicas em resposta a estímulos externos. Este é um processo de secreção regulada nas quais as moléculas efetoras são estocadas intracelularmente dentro de compartimentos especializados (Stinchombe *et al.*, 2006).

A liberação do conteúdo dos grânulos das células leucocitárias da resposta imune inata, tais como, eosinófilo, neutrófilo, mastócito e células NK, pode ocorrer através de pelo menos quatro mecanismos conhecidos (Abbas *et al.*, 2003, Logan *et al.*, 2003), de acordo com o produto a ser secretado, quais sejam:

a) exocitose clássica: envolve a liberação do conteúdo de cada grânulo secretor que se abre isoladamente na superfície celular;

b) exocitose composta: caracterizada pela fusão prévia de múltiplos grânulos no compartimento intracelular que se abrem em um ponto na superfície celular para a secreção do conteúdo de vários grânulos;

c) degranulação fragmentada ou em partes do conteúdo do grânulo denominado de *piecemeal degranulation* (PMD): caracterizada pela liberação de vesículas citoplasmáticas na presença de grânulos cristalóides intactos contendo componentes do core parcialmente erodidos,

d) necrose ou citólise: liberação de grânulos intactos no tecido decorrente da ruptura e morte da própria célula que contem os grânulos (Logan *et al.*, 2003).

Citocinas, quimiocinas e vários fatores imunologicamente ativos também podem ser estocados em dois tipos de compartimentos: os grandes grânulos e as pequenas vesículas, que podem ser potencialmente liberadas pelas quatro vias citadas acima (Moqbel *et al.*, 2006).

O processo de exocitose envolve uma série de eventos altamente regulados, desde a mobilização e a translocação de vesículas ou grânulos para a periferia celular, o encontro do grânulo com a membrana plasmática, a ligação do grânulo com a membrana plasmática, a fusão do grânulo com a membrana e finalmente, a liberação do conteúdo granular (Logan *et al.*, 2003).

Já a degranulação fragmentada ou por PMD permite a liberação diferencial dos produtos secretados pelas células (Bandeira-Melo *et al.*, 2001), sendo um evento fisiologicamente relevante. A presença deste tipo de secreção em basófilos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos sugerem que os eventos de PMD possam estar envolvidos na secreção de citocinas e outros produtos associados com inflamação e crescimento de tumores (Crivellato *et al.*, 2003).

Uma característica marcante das células que secretam via PMD é a presença de grande quantidade de vesículas de 70-150 nm de diâmetro, maioria das quais estão livres no citosol e próximas da membrana plasmática, ou próximas da membrana peri-granular, ou

como um “broto” do grânulo (Crivellato *et al.*, 2003). De acordo com Spencer e colaboradores (2006) a secreção de citocinas baseada no mecanismo de PMD, explica a variação de citocinas liberadas mediado por diferentes receptores. Isto é, eosinófilos estimulados com Ifn- γ secretam Il-12, mas não Il-4 (Bandeira-Melo *et al.*, 2002), enquanto que eosinófilos estimulados pelos Ccl11, RANTES (CCL5) ou Il-6 secretam Il-4, mas não Il-12 (Bandeira-Melo *et al.*, 2002; Spencer *et al.*, 2006.), sabendo-se que tanto Il-4 quanto Il-12 estão associados ao mesmo grânulo cristalóides de eosinófilos (Moqbel *et al.*, 1995; Bjerke *et al.*, 1996). Mecanismo semelhante pode estar associada com a degranulação do conteúdo dos grânulos lisossomo-secretor das células uNK no útero gestante.

1.4.1 -Mecanismos de secreção dos grânulos lisossomo-secretores

Lisossomos são considerados a estação terminal das células para a hidrólise de substratos de origem extra ou intra-celulares e na maioria das células estas organelas não liberaram seu conteúdo para o espaço extracelular. Porém, Rodriguez e colaboradores (1997) demonstraram que lisossomos podem ser induzidos à exocitose pelo aumento nos níveis intracelulares de cálcio.

A liberação do conteúdo dos lisossomo-secretores pode ocorrer pela fusão dos grânulos com a membrana plasmática, pela degranulação PMD, onde o conteúdo dos grânulos é transportado para a superfície celular em pequenas vesículas, ou pelo processo de exocitose composta, onde os grânulos fusionam uns com os outros na superfície da célula (Logan *et al.*, 2003).

O mecanismo estabelecido para liberação do conteúdo dos grânulos lisossomo-secretores em células NK é a exocitose clássica (Griffiths, 1997), exigindo a ocorrência da sinapse imunológica cujo reconhecimento das células alvo é mediado por receptores de membranas e ligantes específicos (Stinchcombe *et al.*, 2006., Ménager *et al.*, 2007). Quando a célula alvo é reconhecida, os lisossomo-secretores são transportados para o sítio de estimulação para serem liberados. Em CTLs, este movimento é altamente polarizado,

ocorrendo através de microtúbulos a partir do centro organizador de microtúbulos (MTOC), sendo dirigida por proteínas motoras da família das Quinesinas (Burkhardt *et al.*, 1993). Uma vez perto da periferia celular, o lisossomo secretor utiliza movimentos da actina para percorrer o curto trajeto final para o “*docking*” na membrana plasmática (Langford, 1995).

Ensaio *in vitro* realizados com células uNK demonstraram que, diferentemente das células cNK, não há polarização de grânulos frente às células alvo (Kopcow *et al.*, 2005) e, devido ao seu papel preponderante na produção de citocinas, sugere-se a degranulação fragmentada, PMD. Não há, contudo, evidências experimentais que comprovem a degranulação e citotoxicidade das células uNK contra células alvo (Croy *et al.*, 1991).

Estudos prévios desenvolvidos em nosso laboratório, utilizando o modelo de lesão embrionária em camundongos para simular anomalias gestacionais, demonstraram que as células uNK apresentam alterações morfológicas marcantes através da citoquímica com lectina DBA como a desestruturação dos grânulos e perda dos conteúdos do compartimento secretor (Copi, 2006). Tais observações na resposta das células uNK sob condições de anomalia ou estresse do ambiente uterino gestante sugerem que o processo de secreção das células uNK não coadunam com os paradigmas estabelecidos no momento para secreção dos grânulos lisossomo-secretore, merecendo esta organela uma atenção especial para se compreender a atividade das células uNK na gestação.

1.4.2 - Moléculas reguladoras do transporte intracelular e vias de secreção

Qualquer que seja o produto de secreção, a liberação deste para o meio extracelular envolve o transporte, a relocação e a fusão de membranas num mecanismo altamente seletivo e controlado por moléculas reguladoras (Logan *et al.*, 2003). A fusão entre membranas é regulada essencialmente por proteínas SNARE (receptores SNAP - Receptor de proteína de ligação do fator sensível à N-etilmaleimida solúvel). Estas proteínas estão localizadas nas vesículas ou grânulos (v- SNARE) e interagem com outras proteínas SNARE da membrana alvo (t-SNARE) (Sollner *et al.*, 2003). A formação desses complexos SNARE é por sua vez controlada por outras proteínas na cascata exocítica,

incluindo as proteínas da família Rab (GTPases da superfamília Ras). As proteínas Rab regulam e controlam o tráfego de membranas intracelulares, eventos como formação de vesículas, motilidade de organelas e fusão de vesículas em membranas específicas (Stinchombe *et al.*, 2000).

Isoformas de proteínas SNARE são classificadas também com base em seus domínios conservados, arginina (R) ou glutamina (Q) na região central do core da proteína (Fasshauer *et al.*, 1998). Em mamíferos, a fusão de membranas acontece pela complexação de 4 proteínas SNARE α -*helix*, formadas pela interação de 1 isoforma R-SNARE, uma proteína de vesícula associada a membrana (Vamp- *Vesicle-associated membrane protein*) com 3 isoformas Q-SNARE, uma syntaxina e 2 proteínas Snap (*synaptosome-associated protein*) 23,25 ou 29 (Rizo *et al.*, 2002; Sutton *et al.*, 1998)

Vamp-7, por exemplo, é uma v-SNARE, e assim como em neurônios, ela é crucial para a liberação de mediadores contidos em compartimentos lisossomais secretórios em eosinófilos e neutrófilos (Logan *et al.*, 2006). Marcet-Palacios e colaboradores (2008) demonstram a co-localização de Vamp-7 com grânulos que contêm granzima B em células NK da linhagem YT-Indy. Outro recente estudo demonstrou que Vamp-7 está presente em grânulos relacionados com lisossomo de células 2H3 (linhagem de mastócitos da mucosa) e esta proteína SNARE se transloca para a membrana plasmática após estímulo de exocitose com cálcio (Hibi *et al.*, 2000).

Vamp-8, também conhecida como endobrevina é expressa em muitos tecidos, incluindo pulmão, rim, coração e glândulas salivares (Wang *et al.*, 2007). Esta proteína foi inicialmente caracterizada como uma v-SNARE envolvida na fusão homotípica de endossomos precoces e tardios (Antonin *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 1998), e na fusão heterotípica de endossomos e lisossomos (Mullock *et al.*, 2000). Porém, mais recentemente, tem-se demonstrado o papel crucial na regulação da exocitose no pâncreas e em outras glândulas exócrinas (Wang *et al.*, 2007). Tiwari e colaboradores (2007) também vêm demonstrando a importância de Vamp-8 na formação do complexo de 4-helix SNARE na exocitose de mastócitos. Vamp-8 está localizado em grânulos secretórios da linhagem de

mastócitos RBL (Paumet *et al.*, 2000), e quando estas células são deficientes para Vamp-8, mesmo sob estimulação do FcRI, estas não são capazes de liberar B- hexosaminidase (marcador de grânulos secretórios em mastócitos) (Tiwari *et al.*, 2007).

Vamp-8 é capaz de se complexar com Snap-23 para efetivar a degranulação de mastócitos (Paumet *et al.*, 2000). Snap-23 é uma t-SNARE envolvida principalmente na secreção de lisossomos, e é expressa na membrana plasmática de alguns tipos celulares (Wong *et al.*, 1997). É proposta também a participação de Snap-23 na exocitose de grânulos relacionados a lisossomos em mastócitos (Guo *et al.*, 1998; Andrews *et al.*, 2000). Em células do sistema imune, Snap23 e syntaxina 4 frequentemente formam complexo SNARE pelo pareamento com as R-SNARE as proteínas Vamp-7, Vamp-8 e Vamp-2 dos grânulos secretórios.

Já as proteínas Rabs pertencem a uma família muito diversificada (mais de 40 isoformas), constituídas de proteínas G monoméricas relacionadas à Ras (*Rat Sarcome protein*). Estas isoformas possuem distintas localizações subcelulares e regulam etapas específicas do tráfego de vesículas por ligações com proteínas efetoras (Grosshans *et al.*, 2006). Uma ampla variedade de proteínas Rab tem sido identificadas e atuam em diferentes processos, como a formação de “*buddings*” de vesículas no Golgi, recrutamento de proteínas do citoesqueleto para o movimento de organelas/vesículas e a conexão entre proteínas durante o “*docking*” de grânulos e vesículas (Pfeffer *et al.*, 2001). Vários são os estudos que relacionam uma variedade de isoformas Rab em estágios tardios da exocitose com a formação de complexos SNARE em células hematopoiéticas. CTLs deficiente para Rab27, por exemplo, tem sua secreção inibida, porém exibem a polarização dos seus grânulos juntamente com a membrana plasmática, indicando um possível papel de Rab27 durante o entrelaçamento das proteínas para a formação do complexo SNARE (Stinchombe *et al.*, 2000). Rab27a está envolvida na secreção lisossomal de muitos tipos celulares, associada a grânulos de cromafins (Guo *et al.*, 1998), grânulos secretórios de insulina (Paumet *et al.*, 2000), vesículas pro-acrossomais de espermátides (Hibi *et al.*, 2000), melanossomos (Bahadoran *et al.*, 2001) e grânulos líticos (Haddad *et al.*, 2001). Já a Rab11 está envolvida principalmente no “*sorting*” e reciclagem de endossomos, na rede de

membranas *trans*-Golgi e nas vesículas secretórias pós Golgi (Babast *et al.*, 2002). Portanto, está presente em tecidos com intensa atividade de vesículas (Bache *et al.*, 2003), porém o seu modo de ação ainda não é claro. Na rede Golgi, a proteína Rab34 pode apresentar dupla função, uma sendo relacionada com o transporte intra-Golgi, enquanto que outra pode estar relacionada com mobilidade de lisossomos na região justa nuclear (Wang e Hong, 2002), uma vez que, Rab34 é capaz de mover lisossomos através do MTOC.

Assim, tanto proteínas SNAREs, como as pequenas GTPases e Rab são potenciais candidatas a serem as reguladoras da exocitose clássica e/ou fragmentada, assim como, da suposta secreção por PMD nas células uNK. Contudo, não há até o momento experimentos que evidenciem a expressão destas moléculas reguladoras de biogênese e tráfego de vesículas intracelulares e secreção celular nas células uNK.

1.5 – Considerações

Estima-se que as perdas gestacionais clinicamente reconhecidas afetam cerca de 2% de mulheres em idade reprodutiva. Já em mulheres que já tiveram dois abortos sucessivos, a probabilidade varia de 17 a 35%, e para aquelas com três ou mais abortos, a probabilidade de ocorrência do quarto está entre 25 e 46% (Barini *et al* 2000). As perdas gestacionais, principalmente aquelas de abortos espontâneos recorrentes (AER) estão relacionadas a mecanismos imunológicos, este conhecimento importante durante no sucesso da gestação envolvendo a adaptação do sistema imune materno em resposta ao desenvolvimento do embrião semi-alogenico.

Neste contexto as células NK encontradas tanto no sangue periférico como no útero, representam o foco de estudo nos casos de perdas gestacionais pelo fato de pertencerem à categoria de células efetoras da resposta imune inata e representarem a população majoritária de leucócitos que acumulam no útero gestante. Se por um lado as evidências da atuação das células uNK na regulação positiva da homeostasia da interface materno fetal são crescentes, do outro lado, o potencial citolítico da resposta imune inata das células uNK

não tem avançado. Este pouco avanço é compreensível uma vez que, aparentemente, estas células mantêm quiescente a sua atividade citotóxica durante a gestação normal em humanos e outros animais, inclusive em camundongos.

Evidências demonstram o aumento das células uNK em casos de perdas gestacionais (Tuckerman *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2011; Lash *et al.*, 2011; Janosević *et al.*, 2011), porém sem muitos esclarecimentos sobre o fenótipo ou comprovação da atividade citotóxica destas células nestas situações. Em animais experimentais como camundongos, as perdas gestacionais ocorrem, porém são eventos raros e igualmente não se pode prever a ocorrência deste fenômeno. De acordo com Murphy e colaboradores (2005) a inoculação de lipopolissacarídeo bacteriano induz o aborto e supostamente envolve as células uNK e a expressão de Il-10 que modulam a resposta imune inata destas células na gestação. Contudo, não faz menção do mecanismo de ativação e resposta correspondente das uNK como célula efetora, ou ainda, se a possível ação citolítica seria exercida por subpopulações específicas de células uNK, distinta daquelas que modulam positivamente a homeostasia da interface materno-fetal.

Assim, para se elucidar a participação das células uNK na gestação normal e anormal, torna-se importante determinar: 1) a ocorrência de subpopulações de fenótipos funcionais de células uNK quanto a função citolítica e angiogênica ao longo da gestação e 2) compreender a biologia da célula uNK quanto aos mecanismos que regulam as vias de liberação de proteínas da atividade citolíticas e angiogênicas em gestações normais e a participação destas células em perdas gestacionais. A comprovação da célula uNK como efetora das perdas gestacionais é de essencial importância na imunologia da reprodução, podendo abrir uma vertente de pesquisa tanto para estabelecer novos parâmetros para uso em diagnóstico clínico da gestante, assim como desenvolver terapias no controle adicional das células uNK na gestação.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Identificar *in situ* as possíveis ocorrências de subpopulações funcionais relacionadas com a atividade angiogênica mediada pelo Vegfa (*Vascular Endotelial Growth fator A*) e com a atividade citotóxica mediada pelas proteínas citolíticas Prf (Perforina) e Gzma (Granzima A), dentre as células uNK DBA⁺ no útero gestante de camundongos.

2.2- Objetivos Específicos

- Identificar e quantificar as células uNK DBA⁺ produtoras de Vegfa e Prf/Gzma nos períodos iniciais de incidência (7º dg), de maior incidência (9ºdg) e declínio (14ºdg) no útero gestante de camundongos;
- Identificar os compartimentos intracelulares das vias de secreção do Vegfa e Prf/Gzma e sua possível correlação com a heterogeneidade dos grânulos das células uNK DBA⁺;
- Avaliar a capacidade de mobilização dos componentes citolíticos das células uNK DBA⁺ e a sua interdependência com a atividade angiogênica.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem Swiss provenientes do Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), e os da linhagem Balb/c provenientes de *Queen's University*. Todos os animais com idades de 12 a 16 semanas foram mantidos em gaiolas com acesso à água e alimentação “*ad libitum*”. Fêmeas virgens foram acasaladas com machos da mesma linhagem e o dia da constatação do tampão vaginal foi considerado o dia 0 de gestação (dg). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, CEUA/UNICAMP (2043-1) e da *Queen's University*, Canada.

3.2- Coleta e Processamento dos sítios de desenvolvimento embrionário/fetal

3.2.1- Parafina:

Camundongos fêmeas prenhes com 7º, 9º e 14º dg (3 animais para cada dia de gestação) foram anestesiadas com injeção via intraperitoneal de cloridrato de xilazina 2% (Anasedan – Sespo) e cloridrato de Ketamina (Dopalen- Sespo) e perfundidas com 30 a 50 ml de solução fixadora constituído de paraformaldeído 4% em tampão fosfato salina 0,1M em pH 7,4 PBS e sacarose 0,1M via ventrículo esquerdo. Foram coletados todos os sítios de desenvolvimento embrionário/fetal destes animais e processados de acordo com as técnicas rotineiras de embebição em parafina com desidratação crescente de etanol (*Histosec*, Merck, Brasil). Cortes seriados de 5-6µm de espessura foram coletados em lâminas histológicas previamente silanizadas de acordo com o protocolo padrão estabelecido para estudo de células uNK de camundongos (Croy *et al.*, 2010).

3.2.2- Resina Epon:

3 fêmeas prenhes no 9º dg foram anestesiadas e sacrificadas por meio da perfusão via ventrículo esquerdo com 30 a 50 ml de solução fixadora de paraformaldeído (Sigma, *ST Louis, USA*) 2% e glutaraldeído (EMS, *USA*) 1,5% em PBS 0.1M com Sacarose 0,1M. Os fragmentos uterinos contendo os sítios de desenvolvimento embrionário foram dissecados para a obtenção da região mesometrial, e estes foram pós-fixados em tetróxido de ósmio (*Ladd Research, USA*) 1% durante 1 hora à temperatura ambiente. Após desidratação em gradiente crescente de etanol e óxido de propileno (*Aldrich Chemical Co, USA*) as amostras foram embebidas em resina epoxy (Epon, EMS, *USA*). A polimerização foi realizada a 60°C durante 72 horas.

