

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

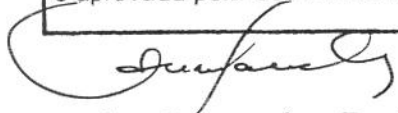


ALINE MACEDO FARIA

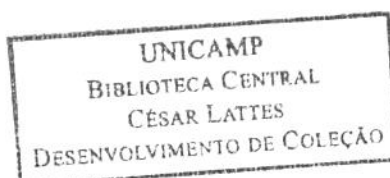
**“ANÁLISES DOS EFEITOS DA MATRIZ EXTRACELULAR,
CITOCINAS E QUIMIOCINAS NA MANUTENÇÃO
IN VITRO DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER*-UTERINAS
ISOLADAS DE CAMUNDONGOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Aline Macedo Faria
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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


Orientador: Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada

Campinas, 2007



UNIDADE BC
Nº CHAMADA: _____
T/UNICAMP F225a
V. _____ EX. _____
TOMBO BCCL 45626
PROC 16.129-02
C _____ D x
PREÇO 11,00
DATA 18-02-02
BIB-ID 423882

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

F225a

Faria, Aline Macedo

Análises dos efeitos da matriz extracelular, citocinas e quimiocinas na manutenção *in vitro* das células natural killer uterinas isoladas de camundongos / Aline Macedo Faria. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Áureo Tatsumi Yamada.

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

1. Células natural killer uterinas. 2. Interação materno-fetal. 3. Células – Cultura e meios de cultura. I. Yamada, Áureo Tatsumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em Inglês: Analysis of the effects from extracellular matrix, cytokines and chemokines in maintenance in vitro of isolated mice uterine natural killer cells.

Palavras-chave em Inglês: Uterine natural killer cells; Maternal-fetal interaction; Cell culture.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Áureo Tatsumi Yamada, Maria Silvia Viccari Gatti, Silvia Daher.

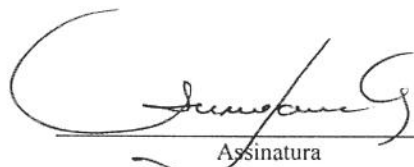
Data da defesa: 13/11/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 13 de novembro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr . Áureo Tatsumi Yamada (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Silvia Daher


Assinatura

Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti


Assinatura

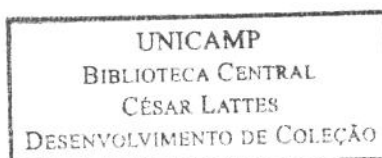
Prof. Dr. Paulo Pinto Jaozeiro

Assinatura

Profa. Dra . Lúcia Elvira Alvares

Assinatura

200802284



O temor do Senhor é o princípio do saber. Provérbios 1:7

A ARTE é o saber ou perícia em fazer algo. Deste modo todos nós somos artistas, afinal todos temos um saber, desde os mais estudados ao menos letrados têm uma capacidade única, uma habilidade própria. Até os ociosos são artistas já que é necessário saber não fazer nada, pois para muitos o não fazer nada seria uma grande tortura. Pensando assim, comecei a refletir sobre a arte de cada pessoa. Se pensarmos na bailarina, ela tem sua arte na dança, a dona de casa no desenvolvimento e administração das atividades domésticas, o engenheiro tem com sua arte a construção, o médico a prevenção e a cura. Mas e os cientistas da área de histologia? Qual a arte destas pessoas que por tanto tempo se dedicam à sua carreira. Depois de muito tempo de arrazoar sobre o assunto conclui que a arte desenvolvida pelos cientistas é a observação. O cientista tem que aprender a ver os pequenos detalhes, a enxergar o que os outros não vêem. Ver modificações tão pequenas e discretas que muitos diriam que ocorrem ao acaso, mas que os histologistas enxergam o seu padrão e que a partir destas pequenas modificações são geradas conseqüências de grandes proporções. Foi em busca do desenvolvimento desta arte que me propus a realizar meu mestrado e espero ao fim desta etapa ter dado um passo em direção à esta conquista.

*Dedico esta tese aos meus
pais Eustáquio e Teresinha, ao
meu namorado Neto, aos meus
irmãos Emerson, Breno, Artur e
Hernando e à minha cunhadinha
Carla que juntamente comigo
formam uma família grande,
barulhenta e muiiiito feliz e que,
apesar dos encontros e
desencontros comuns de famílias,
trazem paz, amor, conforto e
aconchego ao coração...*

AGRADECIMENTOS

Deus por ser este amável Criador por me conduzir sempre pelos melhores caminhos, dar a certeza da vitória quando estou ao Seu lado.

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

À Fundação de Apoio a Pesquisa de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa. À Capes por proporcionar o desenvolvimento e manutenção do laboratório LCI pela concessão de verbas.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, meu orientador, exemplo de competência e amor à ciência. Por ter sido meu guia, proporcionando-me oportunidades para meu crescimento profissional e moral, pelos anos de convivência, pela confiança depositada desde a iniciação científica e pelo imensurável auxílio e estímulo que permitiu a realização deste trabalho.....Muito obrigada!

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

Ao membros da pré-banca, Prof. Dr. Valdemar Paffaro Júnior, Prof^a. Dr^a. Maria Silvia Viccari Gatti e Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, pela leitura preliminar desta tese, pelas contribuições que deram ao meu trabalho e que foram de grande valia, e pela atenção dispensada.

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

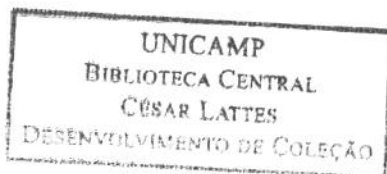
Aos docentes do Departamento de Histologia e Embriologia, IB/UNICAMP, por me auxiliarem no aprimoramento das atividades acadêmicas e científicas.

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

Aos meus pais Eustáquio e Teresinha por terem se dedicado à criação minha e de meus irmãos de modo tão especial. Com constante amor, carinho, compreensão, dando tudo de si e abdicando de muitos desejos para a realização de nossos sonhos.... A vocês devo tudo o que sou!

Ao meu querido Neto....que esteve comigo desde o primeiro momento desta jornada, por me mostrar que Deus nunca nos abandona. Por ser meu companheiro, pelo seu amor. E por deixar meus dias mais ensolarados....como uma bela manhã de domingo.

Ao irmão Breno...por ser uma pessoa de grande espírito, por sua constante dedicação à nossa família, por estar sempre disposto a ajudar, por seu exemplo de retidão moral.



Ao meu irmão Hernando...por me mostrar que sempre devemos pensar mais alto e, se formos dedicados, alcançaremos o que desejamos.

À minha cunhadinha Carla....por sua constante doçura, por seu grande coração e por enxergar sempre o lado cor-de-rosa da vida.

Ao meu irmão Emerson...por ser sempre sincero e otimista, por seu exemplo de pessoa batalhadora e trabalhadora.

Ao meu irmão Artur...pelo carinho, pelas conversas de madrugada, pelas risadas, e por seu exemplo de dedicação em tudo o que faz.

Às minhas tias Leda, Fátima, Maria José, Beatriz; à minha vó Nazita e meu primo José Américo pelo constante carinho e por sempre torcerem por mim.

Ao Edgard de Oliveira Júnior por me acolher com tanto carinho como um membro de sua família e por suas maravilhosas histórias da África que tanto me encantam.

À Família Oliveira pela constante amabilidade, por me mostrar que a fé move montanhas e pelas maravilhosas reuniões de sexta-feira que são um refrigério para minha alma.

Às minhas grandes amigas Eliane Martins que mesmo tão longe sempre esteve presente em minha vida; Kássia por seu carinho e amizade e preocupação neste tantos anos de convívio e à Thalita pelo carinho, acolhimento e incentivo.

Aos grandes amigos da ex-casa de madeira Wilton, Júnia, Pati, Fabio, Vanessa, Hiale, Kinha, João, Ferfer, Welton e Giovanninha pelos ótimos momentos que passamos juntos e que estão gravados em minha mente e meu coração.

Aos amigos do laboratório.... Eliana pela amizade, companheirismo e apoio que me deu durante o mestrado; Patrícia, por ter este jeitinho meigo e amável que a todos conquista; Claudia, que em pouco tempo se tornou uma grande amiga; Júlio, pelo grande auxílio durante o término desta tese e por sempre me fazer rir com seus "causos"; Renata, por ser uma pessoa centrada e sempre dar bons conselhos; Juarez, por ser prestativo, sempre disposto a ajudar; Petra, por carinhosamente me chamar de *caperucita roja*; Maria Amália, pela afeição e por me dar uma música tão bonitinha; Karina, pela grande ajuda em biologia molecular; Patrick, pelo carinho e atenção; Marlúcia, pelo afeto e convívio; Márcia, por me ensinar a dar os primeiros passos no laboratório; Juvani, por sua constante dedicação ao laboratório. A todos vocês agradeço pela amizade, convivência, apoio, risadas e ajuda dispensadasvocês são realmente pessoas muito especiais!!!

A Bolinha e ao Bazu que me trouxeram imensa alegria e foram minhas companhias durante madrugadas adentro.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram a alcançar meu objetivo.

RESUMO

O sucesso da implantação e desenvolvimento embrionário em animais de placentação do tipo hemocorial requer além da presença física do embrião/feto, uma dinâmica de alterações sequenciais na interface materno-fetal do útero gestante. Tais alterações são mediadas e controladas pelas ações sincronizadas de uma série de fatores de efeito endócrino, parácrino e autócrino, com o comprometimento de diversas células presentes nesta interface. Dentre as peculiaridades do útero gestante, o recrutamento e o acúmulo de células uNK têm sido apontado como de fundamental importância na modulação da homeostase da interface materno-fetal para o desenvolvimento normal da gestação. Por outro lado, a complexidade das múltiplas interações célula-célula e citocinas-células que modulam a interação materno-fetal, dificulta a compreensão plena dos mecanismos envolvendo a participação das células uNK na imunomodulação do útero gestante. Portanto, procuram-se por procedimentos que permitam as análises do comportamento das células uNK em condições experimentais controladas, assim como, elucidar tanto as vias da ativação, quanto da inibição das atividades moduladoras destas células na gestação. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um modelo experimental de cultivo de células uNK avaliando desde a viabilidade das células isoladas do útero de camundongos gestantes e, testando diversas condições para manipulação e manutenção *in vitro* destas células. Foram aprimorados os procedimentos de isolamento positivo e purificação das células uNK de camundongos pelo método da esfera magnética revestida com lectina DBA. Foram conduzidos testes quanto aos efeitos dos componentes da matriz extracelular - fibronectina, laminina e colágeno I na sobrevivência destas células e, quanto aos efeitos isolados e combinados das interleucinas IL-2, IL-15 e GM-CSF e, das quimiocinas MIP-1 β e CXCL10. Para otimização dos procedimentos destes ensaios, foi desenvolvido um protocolo de cultivo em *micro-spots*, visando manipular células em escala mínima (5×10^3 células) com reprodutibilidade e sensibilidade que permitisse a padronização dos ensaios *in vitro*. Dentre os componentes da matriz extracelular testados, a fibronectina proporcionou a manutenção de maior número de células viáveis pelo período de até sete dias de cultivo, enquanto a citocina IL-15 promoveu a diferenciação das células uNK notadamente pelo aumento de grânulos citoplasmáticos. A quimiocina MIP-1 β induziu a migração de células *in vitro*, enquanto a CXCL10 teve um efeito inibidor desta ação do MIP-1 β . Por outro lado, as análises quantitativas mostraram que a combinação da CXCL10 e IL-15 manteve o maior

número de células uNK aderidas ao substrato de fibronectina em períodos prolongados de cultura, além de promover a diferenciação destas células. A integridade e viabilidade das células uNK pode ser comprovada pela amplificação de transcriptomas isoladas de 5×10^3 células através do RT-PCR. Porém, as reações imunocitoquímicas com anti-PCNA não demonstraram qualquer atividade proliferativa nas células uNK mantidas nestas condições de cultivo. Estes resultados demonstram a adequação deste protocolo de cultivo em *micro-spot* para diversos ensaios *in vitro* com as células uNK isoladas de camundongos mesmo em pequenas quantidades e, um protocolo inovador para estudos da fisiologia destas células em situações experimentais controladas.