Cortes ultrafinos de 50-70 nm de espessura foram realizados e coletados em telas de cobre (150 mesh) e contrastados em acetato de uranila e citrato chumbo.

3.2.3- Resina LR-White:

3 fêmeas gestantes no 9ºdg foram perfundidas com solução fixadora de paraformaldeído (Sigma, *ST Louis, USA*) 4% e glutaraldeído (EMS, *USA*) 0,1% em PBS 0,1M com sacarose 0,1M durante 15 minutos (min). Os fragmentos uterinos contendo os sítios de desenvolvimento embrionário foram dissecados para a obtenção da região mesometrial. Em adição, a região mesometrial dissecada foi fatiada em plano transversal no vibratome (*Leica*) e secções de 500 µm foram desidratadas em gradiente crescente de N-N-dimetilformamida (Sigma, *Aldrich*), embebidos em resina *LR-White* (EMS, *USA*) e polimerizados a -20°C sob luz UV durante 72 horas.

Cortes semi-finos de 400nm foram obtidos em ultramicrotomo LKB, corados com azul de toluidina 1% para avaliação prévia em microscopia de luz quanto à preservação do material e escolha da região que continha células uNK granulares.

Para reações citoquímicas e imunocitoquímicas, foram coletados cortes ultrafinos (50-70nm de espessura) em telas de níquel (150 *mesh*).

3.3 - Identificação das células uNK DBA⁺ granulares e agranulares com expressões das moléculas Prf, Gzma e Vegfa e suas distribuições no útero gestante.

Para a identificação das células uNK DBA⁺ granulares e agranulares foram utilizadas a citoquímica de lectina DBA de acordo com o protocolo estabelecido por Paffaro e colaboradores (2003) e para a identificação da co-expressão dos marcadores funcionais Prf, Gzma e Vegfa foram utilizados os anticorpos primários e secundários correspondentes em concentrações pre-testadas identificados na tabela 1, como segue:

Tabela 1: Relação dos anticorpos e lectinas utilizados.

Anticorpos Primários e Lectina DBA	Anticorpos Secundários e Estreptoavidina
Lectina DBA biotilada (Sigma- 1mg/ml) 1:200 Lectina DBA FITC (Sigma 1mg/ml) 1:200	Estreptoavidina – Alexa fluor 488 (Sigma 1mg/ml) 1:400 ou Estreptoavidina- <i>gold</i> (ESM-6nm) 1:50
Anti- Perforina feito em rato (Abcam-0,2mg/ml)1:50	Anti-rato – Alexa fluor 594 (Invitrogen) ou Anti- rato –FITC (Sigma) ou Anti-rato- <i>gold</i> 6n (ESM) 1:25
Anti-Catepsina D feito em coelho (Prof. Dr. Sadaki Yokota, <i>Yamanashi School of Medicine, Japan</i>)1:200	Anti- Coelho Cy3 (Vector) ou Anti- Coelho FITC (Sigma) ou Anti-coelho- <i>gold</i> (ESM-10nm) 1:20
Anti-Granzima A feito em cabra (Santa Cruz, 1mg/ml) 1:50	Anti- Cabra - Alexa fluor 594 (Invitrogen) ou Anti- Cabra –Alexa fluor 647 (Invitrogen) ou Anti-Cabra - Alexa fluor 488 (Invitrogen)
Anti-Vegfa feito em coelho (Abcam 0,2mg/ml) 1:200	Anti- Coelho Cy3 (Vector) ou Anti-Coelho Alexa fluor 594 (Invitrogen) Anti- Coelho FITC (Sigma)
Anti-Serglicin feito em cabra (m-20 Santa Cruz)	Anti- Cabra- Alexa fluor 594 (Invitrogen) ou Anti-Cabra- Alexa fluor 488 (Invitrogen).

3.3.1 - Reações citoquímicas e imunocitoquímicas

As lâminas de 7°, 9° e 14° dg foram desparafinizadas, reidratadas e lavadas em PBS 0,05M pH 7,4. Para o bloqueio das reações inespecíficas, os cortes histológicos foram tratados com BSA 1% (Fração V- albumina sérica bovina, Sigma) em PBS 0,1M (PBS/BSA) durante 30 min em temperatura ambiente e incubados com os anticorpo

primários anti-Vegfa ou; anti-Granzima A de camundongo ou; anti- Perforina de camundongo, todos diluídos em PBS 0,05M. Os cortes permaneceram incubados *overnitgh*, 4°C e lavados em PBS 0,05M, pH 7,4. Foram então incubados com os anticorpos secundários de afinidade específica (tabela 1) durante 1 hora em temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram lavados com PBS 0,05M pH 7,4 e submetidos à incubação com lectina DBA conjugada com FITC (Sigma) por 2 horas em temperatura ambiente, ou lectina DBA biotinizada por igual tempo e revelada com estreptoavidina-FITC (Sigma *St Louis*, USA). Os cortes foram lavados e montados em meio Vecta-Schield com DAPI (*Vector, Laboratories*).

Para as análises foram utilizados os microscópios: Eclipse 800 (*Nikon*, Japan), sendo as imagens documentadas com o programa *Image Pro Plus* (*Media Cybernetic*, USA) e o Zeiss AxioCam, utilizando o sistema de captura e imagens da *Axiovision* (*Zeiss*, Canada).

3.3.2 Quantificação das células uNK DBA⁺, Prf⁺, Gzma⁺ e Vegfa⁺

Em cada um dos sítios de desenvolvimento embrionária (7° e 9°dg) ou fetal (14°dg) foram distinguidas as duas regiões do mesométrio: MLAp e DB.

As quantificações foram realizadas em pelo menos 3 cortes histológicos submetidos às reações citoquímica/imunocitoquímicas nas seguintes combinações: 1) lectina DBA/Prf e DAPI; 2) lectina DBA/ Gzma e DAPI; 3) lectina DBA/Vegfa e DAPI.

O DAPI foi utilizado para evidenciar os núcleos e estes adotados como referência do número total de células em cada campo de imagem digitalizada.

Campos de imagem distinguindo-se as regiões entre MLAP e DB foram padronizados em objetivas de 20x, e foram obtidas imagens digitalizadas de cada dia de gestação, respeitando-se a dinâmica das alterações morfológicas correspondentes descritas por Paffaro Jr e colaboradores (2003) e Croy e colaboradores (2010). Para cada conjunto de

reações imunocitoquímicas nos diferentes dias de gestação foram obtidas de 23 a 47 imagens digitalizadas direcionadas à quantificação.

O programa utilizado para a quantificação das células foi o *Image ProPlus 6*, onde foi utilizado a ferramenta *Manual Point Count*.

A quantificação foi realizada estabelecendo-se uma ordem de contagem, onde primeiramente foi contabilizado o número total de núcleos (células), seguido a este a contagem das células somente DBA⁺ e finalmente as células duplamente positivas (DBA e Prf ou Gzma ou Vegfa).

3.3.3 Análises estatísticas

Conhecido o número total de células uNK DBA⁺ presente no útero gestante nos diferentes dias de gestação, e considerando este número como 100% das células alvo em estudo, foram obtidos os valores relativos de células: 1) uNK DBA⁺ / Prf⁺; 2) uNK DBA⁺ / Gzma⁺ e; 3) uNK DBA⁺ / Vegfa⁺.

Considerando que as variáveis qualitativas- dia de gestação e região do útero - interferem na análise da incidência de células uNK DBA⁺, a distribuição normal dos dados foi verificada por Kolmogorov-Smirnov (KS) seguido de dois diferentes testes estatísticos dos valores relativos das células uNK que expressam as três moléculas funcionais. O primeiro consistiu na comparação entre fatores (Prf; Gzma;Vegfa) em uma mesma região (MLAp ou DB). Nesta análise foi aplicado o teste de ANOVA *one-way* seguido de *a posteriori* Tukey, de $p < 0,05$ (value:±SEM). O segundo parâmetro foi a comparação entre as duas regiões (MLAP e DB) do útero quanto à expressão de um mesmo fator. Esta análise envolveu duas variáveis: molécula alvo expresso nas uNK DBA⁺ e sua distribuição no MLAP e DB. Sendo assim, foi utilizado o ANOVA Two-way seguido do pós-teste Bonferroni, com $p < 0,05$ (value±SEM). Todas as análises estatísticas foram realizadas através do Programa *Prisma*.

3.4 - Avaliação dos compartimentos intracelular contendo Vegfa, Prf e Gzma nas células uNK DBA⁺

Neste estudo foram utilizados sítios de desenvolvimento embrionário ao 9ºdg processados para parafina, dia de gestação o qual apresenta células uNK DBA⁺ granulares e agranulares. Foram realizadas imunomarcações para as moléculas Prf, Gzma e Vegfa, seguida das análises no Microscópios Confocal *Leica TCS SP2 Multi Photon (Queen's University)*. O software utilizado foi o *ImageProPlus Basic Leica Operating Software, Multi-Colour Imaging*.

Foram utilizados o painel de anticorpos primários e secundários adotados descritos em 3.3 (**tabela 1**) em procedimentos semelhantes para duplas marcações.

As combinações de marcações utilizadas são demonstradas na Figura 2:

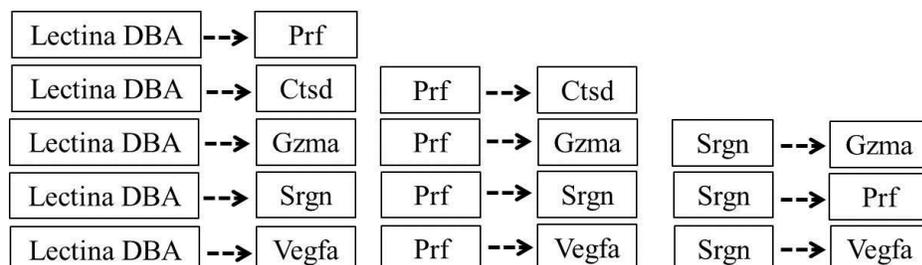


Figura 2: Esquema das combinações entre as duplas reações imunofluorescentes direcionadas às análises de correlação de co-localização de fatores nas células uNK.

3.4.1- Análise de co-localização de Prf, Ctsd, Gzma, Srgn e Vegfa nas células uNK DBA⁺

Para cada um dos conjuntos de imunocitoquímica e citoquímica realizados, nas combinações demonstradas na figura 2, foram digitalizadas imagens das células uNK

granulares utilizando a objetiva de 40x. A partir destas imagens, análises de co-localização entre os fatores foram realizadas. Para isso foi utilizado o recurso de seleção do programa *Image Pro plus* capaz de selecionar áreas no citoplasma da célula uNK contendo marcações isoladas e/ou marcações superpostas, e assim determinar o valor de co-localização entre os marcadores analisados.

Após a seleção, o Coeficiente de Pearson foi realizado através do mesmo *Programa Image Pro plus*, o qual funciona por contagem de sobreposição de pixels de ambas as marcações fluorescentes.

A normalidade dos valores foi verificada pelo teste estatístico de *D'Agostino* no Programa Prisma.

3.4.2 - Dimensão das vesículas e grânulos das células uNK DBA⁺

Foram utilizadas um total de 37 imagens digitais de células uNK registradas em microscopia confocal obtidas em aumento constante (objetiva de 40x). Cada uma das imagens conteve entre 47 e 63 cortes digitais em intervalos de 0,120 μ m e 0,09 μ m, respectivamente, que conferiam à imagem profundidade com possibilidade de decomposição das mesmas. Isso permitiu a análise individualizada dos grânulos e vesículas contidos numa mesma célula com até 6 μ m de espessura (espessura do corte de parafina). Considerando o curto intervalo entre os registros digitais e a dimensão das vesículas, as medidas dos diâmetros das vesículas foram realizadas a cada 5 cortes digitais, acompanhando manualmente cada imagem para assegurar a medida no maior diâmetro de cada estrutura mensurada. As medidas foram realizadas no programa *Image pro plus 6*, através da contagem de pixels, seguida de conversão em micrômetros. Para isso foi utilizada a ferramenta *measurements line feature*.

3.5- Expressão dos genes de moléculas reguladores da biogênese e tráfico de vesículas intracelulares

3.5.1- Isolamento de células uNK DBA⁺

As células uNK foram isoladas do útero gestante no 9ºdg, conforme protocolo descrito por Bizinotto *et al* (2008) utilizando esferas magnéticas *Collection M450 Biotin Binder* (Invitrogen-Dynal Co, USA) de 4,5µm de diâmetro.

Em resumo, o procedimento consistiu em revestir a proporção de 10^7 esferas magnéticas conjugadas com estreptoavidina com 1µg de lectina DBA biotinada (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Para a obtenção de suspensão celular da região mesometrial, pelo menos 3 fêmeas gestantes foram sacrificadas por deslocamento cervical, os cornos uterinos foram removidos e cada sítio de desenvolvimento embrionário dissecados para obtenção dos tecidos mesometriais isentos de trofoblasto. O tecido mesometrial foi finamente recortado com auxílio de lâminas de bisturi de e dissociado com 500U de DNase (Roche, Alemanha) em 1ml de solução de *Hanks* e homogeneizados por pipetagem. Esta suspensão celular foi filtrada em telas de nylon com malhas de 80µm, lavada em PBS/BSA a 1% por centrifugação 200g durante 10 min a 4°C e ressuspendida em 1ml de PBS/BSA a 1%. Após quantificações em câmara de Neubauer, estas foram colocadas em proporção de 5 esferas magnéticas revestidas com lectina DBA por célula. As células foram concentradas, imobilizadas e isoladas no concentrador de partículas magnéticas (MPC, Dynal Co, Oslo). As células uNK foram ressuspensas em solução de N-acetil-Galactosamina (Sigma Co, St Louis/USA) na concentração de 0,1M para desassociar as células uNK das esferas.

As células livres foram lavadas por centrifugação a 200g por 10 min a 4°C e adicionado Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) para a extração do RNA total das células uNK.

3.5.2 - Isolamento das células esplência NK NK1.1⁺

Camundongos machos foram sacrificados por deslocamento cervical e imediatamente após o sacrifício o baço foi removido em condições assépticas e imerso em meio RPMI 1640 com 10% FBS (*Fetal bovine serum*), recortado com lâminas de bisturi e macerado em tamiz. A suspensão celular foi centrifugada e o sedimento celular foi submetido à lise de hemáceas em solução salina/água destilada na proporção de 1:2 por 20 segundos sob agitação. Depois de reconstituída a isotonicidade do meio em salina, a suspensão celular foi centrifugada, e o sedimento enriquecido de esplenócitos foi ressuspendido em meio RPMI 1640 10% FBS à 37°C e incubadas em placas de petri em estufa de atmosfera úmida com 5% de CO₂ à 37°C. Os macrófagos foram removidos do meio por adesão após 120 min de incubação. As células em suspensão foram tratadas com o anticorpo NK1.1 biotilado (gentilmente cedido pela Profa. Dra. Wirla Tamashiro, Depto Microbiologia e Imunologia, IB, UNICAMP) em 400 µl PBS/BSA 1% na concentração de 1µg de anticorpo por 10⁶ células alvo durante 30 min. Em seguida, estas células foram lavadas com PBS/BSA 1%, quantificadas em câmara de Neubauer e incubadas com esferas magnéticas revestida com estreptoavidina na proporção de 5 esferas por célula viáveis durante 30 min a 4°C. Em seguida as células foram imobilizadas no MPC (*Dynal*), lavadas em PBS/BSA centrifugadas. Ao sedimento de células NK esplênicas (sNK) NK1.1, isoladas e purificadas foram adicionados Trizol (*Invitrogen, Carlsbad, CA*) para a extração do RNA total.

3.5.3 –Extração de RNAtotal e obtenção do cDNA das células uNK DBA⁺ e sNK NK1.1⁺.

A suspensão de células uNK DBA⁺ e sNK NK1.1⁺ isoladas com 1 ml de Trizol foram homogeneizadas no Vórtex mantidas em repouso por 5 min a TA. Adicionou-se 100 µl de clorofórmio (*J.T. Baker*), e as amostras foram homogeneizado em Vórtex durante 30 seg. Após 3 min de repouso em TA foram centrifugadas por 15 min a 12.000g a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para tubo de 1,5ml. Nesta fase aquosa acrescentou-se 500 µl ml de

álcool isopropílico (*J.T.Baker*) e 1,5ul de acrilamida linear (*J.T.Baker*; 20ug/ml), para obter uma maior eficiência na precipitação do RNAtotal. Após homogeneização suave, as amostras foram mantidas em repouso por 12 horas a -20°C.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 10 min a 4° C e após completa remoção do sobrenadante, adicionou-se 500 µl de etanol (*J.T.Baker*) a 70% e H₂O/DEPC (Sigma) gelado e submetidos a nova centrifugação por 10 min a 7.500g a 4°C. Os sobrenadantes das amostras foram descartados e ao sedimento foram adicionados 500µl de etanol absoluto (*J.T.Baker*) a - 20°C. Constatada a soltura do sedimento do fundo do tubo após agitação no Vortex, centrifugou-se as amostras a 7500 g a 4°C por 10 min. O sedimento obtido foi solubilizado em 14 µl de H₂O/DEPC e mantidos congelados a -80° C até o momento do uso.

O cDNA foi obtido a partir de 5ul de RNA total utilizando-se o kit *SuperScript II* (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com os procedimentos recomendados nas instruções do fabricante. Para a realização da reação de RT-PCR (*Reverse Transcriptase- Polymerase chain reaction*) foi padronizada a concentração de 0,75ug/ul de cDNA.

3.5.4 - Amplificação dos transcritos pelo-PCR

Os pares de primer sense e *anti-sense* específicos para os genes de camundongos de: *rab11b*, *rab27a*, *rab34*, *vamp8*, *vamp7*, *snap* (tabela 2) foram desenhados utilizando os programas *Primer 3* e o *Primer Express* versão 2.0 (Applied Biosystems), *Operon Molecules for life*.

Tabela 2 - Seqüência de primers desenhado para o PCR

Genes alvos	Primer sense	Primer anti-sense
rab11b	5' CCG TGC CAT TAC CTC TGC GTA C 3'	5' CCT TCA GCC AGC GCT CCA CGT TCT CAT A 3'
rab27a	5' GCA TTC TTC AGG GAC GCT AT 3'	5' GCA TCT GTA GCT GGC TTA TC 3'
rab34	5' CGA TTT GAA GTC TTG GGT GT 3'	5' GCT TGA GCT CCA CGG TAG TA 3'
vamp8	5' CCA GAA TGT GGA GCG GAT CTT 3'	5' CCT TCT GGG ACG TTG TCT TG 3'
vamp7	5' GCT GCA GCC ATG TGT ATG AA 3'	5'GCC ATG TAA ACC CAC CAC AG 3'
snap23	5' GAC TCA ATG GGG CAG CAT 3'	5' GGC AAT GTC AAT ACG ATT C 3'

Para o PCR foram utilizados o Kit *Taq-DNA polimerase (Invitrogen)* com protocolo ajustado para uso de volume final de 10µl para cada reação, no termociclador (*GeneAmp PCR System 9700 – Applied Biosystems*). Para todos os transcritos analisados foram utilizados o seguinte programa de ciclagem: 94°C por 2 min (1x), 45 ciclos de 94°C por 45 seg, 57°C por 45 seg e 72° por 45 seg, seguidos de 72°C por 5 min.