ABSTRACT

The success of embryo implantation and development in the animals of hemochorial type placentation requires beside the presence of the embryo/fetus properly, a dynamic sequential changes at the maternal-fetal interface in the pregnant uterus. These changes are mediated and controlled by synchronized actions of many endocrine, paracrine and autocrine factors with commitment of several cells present at this interface. Among the peculiar features of normal pregnant uterus, the uNK cells recruitment and accumulation has been hallmarked as essential to modulate the maternal-fetal interface homeostasis. Otherwise, the complexity of multiple cell-cell and cytokine-cells interactions involved at the maternal-fetal interaction of pregnant uterus, make difficult the fully understanding of mechanisms related to the participation of uNK cells in the immunomodulation of pregnant uterus. Therefore, it is widely expected to establish and experimental procedures that benefit the analysis of uNK cells behavior under controlled condition and those allowing elucidation of both activation and inhibition of modulator activities of these cells. The present work aimed to establish an experimental model of uNK cells culture evaluating since the viability of isolated from pregnant mouse uterus and testing several conditions for *in vitro* manipulation and maintenance of these cells. There were improved the procedures of positive isolation and purification of mouse uNK cells by DBA lectin coated magnetic-bead method. Tests regarding the effects of extracellular matrix components – fibronectin, lamminin and collagen I on surviving of these cells and effects of interleukin IL-2, IL-15 and GM-CSF and, chemokines MIP-1 β and CXCL10 alone or in combination were perfomerd. To optimize the procedures of these *in vitro* assays, it was set up a protocol of micro-spot culture for manipulation of minimal scale ($5 \cdot 10^3$ cells) of cells with reproducibility and sensibility. Among the extracellular matrix components, the fibronectin promoted the maintenance of highest proportion of viable cells during seven days culture, while the cytokine IL15 induced the uNK cell differentiation noticeable by increasing of cytoplasmatic granules. The chemokine MIP-1 β induced the cell migration *in vitro*, while CXCL-10 inhibited the effect on MIP-1 β . On the other hand, the quantitative analysis showed the combination of CXCL-10 and IL-15 maintained the largest number of uNK cells for longest time adhered on fibronectin-coated cultures, as so as, the differentiation of these cells. However, the PCNA immunocytochemistry did not show any

proliferation activity of uNK cells in culture. The integrity and viability of uNK cells in culture was confirmed by RT-PCR of transcriptomes obtained from $5 \cdot 10^3$ cells. These results confirm the adequacy of micro-spot culture as new insight using small number of uNK cells for in vitro assays and the establishment of required conditions to maintain these cells in primary culture to study their physiology under controlled experimental conditions.

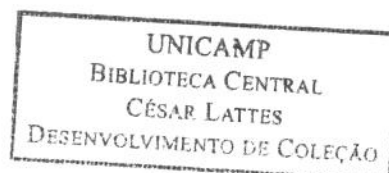
LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
Asialo-GM1	Asialo-gangliosideo gangliotetraosil-ceramida
BSA	Albumina sérica bovina
CCL14/HCC-1	<i>Haemofiltrate CC chemokines-1</i>
CCL16/HCC-4	<i>Haemofiltrate CC chemokines-4</i>
CCL19/MIP-3 β	Proteína inflamatória de macrófago-3 β (<i>macrophage inflammatory protein-3β</i>)
CCL22/MDC	Quimiocina derivada de macrófago (<i>macrophage-derived chemokine</i>)
CCL-3/MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófago-1 α (<i>macrophage inflammatory protein-1α</i>)
CCL-4/MIP-1 β	Proteína inflamatória de macrófago-1 β (<i>macrophage inflammatory protein-3β</i>)
CCL5/RANTES	<i>Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted</i>
CCR	Receptor para quimiocinas CC
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
cNK	<i>Natural killer</i> circulantes
Células GMG	Células granulosas da glândula metrial
CSF-1	Fator estimulador de colônia-1 (<i>colony stimulating factor-1</i>)
CX ₃ CL1/FKN	Fractalcina
CX ₃ CR1	Receptor de fractalcina
CXCL10/IP-10	<i>Interferon (IFN)-inducible protein 10</i>
CXCL11/I-TAC	<i>IFN-inducible T cell α chemoattractant</i>
CXCL12/SDF-1	Fator derivado de células estromais - 1 (<i>stromal-cell-derived factor -1</i>)
CXCL9/MIG	monocina induzida por interferon (<i>monokine induced by interferon</i>)
CXCR	receptor para quimiocina CXC
DBA	<i>Dolichus biflorus agglutinin</i>
DEPC	Dietil Pirocarbonato (<i>Diethylene Pyrocarbonate</i>)
dg	dia de gestação
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine Tetraacetic acid</i>)
ELR	glutamina-leucina-arginina
ER β	Receptores para estrógeno - β
ER α	Receptores para estrógeno - α
EtBr	Brometo de etídio

FcR	Receptor Fc de imunoglobulinas
G-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócito (<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>)
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito-monócito (<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HLA	Antígeno leucocitário humano (<i>human leukocyte antigen</i>)
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular – 1 (<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>)
IFN-γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
IL-15R	Receptor de IL-15
IL-2R	Receptor de IL-2
ITAM	<i>Immune receptor tyrosine-based activated motif</i>
ITIM	<i>Immune receptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
KIR	<i>Inhibitory killer Ig-like receptor</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LGL	Grandes linfócitos granulados (<i>large granulated lymphocytes</i>)
LIF	Fator inibidor da leucemia (<i>Leukemia inhibitory factor</i>)
MEC	Matriz extracelular (<i>extracellular matrix</i>)
MLAp	Agregado linfóide mesometrial da gravidez (<i>mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy</i>)
MMP	Metaloproteinase de matriz (<i>matrix metalloproteinase</i>)
MOPs	Ácido (N-morfolinico)propanosulfônico [(<i>N-morpholino</i>)propanesulfonic acid]
MPC	Magneto concentrador de partículas
NK	<i>Natural killer</i>
PBS	Tampão fosfato salina (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular (<i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral – α (<i>tumor necrosis factor-alpha</i>)
uNK	<i>Natural killer uterina</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

ÍNDICE

1	Introdução.....	1
1.1	Histórico e características das células <i>natural killer</i> uterinas (uNK).....	2
1.2	Funções das células uNK.....	4
1.3	Fatores que atuam na diferenciação e proliferação das células uNK.....	6
1.4	Recrutamento das células uNK.....	8
1.5	Componentes da matriz extracelular do útero.....	13
1.6	Isolamento e manipulação <i>in vitro</i> de células uNK.....	16
2	Objetivos.....	18
3	Material e Métodos.....	20
3.1	Animais.....	21
3.2	Isolamento das células uNK.....	21
3.2.1	Obtenção de esferas magnéticas conjugadas com lectina DBA.....	23
3.3	Manipulação das células uNK em cultivo.....	24
3.3.1	Avaliação da aderência das células uNK em substratos da matriz extracelular.....	25
3.3.2	Cultivo de células uNK em <i>micro-spots</i>	25
3.3.3	Avaliação da viabilidade e quantificação celular.....	27
3.3.4	Reatividade das células uNK à lectina DBA.....	27
3.3.5	Imunocitoquímica para PCNA.....	28
3.3.6	Mobilidade das células uNK sob ação das quimiocinas de MIP-1 β e CXCL10.....	28
3.3.7	Extração de RNA total de células uNK em cultivo de <i>micro-spots</i> e avaliação da sua integridade pelo RT-PCR.....	29
4.	Resultados.....	32
4.1	Isolamento das células uNK e cultivo primário.....	33
4.2	Manipulação das células uNK em cultivo primário.....	33
4.2.1	Efeito dos substratos de matriz extracelular.....	33
4.2.2	Efeitos das ações das citocinas IL-2, IL-15 e GM-CSF.....	35
4.2.3	Efeitos das ações de MIP-1 β , CXCL10 e IL-15.....	36
4.2.4	Avaliação da viabilidade celular.....	37
4.2.5	Avaliação da motilidade das cuNK sob ação das quimiocinas MIP-1 β e CXCL10.....	39
4.2.6	RT-PCR.....	39
5.	Discussão.....	41
6.	Conclusões.....	52
7.	Ilustrações.....	54
8.	Referências Bibliográficas.....	69
Anexo.....		84



1.INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e características das células *natural killer* uterinas (uNK)

Em 1977, STEWART & PEEL descreveram uma região presente no útero de camundongos apenas durante a gestação, que denominaram de glândula metrial. Esta região, localizada na base do endométrio mesometrial de cada sítio de desenvolvimento embrionário, é limitada externamente pelo miométrio. Posteriormente, STEWART & PEEL, (1980) e PEEL (1989), confirmaram a glândula metrial como uma estrutura transitória, formada somente a partir da implantação do embrião no útero.

Estes estudos pioneiros denominaram as principais células presentes na glândula metrial como células granulosas da glândula metrial (células GMG) por apresentarem grande quantidade de grânulos citoplasmáticos, PAS (ácido periódico-Schiff) positivos, com suposta função glandular (STEWART & PEEL, 1980).

A identificação de enzimas proteolíticas lisossômicas (PARR *et al.*, 1990) e de proteínas líticas como a perforina (ZHENG *et al.*, 1991), moléculas associadas com a atividade lítica das células *natural killer* (NK) e T citotóxicas. A partir desta constatação as células foram denominadas de grandes linfócitos granulosos (LGL) (PARR *et al.*, 1990). A comprovação de que estas células da glândula metrial do útero gestante constituíam populações de linfócitos NK foi elucidada pelo grupo canadense liderado por B.A. CROY, utilizando uma série de camundongos *knockout* e mutantes imunodeficientes (CROY *et al.*, 1991, GUIMOND *et al.*, 1997, GUIMOND *et al.*, 1998). A partir destas comprovações, CROY (1999) sugeriu a denominação de agregado linfóide mesometrial da gravidez (MLAp) à região onde ocorria o acúmulo destas células NK, em substituição ao termo glândula metrial do útero gestante de camundongos. Paralelamente, diversos relatos consolidavam as semelhanças entre as células *natural killer* circulantes (cNK) e *natural killer* uterinas (uNK) pela expressão comum de receptores como asialo-GM1, Ly49G, NK1.1, FcR e CD45 (MUKHTAR *et al.*, 1989; LINNEMEYER & HAMILTON, 1990) e por apresentarem grânulos que contêm perforina e granzimas característicos de células NK (ZHENG *et al.*, 1991, COPI, 2006). Estas constatações asseguraram que as células GMG realmente pertenciam à linhagem linfocitária NK.

As células uNK estão presentes no útero de várias espécies de mamíferos. Em humanos são encontradas a partir do final da fase proliferativa, com maior quantidade na

fase secretora do ciclo menstrual (KOOPMAN *et al.*, 2003, VAN DER MEER *et al.*, 2004). Em camundongos, as células uNK aparecem por volta do 5º dia de gestação (dg) coincidindo com o período de implantação do blastocisto e decidualização do endométrio. Sua incidência aumenta gradualmente até atingir o pico por volta do 12ºdg na decídua basal (STEWART & PEEL, 1980; PAFFARO JR, *et al.*, 2003, WU, *et al.*, 2006).

Segundo PAFFARO JR e colaboradores (2003), quatro subtipos morfológicos de células NK, que correspondem aos estágios de maturação desta população celular podem ser identificados no ambiente uterino de camundongos. No subtipo 1, as células apresentam-se menores com diâmetro em torno de 9µm e não contêm grânulos. No subtipo 2, as células têm, em média, 13µm de diâmetro, com presença de poucos grânulos em seu citoplasma. O subtipo 3, apresenta a forma madura das células uNK com diâmetro em torno de 26µm, com grande quantidade de grânulos. Já no subtipo 4, as células têm diâmetro em torno de 30µm, apresentam condensação irregular da cromatina, vacúolos citoplasmáticos e grânulos pequenos, tipicamente de células em processo de apoptose. A incidência dos subtipos menos diferenciados (1 e 2) é maior no início da gestação em camundongo(6-9ºdg), enquanto após o 13ºdg, há um predomínio marcante do subtipo 3 e no final da gestação, do subtipo 4.

Apesar das células uNK pertencerem à linhagem de linfócitos NK elas diferem em alguns aspectos das células cNK. Em humanos, as células uNK são CD56^{bright} CD16^{dim}, diferenciando-se das células cNK que são, predominantemente, CD56^{dim} CD16^{bright} (COOPER *et al.*, 2001). Em camundongos, não se conhecem os homólogos destes receptores, mas as células uNK apresentam afinidade pela lectina *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA), o que não pode ser observado nas cNK (PAFFARO JR *et al.*, 2003). Outro aspecto que distingue células uNK das cNK é a expressão de receptores de hormônios. Enquanto as células uNK expressam os receptores para estrógeno ERβ e para prolactina as células cNK expressam também, o receptor de estrógeno ERα (DOSIOU & GIUDICE, 2005). As células NK CD56^{dim} são aparentemente mais citotóxicas, com maior quantidade de grânulos citolíticos, enquanto as células NK CD56^{bright} mostram baixa atividade citotóxica e atuam na produção de citocinas (COOPER *et al.*, 2001, JACOBS *et al.*, 2001). Portanto, apesar das semelhanças entre as células uNK e cNK, provavelmente elas pertençam a subpopulações diferentes, sendo as células uNK uma subpopulação única no ambiente uterino gravídico (CROY & KISO, 1993, HEAD, 1996).