Os transcriptos amplificados pelo PCR foram avaliados pela eletroforese em gel de agarose de 3%, no aparelho de eletroforese (*Bio-raid Laboratories*) a 75 volts. 6 µl de *TrackII100bp DNA Ladder* (Invitrogen) como referência e corado com brometo de etídio e fotodocumentada no *Image Master VDS – Pharmacia Biotech*.

3.6 - Ativação das células uNK DBA⁺ in vivo

Trabalhos anteriores do grupo (Roman, 2002, Copi, 2007, Lima, 2008) demonstraram que a Eutanásia cirúrgica do embrião (ECE) promove alterações profundas na morfologia das células uNK detectadas pela citoquímica de lectina DBA. Dentre as alterações, a perda da marcação do conteúdo dos grânulos pela lectina DBA, sugere a ativação da resposta imune inata mediada pela secreção das proteínas líticas presentes nestes grânulos. Baseado neste conhecimento, foi realizado o procedimento de ECE para avaliar a mobilização das proteínas líticas contido no compartimento secretor dos grânulos lisossomo-secretor das uNK DBA+, como descrito a seguir:

3.6.1- Eutanásia cirúrgica do embrião (ECE)

Pelo menos 3 fêmeas prenhes da linhagem Swiss nos 9º dg foram anestesiadas com injeção via intraperitoneal de cloridrato de xilazina 2% (Anasedan – Sespo) e cloridrato de Ketamina (Dopalen- Sespo) e laparatomizadas em seguida. Constatada a presença de sítios de implantação em desenvolvimento ao longo dos cornos uterinos, foram induzidas lesões mecânicas introduzindo uma agulha hipodérmica (15x5) através da parede uterina na face anti-mesometrial do sítio de desenvolvimento embrionário, em profundidade suficiente para lesar o embrião sem atingir a região mesometrial, onde se localiza as células uNK. As lesões foram realizadas em sítios alternados, sendo no mínimo 2 sítios de cada corno uterino e, padronizados para serem realizadas entre 8 e 9 horas da manhã.

Os períodos utilizados pós- ECE até o sacrifício do animal foram de: 10, 30 e 60 min. Como controle, um grupo de animais foi manipulado de forma semelhante, exceto quanto à intervenção cirúrgica de lesão embrionária.

Os sítios de desenvolvimento embrionário submetidos ao ECE e seus respectivos controles foram coletados e processados para parafina, resina Epon e resina LR-White como descrito em 3.2.

3.6.2-Citoquímica e imunocitoquímica para microscopia de fluorescência.

Os procedimentos para reação da lectina DBA e imunomarcção para Prf, Gzma e Vegfa foram realizados nas amostras de 3.6.1 processadas para parafina, conforme descrito em 3.3 e analisados ao microscópio Eclipse 800 (*Nikon*, Japan) e as imagens digitalizadas com o programa *Image Pro Plus* (*Media Cybernetic*, USA).

3.6.3 -Análise ultraestrutural

Cortes ultrafinos obtidos de materiais processados das amostras de LCE em 3.6.1 e de animais controles em 3.2.2 foram observados em microscópio eletrônico de transmissão–LEO EM 906 do Laboratório.

3.6.4 - Citoquímica e imunocitoquímica ultraestrutural

Para citoquímica ultraestrutural de lectina DBA, foi adotado o protocolo descrito por Paffaro e colaboradores (2003) e Croy *et al* (2010). Para imunomicroscopia eletrônica os cortes ultrafinos de resina LR-White dos materiais obtidos em 3.6.1 coletados em telas de níquel foram reidratados com água ultra-pura, equilibradas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4, e seguido de incubação com BSA 1% (Sigma, Aldrich) em tampão Tris-HCl 0,1M pH7,4, durante 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-Prf ou anti-Ctsd (tabela 1), *overnight*, 4°C. Os cortes foram lavados em Tris-HCl 0,1M pH 7,4 e incubados com anticorpo secundário correspondente conjugado com ouro coloidal (tabela 1) durante 60 min a TA. Após lavagem com Tris-HCl 0,05M, seguido de água ultra- pura e secagem durante 1 hora, os cortes foram contrastados com acetato de uranila (1%), citrato de chumbo e revestidos com película de carbono. Como controles foram utilizados os cortes ultrafinos obtidos em 3.2.2 de animais normais no 9º dg.

As análises foram realizadas com microscópio eletrônico de transmissão, LEO EM 906 do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia- UNICAMP e o Microscópio Eletrônico Phillips do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual de Londrina.

4- RESULTADOS

A citoquímica de lectina DBA (*Dolichos biflorus*) é o método consagrado para a identificação das células uNK no útero gestante de camundongos. Este método identificou e localizou as células uNK agranulares e granulares baseado na expressão de glicoconjugados contendo N-acetil,D-galactosamina terminal na superfície celular e nos grânulos citoplasmáticos (quando presentes) destas células em todos os dias de gestação analisados. A incidência relativa das células uNK DBA⁺ (Figura 3a) foi realizada distinguindo a região MLAp da DB nos 7º, 9º e 14º dg (Figuras 3 b-g).

No 7ºdg, a região do MLAp ainda não está plenamente organizada, porém para fins de análises comparativas da distribuição das células uNK DBA⁺ granulares e agranulares, foram estabelecidas como DB a área do endométrio decidualizado próximo ao embrião e como MLAp a área do endométrio não decidualizado próximo ao miométrio. Neste endométrio da região mesometrial foram detectadas que apenas 1% eram células uNK DBA⁺ do total de células no endométrio não-deciualizado (MLAp para fins ilustrativos na figura 1), enquanto no endométrio decidualizado (DB), estas representaram 4% (Figuras 3 b-c). Neste período, a maioria das células uNK DBA⁺ são agranulares e mesmo as granulares apresentaram poucos grânulos (Figuras 3 h-i).

O 9ºdg representa o período de maior incidência das células uNK DBA⁺ no útero gestante de camundongos, tanto na região da MLAp com 24% do total de número de células, quanto na DB com ~20% (Figuras 3 d-e). Neste período de gestação a MLAp junto ao miométrio é facilmente identificada pelo acúmulo de células uNK DBA⁺ enquanto a DB ocupa uma grande área do endométrio mesometrial decidualizado. Neste período gestacional, as células uNK DBA⁺ podem ser distinguidas em pequenas células agranulares e células maiores com poucos e com muitos grânulos (Figuras 3h-j), sendo que as agranulares localizam-se predominantemente na MLAp, enquanto as granulares maiores encontram-se na DB (Figuras 3 d-e; 1h-j).

No 14ºdg, a proporção de células uNK DBA⁺ é reduzida em relação ao 9ºdg, sendo representada por 12% das células na MLAp e 8% na região da DB (Figuras 3f-g) com predomínio absoluto de células uNK DBA⁺ granulares grandes (Figura 3j). Esta distribuição das células uNK DBA⁺ granulares e agranulares no MLAP e DBA com maior incidência no 9ºdg são condizentes com os relatos de Paffaro Jr e colaboradores (2003).

4.1- Expressão de fatores angiogênicos e líticos das células uNK DBA⁺

Com o intuito de avaliar a possível diferença na expressão de fatores angiogênicos e líticos entre as células uNK DBA⁺ granulares e agranulares, o Vegfa foi utilizado como molécula marcadora da atividade angiogênica e as proteínas líticas Prf e Gzma como marcadores da atividade citolítica. A incidência destas células também foi analisada nos 7º, 9º e 14º dg (Figuras 4)

Do reduzido número de células uNK DBA⁺ (1%) presentes na MLAp do 7ºdg, 5% eram Gzma⁺ e 19% de Prf⁺, valores estes diminutos quando comparado com 45% das células uNK DBA⁺ que expressaram Vegfa⁺ (p<0,05) (Figura 4 a,i). Na região da DB onde podem ser evidenciadas células uNK DBA⁺ com poucos grânulos citoplasmáticos, 8% expressaram Gzma e 21% expressaram Prf, também significativamente menores quando comparadas com as células uNK DBA⁺ que expressaram Vegfa (p<0,05) (Figura 4 aii).

Importante ressaltar que o padrão de expressão de Prf e Gzma nas células uNK agranulares era citoplasmático (Figura 5 a-b; c-d), enquanto que o Vegfa era mais evidente no perímetro celular (Figura 5 e-f). Nas células uNK DBA⁺ granulares foram constatadas marcações para Prf nos grânulos citoplasmáticos (Figura 5 i-j), Gzma possuía uma marcação citoplasmática mais difusa (Figura 5k-l), e Vegfa apresentava um padrão de marcação difusa e no perímetro celular observado nas células uNK DBA⁺ agranulares (Figura 5 m-n).

A análise quantitativa do número de células uNK DBA⁺ que expressaram Prf, Gzma e Vegfa não demonstrou diferenças significativas entre as regiões MLAP e DB do útero (Figuras 4 aiii).

O 9ºdg é o período gestacional de maior incidência das células uNK DBA⁺ e onde podem ser contempladas células uNK DBA⁺ agranulares e granulares, estas últimas maiores e contendo numerosos grânulos.

Na MLAp, onde as células uNK DBA⁺ são predominantemente agranulares, 22% destas células expressam Gzma, em contraste com 43% que expressam Prf e 44% que expressam Vegfa (Figura 4 b (i)), número estes significativamente maiores que as células uNK DBA⁺ que expressam Gzma (p<0,05). O padrão de expressão de Prf e Vegfa nas

células uNK DBA⁺ agranulares presentes na região da MLAp foi similar ao encontrado nas células uNK DBA⁺ no 7ºdg, ou seja, citoplasmático para Prf (Figuras 5 a,b) e no perímetro celular para Vegfa (Figuras 5 e,f).

O mesmo padrão no número de células uNK DBA⁺ que expressam de Gzma, Prf e Vegfa foi encontrada na região da DB, com 46% de células uNK DBA⁺ que expressam Prf e Vegfa, e 35% que expressam Gzma. O número de células uNK DBA⁺ que expressam Gzma foi significativamente menor quando comparadas com Prf e Vegfa (Figura 4bii) ($p < 0,05$). Na DB, as células uNK DBA⁺ são células granulares, grânulos os quais continham Prf (Figuras 5 i,j). Nestas mesmas células, a expressão de Gzma apresentava-se na forma de pequenos grânulos citoplasmáticos (Figuras 5 k,l) e de Vegfa além de ser no perímetro celular foi evidenciada em vesículas citoplasmáticas (Figuras 5m,n).

Análises comparativas entre MLAP e DB quanto ao número de células que expressam Gzma, Prf e Vegfa demonstraram que apenas as células uNK DBA⁺ Gzma⁺ diferem significativamente entre a MLAp e DB com $p < 0,05$ (Figura 4 b iii).

A dupla marcação utilizando Prf e Vegfa ao 9ºdg demonstrou que estes fatores eram co-expressos nas células uNK (Figuras 5 g,h; o,p) e portanto as atividades da resposta citolítica e angiogênica são funções inerentes a uma mesma subpopulação de células uNK.

No 14º dg, o número de células uNK DBA⁺ que expressam Prf na MLAp é reduzida (17%) e significativamente menor quando comparada com as células uNK DBA⁺ que expressam Gzma (30%) e Vegfa (30%) com $p < 0,05$ (Figura 4 c (i)). Na região da DB as células uNK DBA⁺Prf⁺ representam 29%, as uNK DBA⁺Gzma⁺ são 21%, e Vegfa⁺ 36%, sendo que apenas a proporção de células uNK DBA⁺Gzma⁺ e uNK DBA⁺Vegfa⁺ são significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Figura 4 cii).

Análises comparativas entre as regiões demonstraram que o número de células uNK DBA⁺Prf⁺ presentes na MLAp estão significativamente menores em número do que as que estão na DB ($p < 0,05$) (Figura 4 ciii). Importante ressaltar que neste período gestacional não foram encontradas células uNK DBA⁺ agranulares em nenhuma das regiões analisadas, assim, foram observadas apenas células uNK DBA⁺ granulares, sendo que grande parte delas já apresentava características senescentes.

4.2- Compartimentalização dos mediadores angiogênicos e citolíticos nos grânulos da células uNK DBA⁺

4.2.1- Identificação dos grânulos das células uNK DBA⁺

A característica mais marcante das células uNK granulares é a presença de grânulos citoplasmáticos conhecidos como lisossomo-secretore de duplo compartimento (Figura 6 a). As células uNK granulares variam quanto à quantidade e tamanho dos grânulos citoplasmáticos, acreditado ser parte do processo de biogênese destes. Assim, os estudos da heterogeneidade dos grânulos das células uNK foram direcionados àquelas células uNK granulares do 9ºdg. Da mesma forma que critérios foram adotados para restringir em nosso estudo as células uNK granulares, foram também excluídas deste estudo as células uNK com características senescentes, com grande quantidades de grânulos condensados de tamanho menor e apresentando vacúolos citoplasmáticos (Paffaro *et al.*, 2003) presentes em maior proporção a partir do 14ºdg.

A célula uNK com grânulos lisossomo-secretor e grande quantidade de organelas membranosas relacionadas à síntese, biogênese dos grânulos e secreção são facilmente identificadas na microscopia eletrônica(Figura 6a). Os grânulos lisossomo-secretore são organelas de duplo compartimento composto por capuz periférico mais eletrodenso, constituído de uma área compactada de microvesículas correspondente ao compartimento lisossomal (*cap*) e, o outro compartimento mais homogêneo e menos eletrodenso ocupando a área central (*core*) do grânulo que corresponde ao compartimento secretor (Figuras 6 b). São organelas que possuem de 0,5-2µm de diâmetro dispostas circundando o complexo de Golgi-*network*.

O processo de aquisição dos grânulos citoplasmáticos das células uNK é altamente dinâmico, onde mesmo restringindo morfológicamente uma subpopulação de células uNK (granulares), foram evidenciadas diferenças ultraestruturais entre os grânulos lisossomo-

secretores. Tais diferenças referiam-se às dimensões (Figura 6c), grau de compactação do capuz periférico (Figura 6c-d), variações nas proporções entre o *cap* e o *core*, e diferenças na eletrondensidade do *core* (Figura 6d). Foi constatada ainda a ocorrência de descontinuidade da membrana que delimita alguns grânulos (Figura 6c).

Em adição aos grânulos lisossomo-secretores, foram encontrados outros grânulos de único compartimento e de diâmetro entre 0,3µm à 0,6µm, muitas dos quais demonstraram-se eletrodensos na microscopia eletrônica (Figuras 6 d,e,).

Próximas às cisternas do complexo de Golgi verificaram-se a profusão de pequenas vesículas com diferentes morfologias, principalmente na região do centro celular (Figura 6f), ao redor dos grânulos lisossomo-secretor (Figura 6 b,c) e em outras áreas do citoplasma. Estas vesículas foram distinguidas em vesículas eletrodensas, vesículas eletrólúcidas com membrana eletrodensa, e vesículas eletrolúcidas (Figura 6 f).

4.2.2-Identificação do conteúdo e classificação dos grânulos

A partir da decomposição das imagens de microscopia confocal, e da análise estatística pelo Coeficiente de Pearson (CP) aplicado para avaliar o grau de compartilhamento entre os marcadores DBA/Prf/Ctsd/Gzma/Vegfa (Figura 7a) sendo considerado o limiar igual ou superior 0,5 como significativo de co-localização, constatou-se que os grânulos DBA⁺ das células uNK compartilhavam os mesmo compartimentos que Prf (CP:=,7) e Ctsd (CP= 0,6) e, Prf e Ctsd estão co-localizados em mesmo compartimento (Figura 7b) com CP= 0,9. (Figura 7 *aii*). Confirmando a acuidade deste método estatístico, a ultraestrutura demonstrou que Prf e Ctsd estavam localizados no grânulo lisossomo-secretor de 0,5-2µm de diâmetro (Figuras 7h,i) o qual também eram lectina DBA⁺ (Figura k). A Ctsd está localizada na região do *cap* dos grânulos lisossomos-secretores (Figura 7h), enquanto Prf estava na região do *core* destes mesmos grânulos (Figura 7i).

Grânulos contendo Gzma demonstraram baixa relação com os grânulos DBA⁺ (Figura 7c), com valores de CP < 0,2 (Figura 7 ai). Da mesma forma, grânulos citoplasmáticos Srgn⁺ e grânulos DBA⁺ apresentaram valores de CP inferiores à 0,1 (Figura 7 ai, iii). A relação entre os compartimentos contendo Prf e Gzma (Figura 7 f) apresentou valores de CP menores que 0,5 (Figura 7ii]) e portanto, considerados compartimentos distintos.

Por outro lado, grânulos Gzma⁺ e Srgn⁺ foram altamente relacionados (Figura 7g) com o CP igual a 0,9 (Figura 7 aiii), confirmando o compartilhamento de Gzma no grânulo que contém Srgn. Estes grânulos DBA⁻Gzma⁺Srgn⁺ apresentaram diâmetros que variam entre 0,4-0,6 µm sem distribuição preferencial no citoplasma.

O compartimento contendo Vegfa⁺ foi independente dos grânulos DBA⁺ e Prf⁺ (Figura 7 d), com valores de CP menores 0,2 (Figuras 7ai,ii), assim como, não apresentou co-localização com nenhum dos outros fatores analisados.

4.3- Expressão de genes das moléculas envolvidas nas vias de transporte e secreção dos grânulos

As células uNK DBA⁺ expressaram os transcritos dos genes *rab11*, *rab27a*, *rab34*, *vamp7*, *vamp8* e *sNAP23*, cujas proteínas correspondentes regulam as principais vias relacionadas ao transporte intracelular de vesículas e secreção de grânulos. Por outro lado, as células NK esplênicas (sNK) NK1.1 não expressaram os genes *rab34* e *vamp-8* (Figura 8). Estas diferenças sugerem diferenças nas vias de regulação entre as células uNK e sNK sendo mais complexa nas células uNK DBA⁺.

4.4- Mobilização dos grânulos citolíticos das células uNK DBA⁺

Para confirmar a capacidade de liberação do conteúdo citolítico dos grânulos, foram realizados experimentos de eutanásia cirúrgica de embrião (ECE) no útero do 9ºdg conforme protocolo descrito por Copi (2006).

A integridade das células e dos grânulos lisossomo-secretores foi marcadamente afetada (Figura 9a), com acentuada perda do conteúdo destes grânulos (Figura 9b). Outras alterações como formatos irregulares (Figura 9c), redução da eletrodensidade do conteúdo do *core* e a descontinuidade da membrana que reveste alguns dos grânulos também foram observadas. Os grânulos com perda do conteúdo eletrodensido do *core* apresentavam-se comumente com as microvesículas dispersas na área do capuz (Figura 9d).

Estas alterações foram observadas a partir de 30 minutos após ECE, acentuando-se em 1 hora. Porém não foram observadas fusões ou *docking* entre os grânulos ou desta com a membrana plasmática das células uNK em nenhum dos períodos de após a ECE.

Foram observadas com maior frequência vesículas pequenas na região do centro celular, particularmente próximos ao complexo de Golgi e dos grânulos lisossomo-secretores (Figura 9e). Foi constatado também o aumento na incidência de vesículas entre o grânulo lisossomo-secretor e a membrana plasmática. Não foi possível detectar predominância de tipos de vesículas quanto à eletrodensidade, dimensões ou formato nos compartimentos citoplasmáticos analisados, sendo notória o aumento em todas as formas encontradas nas células uNK da gestação normal.

Foi constatada também uma maior incidência de vesículas na região peri-granular com conteúdo de eletrodensidade semelhante ao do *core* dos grânulos lisossomo-secretor nos períodos de até 1 hora após ECE (Figura 9c). Nos períodos de ECE superiores à 1 hora foram encontradas frequentemente células uNK com citoplasma vacuolizadas e perda da integridade das membranas, apresentando as mitocondriais túrgidas ou rompidas, núcleo com áreas maiores de condensação cromatínica e aumento na formações de projeções citoplasmáticas de dimensões variadas na superfície celular.

Para comprovar a ocorrência de secreção seletiva do conteúdo dos grânulos, foram utilizados como marcadores a Prf, Gzma, e Vegfa, tendo como referência as células uNK DBA⁺ granulares.

As imunomarcações para Prf, antes detectada nos grânulos das células uNK DBA⁺, não apresentaram alterações perceptíveis aos 10 minutos após ECE, porém, aos 30 min após ECE ocorreu redução na marcação seguido do seu desaparecimento completo após 60 min (Figuras 10a-c).

A marcação para de Gzma apresentou redução significativa de intensidade nas células uNK DBA⁺ já aos 10 minutos pós-ECE e raras células apresentavam marcação positiva após 30 minutos (Figuras 10d-f), sugerindo mobilização mais rápida e intensa em relação ao conteúdo de Prf nos grânulos lisossomo-secretor.

O Vegfa não apresentou alterações perceptíveis nas células uNK presentes nos sítios pós-ECE nos períodos analisados (Figura 10g-i), demonstrando não ser afetada pelo estímulo provocado pela ECE e portanto desvinculada da resposta imune inata.

5-DISCUSSÃO

A remodelação do útero é um evento essencial para a formação da placenta e suporte da prenhez em camundongos. Entre os processos que fazem parte da remodelação do útero está a decidualização do endométrio (Abrahamsohn e Zorn 1993; Gellersen *et al.*, 2007; Herington *et al.*, 2009, Ramathal *et al.*, 2010) e a modificação estrutural e funcional das artérias espiraladas (Leonard *et al.*, 2006; Sheikhi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; 2011). Neste mesmo ambiente e cronologicamente coincidente ocorre o influxo das células uNK, as quais são apontadas como importantes contribuintes na remodelação tecidual do útero e o adequado desenvolvimento da placenta para sustentação do embrião (Leonard *et al.*, 2006; Sheikhi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011).

No 6ºdg, células estromais da região antimesometrial próximas e ao redor do blastocisto em implantação encontram-se decidualizadas, que gradualmente propagam-se formando a decídua basal (DB) (Abrahamsohn e Zorn 1993; Gellersen *et al.*, 2007; Herington *et al.*, 2009; Ramathal *et al.*, 2010). Nesta mesma região mesometrial é que são observadas as primeiras células uNK DBA⁺ pequenas e agranulares (Paffaro Jr *et al.* 2003). Com o decorrer da gestação, o útero aumenta em tamanho devido à expansão da reação decidual em direção ao miométrio, sendo que aproximadamente na metade da gestação (9º-12ºdg) forma-se duas áreas morfológicamente distintas na região mesometrial em decorrência do aumento de células uNK: a DB ocupando a maior parte do endométrio mesometrial, e uma região junto ao miométrio nomeada de MLAp (*Mesometrial Lymphoid Aggregate of pregnancy*) (Croy *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2011).

As células uNK foram primeiramente identificadas pela presença de grânulos PAS positivos (*Periodic Acid Schiff*) (Stewart e Peel, 1977; Paffaro Jr *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009), análogos às células NK circulantes. Estes grânulos são perforina positivos (Parr *et al.*, 1990), que contem também enzimas lisossomais (Stewart e Peel, 1977; Parr *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1991) e na ultraestrutura apresentam o duplo compartimento de um capuz eletrondenso de vesículas e um centro homogêneo (Paffaro Jr *et al.*, 2003).

Paffaro Jr e colaboradores (2003) sugerem que o padrão de granularidade relaciona-se com o estágio de maturação das células uNK durante a gestação, onde as células imaturas

(subtipos I e II) encontrar-se-iam na MLAp, enquanto que as maduras (subtipos III e IV) estariam na DB, e que no decorrer da gestação as células imaturas ganhariam grânulos e atividade funcional (Paffaro Jr *et al.*, 2003).

De fato, células uNK DBA⁺ granulares presentes principalmente na região da DB possuem grânulos citoplasmáticos reativos à Prf, enquanto as células agranulares presentes ao 7º dg e na MLAp do 9º dg possuem um padrão citoplasmático de marcação, identificada na microscopia eletrônica como sistema retículo endoplasmático- Golgi positivo. Em linfócitos citotóxicos a Prf é sintetizada como precursor inativo no retículo endoplasmático, sofre clivagem no Complexo de Golgi e é ativada apenas no interior do ambiente ácido dos grânulos lisossomos-secretóres (Uellner *et al.*, 1997; Froelich e Metckar, 2011).

Nossa quantificação demonstrou que no 9º dg, 43% das células uNK presentes tanto na DB como na MLAp são DBA⁺Prf⁺, em contraste com o 7ºdg em que este número tanto absoluto quanto relativo é reduzido. A comparação entre os dias de gestação claramente demonstra que a aquisição de proteínas lítica relaciona-se com a granularidade das células uNK DBA⁺.

Assim como a Prf, a expressão de Gzma também acompanha a aquisição dos grânulos citoplasmáticos das células uNK. Células uNK DBA⁺Gzma⁺ agranulares e granulares são poucas no 7ºdg e na MLAp do 9ºdg, e apresentam número maiores na DB do 9º e 14º dg. Isso demonstra a maior incidência de Gzma pelas células uNK DBA⁺ granulares do que nas agranulares, à semelhança do que se verifica com as células uNK DBA⁺Prf⁺. A co-expressão da Prf e Gzma na mesma célula uNK DBA⁺ confirma a ocorrência do fenótipo uNK DBA⁺Prf⁺Gzma⁺.

Prf e Gzma são descritas como proteínas citolíticas inerentes aos linfócitos citotóxicos, incluindo os linfócitos NK (Trinchieri, 1989; Whiteside *et al.*, 1994; Abbas *et al* 2002; Trapani e Smith., 2002), e de essencial importância na resposta imune inata mediada por células. Apesar de não se saber o papel das proteínas citolíticas durante uma gestação normal, demonstramos aqui que estas são potencialmente expressas pelas células uNK DBA⁺ ao longo da gestação.

As observações sobre a expressão de Vegfa nas células uNK DBA⁺ indicam que aproximadamente 45 % das células uNK DBA⁺ agranulares presentes no 7º e 9º dg são ativas e produtoras de Vegfa, e portanto, células capazes de modular a angiogênese na interface materno-fetal, independente da aquisição dos grânulos.

A modulação direta da angiogênese e ação vasoativa direta das células uNK através da produção de Vegfa (Croy *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011), Pgf (Tayade *et al.* 2007; Zhang *et al.*, 2011), receptores de angiotensina 1 e 2 (Hatta *et al.*, 2010) e do óxido nítrico (Burnett *et al.*, 2000), assim como a indireta através da produção do Ifng (Ashkar *et al.*, 2000; Croy *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011) são consideradas críticas no útero gestante para a remodelação das artérias espiraladas que suprem a placenta. A incidência de células uNK DBA⁺Vegfa⁺ inicialmente pequena no 7º dg, atinge a maior proporção no 9º dg tanto no MLAp quanto na DB e posterior redução no 14º dg, indicando uma ação angiogênica crescente das células uNK coincidente com o período da vasodilatação e adelgaçamento da túnica muscular das artérias espiraladas da região mesometrial (Ashkar *et al.*, 2000; 2003). A remodelação das artérias espiraladas está diretamente relacionada com suprimento sanguíneo da placenta que inicia a sua organogênese neste período. A ausência das células uNK em camundongos comprovadamente apresentam deficiência na remodelação destas artérias (Croy *et al.*, 2003) e conseqüente o desenvolvimento inadequado da placenta (Croy *et al.*, 2003). Os nossos dados comprovam que ambas as células uNK DBA⁺ agranulares e granulares são capazes de produzir Vegfa. Assim, se considerada a sua atuação na atividade angiogênica, a expressão do Vegfa constatada nas células uNK DBA⁺ agranulares já no 7º dg e também na região MLAp do 9º dg, asseguram a competência funcional angiogênica independente da granulosidade e da distribuição regionalizada (MLAP ou DB) destas células no útero gestante.

Os nossos dados confirmam ainda a co-expressão de Vegfa nas células uNK DBA⁺Prf⁺, e portanto, a atividade angiogênica é compartilhada também com as células uNK com competência lítica, sugerindo a dualidade funcional de uma mesma célula. Isto é,

as duas atividades essenciais atribuída às células uNK não são competências isoladas de subpopulações distintas de células uNK DBA⁺.

A suposta imaturidade funcional das células uNK DBA⁺ baseada na ausência ou presença dos grânulos inicialmente sugerida por Paffaro Jr e colaboradores (2003) baseia-se na aquisição da competência citolítica relacionada com a resposta imune inata mediada pelo conteúdo das proteínas citolíticas, Prf (Parr *et al.*, 1990; Zheng *et al.*, 1991; King e Loke., 1991). Por outro lado, estudos que abordam a expressão de receptores de superfície demonstram que ao lado da identificação de subpopulações agranulares e granulares das células uNK no útero gestante, estas podem ser separadas em subpopulações fenotípicas: CD3⁻CD112⁺NK1.1⁺DX5⁺DBA⁻ e aquelas que são CD3⁻CD122⁺NK1.1⁻DX5⁻DBA⁺ (Yadi *et al.*, 2008), as quais não obedecem ao padrão morfológico. Yadi e colaboradores (2008) demonstram que o perfil fenotípico das células CD122⁺NK1.1⁻DX5⁻DBA⁺ permanece constante independente da granulosidade celular, inclusive a expressão de receptores como Ly49 e, receptores NKR são expressos apenas em células consideradas maduras.

Sendo assim, a classificação das células uNK DBA⁺ agranulares como imaturas ou indiferenciadas e/ou e as uNK DBA⁺ granulares como maduras ou diferenciadas, anteriormente descrita por Paffaro e colaboradores (2003) torna-se inconsistente. Há que se destacar algumas divergências conceituais de terminologias adotadas que dificultam a melhor compreensão da relação morfo-funcional das células uNK na gestação. Uma destas divergências são os conceitos que distinguem o que é o processo de diferenciação e de maturação, e que na maioria das vezes são utilizados como sinônimos na literatura. Neste sentido, a questão: *“Se uma seletiva população de células imunológicas é capaz de reconhecer e transmigrar a partir do sangue circulante especificamente para o estroma uterino, não seria esta já uma população celular diferenciada?”*, torna-se determinante para a correlação fenótipo funcional mais precisa das células uNK. Para esta questão, torna-se crítico compreender e estabelecer a origem das células uNK que por sua vez, determinam a identidade destas células a partir do primeiro momento em que são encontradas no ambiente uterino. Isto é, se estas podem ser consideradas células “diferenciadas” ou não.

Neste sentido, consideramos que a célula uNK diferenciada seria aquela capaz de exercer uma atividade funcional relevante no órgão em que se encontra e a célula uNK madura aquela capaz de exercer todo o conjunto de funções a ela atribuída. Assim, nossa hipótese é de que as células uNK, uma vez localizada no estroma uterino já são células diferenciadas uNK DBA⁺Vegfa⁺ capazes de desempenhar papel funcional na gestação, e que a aquisição de grânulos Prf e Gzma é um processo adicional de maturação celular, que confere competência funcional adicional em resposta a estímulos locais gerados nos diferentes períodos gestacionais, tornando-se uNK DBA⁺Vegfa⁺Prf⁺.

Pelos resultados obtidos utilizando o conjunto Vegfa e Prf/Gzma como marcadores de duas atividades funcionais nas células uNK DBA⁺, passamos a indagar se os mecanismos de vias de secreção de mediadores citolíticos e do fator angiogênico Vegfa seriam do tipo constitutivo ou regulado e ainda, e se estas duas vias seriam independentes entre si. Para este estudo, foram focadas as células uNK DBA⁺Prf⁺Vegfa⁺ que predominam na DB do 9ºdg.

A estocagem e/ou secreção de proteínas em grânulos e vesículas envolve a expressão de proteínas de transportes SNARE e Rabs (Sollner *et al.*, 2003; Stinchombe *et al.*, 2000). Assim, a avaliação da expressão dos genes das moléculas reguladoras confirmam que as células uNK DBA⁺ expressam *rab11*, *rab 34*, *rab27a*, *vamp-7* e *vamp-8* envolvidos no tráfico de vesículas e na secreção regulada e constitutiva.

Já as análises ultraestruturais e as imunomarcações confirmaram a localização da Prf nos grânulos lisossomo-secretor de 0,5 a 2,0µm de diâmetro, ocupando o compartimento central do grânulo, enquanto a Ctsd o compartimento do capuz periférico eletrondenso corroborando com as descrições prévias (Parr *et al.*, 1990, Paffaro Jr *et al.*, 2003). De forma inesperada encontramos que os grânulos lisossomo-secretores Prf⁺ eram desprovidos de Gzma. Assim, outro grupo de grânulos foi identificado contendo Gzma que co-expressam o Srgn, um proteoglicano presente em grânulos secretórios (Kolset e Tveit, 2008). A medição destes grânulos demonstrou dimensões próximas a 0,4-0,6µm, estes que foram relacionados

com grânulos de único compartimento observados na microscopia eletrônica, por conter diâmetros similares.

A formação e transporte dos grânulos lisossomo-secretóres estão intimamente relacionados com a presença das moléculas Rab27a e Vamp-7. Rab 27a está envolvida na secreção lisossomal de muitos tipos celulares, associada aos grânulos de cromafins (Guo *et al.*, 1998), vesículas pro-acrossomais de espermátides (Hibi *et al.*, 2000), melanossomos (Bahadoran *et al.*, 2001) e grânulos líticos (Haddad *et al.*, 2001). E Vamp-7 é uma v-SNARE também considerada crucial para a liberação de mediadores contidos no compartimento lisossomo-secretor em eosinófilos e neutrófilos (Logan *et al.*, 2006). Nossos dados demonstram que tanto as células uNK DBA⁺ como as células NK NK1.1+ do baço expressam os transcritos de *rab27a* e *vamp-7*. Recentemente foi demonstrado que tanto Vamp-4 como Vamp-7 são co-localizados nos grânulos líticos de células cNK, porém somente Vamp-7 está associada com os grânulos contendo Prf em células não ativadas, indicando que esta molécula pode estar envolvida na inibição da liberação dos grânulos líticos (Krzewski *et al.*, 2011).

A expressão de Prf e Gzma nas células uNK potencialmente capacitam-nas no desempenho da função citolítica da resposta imune inata. Porém a expressão diferencial de Prf e Gzma é intrigante. Apesar dos estudos sobre a ação conjunta da perforina e das granzimas no processo de citotoxicidade (Pardo *et al.*, 2009), ainda permanecem dúvidas sobre a participação especificamente da Gzma. Isto porque todas as observações sobre a citotoxicidade da Gzma foram realizadas em ensaios *in vitro* e em altas concentrações (micro molar) (Froelich *et al.*, 2009). Além disso, outras funções vêm sendo atribuídas à Gzma independente da ação citotóxica. Gzma pode induzir a produção de citocinas inflamatórias (Metkar *et al.*, 2008), como Il-1 e Tnf α em monócitos (Metkar *et al.*, 2008), além de ser capaz de modular a expressão de Il-6 e Il-8 em fibroblasto e células epiteliais (Sower *et al.*, 1996).

O significado biológico da diferença de estocagem entre Prf e Gzma nas células uNK é um dado inédito a ser melhor investigado para compreensão dos mecanismos da ação citolítica das células uNK.

Já Vegfa foi localizado em vesículas citoplasmáticas menores que 0,2µm de diâmetro e/ou acumuladas no perímetro celular, independentes dos demais fatores. Acreditamos que esta variação no padrão de marcação reflita a rápida síntese e secreção de Vegfa no útero gestante de camundongo pelas células uNK DBA⁺.

O painel das moléculas envolvidas com o tráfego de vesículas: Rab11, Rab 34 e Vamp-8, demonstra que as células uNK DBA⁺ são capacitadas para a via de secreção constitutiva. De forma especial notamos que transcritos de *rab 34* e *vamp-8* estavam ausentes nas células NK/NK1.1⁺ do baço, as quais não expressam Vegf (Kalkunte *et al.*, 2009). Isto sugere fortemente o envolvimento destas moléculas reguladoras de secreção na mobilização do Vegfa pelas uNK DBA⁺. Rab 11 está envolvido no *sorting* e reciclagem de endossomos, na rede de membranas *trans*-Golgi e nas vesículas secretórias pós-Golgi (Babast *et al.*, 2002) e está presente em células com intensa atividade de biogênese e tráfego de vesículas (Bache *et al.*, 2003). Portanto a expressão *rab 11* é condizente com profusão e diversidade de vesículas e grânulos com diferentes conteúdos encontrados nas células uNK DBA⁺.

O fato da proteína Rab 34 estar relacionada com o transporte intra-Golgi, e com a mobilidade de lisossomos na região justa nuclear (Wang e Hong, 2002) aliada às evidências de microscopia eletrônica, sugerem uma intensa atividade de *sortings* de fatores recém-sintetizados e empacotados no Golgi das células uNK.

O Vamp-8, também conhecida como endobrevina é expressa em muitos tecidos, incluindo pulmão, rim, coração e glândulas salivares (Wang *et al.*, 2007). Esta proteína caracterizada como uma v-SNARE e está envolvida na fusão homotípica de endossomos precoces e tardios (Antonin *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 1997), na reciclagem de membrana e de proteínas de membrana por endossomos (Epp *et al.*, 2011) e portanto importantes no compartimento endocítico, de células com grande atividade secretora. Esta molécula reguladora também poderia estar relacionada com a biogênese dos grânulos lisossomo-

secretoras das células uNK DBA⁺, onde o compartimento endocítico torna-se fundamental na formação destes (Bossi e Griffiths 2005).

Percebe-se então que Rab34 e Vamp-8 são importantes moléculas no processo de secreção e estocagem nas células uNK, tanto pela participação no *sorting* de proteínas a partir do Golgi, como na formação de endossomos e lisossomo-secretoras.

Para testar a capacidade das células uNK em mobilizar os grânulos de conteúdo citolítico inerente à atividade de resposta imune inata, assim como sua possível habilidade em discernir as atividades citolítica da angiogênica, utilizamos o método de ECE de ativação *in vivo* das células uNK.