1.2. Funções das células uNK

Considerando a composição dos grânulos encontrados nas células uNK foi sugerido a elas, inicialmente, a função citolítica de células tumorais e de combate a microrganismos, similar ao papel desempenhado pelas células cNK (ZHENG *et al.*, 1991; COOPER *et al.*, 2001). No entanto, nos estudos *in vitro*, com o intuito de avaliar a citotoxicidade de células uNK utilizando Yac-1 como células alvo, não foi constatada atividade citolítica significativa destas células, quando comparadas com as respostas das células cNK (CROY *et al.*, 1991). De modo semelhante, a função de conter a invasão das células trofoblásticas não foi comprovada para as células uNK em ensaios *in vitro* (KAGI *et al.*, 1994). Estes resultados foram considerados intrigantes, uma vez que as células uNK expressam, assim como, as células cNK, receptores de membrana com capacidade de interagir com as células trofoblásticas (MOFFETT-KING, 2002, CROY *et al.*, 2003a). Porém, a presença de receptores KIR (*Inhibitory killer Ig-like receptor*) nas células uNK, que têm como ligante os isotipos G e E das moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA) expressas predominantemente pelas células trofoblásticas das colunas de vilosidades coriônicas da placenta humana (LONG *et al.*, 1997), destituíram o paradigma do envolvimento da resposta imune inata mediada pelas células uNK sobre o trofoblasto. De fato, as células uNK em humanos ou roedores não desencadeiam respostas imune do tipo inata com atividade citotóxica no ambiente uterino na gestação normal (KING, 2000, CROY *et al.*, 2003b).

Em camundongos, os receptores da família Ly49, em sua maioria, têm função similar aos receptores KIR em humanos, estando envolvidos com o reconhecimento das células trofoblásticas e inibição da atividade citotóxica das células uNK. Apesar da expressão de receptores de ativação Ly49D e Ly49H, que sinalizando por meio do receptor ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) podem levar à promoção de uma ação citolítica, as células uNK têm uma expressão balanceada de receptores de ativação e inibição e apresentam uma dominância de sinais inibitórios (CROY *et al.*, 2003b).

Estudos experimentais mais recentes demonstram a capacidade inequívoca de produção de citocinas e fatores de crescimento que contribuem para a homeostase do ambiente uterino pelas células uNK. Dentre as citocinas produzidas pelas células uNK estão a interleucina-1 (IL-1), o fator inibidor da leucemia (LIF), fator estimulador de colônia-1 (CSF-1) (CROY *et al.*, 1991), Fator de necrose tumoral- α (TNF α) (PARR *et al.*, 1995), interferon- γ (IFN- γ) (CROY & KISO, 1993, PLATT & HUNT, 1997, PLATT & HUNT, 1998; ASHKAR &

CROY, 1999), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) (WANG *et al.*, 2003) e óxido nítrico (NO) (TRANGUCH *et al.*, 2003).

A presença de IFN- γ no útero tem sido muito estudada, sendo seu receptor expresso nas células decíduais, células endoteliais e células musculares lisas, presentes nos vasos sanguíneos do útero e, também, em células trofoblásticas (CHEN *et al.*, 1996). ASHKAR e colaboradores (2000) realizaram experimentos utilizando camundongos *knockout* para IFN- γ , que apresentaram uma MLAp hipertrófica e hiperplasia de células uNK com poucos grânulos e com baixa taxa de morte celular. Outro fenômeno observado nestes animais foi que a decídua se apresentava necrótica a partir da metade da gestação e a maioria das artérias não eram remodeladas, comprovando a importância do IFN- γ para manutenção da decídua, modificação das artérias uterinas, bem como para maturação das células uNK.

ASHKAR & CROY (1999) também utilizaram em seus experimentos camundongos fêmeas *tg ϵ 26*, que não possuem células NK, e comprovaram que ocorria uma significativa queda na produção de IFN- γ durante a gestação, afetando o ambiente uterino à semelhança do que era observado em animais *knockout* para IFN- γ (ASHKAR, *et al.*, 2000) sendo, portanto, as uNK as principais produtoras desta citocina no útero gestante.

A LIF, citocina que tem entre suas fontes produtoras as células uNK, tem papel fundamental na gestação tendo sido constatado que em animais *knockout* para LIF existe o desenvolvimento do embrião até a fase de blastocisto, mas este não consegue se implantar na parede uterina (KIMBER, 2005). Esta citocina também está envolvida na reação decidual (STEWART, 1994) e no estímulo da produção de gonadotrofina coriônica pelo trofoblasto (SAWAI *et al.*, 1995). SHARKEY e colaboradores (1999) sugeriram que a LIF tenha um papel fundamental na mediação de interações entre a decídua materna e o trofoblasto, além de estar envolvida no controle da angiogenese em humanos.

O fator de crescimento VEGF também é expresso pelas células uNK. Este fator está diretamente envolvido na angiogênese e hiperpermeabilidade vascular, participando na remodelação vascular que ocorre no útero gravídico (WANG *et al.*, 2003).

Outra citocina produzida pelas células uNK é a IL-1 que parece induzir a produção de metaloproteinase-3 da matriz (MMP-3) que por sua vez é de grande importância na remodelação da matriz extracelular (MEC) durante a gestação (FAZLEABAS *et al.*, 2004)

Estes relatos atestam de forma irrefutável a participação e importância das células uNK durante a gestação como células imunomodulatórias. Porém, a possível ação citotóxica desta população celular no ambiente uterino gestante permanece ainda por ser comprovada.

1.3. Fatores que atuam na diferenciação e proliferação das células uNK

Citocinas são peptídeos ou glicoproteínas que podem ser produzidas por qualquer tipo celular e têm efeitos regulatórios em células hematopoiéticas, endócrinas, neurais, do sistema imune e muitos outros tipos celulares. Diferentemente dos hormônios, as citocinas geralmente agem como sinais parácrinos e/ou autócrinos no tecido e somente ocasionalmente vão para a circulação agindo como mediadores endócrinos (MIYAJIMA *et al.*, 1992, KISHIMOTO *et al.*, 1994).

Citocinas são moléculas imprescindíveis na reprodução estando envolvidas em várias etapas deste processo tais como, no desenvolvimento folicular, na implantação do embrião e no crescimento e diferenciação do endométrio (HUNT & ROBY, 1994, SAVINO & DARDENNE, 1995, SIMON *et al.*, 1995, PETRAGLIA *et al.*, 1996). De acordo com SAITO (2000), há uma predominância de citocinas produzidas por células Th2 do que aquelas produzidas por células Th1 no ambiente uterino gestante normal. Porém, o equilíbrio entre estas duas categorias de citocinas assegura o pleno desenvolvimento da gestação. Dentre as citocinas produzidas tem-se IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, fator estimulador de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF), fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF), LIF, TNF α entre outras, que parecem ser cruciais para a homeostasia da interface materno-fetal durante a gestação (DIMITRIADIS *et al.*, 2005, CASTRO-RENDON *et al.*, 2006). Tais citocinas formam uma complexa rede de sinalização que contribui para a manutenção da gravidez pela modulação dos sistemas imune e endócrino (SAITO, 2000, CASTRO-RENDON *et al.*, 2006).

O acúmulo das células uNK em grande proporção no ambiente uterino durante a gestação sugere que além da migração temporal durante a gestação estas células possam proliferar e diferenciar no útero gestante, moduladas por fatores locais. De acordo com PAFFARO JR. e colaboradores (2003), as células uNK do subtipo um e dois são antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) positivas no útero de camundongos prenhes. Estes estudos sugerem que boa parte das células uNK presentes no útero de camundongos tenha sido originada da proliferação e diferenciação local de células uNK imaturas que migraram para este local.

A IL-2 é uma citocina de 15,5KDa, que pertence à família que inclui IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Sua ação é mediada pelo complexo receptor de IL-2, presente na superfície celular que consiste em três subunidades, IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) e gama (γ c). Esta

última é compartilhada por todos os membros desta família de citocinas (WALDMANN, 2006). As células NK quando induzidas por IL-2 sofrem proliferação e diferenciação (WALDMANN, 2006) e, as células uNK expressam receptores de IL-2 (CROY *et al.*, 1997), o que é um fato intrigante pois esta molécula não é encontrada em altos níveis na interface materno-fetal (JOKHI *et al.*, 1994, KITAYA *et al.*, 2000).

O fator GM-CSF na gestação é conhecido por promover o desenvolvimento do blastocisto *in vitro* de embriões de bovinos (DE MORAES & HANSEN, 1997), assim como promover o desenvolvimento de zigotos de camundongos a blastocisto (ROBERTSON *et al.*, 2001), o recrutamento e ativação de populações leucocitárias (WOOD *et al.*, 1992) e a formação e manutenção da placenta (GARCIA-LLORET *et al.*, 1994).

O GM-CSF é secretado pelas células da linhagem epitelial do trato reprodutivo de camundongos (ROBERTSON *et al.*, 2001) e também por células uNK (COOPER *et al.*, 2001). Em experimentos *in vitro* foi observada a produção constitutiva de GM-CSF durante o ciclo estral, tanto no início da gravidez quanto na metade da gestação de camundongos (ROBERTSON *et al.*, 1992). ROBERTSON e colaboradores (1996) demonstraram, em seus experimentos utilizando células epiteliais uterinas, que a produção de GM-CSF por estas células é regulada por estrógeno, mas não por progesterona.

A interleucina-15 (IL-15) é uma molécula de 14-15kDa e um membro da família 4 α -hélice que inclui a IL-2. A ação desta citocina ocorre via complexo receptor IL-15R (SCHLUNS *et al.*, 2005). Este receptor apresenta uma subunidade IL-15-R α , IL-2R β e a subunidade gama (γ). A subunidade γ também é utilizada pelas IL-4, IL-7 e IL-9, enquanto IL-2R β somente é utilizada para sinalização de IL-2 e IL-15 (CARSON *et al.*, 1994). Em experimentos utilizando linhagem de células transfectadas com IL2R β e γ foi demonstrado que ambas as subunidades são necessárias para a ligação do IL-15 e transdução do sinal (CARSON *et al.*, 1994). Apesar das similaridades entre IL-15 e IL-2 a distribuição de mRNA de IL-15 e IL-15-R α sugere que IL-15 apresenta funções distintas de IL-2 (WALDMANN, 2006).

IL-15 é produzida por uma grande variedade de tipos celulares como monócitos (NIEDBALA *et al.*, 2002), células dendríticas e macrófagos (STEVCEVA *et al.*, 2006), células epiteliais (REGAMEY *et al.*, 2007). IL-15R α está presente em uma grande variedade de células como linfócitos T (HUANG *et al.*, 2007, SATO *et al.*, 2007), linfócitos B, neutrófilos (PELLETIER & GIRARD, 2005) e células do pulmão e fígado (GIRI *et al.*, 1994). A vasta distribuição de IL-15R sugere que IL-15 medeia efeitos pleiotrópicos em múltiplos tipos celulares, incluindo células que não têm origem linfóide (STEVCEVA *et al.*, 2006). CARSON

e colaboradores (1994) observaram que células NK expressam constitutivamente, receptores de IL-15 e que a estimulação por IL-15 de células NK circulantes de humanos, leva à produção de citocinas, assim como ocorre quando há adição de IL-2.

A expressão de IL-15R também foi identificada em células uNK (VERMA *et al.*, 2000). Assim como seu receptor, a molécula de IL-15 é encontrada tanto no endométrio de humanos (KING, 2000), como no de camundongos (YE *et al.*, 1996), tendo como produtoras células do estroma uterino e macrófagos em humanos (CARSON *et al.*, 1994; KELLY *et al.*, 2001) e camundongos (KENNEDY *et al.*, 2000). Estudos *in vitro* foram realizados utilizando células do estroma endometrial, sob condicionamento do meio de cultura com progesterona e/ou estrógeno. Foi constatado que a progesterona é um potente indutor da expressão do mRNA de IL-15 por estas células, enquanto o estrógeno não levava ao aumento dessa expressão. Com estes resultados pode-se constatar que a expressão de IL-15 no útero é regida por controle hormonal (OKADA *et al.*, 2000).