Demonstramos que após ECE, tanto Prf como Gzma são mobilizados nas células uNK DBA⁺, enquanto que a expressão do Vegfa permanece inalterada. A permanência de Vegfa nas células uNK DBA⁺ após ECE confirma a capacidade destas células de responderem de forma seletiva na sua competência como células moduladoras da angiogênese e células imunes efetoras da resposta imune inata.

Gzma é visivelmente reduzida nos primeiros 10 minutos após ECE. Tempos subsequentes de ECE demonstram que as células uNK DBA⁺ granulares tendem a perder a expressão de Gzma. Já a expressão de Prf é perdida dos grânulos lisossomo-secretoras após 30 min de ECE, reduzindo ainda mais em períodos subsequentes. As perdas diferenciais de Gzma e Prf refletem ao fato de que estes fatores são estocados em distintos compartimentos.

Moléculas uma vez estocadas podem ser liberadas sob estímulos por pelo menos três vias: exocitose clássica; exocitose composta e/ou degranulação fragmentada ou também conhecida com *piecemeal degranulation* (PMD) (Moqbel *et al.*, 2006).

Análises ultraestruturais demonstram que após ECE os grânulos lisossomo-secretoras são desestruturados. Estes passam a apresentar contornos irregulares, descontinuidades da membrana e frequentemente tornam-se eletrolúcidos, o que representa perda de seus conteúdos. A perda do conteúdo destes grânulos acompanhada da descompactação no arranjo das microvesículas membranosas do *cap* também foi frequentemente observada sem

que houvesse evidências da fusão com a membrana plasmática. Por outro lado, observa-se o aumento de vesículas citoplasmáticas pós-ECE que coincidem com o aumento de vesículas Prf positivas identificadas pela imunomicroscopia eletrônica. Estas vesículas Prf positivas corroboram com um tipo de secreção diferencial do conteúdo armazenado em grânulos, a secreção por PMD (Moqbel *et al.*, 2006).

A exocitose pela via clássica de grânulos secretores ou de vesículas secretoras envolve uma série de eventos, incluindo o deslocamento da vesícula/grânulo até a periferia celular, ligação e ancoragem à membrana plasmática para que ocorra a fusão e liberação dos grânulos (Logan *et al.*, 2003), porém o mecanismo completo está longe de ser esclarecido (Clarck e Griffiths, 2003). As nossas evidências contribuem para a hipótese de que a liberação dos conteúdos dos grânulos lisossomo-secretores das uNK são controlados por outros mecanismos ainda pouco conhecidos e são distintos daqueles preconizados para as células cNK, uma vez que, não ocorre o deslocamento e posicionamento dos lisossomos-secretores para a formação da sinapse imunológica.

Nossa hipótese é de que as células uNK utilizam a via de secreção por PMD. Este processo de secreção foi primeiramente identificado em grânulos de basófilos, nos quais estudos de ultraestrutura revelaram que estas células apresentavam seus grânulos vazios ou parcialmente vazios sem a fusão entre grânulos com a membrana plasmática e com presença de numerosas vesículas citoplasmáticas (Dvorak, 1991). As células uNK apresentaram características ultraestruturais semelhantes após estímulo pela ECE (Copi 2006).

Assim, constata-se que as células uNK são capazes de mobilizar o conteúdo citolítico dos grânulos e portanto, passível de exercer uma ação citotóxica *in vivo* até então não evidenciada nos ensaios *in vitro* (Kopcow *et al.*, 2005). A constatação deste mecanismo de degranulação é inédito e diferente daqueles até então consideradas para as células cNK e CTL que preconiza a degranulação por exocitose clássica junto à sinapse imunológica com a célula alvo (Stinchcombe *et al.*, 2006). Este mecanismo peculiar das células uNK DBA⁺ onde os dois principais mediadores citolíticos, Prf e Gzma são acumuladas em

compartimentos distintos pode ser decorrente de um mecanismo regulador melhor controlado e requerido para a atuação das células uNK DBA⁺ na interface materno-fetal, onde a prioridade seria a sua função angiogênica em detrimento da citotóxica que permanece quiescente durante uma gestação normal. Desta forma, este trabalho demonstra que as células uNK, são células com a dualidade funcional, onde a sua atividade angiogênica é adquirida de forma precoce e independente da aquisição dos mediadores citolíticos estocados nos grânulos, e portanto, a sua maturidade funcional relacionada com a resposta imune inata. E que a dualidade funcional das células uNK DBA⁺ é peculiar ao ambiente uterino respondendo aos estímulos deste ambiente e não compartilhada pelas células NK NK1.1 esplênica.

6-CONCLUSÕES

- As células uNK DBA⁺ possuem dualidade funcional capacitadas tanto na atividade da síntese e secreção de fatores angiogênicos, como na síntese e secreção de fatores citolíticos;

- A expressão de Vegfa pelas células uNK DBA⁺ agranulares em períodos precoces da gestação, caracterizam-nas como células funcionalmente aptas e portanto diferenciadas, independente da aquisição dos grânulos contendo as proteínas líticas Prf ou Gzma;

- De acordo com o Coeficiente de Pearson, a Prf e Ctsd são co-expressas ocupando respectivamente o compartimento secretor e lisossomal nos grânulos lisossomo-secretorios DBA⁺, enquanto a Gzma e Srgn compartilham outros grânulos DBA⁻ de diâmetro menor;

- O Coeficiente de Pearson demonstra que o Vegfa⁺ está compartimentalizada em grânulos pequenos e independente das proteínas líticas e do Srgn;

- As células uNK DBA⁺ expressam os genes (*rab11b*, *rab27a*, *rab34*, *vamp8*, *vamp7*, *snap23*) das principais moléculas reguladores das vias de tráfego, síntese e secreção de vesículas membranosas, pelas quais são capazes de ativar a liberação regulada de Prf e Gzma de forma independente da secreção constitutiva do Vegfa.

7-FIGURAS

Figura 3: Incidência de células uNK DBA⁺ nas regiões do MLAp e DB do útero gestante de camundongos no 7º, 9º e 14ºdg. (a) Gráfico da distribuição percentual de células uNK DBA em relação ao número total de núcleos (DAPI⁺) nas regiões do MLAp e DB; **(b-j)** Imagens representativas em microscopia de fluorescência da distribuição das células uNK DBA⁺ (Verde-Alexa-fluor 488) e núcleos (azul,DAPI) no útero gestante. no 7ºdg (b,c) ; 9º dg **(d-e)** e 14gd **(f-g)** e detalhes da célula uNK DBA⁺ agranular pequena **(h)**, célula uNK DBA⁺ com grânulos DBA⁺ **(i)**; e: célula uNK DBA⁺ granulares senescentes **(j)**. Barras: a-g=40µm; h-j=20µm.

FIGURA 3

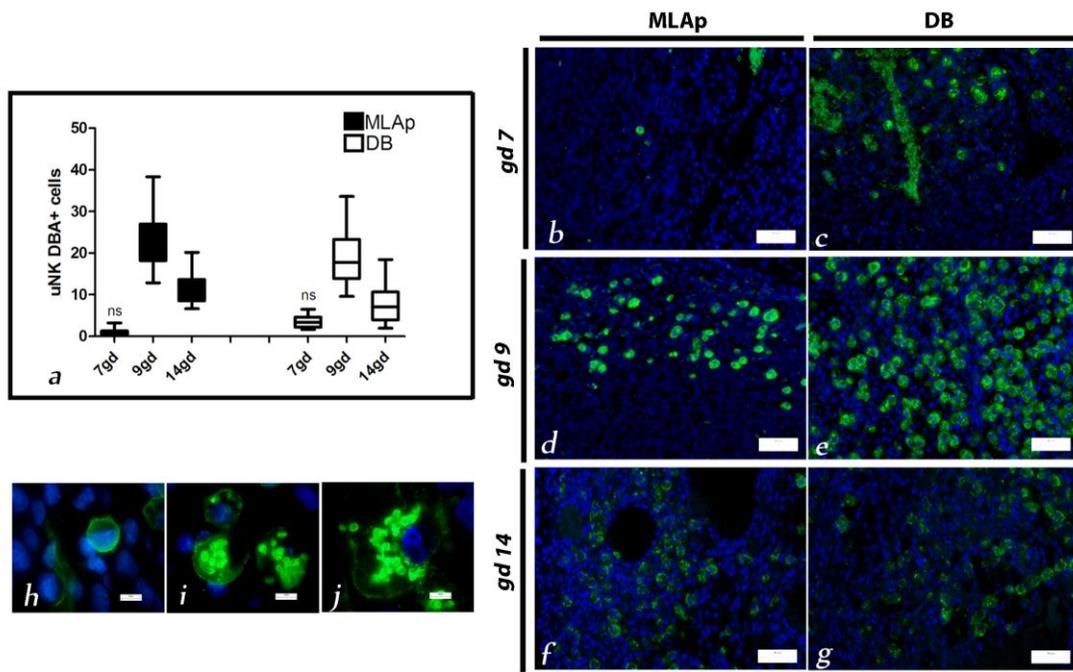


Figura 4: Histograma da quantificação das células uNK DBA⁺ que expressam Prf, Gzma e Vegfa, nas regiões do MLAp e DB do útero gestante nos dias 7 dg (**ai,ii,iii**), 9 dg (**bi,ii,iii**) e 14 dg (**ci,ii,iii**), obtidos de n=3 em experimentos independentes. (*) diferença significativa pela análise estatística de (i.ii)- ANOVA one way seguido de Tuckey (value \pm SEM p<0,05) e em (iii)- ANOVA two way postest Bonferroni (value \pm SEM p<0,05).

FIGURA 4

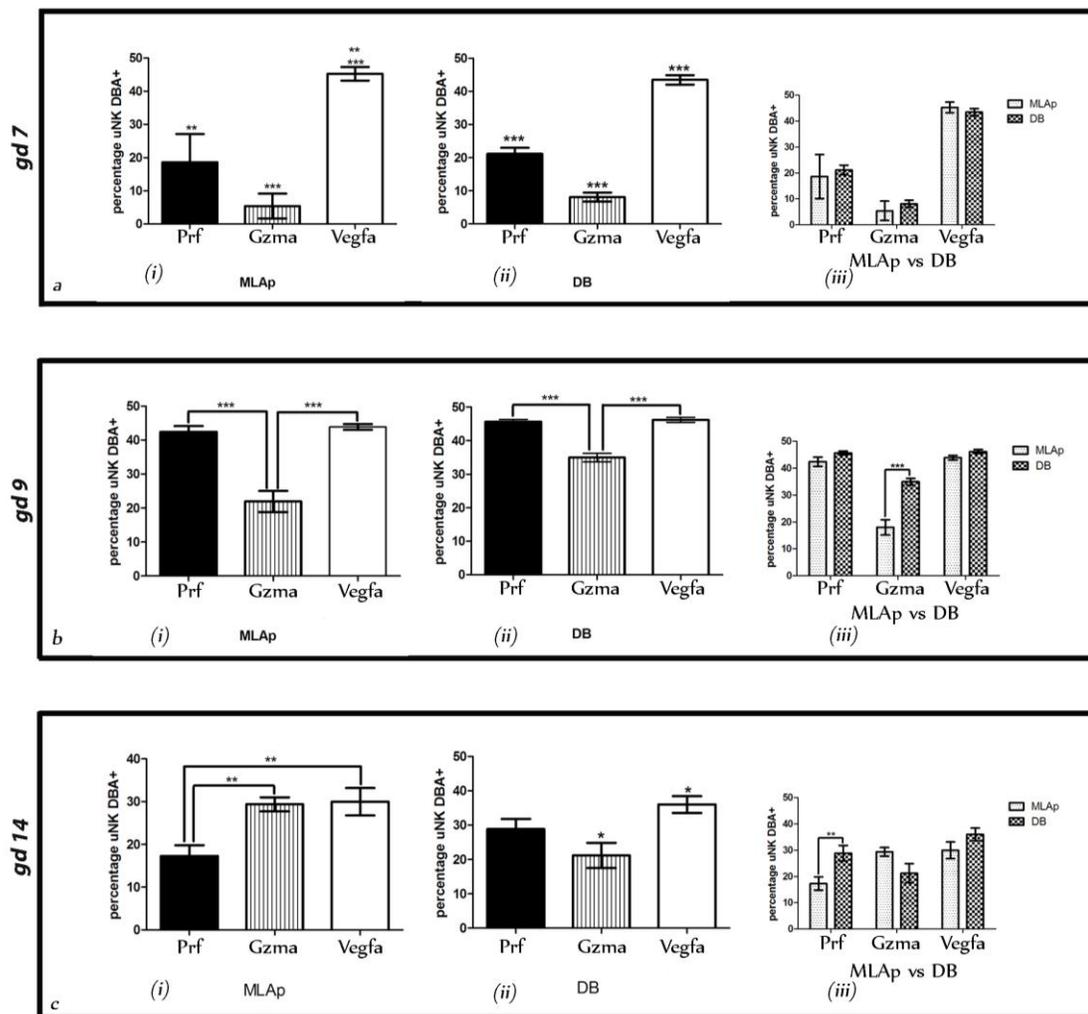


Figura 5: Imunofluorescência das células uNK DBA⁺ (Alexa fluor 488) em co-marcação com anti-Prf- Alexa fluor 594 (**a,b,i,j**); anti-Gzma- Alexa fluor 594 (**c,d,k,l**); e anti-Vegfa Alexa fluor 594 (**e,f,m,n**) nas regiões do MLAp e DB no útero gestante de 9^odg. Em (**g,h,o,p**) dupla marcação de anti-Prf- TRITC e anti-Vegfa- FITC. Em (**a-h**) observa-se células uNK DBA⁺ agranulares (**setas**) presentes na região da MLAp, enquanto as células uNK DBA⁺ granulares (**cabeças de seta**) são observadas na região da DB (**i-p**). Notar que o padrão de marcação para Prf e Gzma exibem diferenças entre as células uNK DBA⁺ agranulares e granulares, enquanto o Vegfa é mantido. A dupla marcação entre Prf e Vegfa (**g-h, o-p**) demonstra a -expressão destes nas células uNK DBA⁺ (**setas**) . Barra= 20µm.

FIGURA 5

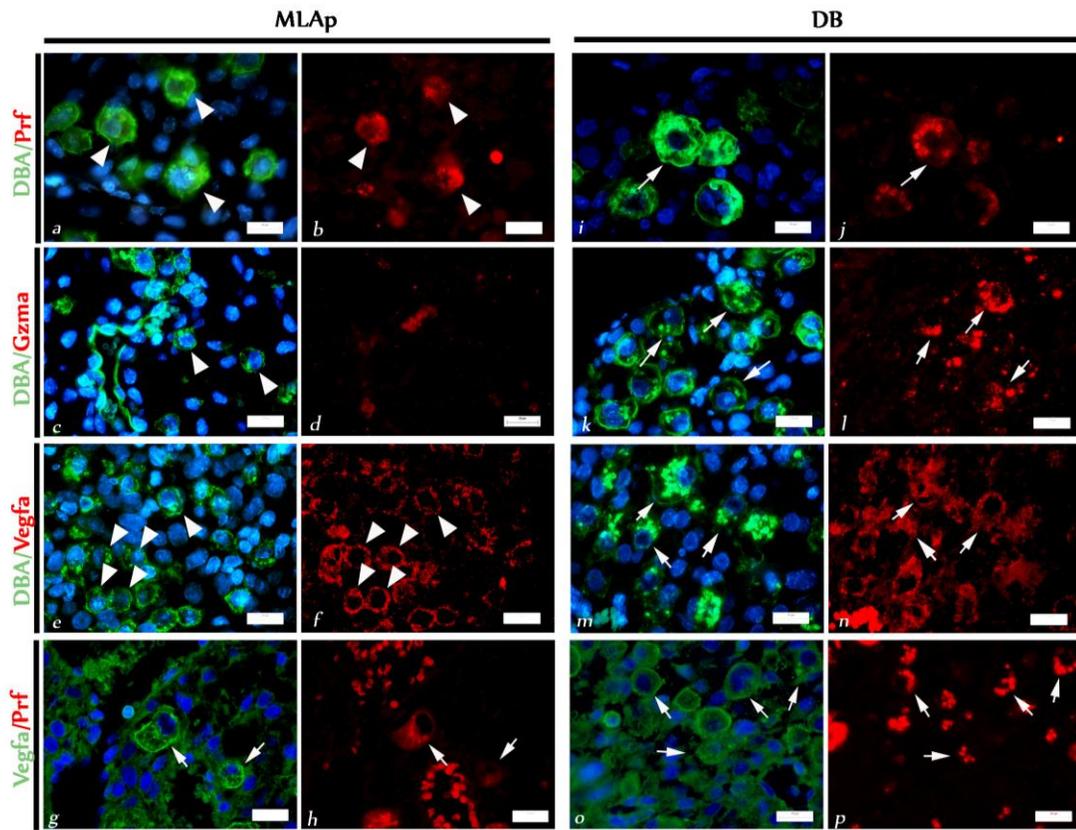


Figura 6: Ultraestrutura das células uNK de 9ºdg. Em (a) área do citoplasma de célula uNK granular evidenciados grânulos lisossomo-secretores (**g**) em torno do centro celular (**cc**) com o complexo de Golgi e retículo endoplasmático granular (RE); (b) grânulo lisossomo-secretor em detalhe, com a região do capuz contendo microvesículas compactadas (*cap*) e a uma área central mais homogêneo (*). Notar a presença de pequenas vesículas (**setas**) que circundam o grânulo lisossomo-secretor; (c,d) grânulos lisossomo-secretores que diferem quanto ao tamanho e eletrondensidade. Notar que a membrana dos grânulos apresenta segmentos descontínuos (**seta branca**) e pequenas vesículas membranosas de diferentes tamanhos e conteúdo encontradas próximos aos grânulos; (d) grânulos lisossomo-secretor ao lado de um grânulo de único compartimento eletrodense (#); (e) grânulos de único compartimento eletrodense são comumente observados em outras áreas do citoplasma; (f) detalhe da região do centro celular com muitas mitocôndrias (**M**), segmentos do retículo endoplasmático rugoso, grupos de cisternas do complexo de Golgi (**Go**) e a presença de muitas vesículas de dimensões variadas (**setas brancas**). Barras: a=2µm; b,c,d,e,f= 0,5µm.

FIGURA 6

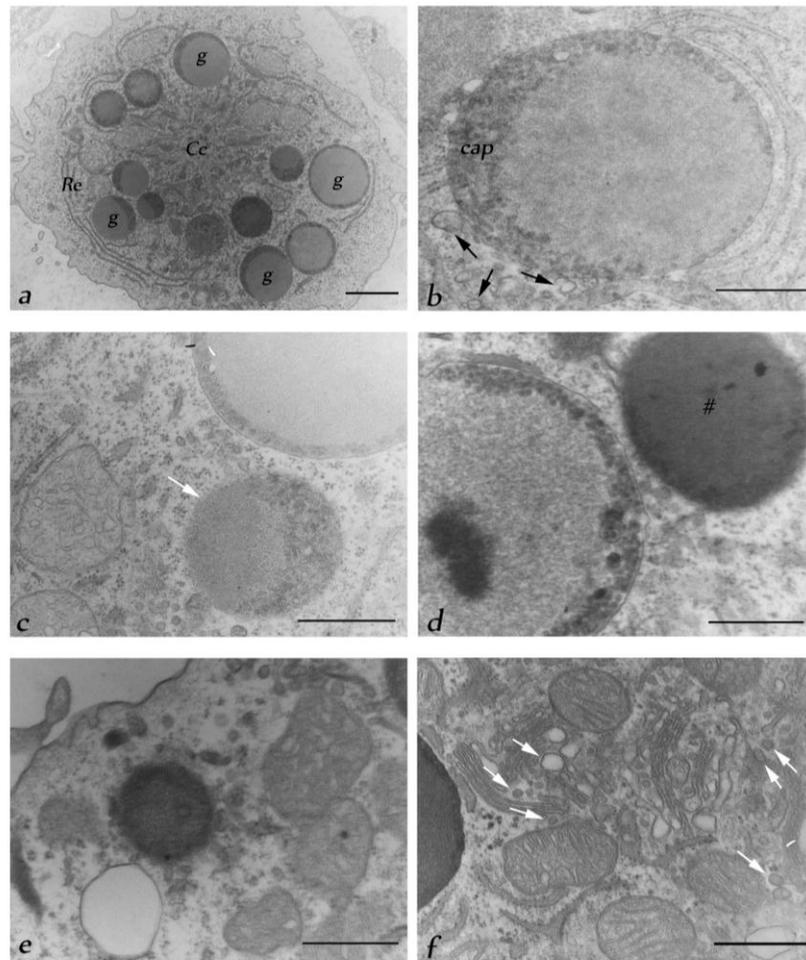


Figura 7: Compartimentalização e co-expressão da Prf, Gzma, Vegfa, Srgn e Cttd nos grânulos das células uNK DBA⁺ presentes na DB do útero gestante do 9ºdg. **(a)** Análise correlacional de Pearson (CP) das co-localizações de Prf, Cttd, Gzma, Srgn e Vegfa nos grânulos DBA⁺ (*i*), co-localizações de Cttd, Gzma, Srgn e Vegfa com a Prf (*ii*), e co-localizações de Gzma, Prf e Vegfa com Srgn (*iii*). Co-localização com CP>0,5 ocorrem para Prf e Cttd nos grânulos DBA⁺, Cttd nos grânulos Prf⁺ e somente Gzma nos grânulos Srgn⁺, enquanto Vegfa não compartilha nenhum destes compartimentos; **b-g**). Imagens representativas de células uNK utilizadas para avaliação do CP das combinações de marcações (imunofluorescência) entre DBA-Alexa-fluor 488; Cttd-Cy3 ou, Gzma-Alexa fluor 594, Vegfa-Alexa fluor 594 e Prf-Alexa-fluor 594; **(h-l)** Imunomicroscopia eletrônica. Reação positiva na região do capuz do grânulo lisossomo-secretor com anti-Cttd (ouro coloidal de 10 nm). (h) reação positiva para anti-Prf (ouro coloidal de 6nm) no compartimento secretor do grânulo lisossomo-secretor **(i)** e no retículo endoplasmático das células uNK **(j)**. **(k)** Citoquímica ultraestrutural de lectina DBA (ouro coloidal 6nm) demonstrando reatividade no compartimento secretor do grânulo lisossomo-secretor. Barras: b-g= 20µm; h-l=0,5µm.

FIGURA 7

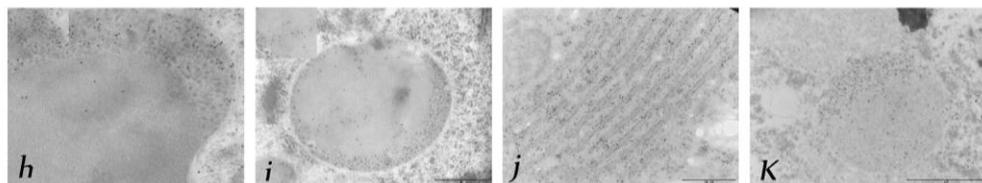
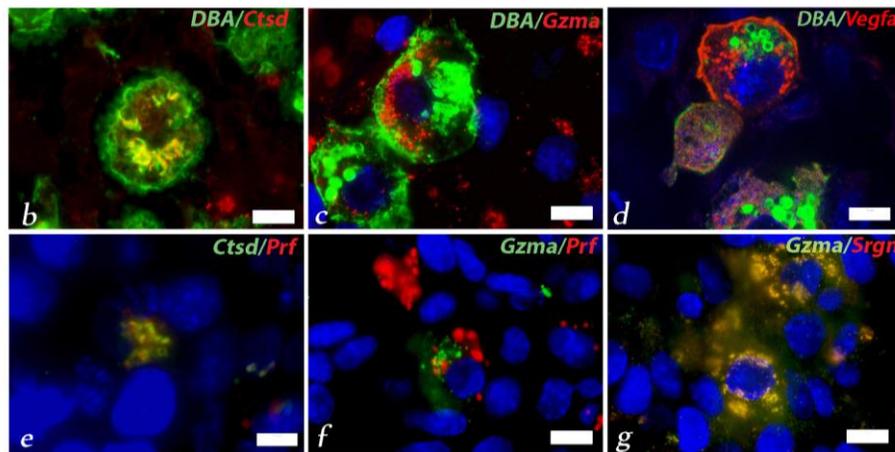
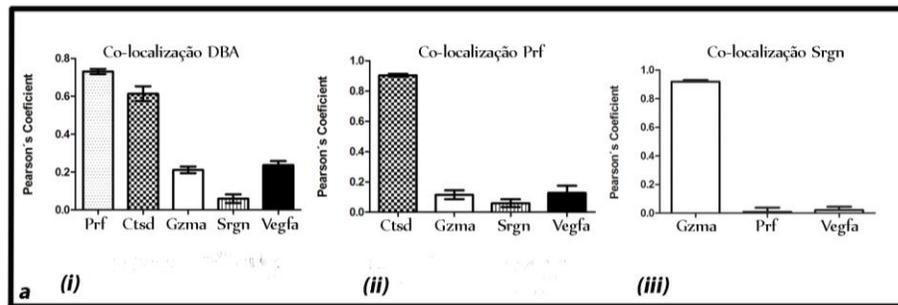


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose (3%) dos genes *18s* (110pb); *rab11b* (104 pb); *rab 27a* (100 pb); *rab34* (104 pb); *snap-23*, (100 pb); *vamp7* (109pb); e *vamp-8* (110pb) amplificados pelo RT-PCR, do RNA extraído das células uNK e sNK isoladas.

FIGURA 8

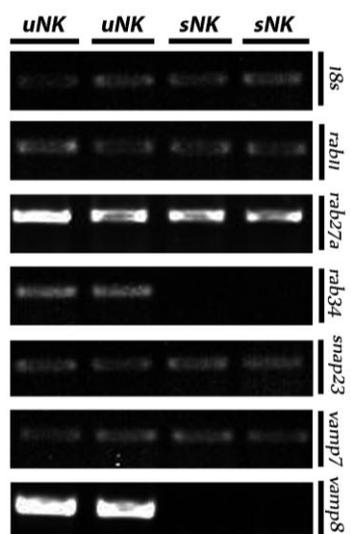


Figura 9: Ultraestrutura das células uNK granulares presentes na DB do útero gestante de 9ºdg após eutanásia cirúrgica do embrião (ECE). **(a)** Observar a desorganização do citoplasma com a perda do conteúdo de alguns grânulos lisossomo-secretores (*); **(b)** detalhe do anterior mostrando um grânulo eletrólúcido conotando perda do seu conteúdo; **(c)** notar formato irregular dos grânulos lisossomo-secretores, porém com os seu compartimento lisossomal e secretor aparentemente intactos e, o aumento de vesículas menores com conteúdo de mesma eletrodensidade do grânulo (**setas**); **(d)** detalhe de um grânulos lisossomo-secretor desestruturado com áreas eletrólúcidas denotando perda de parte do seu conteúdo, e as microvesículas membranosas do capuz periférico descompactadas; **(e)** aumento de pequenas vesículas (**setas**) nas áreas próximas ao centro celular, assim como, a dilatação das cisternas do complexo de Golgi; **(f,g)** imunocitoquímica ultraestrutural para Prf demonstrando a redução da reatividade nos grânulos lisossomo-secretores e aumento da marcação no entorno dos grânulos; **(h)** citoquímica ultraestrutural com lectina DBA mostrando drástica redução de marcação nos grânulos lisossomo-secretores. Barras: a=2µm; c=1µm; b,d,e,g,h= 0,5µm.

FIGURA 9

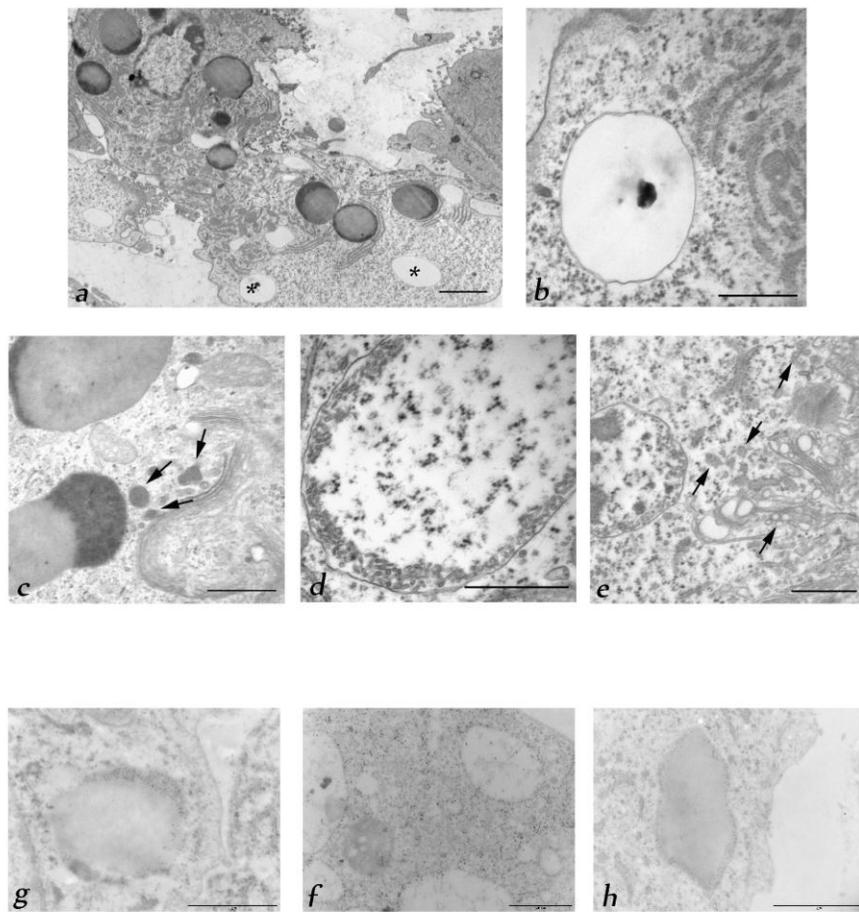
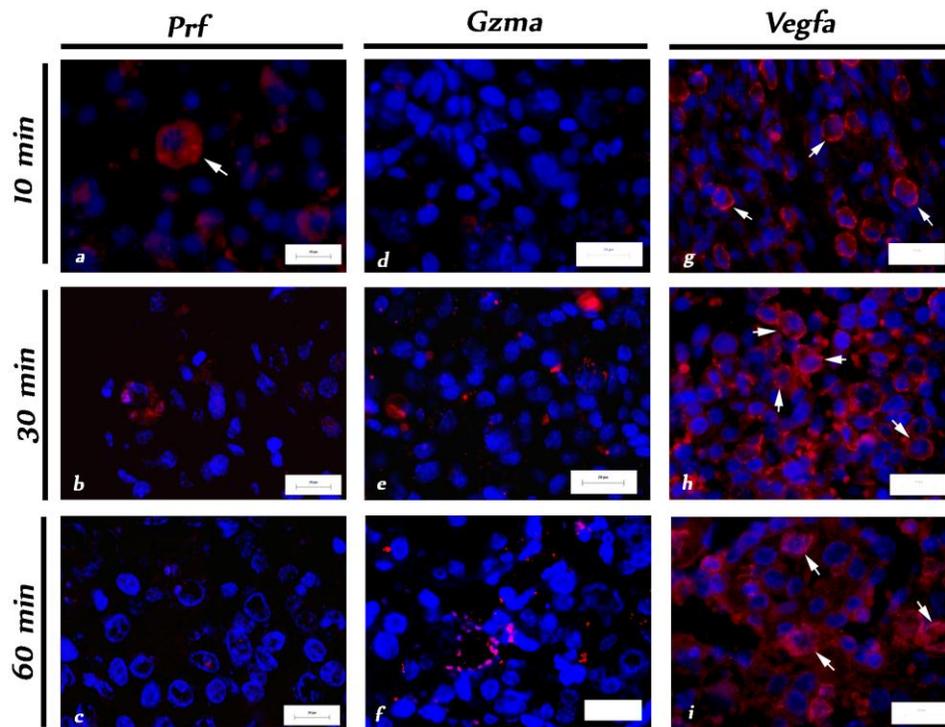


Figura 10: Imunofluorescência para anti-Prf- Alexa fluor594 (**a-c**); anti-Gzma- Alexa fluor 594 (d-f) e anti Vegfa- Alexa fluor 594 (g-i) nos períodos de 10, 30 e 60 min pós-eutanásia cirúrgica do embrião (ECE) no útero de camundongo do 9ºdg. Notar a redução significativa da marcação para Prf em 30 min pós-ECE (b), enquanto a redução da marcação de Gzma já é efetiva em 10 min pós-ECE (d). A intensidade de marcação para Vegfa não sofre alteração com a ECE. Barra=20um.

FIGURA 10



8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIN, W.; HOLROYD, C.; TIKKANEN, R.; HONING, S.; JAHN, R. (2000) - The R-SNARE Endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. **Mol Biol Cell** .; v.1, p. 3289-3298.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. (2002) - Immunologia Celular e Molecular, tradução de Raymundo martagão Gester, 4º. ed. Rio de Janeiro: **Livraria e Editora Revinter Ltda**, p. 55 14916–14922.

ABRAHAMSOHN, P.A.; ZORN T.M. (1993) - Implantation and decidualization in rodents. **J Exp Zool**. v.266(6), p.603-28.

ALBERTS, B .; JOHNSON, A .; LEWIS, J .; RAFF, M .; ROBERTS, K .; WALTER, P. (2002) - Cell Junctions, Cell Adhesion and the Extracellular Matrix, **Molecular biology of the cell**.

ANDREWS, N.W. (2000) - Regulated secretion of conventional lysosomes. **Rev. Trends Cell Biology**. v.10, p.316-321.

ASHKAR A.A.; BLACK G.P.; WEI Q.; HE H.; LIANG L.; HEAD J.R.; CROY, B.A. (2003) - Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. **J. Immunol.**, v.171, p.2937–2944.

ASHKAR A.A.; CROY B.A. (1999) - Interferon- γ contributes to the normalcy of murine pregnancy. **Biol. Reprod.**; v.61, p.493–502

ASHKAR, A.A.; DISANTO, J.P.; CROY, B.A. (2000) – Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J. Exp. Med**. v.192, p.259–269.

BABST, M.; KATZMANN, D.J.; SNYDER, W.B.; WENDLAND, B.; EMR, S.D. (2002) - Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. **Dev. Cell.**, USA, v. 3, p. 283-289.

BACHE, K.G.; RAIBORG, C.; MEHLUM, A.; STENMARK, H. (2003) - STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. **J. Biol. Chem.**, v.278, p. 12513- 12521.

BAHADORAN, P.; ABERDAM, E.; MANTOUX, F.; BUSCÀ, R.; BILLE, K.; YALMAN, N.; DE SAINT-BASILE, G.; CASAROLI-MARANO, R.; ORTONNE, J.P.; BALLOTTI (2001) - Rab 27: A key to melanosome transport in human melanocytes. **J. Cell Biol.**, USA, v.152(4), p.843-850, Feb .;.

BANDEIRA-MELO, C.; SUGIYAMA, K.; WOODS, L. J.; WELLER, P. F. (2001) - Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. **J. Immunol.**, v.166, p.4813–4817.

BANDEIRA-MELO, C.K.; SUGIYAMA, L. J.; WOODS, M.; PHOOFOLO, D. M.; CENTER, W. W.; CRUIKSHANK, P. F. (2002) - IL-16 promotes leukotriene C(4) and IL-4 release from human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3- chemokine-mediated signaling. **J. Immunol.**, v.168, p.4756-4763.

BARRIENTOS, G.; TIRADO-GONZALEZ, I.; KLAPP, B.F.; KARIMI, K.; ARCK, P.C.; GARCIA, M.G.; BLOIS, S.M. (2009) - The impact of dendritic cells on angiogenic responses at the fetal–maternal interface. **J. Reprod. Immunol.** v.83, p.85–94.

BARINI, R.; COUTO, E.; MOTA, M.M.; SANTO, C.T.M.; LEIBER, S.R.; BATISTA, S.C. (2000) Fatores Associados ao Aborto Espontâneo Recorrente. **RBGO.** v.22(4), p.217-223.

BARRY, M.; HEIBEIN, J.A.; PINKOSKI, M.J.; LEE, S.F.; MOYER, R.W.; GREEN, D.R.; BLEACKLEY, R.C. (2000) - Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. **Mol. Cell. Biol.** v.20, p.3781–94.

BECKMAN, M.; FREEMAN, C.; PARISH, C.R.; SMALL, D.H. (2009) - Activation of cathepsin D by glycosaminoglycans. **The Febs Journal.** v.276, p.7343-7352.

BENES, P.; VETIVCKA, V.; FUSEK, M. (2008) - Cathepsin D- many functions of one aspartic protease. **Oncology Hematology**, v.68, p.12-28.

BIANCO, J.; STEPHENSON, K.; YAMADA, A.T.; CROY, B.A. (2008) - Time-course analyses addressing the acquisition of DBA lectin reactivity in mouse lymphoid organs and uterus during the first week of pregnancy. **Placenta**, v.29(12), p. 1009-15.

BILINSKI, M.J.; THORNE, J.G.; OH, M.J.; LEONARD, S.; MURRANT, C.; TAYADE C.; CROY, B.A. (2008) - Uterine NK cells in murine pregnancy. **Reprod. Biomed. Online**, v.16, p.218-226.

BJERKE, T.; GAUSTADNES, M.; NIELSEN, S.; NIELSEN, L.P.; SCHIOTZ, P.O.; RUDIGER, N.; REIMERT, C.M.; DAHL, R.; CHRISTENSEN, I.; POULSEN, L.K. (1996) - Human blood eosinophils produce and secrete interleukin 4. **Respir. Med.**; v.90, p.271-277.