GUIMOND e colaboradores (1998) e CROY e colaboradores (2003a) em experimentos utilizando camundongos que não apresentavam o receptor de IL-15, comprovaram a participação desta molécula na regulação da diferenciação de uNK durante a gravidez, pela constatação da não diferenciação. OKADA e colaboradores (2000) verificaram o aumento no nível de mRNA de IL-15 na fase secretora do útero de humanos, o que coincide com o pico de células CD56^{bright} e CD16^{dim}, mostrando o envolvimento desta molécula com as células uNK em humanos.

1.4. Recrutamento das células uNK

O recrutamento de células linfocitárias, particularmente das células T e B, é bem estabelecido sendo um processo em cascata de quatro eventos que ocorrem em vênulas pós-capilares de órgãos imunes secundários ou locais de inflamação (BUTCHER & PICKER, 1996; VON ADRIAN & MEMPEL, 2003). Inicialmente, ocorre uma seqüência de interações transitórias entre moléculas de adesão expressas nos linfócitos circulantes (L-selectina e/ ou integrina $\alpha_4\beta_7$) e seus respectivos ligantes em vênulas endoteliais especializadas. Esta interação leva os linfócitos a rolarem vagarosamente sobre o endotélio e pararem. Segue-se uma rápida ativação por quimiocinas (CCL19, CCL21 e CXCL12) que induzem uma mobilidade lateral e, temporariamente, aumentam a afinidade de LFA-1 por seu ligante, ICAM-1. Como resultado ocorre uma firme ligação e a migração transendotelial em direção à maior concentração de quimiocina no tecido (WARNOCK *et al.*, 2000; CONSTATIN *et al.*,

2000). Entre as células migratórias estão incluídos linfócitos de memória, células dendríticas e neutrófilos (PICKER & BUTCHER, 1992).

Uma evidência da migração das células NK CD56^{bright} é a expressão em sua superfície de L-selectina e integrinas α_4 e β_1 (FREY *et al.*, 1998). Com o objetivo de avaliar o recrutamento de células NK para o útero foram utilizados anticorpos bloqueadores de L-selectina ou integrina α_4 . Estes anticorpos reduziram significativamente a adesão e eliminaram o aumento das células uNK no período pré-ovulatório em humanos. Estes ensaios sugerem que o recrutamento é dependente do processo clássico de recrutamento celular utilizado em processos inflamatórios (VAN DEN HEUVEL *et al.*, 2005).

Em camundongos foi observado que estas células linfocitárias migram para o endométrio uterino concomitante ao processo de decidualização (STEWART & PEEL, 1977). A migração desta população celular em camundongos tem início no 5ºdg, aparentemente em sua forma imatura, apresentando-se como pequenos linfócitos agranulares. Após chegarem ao útero atingem sua maturação e o número máximo de células uNK presentes no útero ocorre entre o 9ºdg e 13ºdg (PAFFARO JR *et al.*, 2003). Em humanos, este pico ocorre entre 6-12 semanas de gestação (KING, 2000). Este fato demonstra que o útero não tem capacidade de renovar as células uNK presentes no ambiente uterino durante o período gestacional em camundongos e humanos. A migração de células uNK não é regida, ao menos exclusivamente, por sinais provindos do feto, já que células uNK estão presentes em úteros de camundongos pseudogestante (BIANCO, 2006). A presença de precursores das uNK em órgãos linfóides primários ou secundários, que possam migrar para o útero, tem sido sugerido por CHANTAKRU e colaboradores (2002), porém esta premissa é ainda controversa.

As razões que levam ao acúmulo de células NK no ambiente uterino durante a gestação permanecem em grande parte especulativas. Atualmente, já se sabe da influência de hormônios esteróides como progesterona e estrógeno, no recrutamento das células NK (DOSIOU & GIUDICE, 2005). A progesterona age estimulando a produção de MIP-1 β , que por sua vez influencia a migração das células NK para o útero (KITAYA *et al.*, 2003). A progesterona também tem influência na produção de VEGF (POPOVICI *et al.*, 2000; ACELIN *et al.*, 2002) e na expressão de moléculas de adesão como a L-selectina e integrina α_4 (CHANTAKRU *et al.*, 2003).

A migração dos linfócitos de órgãos linfóides para a circulação seguindo para os tecidos é orquestrada por uma série de interações entre o tecido específico que secreta quimiocina e seus receptores expressos por subtipos de linfócitos (CAMPBELL & BUTCHER,

2000). Quimiocinas são moléculas funcionais imprescindíveis na regulação do recrutamento de linfócitos. Estas moléculas são peptídeos de baixo peso molecular e são assim chamadas por serem citocinas com função quimiotática (ZLOTNIK & YOSHIE, 2000). As quimiocinas se ligam a receptores que são proteínas G transmembranas (MACKAY, 2001). As quimiocinas agem em subpopulações de leucócitos aumentando sua adesão ao endotélio pelo aumento da expressão de moléculas de adesão na membrana das células leucocitárias (MACKAY, 2001). Provavelmente, para o recrutamento e ativação dos leucócitos é necessária a ação seqüencial ou combinada de múltiplas quimiocinas (VANDAY *et al.*, 2001).

Atualmente, já são conhecidas mais de 50 quimiocinas em humanos que são classificadas de acordo com a configuração dos resíduos de cisteínas na porção N-terminal. De acordo com esta classificação as quimiocinas são divididas em quatro subfamílias: CC, CXC, C e CX3C (ROSSI & ZLOTNIK, 2000).

No útero de humanos, várias quimiocinas são produzidas principalmente pelas células decidualizadas e dos vasos sangüíneos do estroma, leucócitos deciduais e citotrofoblasto (RED-HORSE *et al.*, 2004). JONES e colaboradores (2004) identificaram em seus experimentos a expressão de 21 quimiocinas no endométrio de humanos em diferentes fases do ciclo menstrual. Dentre as quimiocinas encontradas foram destacadas nove que apresentavam uma expressão mais significativa, ou seja: FKN, MIP-1 β , 6CKine, HCC-1, HCC-4, IL-8, MDC, eotaxina e MCP-3.

A quimiocina MIP-1 β (proteína inflamatória de macrófago-1 β) pertence à família CC e também é denominada CCL4 (MAURER & VON STEBUT, 2004). A MIP-1 β é uma pequena proteína de 8kDa e, em camundongos e humanos a MIP-1 β é codificada por genes contendo três exons e dois introns localizados nos cromossomos 11 e 17, respectivamente (MAURER & VON STEBUT, 2004). As moléculas MIP-1 β são sintetizadas como precursores contendo 92 aminoácidos (aa) e a forma secretada (69-70 aa) é gerada por ação de peptidases que clivam peptídeos sinais hidrofóbicos (MENTEN *et al.*, 2002).

O efeito biológico da MIP-1 β ocorre pela ligação específica ao receptor CCR5 presente na superfície celular, que pertence à superfamília de proteínas G. A ligação ao receptor envolve interações de alta afinidade que desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares, levando à ativação da célula alvo (PROUDFOOT *et al.*, 2003). Em concentrações fisiológicas (≤ 100 ng/mL) MIP-1 β é encontrada somente na forma monomérica. Entretanto, em altas concentrações ocorre uma agregação dinâmica e reversível, mas que não afeta a bioatividade da molécula. Já a agregação de moléculas de MIP-1 β com proteoglicanos parece aumentar sua atividade (MENTEN *et al.*, 2002). A

atividade de MIP-1 β é limitada pela ação de proteases, como catepsina D, que clivam estas moléculas (WOLF *et al.*, 2003).

MIP-1 β desempenha importante função na regulação da migração de células Th1 de memória (GAFA *et al.*, 2007), células dendríticas (DRAKES *et al.*, 2000) e células NK (MAGHAZACHI *et al.*, 1994). Recentes estudos têm demonstrado que MIP-1 β é um efector de quimiotaxia em células NK periféricas, especificamente células NK CD56^{bright} CD16^{dim} (CAMPBELL *et al.*, 2001).

Membros da família MIP-1 orquestram respostas agudas e crônicas em locais de injúria ou infecção pelo recrutamento de células pró-inflamatórias (MAURER & VON STEBUT, 2004). Estas moléculas são de grande importância nas condições inflamatórias de muitas doenças incluindo asma, formação de granuloma, artrite, esclerose múltipla, pneumonia e psoríase (MURDOCH & FINN, 2000). Da mesma forma, MIP-1 β é crucial para a quimiotaxia de células T da circulação para tecidos com presença de inflamação e infecções bacterianas por *Pseudomonas aeruginosa* na córnea (HAZLETT, 2007), influenzavírus (SLADKOVA & KOSTOLANSKY, 2006) e vírus da imunodeficiência humana-1 (DEVICO & GALLO, 2004).

No útero, a MIP-1 β tem como fonte as células do estroma e sua produção estimulada pela progesterona. Este mesmo efeito não é observado quando as células são estimuladas por 17 β -estradiol (KITAYA *et al.*, 2003), demonstrando que a expressão de MIP-1 β sofre influências hormonais durante o ciclo menstrual. MIP-1 β foi identificada no útero de humanos durante a fase proliferativa e secretora, tendo seu pico de produção na metade da fase secretora (JONES *et al.*, 2004). Sua produção coincide com o pico de migração das células uNK que, assim como macrófagos, neutrófilos e células T apresentam uma grande quantidade de receptores CCR5 que se ligam a MIP-1 β (RED-HORSE *et al.*, 2004). Além disso, esta quimiocina é encontrada no endométrio ao redor dos vasos sanguíneos e glândulas (KITAYA *et al.*, 2003) o que coincide com a localização das células NK residentes no útero (KING, 2000). Estas observações sugerem uma ação desta quimiocina sob as células uNK.

A quimiocina da subfamília CXC também é descrita como componente fundamental de quimiotaxia de células leucocitárias. Este grupo é subdividido em duas classes, dependendo da presença do motivo glutamina-leucina-arginina (ELR), precedendo as duas primeiras cisteínas (BAGGIOLINI, 1998). CXCL10 é uma proteína de 77aa pertencente à família de quimiocinas CXC não ERL (SARRIS *et al.*, 1993). Em humanos, o gene de

CXCL10 está localizado no cromossomo quatro, juntamente com outras citocinas da família CXC (ZLOTNIK & YOSHIE, 2000).

As quimiocinas CXCL10, CXCL-9 e CXCL11 são estruturalmente e funcionalmente semelhantes, são induzidas por IFN- γ e agem pela interação com o receptor de quimiocina CXCR3 presente na superfície de células T (PANZER *et al.*, 2007), B (HENNEKEN *et al.*, 2005), eosinófilos (KATOH *et al.*, 2005), células dendríticas plasmocitóides e mielóides (YONEYAMA *et al.*, 2004), NK (WALD *et al.*, 2006), dentre outros tipos celulares.

CXCL10 é expressa constitutivamente em baixos níveis no estroma do timo, baço e linfonodos (GATTASS *et al.*, 1994). Entretanto, sua expressão pode ser induzida por uma variedade de células, incluindo células endoteliais (MURDOCH *et al.*, 2002), astrócitos (RIVIECCIO *et al.*, 2005), queratinócitos (WENZEL *et al.*, 2005), células mesangiais (DUQUE *et al.*, 1997), monócitos (PADOVAN *et al.*, 2002) e neutrófilos (LUSTER & RAVETH, 1987).

O envolvimento da quimiocina CXCL10 em reações inflamatórias como na esclerose múltipla (SZCZUCINSKI & LOSY, 2007), arteriosclerose (HELLER *et al.*, 2006) e rejeição a transplantes (LAZZERI *et al.*, 2005). Nestas doenças, os níveis de CXCL10 estão relacionados com a infiltração de linfócitos no tecido comprometido, dentre as quais as células NK. De acordo com OTTAVIANI e colaboradores (2006), no caso da psoríase, os queratinócitos produzem CXCL10 que induz a migração de células NK para o local, sendo que 80% das células NK recrutadas são CD56^{brigh} CD16^{dim} e têm a função de amplificação do processo inflamatório pela liberação de altos níveis de IFN- γ . O acúmulo de células NK CD56^{brigh} CD16^{dim} também pode ser observado no líquido sinovial de pacientes com artrite inflamatória, no líquido peritoneal de pacientes com pulmonite aguda e doenças infecciosas pulmonares (DALBETH & CALLAN, 2002; DALBETH *et al.*, 2004).

A CXCL10 está presente no ambiente uterino de humanos tendo como fonte produtora as células decidualizadas do estroma uterino que são induzidas por estradiol e progesterona (SENTMAN *et al.*, 2004). É interessante atentar ao fato que a produção de CXCL10 coincide com o pico de migração das células uNK, as quais expressam o receptor CXCR3 (MACKAY, 2001; SENTMAN *et al.*, 2004, RED-HORSE *et al.*, 2004).