- BLOIS, S. M.; KLAPP, B. F.; BARRIENTOS, G.(2010) - Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. **J. Reprod. Immunol.**, v.88(2), p.86-96.
- BOSSI, G.; GRIFFITHS, G.M. (1990) - Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. **Nat. Med.**, v.5, p.90–96.
- BOSSI, G.; GRIFFITHS, G.M. (2005) - CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. **Seminars in Immunology**. v.17, p.87–94.
- BOYINGTON, J C.;MOTYKA, S A.;SCHUCK, P.;BROOKS, A G.;SUN, P D. (2000) - Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. **Natura**, v.405 (6786), p.537-43.
- BROOKS A.G.; POSCH P.E.; SCORZELLI C.J.; BORREGO F.; COLIGAN J.E (1997) - NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. **J. Exp. Med.**, v.85, p.795–800
- BULMER J.N.; SUNDERLAND C.A. (1984) - Immunohistological characterization of lymphoid cell populations in the early human placental bed. **Immunology**. v.52(2), p.349-57.
- BULMER, J.N.; MORRISON, L.; LONGFELLOW, M.; RITSON, A.; PACE, D.(1991) - Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. **Hum. Reprod.**, v.6, p.791-798.
- BURKHARDT J.K.; HESTER S.; ARGON Y. (1989) - Two proteins targeted to the same lytic granule compartment undergo very different posttranslational processing. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.86, p.7128–32
- BURKHARDT, J.K .; MCILVAIN, J.M .; JR .; SHEETZ, M.P .; ARGON, Y. (1993) - Lytic granules from cytotoxic T cells exhibit kinesin-dependent motility on microtubules in vitro. **J. Cell Sci.**, v.104, p.151–162.
- BURKHARDT, J.K.; HESTER, S.; LAPHAM, C.K.; ARGON, Y. (1990) - The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. **J. Cell Biol.**, v.111, p.2327–40.
- BURNETT T.G.; HUNT J.S. (2000) - Nitric oxide synthase-2 and expression of perforin in uterine NK cells. **J. Immunol.** v. 15;164(10), p.5245-50.

BURSHTYN D.N, LONG E.O. (1997) - Regulation through inhibitory receptors: Lessons from natural killer cells. **Trends Cell Biol.**, v.7(12), p.473-9.

CALIGIURI, M.A. (2008) - Human natural killer cells. **Blood**, v.112,p.461–469

CARLINO, C.; STABILE, H.; MORRONE,S.; BULLA,R ; SORIANI, A.; AGOSTINIS, C.; BOSSI, F.; MOCCI, C.; SARAZANI, F.; TEDESCO, F.; SANTONI, A.; GISMONDI, A.(2008) - Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. **Blood**. v.111,p.3108-15.

CARRETERO M.; CANTONI C.; BELLÓN T.; BOTTINO C.; BIASSONI R.; RODRÍGUEZ A.; PÉREZ-VILLAR J.J.; MORETTA L.; MORETTA A.; LÓPEZ-BOTET M. (1997) - The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. **Eur J. Immunol.**, v.27, p.563–567.

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

CHOWDHURY, D.; BERESFORD, P.J.; ZHU, P.; ZHANG, D.; SUNG, J.-S.; DEMPLE, B.; PERRINO, F.W. LIEBERMAN J. (2006) - .The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. **Molecular cell**, v.23(1), p.133-42.

CHOY J.C.; KERJNER A.; WONG B.W.; MCMANUS B.M.; GRANVILLE D.J. (2004) - Perforin mediates endothelial cell death and resultant transplant vascular disease in cardiac allografts. **Am J. Pathol.**, v.165, p.127–133.

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

COLUCCI F.; CALIGIURI M.A.; DI SANTO, J.P.(2003) - What does it take to make a natural killer? **Nat. Ver. Immunol.** v.3 (5), p.413-425.

COPI, C. (2006) - Efeito da lesão embrionária nos grânulos lisossomo-secretoras das células Natural Killer uterinas de camundongos, **Tese de Mestrado IB/ UNICAMP**.

CRIVELLATO, E.; NICO, B.; MALLARDI, F.; BELTRAMI, C.A.; RIBATTI, D. (2003) – Peacemeal degranulation as a general secretory mechanism?. The **Anat Record: Discoveries in Molecular, cellular and evolutionary biology**; v.274, p.778-84.

CROY B.A.; REED N.; MALASHENKO B.A.; KIM K.; KWON B.S. (1991) - Demonstration of YAC target cell lysis by murine granulated metrial gland cells. **Cell Immunol.** v.133(1), p.116-26.

CROY B.A.; ZHANG J.; TAYADE C.; COLUCCI F.; YADI H.; YAMADA A.T. (2010) – Analysis of uterine natural killer cells in mice. **Methods Mol. Biol.**, v. 612, p.465-503.

CROY B.A.; CHANTAKRU S.; ESADEG S.; ASHKAR A.A.; WEI, Q. (2002) - Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). **J. Reprod. Immunol.**, v.57(1-2), p.151-68.

CROY, B.A.; ESADEG, S.; CHANTAKRU, S.; VAN DEN HEUVEL, M.; PAFFARO, V.A.; HE, H.; BLACK, G.P.; ASHKAR A.A.; KISO Y.; ZHANG J. (2003) - Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. **J. Reprod. Immunol.**, v.59(2), p.175-91.

CRUZ-SOTO, M.E.; COSIO, G.; JEZIORSKI, M.C.; VARGAS-BARROSO, V.; AGUILAR, M.B.; CARABEZ, A.; BERGER, P.; SAFTIG, P.; ARNOLD, E.; THEBAULT, S.; ESCARELA, G.M.; CLAPP, C. (2009) - Cathepsin D is the primary protease for the generation of adeno-hypophyseal vasoinhibins: cleavage occurs within the prolactin secretory granules. **General endocrinology**, v.150(12), p.5446-5454.

DIEFENBACH, A.; JAMIESON, A.M.; LIU, S.D.; SHASTRI, N.; RAULET, D.H. (2000) - Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. **Nat. Immunol.**, v.1, p.119–126.

DOSIOU C.; GIUDICE LC. (2005) - Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. **Endocr. Rev.** v.26(1), p.44-62.

DVORAK, A.M. (1991) - Basophil and mast cell degranulation and recovery. **Blood Cell Biochemistry**, v.4, p. 340–377.

EPP N.; RETHMEIER R.; KRÄMER L.; UNGERMANN C. (2011) - Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles--Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs. **Eur. J. Cell Biol.**, v.90(9), p.779-85.

- ERICKSON, A.H. (1989) - Biosynthesis of lysosomal endopeptidases. **J. Cell Biochem.**, v.40(1), p. 31–41.
- FASSHAUER, D.; SUTTON, R.B.; BRUNGER, A.T.; JAHN, R. (1998) - Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q and R-SNAREs. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.95, p.15781-5786.
- FEHNIGER T.A.; CAI S.F.; CAO X.; BREDEMEYER A.J.; PRESTI R.M.; FRENCH A.R.; LEY T.J. (2007) - Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. **Immunity**, v.26, p.798–811.
- FROELICH C.; METKAR S. (2011) - Intracellular trafficking of perforin: to thwart a killer. **Immunity**. v. 24;34(6), p.823-5.
- FROELICH, C. J.; PARDO, J.; SIMON, M. M.(2009) - Granule-associated serine proteases: granzymes might not just be killer proteases. **Trends in immunology**, v.30 (3), p.117-23.
- GALY A.H.M.; CEN D.; TRAVIS M.; CHEN S.; CHEN B.P. (1995) - Delineation of T progenitor cell activity within the CD34⁺ compartment of adult bone marrow. **Blood**, v.85, p. 2770–2778. 1
- GELLERSEN B.; BROSENS I.A.; BROSENS J.J. (2007) - Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. **Semin. Reprod. Med.**, v. 25, p.445–453.
- GRIFFITHS, G. (2002) – What’s special about secretory lysosomes? **Semin. Cell Dev. Biol.**, v.13(02), p.279-284.
- GRIFFITHS, G. M. (1997) - Protein sorting and secretions during CTL killing. **Semin. Immunol.** v.9, p.109-115.
- GRIFFITHS, G.M.; ISAAZ, S. (1993) - Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. **J. Cell Biol.**, v.120, p.885–96.
- GROSSHANS, B.L.; ORTIZ, D.; NOVICK, P. (2006) - Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. **Traffic**, v.103 (32), p. 11821-7.
- GRUJIC, M.; BRAGA, T.; LUKINIUS, A.; ELORANTA, M.L.; KNIGHT, S.D.; PEJLER, G.; ABRINK, M. (2005) - Serglycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. **J. Biol. Chem.** v.280, p.33411–33418.

- GUIMOND M-J.; WANG B; CROY BA. (1998) - Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficient tg epsilon 26 mice. **J. Exp. Med.**; v.187, p.217–223
- GUO, Z.; TURNER, C.; CASTLE, D. (1998) - Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. **Cell.** v.94, p.537–548.
- HADDAD, E.K.; WU, X.; HAMMER, J.A.D.; HENKART, P.A. (2001) - Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. **J. Cell Biol., USA,** v.19; 152(4), p.835-42.
- HANNA, J.; WALD, O.; GOLDMAN-WOHL; D.(2003) – CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. **Blood.** V.102, p.1569-1577.
- HARARI, A.; ENDERS, F. B.; CELLERAI, C.; BART, P.-A.; PANTALEO, G. (2009) – Distinct profiles of cytotoxic granules in memory CD8 T cells correlate with function, differentiation stage, and antigen exposure. **Journal of virology,** v.83 (7), p.2862-71.
- HATTA K.; VAN DEN HEUVEL M.J.; CROY B.A. (2009) – NK cells detect changes in adaptive immunity within mouse decidua from gestation day eight. **Placenta,** V.30 (6),p.501-6.
- HATTA K.; CARTER A.L.; CHEN Z.; LENO-DURÁN E.; RUIZ-RUIZ C.; OLIVARES E.G.; TSE M.Y.; PANG S.C.; CROY B.A. (2010) – Expression of the vasoactive proteins AT1, AT2, and ANP by pregnancy-induced mouse uterine natural killer cells. **Reprod. Sci.,** v.18(4), p.383-90.
- HAYAKAWA Y, SMYTH MJ. (2006) - CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. **J. Immunol.,** v. 176, p.1517–1524.
- HERINGTON J.L.; UNDERWOOD T.; MCCONAHA M.; BANY B.M (2009) - Paracrine signals from the mouse conceptus are not required for the normal progression of decidualization. **Endocrinology.** v.150, p.4404– 4413.
- HIBI, T.; HIRASHIMA, N.; NAKANISHI, M. (2000) - Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes. **Biochem. Biophys. Res. Comm.;** v.29;271(1), p.36–41.

HIBY S.E.; WALKER J.J.; O'SHAUGHNESSY K.M.; REDMAN C.; CARRINGTON M.; TROWSDALE J.; MOFFERT A. (2004) - Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. **J. Exp. Med.**, v. 200, p. 957–965.

IKAWA T.; KAWAMOTO H.; FUJIMOTO S.; KATSURA Y., (1999) - Commitment of common T/natural killer (NK) progenitors to unipotent T and NK progenitors in the murine fetal thymus revealed by a single progenitor assay. **J. Exp. Med.**, v. 190(11), p. 1617–1625.

IZUHARA K, KANAJI S, ARIMA K, OHTA S, SHIRAISHI H. (2008) - Involvement of cysteine protease inhibitors in the defense mechanism against parasites. **Med. Chem.**,v.4(4),p.322-7.

JANOSEVIĆ D.R.; LILIĆ V.; BASIĆ H.; PAVLOVIĆ AT.; STEFANOVIĆ M.; MILOSEVIĆ J. (2011) - Decidual natural killer cells in recurrent spontaneous abortions. **Vojnosanit Pregl.** v.68(1), p.41-5.

JENNE DE, TSCHOPP J. (1988) - Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation. **Immunol Rev.**; v.103,p.53-71.

KAISERMAN, D.; BIRD, P. I. (2010) - Control of granzymes by serpins. **Cell death and differentiation (Nature Publishing Group)**, v. 17(4), p. 586-95.

KALKUNTE S.S.; MSELLE T.F.; NORRIS W.E.; WIRA C.R.; SENTMAN C.L.; SHARMA S. (2009) - Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. **J. Immunol.**, v.182, p.4085–4092

KIM, S.; HIZUKA K.; KANGA H.S.; DOKUN A.; FRENCH A.R.; GRECO S.; YOKOYAMA W.M. (2002) - In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. **Nat. Immunol.**, v.3, p.523–528.

KING A.; LOKE Y.W (1991) - On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. **Immunology Today**.v.12, p.432–435.

KITAYA K.; YASUO T.; YAMAGUCHI T.; FUSHIKI S.; HONJO H.(2007) - Genes regulated by Interferon gamma in human uterine microvascular endothelial cells. **Int. J. Mol. Med.**, v. 20, p.689–697.

- KOLSET, S. O .; AND TVEIT, H. (2008) - Serglycin - Structure and biology. **Cell Mol. Life Sci.**, v.65, p.1073- 1085.
- KOLSET, S. O.; PRYDZ, K.; PEJLER, G. (2004) - Intracellular proteoglycans. **Biochem. J.**, v.379, p.217–227.
- KONDO, M .; WEISSMAN, I.L .; AKASHI, K.(1997) - Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. **Cell**, v.91, p.661–72.
- KOPCOW, H. D.; ALLAN, D.S.; CHEN, X.; RYBALOV, B.; ANDZELM, M.M.; GE, B.;STROMINGER, J.L. (2005) - Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. **PNAS**. v. 102 (43), p.15563–15568.
- KRZEWSKI K.; GIL-KRZEWSKA A.; WATTS J.; STERN J.N.; STROMINGER J.L. (2011) - VAMP4- and VAMP7-expressing vesicles are both required for cytotoxic granule exocytosis in NK cells. **Eur. J Immunol.**, v.41(11), p.3323-9.
- KUMMER, J. A.; KAMP, A M.; TADEMA, T.M.; VOS, W.; MEIJER, C.J.; HACK, C. E. (1995) - Localization and identification of granzymes A and B-expressing cells in normal human lymphoid tissue and peripheral blood. **Clinical and experimental immunology**, v.100(1), p.164-72.
- LAIRD S.M.; TUCKERMAN E.M.; CORK B.A.; LINJAWI S.; BLAKEMORE A.I.; LI T.C. (2003) - A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage.**Hum. Reprod. Update**. v.9(2), p.163-74.
- LANGFORD, G.M. (1995) - Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.7, p.82–88.
- LANIER, LEWIS L. (2005) - NK cell recognition. **Annual Review of Immunology**.,v. 23, p.225-74.
- LANIER, LEWIS L.(2003) - Natural killer cell receptor signaling. **Immunol.** v.15(3), p.308-314.2003.
- LASH G.E.; BULMER J.N. (2011) - Do uterine natural killer (uNK) cells contribute to female reproductive disorders? **J. Reprod. Immunol.**, v.88(2), p.156-64.
- LEONARD, S.; MURRANT, C.; TAYADE, C.; VAN DEN HEUVEL; M .; WATERING; R .; CROY, B.A.(2006) - Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification—facts and hypotheses—a review. **Placenta**, v.27, p.40-46.

LIAUDET-COOPMAN, E.; BEAUJOUIN, M.; DEROCQ, D.; GARCIA, M.; GLONDULASSIS, M.; LAURENT-MATHA, V.; PREBOIS, C.; ROCHEFORT, H.; VIGNON, F. (2006) Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. **Cancer Lett.**, v. 237, p.167–179.

LIEBERMAN, J. (2003) - THE ABCS OF GRANULE-MEDIATED THE ARSENAL. **Immunol.**, v.3, p.1-10.

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

LOGAN M.R.; ODEMUYIWA S.O.; MOQBEL R (2003) - Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.111 (5), p.923-32.

LOGAN, M.R ; LACY,P.; ODEMUYIWA, S.O.; STEWARD, M.; DAVOINE, F.; KITA, H.; MOQBEL, R. (2006) - A critical role for vesicle-associated membrane protein-7 in exocytosis from human eosinophils and neutrophils. **Allergy**, v.61, p.777-784.

MARCET-PLACIOS, M.; ODEMUYIWA,S.O.;COUGHLIN, J.J.; GAROFOLI, D.; EWEN, C.; DAVIDSON,C.E.; GHAFARI, M.; KANE,K.P.; LACY,P.; LOGAN, M.R.; BEFUS, A.D.; BLEACKLEY,R.C.; MOQBEL,R. (2008) - Vesicle-associated membrane 7 (VAMP7)is essential for target cell killing in a natural killer cell line. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, v. 15;366 (3), p.617-623.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ J.E.; SAEZ-BORDERÍAS A.;MUNTEIS E.; ROMO N.; ROQUER J.; LÓPEZ-BOTET M. (2010) - Natural killer receptors distribution in multiple sclerosis: Relation to clinical course and interferon-beta therapy. **Clin. Immunol.**, v.137(1), p.41-50.

MARTINVALET, D.; DYKXHOORN, D.M.; FERRINI, R.; LIEBERMAN, J. (2008) – GranzymeA cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. **Cell.** v. 133, p.681–692.

MASSON, D.; PETERS, P.J.; GEUZE, H.J.; BORST, J.; TSCHOPP, J. (1990) - Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH. **Biochemistry**, v.29, p.11229–35.

MEADE, J. L.; DE WYNTER, E. A.; BRETT, P.; SHARIF, S.M.; WOODS, C.G.; MARKHAM, A. F.; & COOK, G. (2006) - P.A family with Papillon-Lefevre syndrome reveals a requirement for cathepsin C in granzyme B activation and NK cell cytolytic activity. **Blood**, v.107(9), p.3665-8.

MEADE, J.L.; WILSON, E.B.; HOLMES, T.D.; DE WYNTER, E.; BRETT, P.; STRASZYNSKI, L.; BALLARD, P.S.; TRAPANI, J.; MCDERMOTT, M. F.; COOK, G. P. (2009) - Proteolytic activation of the cytotoxic phenotype during human NK cell development. **J. Immunol.**, v.183(2).p.803-13.

MELLO, R.C.N.; SPENCER, L.A.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. (2007) - Mechanism of eosinophil secretion: large vesicubular Carrier mediate transport and release of granule-derived cytokine and others proteins. **J. Leuk. Biol.**, v.83(2), p.229-36.

MENAGER, M.M.; MENASCHE', G.; ROMAO, M.; KNAPNOUGEL, P.; HO, C-H.; GARFA, M.; RAPOSO, G.; FELDMANN, J.; FISCHER, A.; SAINT BASILE, G. (2007) - Secretory cytotoxic granule maturation and exocytosis require the effector protein hMunc13-4. **Nature Immunology**, v. 8 (3), p.257-67.

MENASCHE, G.; FELDMANN J.; FISCHER, A.; DE SAINT BASILE, G.(2005) - Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. **Immunol. Rev.** v. 203, p.165–179.

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

METKAR, S.S.; MENAA, C.; PARDO, J.; B. WANG, R.; WALLICH, M.; FREUDENBERG, S.; KIM, S.M.; RAJA, L.; SHI, M.M.; SIMON, C.J.; FROELICH (2008) - Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response, **Immunity**, v.14; 29(5), p.720-33.

MOFFET-KING A.(2002) - Natural killer cells and pregnancy. **Natl Rev.**;v.2, p.656-63.

MOQBEL R, COUGHLIN J.J. (2006) - Differential secretion of cytokines. **Sci STKE.** v. 6; p.338.