Análises realizadas por XIE e colaboradores (2005), utilizando animais CXCR3^{-/-}, mostraram que mesmo sem a indução da quimiocina CXCL10, as células uNK estavam presentes no útero, não sendo portanto esta quimiocina imprescindível no recrutamento das células NK para o ambiente uterino. Contudo, a importância desta quimiocina no ambiente uterino gestante deve ser investigada.

A FKN (fractalcina) ou CX₃CL1 é o único membro da subfamília CX₃C (BAZAN *et al.*, 1997) presente no ambiente uterino sendo expressa em grande quantidade na decídua e vilosidades corionicas (RED-HORSE *et al.*, 2004). Estudos feitos com NK circulantes mostraram que estas células apresentam o receptor CX₃CR1 e são recrutadas para tecidos tumorais pela ação da FKN (LAVERGNE *et al.*, 2003). No útero, os neutrófilos e macrófagos sofrem a influência desta molécula, porém, as células uNK não apresentam o receptor CX₃CR1 que se liga a FKN (HANNAN *et al.*, 2004).

O fato das células uNK expressarem um repertório de receptores de quimiocinas como CCR5 que se liga a MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES; CCR7 que se liga a MIP-3 β e 6Ckine (CAMPBELL *et al.*, 2001); CXCR3 que se liga a CXCL9, CXCL10 e CXCL11 e CXCR4 que tem afinidade por CXCL12 (RED-HORSE *et al.*, 2004), configura a importância das quimiocinas no recrutamento das células uNK para o ambiente uterino.

Cumprе salientar que as quimiocinas têm também ação comprovada em outras funções além do recrutamento de células, como proliferação e diferenciação, além da ativação da migração de populações celulares não hematopoiéticas (SCHALL & BACON, 1994, ZLOTNIK *et al.*, 1999, LUTHER & CYSTER, 2001). Considerando que as células uNK são recrutadas em sua forma imatura para o útero, é plausível supor que a ação das quimiocinas juntamente com outras citocinas do ambiente uterino gestante sejam determinantes não apenas para a migração, mas também no processo de proliferação e diferenciação destas células na interface materno-fetal durante a gestação.

1.5. Componentes da matriz extracelular do útero

A decidualização do estroma endometrial durante a gestação compreende uma profunda remodelação não apenas das células, mas também dos componentes da matriz extracelular (MEC) presentes no endométrio (ABRAHAMSOHN & ZORN, 1993). Estudos morfológicos e imunohistoquímicos têm demonstrado uma reorganização da estrutura da matriz extracelular no endométrio de ratos, camundongos e humanos (APLIN, 1997). Dentre as mudanças ocorridas tem-se: redução da densidade das fibrilas de colágeno intersticial (PARR *et al.*, 1986), aumento de deposição de componentes da membrana basal (WEWER *et al.*, 1986) e desaparecimento do colágeno tipo VI (MULHOLLAND *et al.*, 1992). Estas modificações levam à formação de uma matriz menos compacta com fibrilas menos espessas permitindo, assim, a penetração de células no local, tanto de origem fetal

(trofoblasto) (STAUN-RAM & SHALEV, 2005), como células do sistema imune de origem materna (SHIMIZU *et al.*, 1990).

No caso de roedores, a decidualização das regiões antimesometrial e mesometrial ocorre em velocidades e em espaço temporal distintos. As células uNK estão presentes em grande quantidade exclusivamente na região do MLAp (CROY, 1999). As razões que mantêm estas células estritamente nesta área ainda são pouco conhecidas. Supõe-se que os componentes da matriz extracelular estejam envolvidos na migração de linfócitos periféricos para os tecidos (SHIMIZU *et al.*, 1990) e sua subsequente localização *in vivo*. Durante as fases iniciais da gestação, as proteínas de matriz laminina, colágeno tipo IV e fibronectina são particularmente abundantes e apresentam uma distribuição peculiar (APLIN, 1997).

A laminina é um dos principais constituintes glicoproteicos da membrana basal em tecidos adultos e de embrião (TIMPL & DZIADEK, 1986), tendo como característica estrutural três subunidades formando uma molécula heterodimérica. Estas três subunidades são distintas geneticamente e são denominadas de subunidades A, B1 e B2 (TIMPL *et al.*, 1979, ENGEL *et al.*, 1981). São conhecidos atualmente 12 tipos de heterodímeros de laminina, que estão presentes em praticamente todos os mamíferos (COLOGNATO & YURCHENCO, 2000). Lamininas formam redes independentes e também podem estar associadas com colágeno tipo IV formando redes que se ligam à entactina e perlecan. Elas também se ligam a integrina e outros receptores presentes na membrana plasmática, como o complexo glicoproteico distroglican (COLOGNATO & YURCHENCO, 2000). Com estas interações, a laminina contribui na adesão celular e diferenciação, para o formato das células e seu movimento, além de contribuírem na sobrevivência tecidual (TUNGAL *et al.*, 2000).

No útero a laminina está presente em toda a decídua basal de camundongos no 8ºdg, sendo a expressão gênica da laminina B2 a mais abundante (THOMAS & DZIADEK, 1993). Em ratos no 8ºdg a laminina está presente junto às zonas de decidualização primária e secundária (KORGUN *et al.*, 2007).

Colágeno é a principal glicoproteína do tecido conjuntivo e a mais abundante proteína dos mamíferos, correspondendo a cerca de 25% da massa protéica total destes animais. O colágeno na MEC forma o arcabouço da maioria dos tecidos. A principal característica de uma molécula de colágeno típica é a estrutura longa e rígida da sua tripla fita helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno, denominadas cadeia α são enroladas umas as outras, formando um *coiled coil*. Atualmente são conhecidos cerca de 20 tipos de colágeno que são subdivididos em formadores de fibrilas (I,II, III,V), associados a fibrilas (IX e XII),



formadores de redes (IV e VII) e transmembranas (XVII) (PROCKOP & KIVIRIKKO, 1995). As propriedades fisiológicas e bioquímicas das diferentes matrizes são dependentes da deposição tecido-específica dos diferentes tipos de colágeno (CHANUT-DELALANDE *et al.*, 2001).

Durante o período de implantação do embrião, em camundongos, têm sido demonstradas grandes alterações na composição e distribuição de colágeno (CARBONE *et al.*, 2006), sendo o mesmo encontrado principalmente na forma de finas fibrilas no ambiente uterino (SPIESS *et al.*, 2007).

A fibronectina é um dímero, onde suas subunidades estão ligadas por pontes dissulfetos em uma extremidade. Esta glicoproteína de alto peso molecular contém em sua estrutura cerca de 5% de carboidratos, que se ligam a proteínas receptoras chamadas integrinas (LYON *et al.*, 2000). Todas as formas de fibronectina são codificadas por somente um gene, que contém cerca de 50 exons. Este gene transcreve um único RNA que pode ser processado de forma alternativa, para produzir as diferentes isoformas da fibronectina (SCHWARZBAUER & SECHLER, 1999).

A principal classe de receptores que tem função de mediar adesão à MEC é a família das integrinas (SHEPPARD, 2000). As integrinas são moléculas heterodiméricas, compostas por subunidades α e β que são glicoproteínas transmembrana. Cada heterodímero tem um ligante distinto específico que é determinado por uma combinação específica de várias subunidades α e β (SHEPPARD, 2000). Os ligantes de integrinas presentes na MEC são promíscuos, podendo um ligante reconhecer mais de uma integrina. Muitas integrinas que se ligam à matriz reconhecem a sequência de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), presente em várias proteínas de matriz como a fibronectina, colágeno tipo I e vitronectina (RUOSLAHTI & PIERSCHBACHER, 1987).

A fibronectina é amplamente distribuída no estroma endometrial e está presente ao longo da gestação (BARBIAZ *et al.*, 1996) sugerindo seu importante papel na gestação, já as integrinas tem importante papel na adesão, difusão e migração das células NK do sangue periférico em MEC *in vitro*. Células uNK expressam três receptores de fibronectina, as integrinas $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$ (BURROWS *et al.*, 1993), assim como o receptor de laminina $\alpha_1\beta_1$, mas não os outros receptores como $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ (BURROWS *et al.*, 1995).

Estes dados sugerem a ligação das células uNK a componentes específicos da matriz extracelular, o que pode ser determinante tanto para o recrutamento e localização peculiar das células uNK no ambiente uterino, mas também influenciar as atividades funcionais destas células na gestação.

1.6. Isolamento e manipulação *in vitro* de células uNK

As considerações relatadas nos itens anteriores demonstram o estado da arte dos conhecimentos disponíveis acerca do micro ambiente uterino envolvendo interações entre as diversas células e fatores atuantes na interface materno-fetal do útero gestante. Sem dúvida, compreender os mecanismos que regulam o recrutamento e o estabelecimento das células uNK no ambiente uterino, assim como, a sua participação como célula moduladora da gestação normal ou anormal constituem um dos grandes desafios da imunologia da reprodução. Contudo, a complexidade e o dinamismo da interface materno-fetal no útero gestante, onde coexiste o embrião alogeneico em íntima associação com o organismo materno, dificulta a interpretação e a definição das ações e efeitos isolados e interativos dos diferentes mediadores ali presentes.

Certamente, ensaios com células uNK isoladas *in vitro*, poderiam elucidar vários destes mecanismos e os desafios de se estabelecer estas condições para a obtenção e manutenção de células uNK isoladas em cultivo, se justificam plenamente.

CROY e colaboradores (1997), baseando-se no modelo de explante de tecido uterino de camundongos prenhes idealizado por MUKHTAR & STEWART (1988), realizaram análises sobre o comportamento das células uNK cultivadas sobre substratos de matriz extracelular, associado à ação das citocinas LIF, IL-2, IL-3 e GM-CSF. Apesar do explante total do tecido uterino permitir observar células uNK em cultivo, a influencia não controlada dos fatores oriundos das demais células presentes no próprio explante, tais como as células do estroma decidualizado e não decidualizado do endométrio, células endoteliais e outros leucócitos presentes neste fragmento do órgão, não permitiram elucidar quaisquer dos mecanismos de ação ou da relação causa e efeito envolvendo as células uNK. Saliente-se ainda que de acordo com estes autores, o DNA isolado das células uNK obtidas do sobrenadante do cultivo do explante uterino estavam degradados (CROY *et al*, 1997).

Fonseca (2000), utilizou o mesmo procedimento de explante com fragmentos do MLAp do útero gestante de camundongos e relatou que as células uNK permanecem no cultivo primário, como células aderidas e não em suspensão no sobrenadante. Esta constatação chama a atenção quanto à peculiaridade do comportamento das células uNK em cultivo, considerando que as células linfocitárias são mantidas em suspensão quando em cultivo.

Desde então, não existem outros relatos sobre ensaios utilizando células uNK em cultivo. Este fato deve estar diretamente relacionado com a dificuldade de se isolar as células uNK e, em parte, pela ausência de marcadores específicos para esta população celular que permitam separar estas células das demais populações linfocitárias, particularmente das células cNK.

Em estudos anteriores deste laboratório, demonstrou-se que a lectina DBA tem alta afinidade para as células uNK de camundongos (PAFFARO JR *et al.*, 2003), reagindo com glicoconjugados de superfície destas células. Paralelamente, baseando-se nesta afinidade da lectina DBA com glicoconjugados de superfície das células uNK, LIMA (2002), desenvolveu um procedimento bem sucedido de isolamento de células uNK de camundongos com esferas magnéticas revestidas com a lectina DBA.

Embora Lima (2002) não tenha realizado estudos quanto à viabilidade destas células em cultivo, a partir da demonstração de que as células uNK de camundongos podem ser isolados e purificados de sítios de desenvolvimento embrionário, vislumbra-se o potencial deste procedimento para o cultivo primário destas células em ensaios *in vitro*.

Considerando que participação das células uNK na gestação inicia-se com o seu recrutamento para o ambiente uterino, onde o estroma endometrial da região do MLAp é o local onde se verifica o seu acúmulo, notadamente com proliferação e diferenciação ao longo da gestação, presume-se que este microambiente constitui uma combinação de fatores que o torna um local de características únicas. Dentre os fatores envolvidos, os componentes da matriz extracelular do estroma endometrial desta região, assim como, as combinações seqüências de citocinas e quimiocinas liberadas nesta interface materno-fetal devem ser determinantes desde o recrutamento das células uNK no início da gestação e a sua subsequente proliferação e diferenciação neste local.

Por conseguinte, a manutenção das células uNK em cultivo, deve exigir a combinação precisa destes componentes e, elucidar quais são aqueles essenciais para simular as condições *in vivo* torna-se primordial para posteriormente viabilizar os manuseios destas células para a compreensão da participação destas células na modulação da interface materno-fetal do útero gestante.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver as condições de cultivo primário destas células para ensaios *in vitro*.

Objetivos Específicos:

- 1 – Aprimorar os procedimentos de isolamento de células uNK do útero de camundongos gestantes.
- 2 - Estabelecer as condições de cultivo para as células uNK isoladas de camundongos, visando a realização de ensaios múltiplos.
- 3- Avaliar o efeito de componentes da matriz extracelular (fibronectina, laminina e colágeno I) na melhoria da viabilidade das células uNK em cultivo primário.
- 4 – Avaliar o benefício das citocinas IL-15, IL-2 e GM-CSF como potencial indutor da proliferação e diferenciação de células uNK em cultivo.
- 5 – Avaliar o efeito das quimiocinas CXCL10 e MIP-1 β na manutenção das células uNK em cultivo.
- 6 - Avaliar o efeito das ações simultâneas dos componentes da matriz, citocinas e quimiocinas e comprovar a viabilidade das células uNK mantidas *in vitro*.
- 7 – Avaliar a expressão gênica das células uNK pelo RT-PCR como estratégia para análise funcional das células uNK mantidas em cultivo de *micro-spot*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 40 camundongos fêmeas virgens *Mus musculus* da linhagem Swiss, com idade aproximada de 08-10 semanas, provenientes do Centro Multidisciplinar para investigação Biológica (CEMIB).

Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia – IB/UNICAMP, expostos à luz por um período de 12 horas diariamente, com acesso à água e ração comercial *ad libitum*. Fêmeas Swiss foram colocadas para acasalar com machos da mesma linhagem, sendo a constatação da cópula feita através do tampão vaginal, o qual foi considerado o 1ºdg.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEa) do Instituto de Biologia, UNICAMP (Proc. N°1145-1) (Anexo 1)

Os procedimentos subseqüentes para isolamento e otimização dos procedimentos de cultivo das células uNK estão representados no organograma da Figura 1.

3.2. Isolamento das células uNK

Os animais no 8ºdg foram sacrificados por deslocamento cervical, laparotomizados e os cornos uterinos removidos, imersos em meio Hank's (Sigma Co, St Louis/USA) e dissecados em condições assépticas no interior de fluxo laminar para remoção da região do agregado linfóide do mesométrio associado à gravidez (MLAp).

Os MLAp foram recortados e dissociados em 1mL de DNase (500UN/mL) (Roche, Alemanha), por meio de repetidas aspirações com micropipeta acoplada a ponteira previamente heparinizada. Esta suspensão celular foi filtrada em telas de nylon com malhas de 80µm e acrescida de 2,5mL de água destilada durante 20 segundos para a lise das hemácias. O equilíbrio osmótico foi restabelecido acrescentando 1,25mL de NaCl 3,5%. Seguiu-se a centrifugação da suspensão em 213g, por 10min, a 4°C e o sedimento celular foi lavado por de mais duas centrifugações.

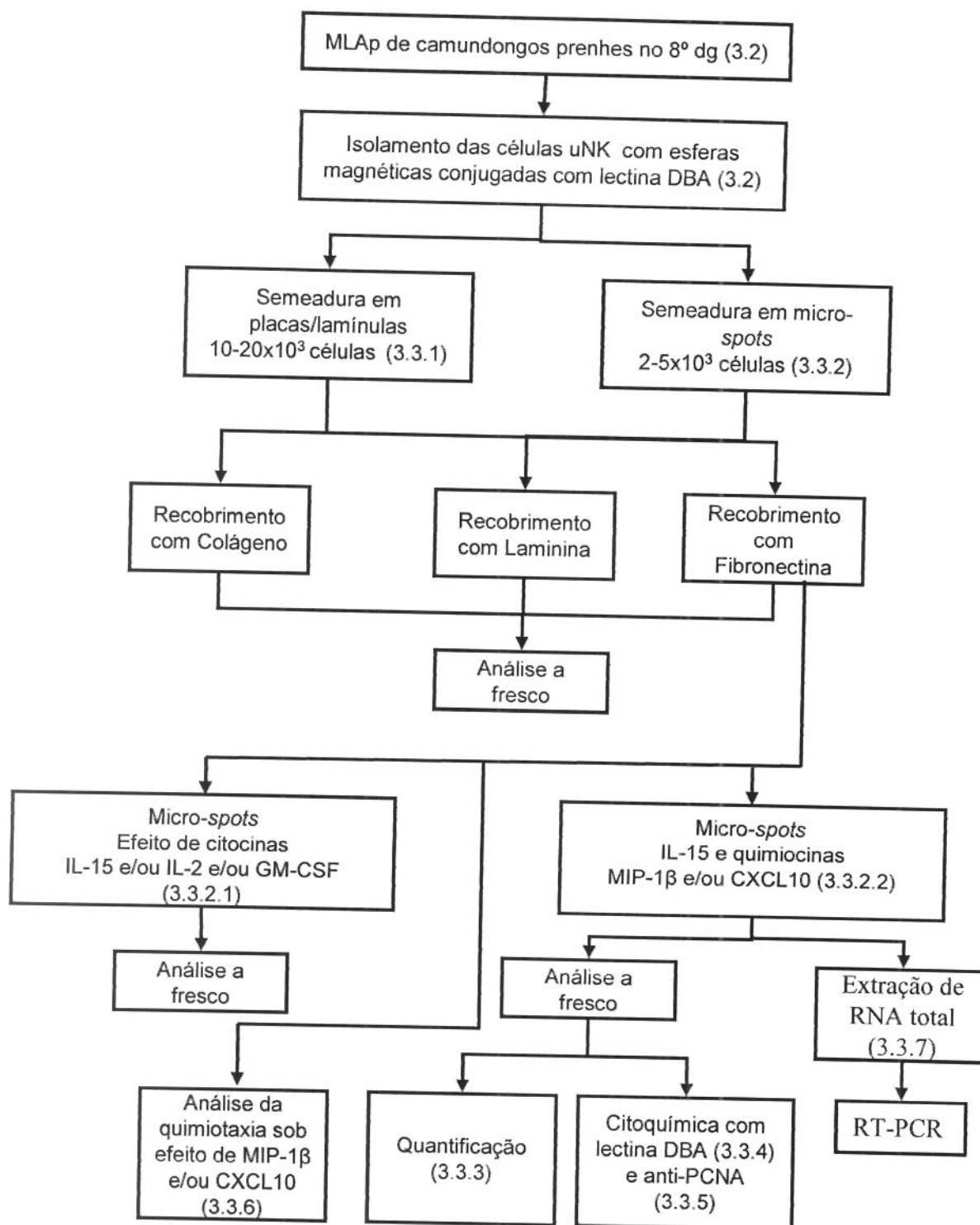


Figura 1. Fluxograma dos procedimentos experimentais do isolamento e cultivo de células uNK

O sedimento celular foi recuperado em 1mL de meio Hanks adicionado de 1% de albumina sérica bovina (BSA type V, Sigma St Louis,USA) e quantificado em câmara de Neubauer com a adição da solução de azul de trypan 0,4% (Sigma Co, St Louis/USA). Para estimar o número provável de uNK em suspensão celular do MLAp, adotou-se a proporção de três células uNK para cada 100 células encontradas de acordo com estudos prévios de Lima (2002)

Foram adicionadas cinco esferas magnéticas revestidas com lectina DBA por célula uNK, de acordo com o protocolo descrito no item 3.2.1. Após adição das esferas magnéticas na suspensão celular esta foi mantida em agitação constante em rotor orbital (DynaL Co,Oslo) por 15 minutos a 4°C em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Em seguida, o tubo de micro-centrífuga foi acoplado no concentrador de partículas magnéticas (MPC, Dynal Co, Oslo) para imobilização das esferas no campo magnético e remoção das células livres. A suspensão de células livres não associadas às esferas foi coletada e submetida a uma segunda associação com esferas revestidas com lectina DBA, em iguais condições.

O conjunto de células, da primeira e da segunda associação, foi ressuspensão em solução de N-acetil galactosamina (Sigma Co, St Louis/USA), na concentração de 0,1M e homogeneizada suavemente por 15 minutos a 4°C. O recipiente foi então colocado no MPC, onde as esferas magnéticas destacadas das células foram imobilizadas e as células livres removidas da solução. As células desassociadas foram submetidas a duas lavagens em meio RPMI 1640 por centrifugação em 213g, por 10min a 4°C.

As células isoladas e purificadas foram contadas em câmara de Neubauer e mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Co, St Louis/USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), de glutamina a 0,02M (Sigma Co, St Louis/USA) e gentamicina (Sigma Co, St Louis/USA) na proporção 1:1000. Com este procedimento pode-se obter de 5 a 7×10^3 células/sítio de implantação embrionária, totalizando, em média 5×10^4 células/animal.

3.2.1 - Obtenção de esferas magnéticas conjugadas com lectina DBA

Foram testadas as esferas magnéticas *CELLection M450 Biotin Binder* (DynaL Co, Oslo) de 4,5µm de diâmetro e *Streptavidin Beads* (Bioestapor, Merck Chimie S.A.S, France) de 2,37µm de diâmetro.

3.2.1.1 - Esferas CELLection M450 Biotin Binder

As esferas foram revestidas com a lectina DBA biotinada (Sigma Co, St Louis/USA), conforme protocolo estabelecido por LIMA (2002). Em resumo, uma alíquota de 25µL de suspensão de esferas contendo 4×10^8 esferas/mL foi transferida para um tubo de microcentrífuga estéril e imobilizadas no MPC para serem lavadas em PBS 0,05M pH 7,4 com 0,1% de BSA por três vezes. Após as lavagens as esferas foram ressuspensas em 50µL de PBS/BSA 0,1% e conjugadas por trinta minutos à temperatura ambiente, em agitação, com a lectina DBA biotinada, na proporção de 10^7 esferas para cada 1µg de lectina DBA biotinada. Em seguida, as esferas foram lavadas três vezes em PBS/BSA 0,1% e ressuspensas no volume de 25µL, com PBS/BSA 0,1%.

3.2.1.2 - Streptavidin Beads da BioEstapor

Foram realizados testes de associação com as esferas *Streptoavidin-Beads* (BioEstapor, Merck, France) de 2,37µm de diâmetro, conjugadas com a lectina DBA de acordo com as recomendações do fabricante. Uma alíquota de 25µL de suspensão de esferas contendo $10,95 \times 10^8$ esferas/mL foram conjugadas, em agitação, com a lectina DBA biotinada, na quantidade de 2, 5, 10 e 15µg, por 30 minutos à temperatura ambiente. As esferas magnéticas conjugadas com a lectina DBA, nas concentrações acima, foram utilizadas em ensaios para associação com células uNK na proporção de cinco a oito esferas por célula, de acordo com o protocolo original adotado para as esferas *CELLection*, assim como, para a remoção da esfera com a N-acetil-D-galactosamina. Durante estas etapas foram retiradas alíquotas da amostra para observação ao microscópio de luz (Eclipse E800) para análise qualitativa das células.

3.3. Manipulação das células uNK em cultivo

Foram realizados procedimentos experimentais de cultivo visando avaliar as melhores condições para manutenção do maior número de células viáveis, pelo maior tempo de sobrevivência das células uNK isoladas, sob o efeito de componentes da matriz extracelular e combinações com citocinas e quimiocinas.

3.3.1 - Avaliação da aderência das células uNK em substratos da matriz extracelular

Para verificação da aderência celular foram utilizados laminina (Sigma Co, St Louis/USA), na concentração de 20µg/mL, fibronectina (Sigma Co, St Louis/USA), na concentração de 2µg/mL e colágeno I purificado da cauda de rato de acordo com (ANDERSON & JACKSON, 1972), na concentração de 20µg/mL. Estes componentes da matriz extracelular foram utilizados na concentração indicada pelo fabricante, esterilizados por filtração em membrana (Millipore de 0,25µm) e, adicionados nas superfícies das placas de quatro e 24 câmaras de 13 mm de diâmetro (NUNC Inc, USA), ou, lâminas de vidro pré-montadas com quatro ou oito câmaras (NUNC Inc, USA), em volume suficiente para cobrir a superfície. As placas e lâminas foram e mantidas a 4°C por 12 horas e, após este tempo o excesso foi delicadamente removido e os recipientes de cultura mantidos a 4°C até completa desidratação da superfície.

Nos recipientes de cultivo recobertos com laminina, fibronectina ou colágeno I, foram semeadas 10 a 20 x 10³ células uNK isoladas em meio RPMI 1640 (suplementado com descrito no item 3.2), que foram incubados a 37°C com 5% de tensão de CO₂, em atmosfera úmida. Estes cultivos foram monitorados diariamente ao microscópio de contraste de fase e o meio substituído a cada 48 horas pelo período de até sete dias.

Como controle foram utilizadas placas ou lâminas estéreis sem quaisquer revestimento com componentes da matriz extra-celular. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.2 - Cultivo de células uNK em *micro-spots*

Células uNK isoladas suspensas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado conforme descrito no item 3.2, foram semeadas no volume de 50µL na concentração de 1x10⁵ células/mL, sobre lâminas de quatro câmaras de cultivo, previamente revestidas com laminina, fibronectina ou colágeno, conforme descrito no item 3.3.1. Os recipientes de cultivo foram, em seguida, preenchidos com óleo de parafina (Sigma, St Louis, USA) cobrindo inteiramente as gotas, isolando-as completamente do contato com o ar, conforme esquema ilustrativo da Figura 2. As culturas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C em atmosfera úmida pelo período inicial de seis horas.

As manipulações das células em cultivos no *micro-spots* foram realizadas com capilares de vidro, de diâmetro interno de um milímetro, acoplados a cânulas de silicone esterilizadas e estas adaptados à microseringa (Narishigue, Japan) calibrada que permite a aferição do volume do líquido removido ou introduzido na cultura.

3.3.2.1 - Ensaios com citocinas IL-2, IL-15 e GM-CSF

Após seis horas de cultivo das uNK *micro-spot*, o meio de cultura foi cuidadosamente removido por aspiração com capilares de vidro estéreis e em seguida substituídos com igual volume do meio de cultivo contendo IL-2 (PeproTech EC Ltd) na concentração de 0,2µg/mL, IL-15 (PeproTech EC Ltd) na concentração de 150ng/mL e GM-CSF (PeproTech EC Ltd) na concentração 0,2µg/mL. As citocinas foram preparadas, diluídas e esterilizadas conforme recomendado pelos fabricantes e adicionadas ao meio de cultivo RPMI 1640 (suplementado conforme item 3.3.1). Foram ainda realizados ensaios com as combinações IL-2 + IL-15, IL-2 + GM-CSF, IL-15 + GM-CSF ou IL-2 + IL-15 + GM-CSF nas mesmas concentrações adotadas para os ensaios com as citocinas isoladas. Como controle foi adotado o cultivo de células sobre substrato de fibronectina sem adição de citocinas.

Estes meios foram substituídos após 48h e o desenvolvimento das culturas foi acompanhado e fotodocumentado diariamente durante sete dias em microscópio invertido com contraste de fase (NikonTMS, USA). Todas as análises foram realizadas em triplicada.

3.3.2.2 - Ensaios com CXCL10 e MIP-1 β e IL-15

Foram utilizadas as quimiocinas MIP-1 β (PeproTech EC Ltd) na concentração de 100ng/mL, CXCL10 (PeproTech EC Ltd) na concentração 100ng/mL e IL-15 (PeproTech EC Ltd) na concentração de 150ng/mL, diluídos em meio de cultivo RPMI 1640 suplementado como descrito anteriormente .

Após seis horas de cultivo das uNK em *micro-spot*, o meio de cultura foi cuidadosamente removido por aspiração com capilares de vidro estéreis e, em seguida, substituídos com o meio de cultivo contendo as citocinas MIP-1 β , CXCL10 isoladas e em combinações de IL-15 + MIP-1 β , IL-15 + CXCL10, MIP-1 β + CXCL10 ou IL-15 + MIP-1 β + CXCL10. As células mantidas nestas condições foram acompanhadas pelo período de 24 horas e destinadas às avaliações de viabilidade celular, quantificação e proliferação celular.

Todos os procedimentos foram realizadas em triplicatas e, como controle foi adotado células cultivadas sobre substrato de fibronectina, em meio de cultivo sem suplementação com citocinas ou quimiocinas.

3.3.3 - Avaliação da viabilidade e quantificação celular

As células uNK mantidas em cultivo primário nas condições descritas em 3.2 e mantidas segundo descrito no item 3.3.2.2 foram lavadas em PBS 0,05M pH7,4 para retirada completa do meio de cultivo nos intervalos de 1, 12 e 24 horas. Após a lavagem foi acrescentada a solução de tripsina/EDTA (Cultilab) a temperatura ambiente tempo suficiente para liberação das células, sendo imediatamente neutralizada com meio RPMI 1640 (suplementado como descrito no item 3.2). A viabilidade celular foi verificada com a adição da solução de azul de trypan 0,4% (Sigma Co, St Louis/USA) na proporção de 1:1 e as células foram contadas em câmara de Neubauer.

As quantificações foram realizadas em triplicatas de procedimentos, com as células obtidas de três animais diferentes, e as médias submetidas à análise estatística ANOVA.

3.3.4 - Reatividade das células uNK à lectina DBA

As células uNK obtidas nas condições descritas em 3.2 e mantidas nas condições descritas em 3.3.2.2 tiveram o meio de cultivo aspirado com capilar de vidro nos períodos de 1, 12 e 24 horas, as células aderidas à superfície foram lavadas com PBS 0,05M pH7,4, e em seguida, fixadas por 45 minutos com solução de paraformaldeído (Sigma Co, St Louis/USA) a 4% em PBS 0,1M pH 7,4. Seguiu-se a lavagem com tampão fosfato-salina (PBS) 0,05M, pH7,4 e bloqueio com albumina sérica bovina 1% (BSA type V, Sigma Co, St. Louis/USA) por 30 minutos em temperatura ambiente. O material foi submetido à reação citoquímica com a lectina DBA biotinilada de acordo com o protocolo estabelecido por PAFFARO JR e colaboradores (2003). Em seguida as células foram incubadas com estreptoavidina-FITC (Vector Laboratories, Inc, CA/USA) por 30 minutos à temperatura ambiente.

As reações foram sempre acompanhadas do controle negativo onde era omitida a incubação com lectina DBA. As análises foram feitas em microscópio Nikon Eclipse E800 e documentadas em imagem digital com o software ImagePro-Plus (Media Cybernetics, USA).

3.3.5 - Imunocitoquímica para PCNA

As células uNK obtidas nas condições descritas em 3.2 e mantidas nas condições descritas em 3.3.2.2 foram avaliadas por imunocitoquímica usando anticorpos anti-PCNA nos períodos de 1, 12 e 24 horas após a adição das citocinas.

O meio de cultivo da gota foi cuidadosamente aspirado com capilar de vidro e as células aderidas à superfície foram lavadas com PBS 0,1M pH 7,4 e em seguida fixadas por 45 minutos com solução de paraformaldeído (Sigma Co, St Louis/USA) a 4% em PBS 0,1M pH 7,4. Seguiu-se a lavagem com PBS 0,05M pH 7,4 e bloqueio com albumina sérica bovina 1% (BSA *type V*, Sigma Co, St. Louis/USA) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram submetidas à reação imunocitoquímica com anticorpo anti-PCNA (Bethyl Laboratories, Inc) por duas horas em temperatura ambiente. Após foi realizada a incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho obtido em cabra, conjugado com Cy3 (Chemicon Laboratories, CA/USA), durante 30 minutos à temperatura ambiente.

As reações foram sempre acompanhadas do controle negativo onde era omitida a incubação com o anticorpo primário. As análises foram feitas em microscópio Nikon Eclipse E800 e documentadas em imagem digital com o software ImagePro-Plus (Media Cybernetics, USA).

3.3.6 - Mobilidade das células uNK sob a ação das quimiocinas MIP-1 β e CXCL10

O ágar (Sigma Co, St Louis/USA) foi dissolvido na concentração de 2g/L, em água ultrapura e autoclavada a 121,6°C por 30 minutos. Em fluxo laminar, foram adicionadas ao ágar: IL-15 (150ng/mL) ou as quimiocinas MIP-1 β ou CXCL10 nas concentrações de 100ng/mL, bem como em suas combinações, e diluídas em meio RPMI 1640 (suplementado como descrito no item 3.2). O ágar semi-sólido no volume de 50 μ L, contendo a citocina e/ou quimiocinas, foi delicadamente aplicado em uma das extremidades da câmara (oito *wells*) montadas sobre lâminas de vidro (NUNC Inc, USA) que foi mantida inclinada até o endurecimento do ágar. Deste modo, o ágar ocupava somente uma parte do câmara (Fig. 3). Como controle foi utilizado o ágar com adição apenas do meio RPMI 1640.

As células uNK isoladas, como descrito no item 3.2, foram semeadas nas placas pré-preparadas sendo colocadas no lado oposto da câmara onde havia o ágar. As observações

e documentações foram feitas após 12 e 24h de cultivo a 37°C em atmosfera úmida, com 5% de CO₂.

O mesmo experimento também foi realizado de modo inverso. Isto é, as células uNK foram preparadas no interior do ágar semi-sólido enquanto as citocina/quimiocina foram adicionadas ao meio RPMI 1640 depositadas na câmara cobrindo o ágar.

3.3.7 - Extração do RNA total de células uNK em cultivo de *micro-spots* e avaliação da sua integridade pelo RT-PCR

Para realização do RT-PCR (Transcrição reversa PCR) foram realizados testes de otimização da extração e recuperação do RNA total de células uNK mantidas em cultivo de *micro-spots*, contendo 5×10^3 células, assim como utilização de kits comerciais para avaliar a sensibilidade e reprodutibilidade dos procedimentos destinados às análises de expressão gênica das células uNK em cultivo.

3.3.7.1 - Testes de extração do RNA total

Nas amostras de 5×10^3 células uNK foram adicionados 800µL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por 5 minutos em temperatura ambiente, para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Para cada amostra foram adicionados 200µL de clorofórmio (J.T.Baker), seguindo-se homogeneização em vórtex durante 30 segundos e um tempo de repouso de 3 min. a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 min. a 4°C. A fase aquosa formada durante a centrifugação foi transferida para outro tubo de microcentrifuga e nela adicionada a mesma quantidade de álcool isopropílico (J.T.Baker), que foi homogeneizada e permaneceu em repouso overnight a -20°C. Após 12h foi realizada a centrifugação das amostras a 12.000g por 10 min. a 4°C, para formação do *pellet* de RNA. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1mL de álcool etílico (J.T.Baker) 70% gelado diluído em água DEPC (Sigma Co, St. Louis/USA), para remover o restante de álcool isopropílico do *pellet*. Seguiu-se a lavagem por centrifugação por 10 minutos a 7.500g a 4°C. Em seguida, o etanol foi completamente removido e o RNA total foi solubilizado em 15µL de água DEPC. As alíquotas obtidas foram quantificadas em espectrofômetro ($\lambda = 260$ e 280nm)(NanoDrop-100 Spectrophotometer).

Alternativamente, amostras de 5×10^3 células uNK foram submetidas à extração do RNA total utilizando também o kit RNAeasy Micro Kit (Qiagen), conforme as instruções do fabricante, com ou sem a adição da poliacrilamida linear (Sigma Co, St Louis/USA), preparada segundo GAILLARD & STRAUSS (1990). A adição da poliacrilamida linear foi baseada no princípio da formação de uma rede polimérica destas moléculas que contribuem para a precipitação do RNA total

Nas amostras de 5×10^3 células uNK isoladas foram adicionados 250µL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) e, em seguida, a suspensão foi homogeneizada por 5 minutos em temperatura ambiente. Para cada amostra foram adicionados 80µL de clorofórmio seguindo-se homogeneização em vórtex durante 30 segundos e um tempo de repouso de 3 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse período de repouso as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa formada durante a centrifugação foi transferida para outro tubo de microcentrífuga e, como etapa adicional foram adicionados 125µL de álcool isopropílico (J.T.Baker) e 20µg de poliacrilamida linear. Seguiu-se a homogeneização e manutenção da amostra em repouso overnight a -20°C. Após 12 horas de repouso, cada amostra foi centrifugada a 12.000g por 10 minutos a 4°C para formação do *pellet* de RNA. O sobrenadante foi então descartado e adicionou-se 1mL de álcool etílico a 4°C (J.T.Baker), na concentração 70%, diluído em água DEPC (Sigma Co, St. Louis/USA), para a remoção do álcool isopropílico do *pellet*. O material foi centrifugado por 10 minutos a 7.500g a 4°C, seguida de completa remoção do etanol e solubilização do RNA total isolado em 15µL de água DEPC. As alíquotas obtidas foram quantificadas em espectrofômetro (NanoDrop-100 Spectrophotometer) através da relação da densidade óptica nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. A solução de RNA foi ajustada para a concentração de 2µg/µL em água DEPC.

Para verificação da integridade do RNA total extraído, em gel de agarose, foram preparadas soluções com 2,0µL de RNA total, 3,0µL de MOPS (Invitrogen, Carlsbad, CA) (10x), 5,0µL de formaldeído (Sigma Co, St. Louis/USA), 12,5µL de formamida (Sigma Co, St. Louis/USA), 2,5µL de brometo de etídeo (EtBr) (Invitrogen, Carlsbad, CA), tampão de corrida *Load Buffer* (LB) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Esta solução foi incubada por 10 minutos a 65°C seguida da incubação por 2 minutos a 0-4°C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% (LGC Biotecnologia – Biologia Molecular/ Grupo Ciambarella) em 41,5mL DEPC, 5mL MOPS 10%, 3,5 mL de formaldeído.

3.3.7.3 - RT-PCR

A partir do RNA total foram obtidos os cDNA utilizando-se o kit SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA) conforme instruções do fabricante.

Foram realizadas análises para determinação da quantidade mínima de cDNA necessário para realização das reações de PCR, sendo testadas as concentrações de 200ng, 500ng e 700ng de cDNA através da reação de PCR, conforme descrito no item 3.3.7.4, utilizando o gene controle β -actina.

3.3.7.4 - PCR semi-quantitativo

O *primer* de β -actina utilizado [sense (gctacagcttcaccaca), antisense (acatctgctggaaggtggac)] foi testado e otimizado em nosso laboratório em trabalho que ocorre paralelamente, de acordo com o descrito por ASHKAR e colaboradores (2003) para amplificação de 477pb.

A Taq-DNA polimerase para RT-PCR foi preparada de acordo com o protocolo do Kit Taq-DNA polimerase (Invitrogen Carlsbad, CA) em termociclador (GeneAmp PCR System 9700 – Applied Biosystems). Para um volume final de 10 μ L foram utilizados: 5,0 μ L de água ultrapura autoclavada, 1,0 μ L 10X PCR Buffer minus Mg, 0,26 μ L (1,5uM) da solução de 50mM MgCl₂, 0,8 μ L da solução de DNTP (1,2mM) (Invitrogen Carlsbad, CA), 0,1 μ L de Taq-polimerase, 2,0 μ L das amostras do cDNA e 0,5 μ L (3pmol) de cada *primer* sense e antisense.

A amplificação do cDNA foi em termociclador (GeneAmp PCR System 9700 – Applied Biosystems) e denaturação inicial foi realizada a 94°C por 2 minutos. Em seguida, iniciou-se os ciclos de amplificação: desnaturação a 94°C por 45 segundos, o anelamento foi feito em temperatura específica de cada *primer* utilizado, por 45 segundos, a extensão da fita de DNA complementar ocorreu a 72°C por um minuto. Utilizando o número de ciclos ideal para cada *primer*, a extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos e a amostra foi mantida a 4°C.

A alíquotas de 3 μ L adicionou-se 0,5 μ L de *Loading buffer* que foram aplicadas no gel de 1% agarose em 1% TAE + 1,5 μ L EtBr (brometo de etídeo). As corridas foram realizadas no aparelho de eletroforese (Biorad Laboratories) a 75 volts. Utilizou-se 6 μ L do marcador λ -Hind III (1mg/12 μ L) ou 2 μ L de Track100bp DNA Ladder (Invitrogen) como referência. O gel foi fotodocumentado utilizando o programa Image Master VDS Software– Pharmacia Biotech.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento das células uNK e cultivo primário

Células uNK de camundongos isoladas por esferas biomagnéticas Dynal conjugadas com lectina DBA (Fig. 4), após desassociação pela ação do açúcar NAc-Gal apresentaram-se íntegras e viáveis quando observadas pela técnica de exclusão do corante azul de trypan. No protocolo utilizado foram realizadas duas associações de tempo máximo de 15 minutos cada. Estas associações parciais são feitas devido ao efeito deletério da lectina DBA sobre as células uNK (FONSECA, 2000). Nas condições utilizadas com duas associações seqüenciais para o isolamento, o rendimento médio de células uNK obtidas do útero de camundongos no 8ºdg foi de 5 a 7 x 10³ células/sítio de implantação embrionária, atingindo a média de 5x10⁴ células por animal doador.

Pelos testes realizados com o uso da esfera magnética BioEstapor (Fig. 5), os resultados mostram que o rendimento final da obtenção das células uNK foi menor em relação às esferas Dynal, sendo obtidas, em média, 2,5 x 10³ células/sítio de implantação embrionária, atingindo a média de 2,5x 10⁴ células por animal doador.

4.2. Manipulação das células uNK em cultivo primário

4.2.1 - Efeitos dos substratos de matriz extracelular

No experimento controle, as células uNK de camundongos cultivadas em placas ou em lamínulas sem qualquer revestimento com componentes da matriz extracelular foi observado um número reduzido de células aderidas após o período de seis horas (Fig. 6). Nos testes de avaliação da adesão celular com componentes da matriz extracelular, as células uNK cultivadas em superfícies revestidas com a fibronectina (Fig. 7) e laminina (Fig. 8) mostraram melhor adesão quando comparadas ao controle e ao colágeno I. Células cultivadas sobre fibronectina permitiram a manipulação do cultivo por um período mais longo e apresentando uma maior quantidade de células aderidas ao longo do período analisado. O revestimento com o colágeno I (Fig. 9), isolado da cauda de rato, também favoreceu a aderência das células uNK nos períodos de até 24 horas, mas este em menor proporção em relação aos demais substratos e com drástica redução após 48h. Entre a fibronectina e a laminina, a primeira manteve um maior número de células aderidas e por um período mais longo. Não foram realizadas quantificações das células nas condições testadas, sendo a

avaliação apenas comparativa em cultivos simultâneos (Quadro 1). Porém, após sete dias a proporção de células remanescentes no cultivo era bastante reduzida em todos os tratamentos testados, sendo notória a redução gradual da proporção de células integras que permaneciam em cultivo após quatro dias, mesmo sobre o substrato de fibronectina. Baseado nestes resultados foi adotada a fibronectina como componente da MEC padrão para revestimento das câmaras de cultura, para as análises subseqüentes das avaliações das células uNK *in vitro*.

Interessante observar que as células uNK passíveis de serem mantidas em cultivo na ausência de substrato de MEC é substancialmente menor, desde os primeiros momentos da sua sobrevida *in vitro*. Da mesma forma, nos testes utilizando placas escavadas de cavidades com $\phi=13\text{mm}$ ou lâminas de vidro pré-montadas de quatro e oito câmaras, independentemente da presença ou não dos substratos de MEC, as células semeadas dispersavam-se ocupando aleatoriamente toda a extensão da superfície, com alguma predominância nas bordas, dificultando o monitoramento e a análise morfológica das células em cultivo. Tal dispersão celular exigia a semeadura de uma concentração mínima de 2×10^4 células por câmara ou por ensaio, para que pudesse ser acompanhado e avaliado o comportamento das células nas diferentes condições de cultivo testados. Esta quantidade de células exigidas para cada possível ensaio *in vitro*, exigia por sua vez, um camundongo doador por ensaio, considerando que o rendimento médio de células uNK isoladas por animal estava em torno de 5×10^4 células.

A partir desta dificuldade foram testadas diversas alternativas para reduzir a quantidade de células necessárias para os ensaios, assim como reduzir o volume dos diversos mediadores (citocinas e quimiocinas) propostos para os testes *in vitro*.

Após vários testes sobre as opções possíveis foram concentrados esforços em padronizar as condições para o cultivo em *micro-spots*, à semelhança do sistema utilizado para manipulação de embriões pré-implantacionais.

Os testes resultaram no procedimento de cultivo com a utilização de 5×10^3 células suspensas num volume de $50\mu\text{L}$ do meio depositado na forma de uma pequena gota sobre superfícies com o tratamento prévio de fibronectina. Estas gotas, por sua vez, completamente recobertas com óleo mineral permitiram isolar as células em cultivo do meio externo, reduzindo os riscos de contaminação, além de delimitar a área de cultivo concentrando as células dentro do perímetro da gota. Nestas condições foi observado que as células em cultivo concentradas no centro da gota facilitavam a observação para análises

morfológicas ao microscópio. Facilitavam também o manuseio preciso nos procedimentos de substituição dos meios de cultivo utilizados nos testes.

4.2.2 - Efeitos das ações das citocinas IL-2, IL-15 e GM-CSF

Os ensaios para avaliação dos efeitos das citocinas IL-2, IL-15 e GM-CSF em células uNK de camundongos foram realizados integralmente em *micro-spots* contendo 5×10^3 células, onde o conjunto dos ensaios com estas citocinas isoladas ou em combinação foi realizados com células obtidas de um único animal. Os resultados foram obtidos em três ensaios realizados em ocasiões distintas.

Neste ensaio, a condição de cultivo referência constituiu aquela onde as células foram semeadas sobre lâminas com quatro ou oito câmaras revestidas com fibronectina (Fig. 10) acompanhadas diariamente pelo período de até sete dias. Quanto às características morfológicas observou-se que as células uNK apresentavam-se pequenas, de formato esférico, sem grandes variações de tamanhos entre elas e o aspecto granular do citoplasma era pouco evidente. Estas características foram mantidas nos períodos subseqüentes de cultivo.

Nos cultivos com o GM-CSF (Fig. 11), as células foram acompanhadas diariamente e não apresentaram mudanças significativas na sua morfologia em relação às células controle, sendo constatada uma proporção maior de células pequenas e com citoplasma pobre em grânulos em todos os tempos em que as células foram analisadas.

As células tratadas com a citocina IL-2 (Fig. 12) apresentaram características morfológicas de células uNK imaturas, com pouca quantidade de grânulos e a maioria das células apresentavam pequeno diâmetro. Na observação destas células até 24 horas de cultivo, foram encontradas, de forma bem rara, algumas células de tamanho aumentado e presença de grânulos citoplasmáticos, porém estas células praticamente não foram observadas nos dias subseqüentes de análise.

As células uNK sob o efeito isolado de IL-15 (Fig. 13) apresentaram nos períodos iniciais de 12-24 horas variações da morfologia celular sendo observadas células que apresentavam diâmetro aumentado e uma grande quantidade de grânulos bem evidentes. Estas características eram mantidas até o sétimo dia de cultivo.

As combinações das citocinas revelaram que IL-15 + IL-2, IL-15 + GM-CSF e IL-15 + IL-2 + GM-CSF, apresentaram resultados semelhantes. Isto é, além de manterem um grande número de células morfolologicamente diferenciadas, estas mantiveram-se até 6-7 dias em

cultivo, à semelhança das células cultivadas somente com a citocina IL-15 (dados não demonstrados).

Na combinação das citocinas, IL-2 e GM-CSF foram observadas poucas células uNK com diâmetro aumentado no decorrer do tempo de cultivo analisado, sendo observadas poucas células. Após quatro dias de cultivo verificou-se uma drástica redução de células que permaneciam aderidas e a morfologia das células viáveis era semelhante àquela das células encontradas no controle (dados não demonstrados).

4.2.3 - Efeitos das ações de MIP-1 β , CXCL10 e IL-15

A partir dos ensaios realizados com as citocinas e suas combinações para verificar a sobrevida das células uNK de camundongo em cultivo, a citocina IL-15 foi adotada como referência para avaliar as ações combinadas com as quimiocinas MIP-1 β e CXCL10, nos períodos de 1, 12 e 24h.. O controle foi realizado com as células cultivadas somente em meio RPMI 1640 sobre o substrato de fibronectina (Fig.10).

Com a CXCL10 isolada não foram observadas alterações morfológicas muito evidentes quando as células uNK foram comparadas com o controle, após uma hora de contato (Fig. 14A). Porém, uma pequena quantidade de células apresentou conteúdo de grânulos mais evidentes no citoplasma. Após 12 horas nota-se uma proporção maior de células com grânulos mais evidentes e uma maior variação do diâmetro celular (Fig. 14B) e, em 24h de cultivo (Fig. 14C), era evidente o predomínio de células de menor tamanho, sem a presença dos grânulos, ou se presentes, estava de forma pouco evidente, sendo encontrada uma população celular mais homogênea no que se refere ao diâmetro celular. Por outro lado, foram observados fragmentos e restos celulares aderidos ao substrato.

A adição de MIP-1 β ao meio de cultura não resultou em alterações morfológicas significativas em relação ao controle em 1h (Fig. 15A). Em 12 horas a maioria das células observadas apresentavam características semelhantes ao controle, mas com algumas células apresentando uma maior quantidade de grânulos e com diâmetro aumentado (Fig. 15B). Em 24h de cultivo as características morfológicas na maioria das células eram mantidas como as observadas no controle e sendo raras as células que apresentavam granulações citoplasmáticas (Fig. 15C). Uma característica intrigante observada nas células cultivadas com MIP-1 β era a sua distribuição dispersa e distantes entre si