MOQBEL, R.; YING, S.; BARKANS, J.; NEWMAN, T.M.; KIMMITT, P.; WAKELIN, P.M.; TABORDA-BARATA, L.; MENG, Q.; CORRIGAN, C.J.; DURHAM, S.R.; KAY, A.B. (1995) - Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. **J. Immunol.**; v.155, p.4939-4947.

MORETTA, A.; MARCENARO E.; PAROLINI S.; FERLAZZO G.; MORETTA L. (2008) - NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. **Cell Death Differ.** v.15, p.226–233.

MORETTA, L.; BOTTINO, C.; PENDE, D.; VITALE, M.; MINGARI, M.C.; MORETTA, A. (2004) - Different checkpoints in human NK-cell activation. **Trends in Immunology**. v. 25, p.270-6.

MULLOCK, B.M.; SMITH, W.; IHRKE, G. (2000) - Syntaxin 7 is localized to late endosome compartments, associates with Vamp 8, and Is required for late endosome-lysosome fusion. **Mol. Biol. Cell**. v.11, p.3137-3153.

MURPHY SP, FAST LD, HANNA NN, SHARMA S. (2005)- Uterine NK Cells Mediate Inflammation-Induced Fetal Demise in IL-10-Null Mice. **J.Immunol**. v.175(6),p.4084-90.

OWER, L.E.; KLIMPEL, G.R.; HANNA, A. C. J. F. (1996) - Extracellular Activities of Human Granzymes. **Cell**, v.163, p.159-163.

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

PARDO, J.; AGUILO, J. I.; ANEL, A.; MARTIN, P.; JOECKEL, L.; BORNER, C.; WALLICH, R.; MÜLLBACHER A.; FROELICH C.J.; SIMMON M.M. (2009) - The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. **Microbes and infection**, v.11(4), p.452-9.

PARR E.L.; YOUNG L.H.; PARR M.B.; YOUNG J.D. (1990) - Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. **J Immunol**. v.145(7):2365-72.

PAUMET, F.; LE, M.A.O. J.; MARTIN, S. (2000) - Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. **J. Immunol**. v.164, p.5850-5857.

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

PFEFFER, S.R. (2001) - Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. **Trends Cell Biol.**, v.11, p.487-91.

RAMATHAL C.Y.; BAGCHI I.C.; TAYLOR R.N.; BAGCHI M.K. (2010) - Endometrial decidualization: of mice and men. **Semin. Reprod. Med.**, v. 28(1), p.17-26.

- RAULET, D. H.; VANCE, R. E.; MCMAHON, C. W. (2001) - Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. **Annu. Rev. Immunol.** v.19, 291–330.
- RIZO, J.; SUDHOF, T.C. (2002) - Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.3, p.641-653.
- ROCHEFORT, H.; GARCIA, M.; GLONDU, M.; LAURENT, V.; LIAUDET, E.; REY, J.M.; ROGER, P. (2000) – CathepsinD in breast cancer: mechanisms and clinical applications. **Clin. Chem. Acta**, v.291, p.157–170.
- RODRIGUEZ, A.; WEBSTER, P.; ORTEGO, J.; ANDREWS, N. W. (1997) - Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. **J. Cell Biol.** v.137, p.93-104.
- ROMERO, V. ANDRADE, F. (2008) -Non-apoptotic functions of granzymes. **Tissue Antigens** ,v.71,p. 409–416.
- ROSMARAKI, E.E.; DOUAGI, I.; ROTH C.; COLUCCI F.; CUMANO A.; DI SANTO J.P. (2001) - Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. **Eur. J. Immunol.**, v.31(6), p.1900-1909.
- SAITO S.; NISHIKAWA K.; MORII T.; ENOMOTO M.; NARITA N.; MOTOYOSHI K.; ICHIJO M. (1993) – Cytokine production by CD162.D56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. **Int. Immunol.**, v. 5, p.559–563.
- SALI, A.; MATSUMOTO, R.; MCNEIL, H. P.; KARPLUS, M.; STEVENS, R. L. (1993) - Three-dimensional models of four mouse mast cell chymases. Identification of proteoglycan binding regions and protease-specific antigenic epitopes. **J. Biol. Chem.** v.268, p.9023–9034.
- SANTONI, A.; CARLINO, C.; GISMONDI, A. (2008) - Uterine NK cell development, migration and function. **Reprod. Biomed. Online**, v.16, p.202-210.
- SELYE, H.; MCKEOWN, T .; 1935. **Proc. Roy. Soc.** ,v.119,p. 1.
- SHEIKHI A.K.; TAYADE C.; PAFFARO V.A.; CROY B.A. (2007) - Are natural killer cells distributed in relationship to nerve fibers in the pregnant mouse uterus? **J. Biol. Sci.**, v.1;10(17), p.2885-9.
- SIVORI S.; FALCO M.; DELLA CHIESA M.; CARLOMAGNO S.; VITALE M.; MORETTA L.; MORETTA A. (2004) - CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.101, p.10116–10121.

SMITH S.D.; DUNK C.E.; APLIN J.D.; HARRIS LK.; JONES R.L. (2009) - Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. **Am. J. Pathol.**, v. 174, p.1959–1971.

SMITH, L. J. (1966) - Metrial gland and other glycogen containing cells in the mouse uterus following mating and through implantation of the embryo. **American Journal of Anatomy**. v.119, p.15-24.

SOLLNER, T.H. (2003) - Regulated exocytosis and SNARE function (Review). **Mol. Membr. Biol.**; v.20(3), p.209.220.

SOWER LE, KLIMPEL GR, HANNA W, FROELICH CJ.(1996) Extracellular activities of human granzymes. I. Granzyme A induces IL6 and IL8 production in fibroblast and epithelial cell lines. **Cell Immunol.**, v.1 10;171(1), p.159-63

SPENCER, L.A.; MELO, R.C.; PEREZ, S.A.; BAFFORD, S.P.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. (2006) - Cytokine receptor-mediated trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**; v.103, p. 3333- 3338.

STEPP, S.E.;MATHEW,P.A.; BENNET,M.;SAINT BASILE,G.; KUMAR,V. (2000) - Perforin: more the just an effector molecule. **Trends Immunology today.**, v.21(6), p.254-256.

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

STINCHCOMBE, J. C.; PAGE, L. J.; GRIFFITHS, G. M. (2000) - Secretory lysosome biogenesis in cytotoxic T lymphocytes from normal and Chediak Higashi syndrome patients. **Traffic**, v. 1(5), p. 435-44.

STINCHCOMBE, J.;BOSSI, G.;GRIFFITHS,G.M. (2004) - Linking albinism and Immunity: The secrets of Secretoy lysosomes. **Science, AAAS**, v.305 (55), p.55-59.

STINCHCOMBE, J.C.; MAJOROVITS, E.; BOSSI, G.; FULLER, S.; GRIFFITHS, G.M. (2006) - Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. **Nature**, v.443 (7110), p.462-5.

SUTTON R.B.; FASSHAUER D.; JAHN R.; BRUNGER A.T. (1998) - Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. **Nature**. v.395 (6700), p.347-53.

SUTTON, V. R.; DAVIS, J.E.; CANCELLA, M.; JOHNSTONE, R.W.; RUEFLI, A.A.; SEDELIES, K.; BROWNE, K.A.; TRAPANI, J.A. (2000) - Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. **J. Exp. Med.**, v.192, p.1403–1414.

SYMONS, H.J.; LEFFELL, M.S.; ROSSITER, N.D.; ZAHURAK, M.; JONES, R.J.; FUCHS, E.J. (2010) - Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. **Biol. Blood Marrow Transplant.** v.16, p.533–542.

TANG A.W.; ALFIREVIC Z.; QUENBY S. (2011) - Natural killer cells and pregnancy outcomes in women with recurrent miscarriage and infertility: a systematic review. **Hum. Reprod.** v.26(8), p.1971-80.

TANG, Y.; PEITZSCH, C.; CHENG, M.; CHAVES, P.; JACOBSEN, S.E.; SITNICKA E. (2011) - Emergence of NK cell progenitors and functionally competent NK cell lineage subsets in the early mouse embryo. **Blood**, v.02-33, p.7980.

TANGYE, S G.; PHILLIPS, J H.; LANIER, L L. (2000) - The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. **Seminars in immunology**, v.12(2), p.149-57.

TAYADE C.; FANG Y.; HILCHIE D.; CROY B.A. (2007) - Lymphocyte contributions to altered endometrial angiogenesis during early and midgestation fetal loss. **J. Leukoc. Biol.**, v. 82, p.877–886

TIWARI, N.; WANG, C.C.; BROCHETTA, C.; KE, G.; VITA, F.; QI, Z.; RIVER, R.; SORANZO, M.R.; ZABUCCI, G.; HONG, W.; BLANK, U. (2008) - Vamp-8 segregates mast-cell preformed mediator exocytosis from cytokine trafficking pathways. **Blood**, v.111, p.3665-3674.

TOMASELLO E.; DESMOULINS P.O.; CHEMIN K.; GUIA S.; CREMER H.; ORTALDO J.; LOVE P.; KAISERLIAN D.; VIVIER E. (2000) - Combined natural killer cell and dendritic cell functional deficiency in KARAP/DAP12 loss-of-function mutant mice. **Immunity**. v.13, p.355-64

TRAPANI, J. A (2001) - Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. **Genome**, p.1-7.

TRAPANI, J.A.; SMYTH, M.J. (2002) - Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nat. Rev. Immunol.**, v.2 (10), p.735–747.

- TRINCHIERI, G. (1989) - Biology of Natural Killler cells, **Adv. Immunol**, v.47, p.187-376.
- TUCKERMAN E.; LAIRD S.M.; PRAKASH A.; LI T.C. (2007) - Prognostic value of the measurement of uterine natural killer cells in the endometrium of women with recurrent miscarriage. **Human Reprod.**, v.22 (8), p.2208-13.
- TUCKERMAN, E.; MARIEE, N.; PRAKASH, A.; LI, T.C.; LAIRD, S.; (2010). - Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. **J. Reprod. Immunol.** v.87, 60–66.
- UELLNER R.; ZVELEBIL M.J.; HOPKINS J.; JONES J.; MACDOUGALL L.K.; MORGAN B.P.; PODACK E.; WATERFIELD M.D.; GRIFFITHS G.M. (1997) - Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. **EMBO J.** v.16(24), p.7287-96.
- UHLIN-HANSEN, L.; ESKELAND, T.;KOLSET, S. O. (1989) - Modulation of the expression of chondroitin sulfate proteoglycan in stimulated human monocytes. **J. Biol. Chem.** v264 (25), p.14916-22.
- VANCE RE, KRAFT, JR, ALTMAN,JD, PETER E. JENSEN,PE', RAULET, DH. (1998)Mouse CD94/NKG2A Is a Natural Killer Cell Receptor for the Nonclassical Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Molecule Qa-1^b. **J Exp Med.**v.188 (10), p. 1841.
- VÉLY, F.; OLIVERO, S.; OLCESE, L.; MORETTA, A.; DAMEN, J E.; LIU, L.; KRYSTAL, G.; CAMBIER, J C.; DAËRON, M.; VIVIER, E. (1997) - Differential association of phosphatases with hematopoietic co-receptors bearing immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. **European journal of immunology**, v 27(8), p.1994-2000.
- VIVIER, E.; ANFOSSI, N. (2008) - Inhibitory NK-cell receptors on Tcells: witness of the past, actors of the future. **Nat. Rev. Immunol.**, v.4, 190–198
- VOSKOBOINIK, I.; SMYTH, M.J.; TRAPANI, J.A. (2006) - Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. **Nat. Rev. Immunol.** v.6(12), p. 940–952.
- WANG A.; RANA S.; KARUMANCHI S.A. (2009) - Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. **Physiology**, v.24, p.147–158.

WANG, C.C.; SHI, H.; GUO, K. (2007) - VAMP8/endobrevin as a general vesicular SNARE for regulated exocytosis of the exocrine system. **Mol. Biol. Cell**, v.18, p.1056-1063.

WANG, T.; HONG, W. (2002) - Interorganellar regulation of lysosome positioning by the Golgi apparatus through Rab34 interaction with Rab-interacting lysosomal protein.- **Mol. Biol. Cell**, v.13, p.4317-4332.

WHITAKER-MENEZES, D .; SCHECHTER, N. M. AND MURPHY, G. F. (1995) – Serine proteinases are regionally segregated within mast cell granules. **Lab. Invest.** v.72, p.34-41.

WHITESIDE, T.L.; HERBERMAN, R.B. (1994) - Role of human natural killer cells in health and disease. **Clin. Diagn. Lab. Immunol .;** v.1 (2), p.125-133.

WONG, S.H.; ZHANG, T.; XU, Y.; SUBRAMANIA, M.V.N.; GRIFFITHS, G.; HONG,W. (1998) - Endobrevin, a novel synaptobrevin/VAMP-like protein preferentially associated with the early endosome. **Mol. Biol. Cell**, v.9, p.1549-1563.

WONG PP, DANEMAN N, VOLCHUK A, LASSAM N, WILSON MC, KLIP A, TRIMBLE WS (1997)- Tissue distribution of SNAP-23 and its subcellular localization in 3T3-L1 cells.**Biochem. Biophys Res.Commun.**, v.230(1), p.64-8.

WU, J.,CHERWINSKI, H.,SPIES, T.,PHILLIPS, J H.,LANIER, L L. (2000)- DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells .**J.Exp.Med.**, v.192 (7), p.1059-68.

XIE X, HE H, COLONNA M, SEYA T, TAKAI T, CROY B.A. (2005) - Pathways participating in activation of mouse uterine natural killer cells during pregnancy. **Biol. Reprod.**, v.73(3), p.510-8.

YADI, H.; BURKE, S.; MADEJA, Z.; HEMBERGER, M.; MOFFETT, A.; COLUCCI, F.(2008) - Unique receptor repertoire in mouse uterine NK cells. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v.181(9),p. 6140-7.

YE, W.; YOUNG, J.D.; LIU, C.C. (1996) - Interleukin-15 induces the expression of mRNAs of cytolytic mediators and augments cytotoxic activities in primary murine lymphocytes. **Cellular immunology**, v.174, p.54-62.

YOKOYAMA,W.M.; SEAMAN,W.E. (1993) - The ly49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. **Annu. Rev. Immunol.** v.11, p.613–635

ZAIDI, N.; MAURER, A.; NIEKE, S.; KALBACHER, H. (2008) - Cathepsin D: a cellular roadmap. **Biochem. Biophys Res. Commun**, v. 7;376 (1), p.5–9.

ZHANG J.; DONG H.; WANG B.; ZHU S.; CROY B.A. (2008) - Dynamic changes occur in patterns of endometrial EFNB2/EPHB4 expression during the period of spiral arterial modification in mice. **Biol. Reprod.**, v.79(3), p.450-8.

ZHANG, J .; CHEN, Z .; SMITH, G. N .; CROY, B. A.(2011) - Natural killer cell-triggered vascular transformation : maternal care before birth ? **Molecular Immunology**, v.1-11

ZHANG, J.H.; YAMADA, A.T.; CROY, B.A. (2009) - DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua. **Placenta**, v.30(11), p.968-73.

ZHENG, L.M.; JOAG, S.V.; PARR, M.B.; PARR, E.L.; YOUNG, J.D.(1991) - Perforin-expressing granulated metrial gland cells in murine deciduoma. **J. Exp. Med.**, v.1;174(5), p.1221-6.

9-ANEXO



UNICAMP

Ata da Sessão Pública de Defesa de Tese para obtenção do Título de DOUTOR em BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL, área de concentração em HISTOLOGIA, a que se submeteu a aluna PATRÍCIA DANIELE AZEVEDO DE LIMA, RA 050562, orientada pelo Prof. Dr. ÁUREO TATSUMI YAMADA.

Aos vinte e nove dias do mês de fevereiro de dois mil e doze, às 9:00 horas, na sala de Defesa de Tese da Pós-Graduação do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pela Senhora Diretora do Instituto de Biologia, composta pelos Professores Doutores: ÁUREO TATSUMI YAMADA, Presidente e Orientador, MARIA TEREZINHA SERRÃO PERAÇOLI, Professor Titular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, SP, LUÍS ANTÔNIO VIOLIN DIAS PEREIRA, Professor Associado do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP, PAULO PINTO JOAZEIRO, Professor Doutor do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP, VALDEMAR ANTONIO PAFFARO JUNIOR, Professor Adjunto do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas, MG, BÁRBARA ANNE CROY (CONVIDADA), Professor and Tier 1 Canada Research Chair in Reproduction, Development and Sexual Function, para analisar o trabalho da candidata PATRÍCIA DANIELE AZEVEDO DE LIMA, apresentado sob o título "DUALIDADE FUNCIONAL DAS CÉLULAS uNK DE CAMUNDONGOS DURANTE A GESTAÇÃO". O Presidente declarou abertos os trabalhos, a seguir a candidata dissertou sobre o seu trabalho e foi argüida pela Comissão Julgadora. Terminada a exposição e a argüição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

APROVADO [] APROVADO CONDICIONALMENTE ao atendimento das alterações sugeridas pela Comissão Julgadora especificadas no parecer anexo).

[] REPROVADO (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora).

Para fazer jus ao Título de DOUTOR em BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL, área de concentração em HISTOLOGIA, a versão final da Tese, considerada Aprovada ou Aprovada Condicionalmente devidamente conferida pela CPG da Unidade, deverá ser entregue à CPG dentro do prazo de 60 dias, a partir da data da defesa. De acordo com o previsto na Deliberação CONSU-A8/08, Artigo 35, parágrafo 1º, inciso II e parágrafo 2º, o(a) aluno(a) Aprovado(a) Condicionalmente que não atender a esse prazo será considerado Reprovado(a). Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Comissão Central de Pós-Graduação da UNICAMP, conferindo título de validade nacional aos aprovados.

Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente declara a sessão encerrada, sendo a ata lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pelo Coordenador da Comissão de Pós-graduação, com ciência do(a) aluno(a).

Prof. Dr. ÁUREO TATSUMI YAMADA
Presidente da Comissão Julgadora

Prof. Dra. MARIA TEREZINHA SERRÃO PERAÇOLI

Prof. Dr. LUÍS ANTÔNIO VIOLIN DIAS PEREIRA

Prof. Dr. PAULO PINTO JOAZEIRO

Prof. Dr. VALDEMAR ANTONIO PAFFARO JUNIOR

Prof. Dra. BÁRBARA ANNE CROY (CONVIDADA)

Prof. Dra. MARIA JULIA MARQUES
Coordenadora da CPG

LILIAM ALVES SENNE PANAGIO
Secretária de Pós-Graduação

Ciência da aluna: PATRÍCIA DANIELE AZEVEDO DE LIMA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada: "Dualidade funcional das células uNK de camundongos durante a gestação".

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____.

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 2043-1, Instituição: _____.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



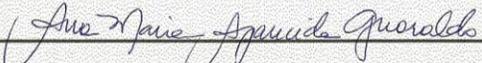
Aluno(a): (Patricia Daniele Azevedo Lima)


Orientador(a): (Adreio Tatsumi Yamada)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura


Prof. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura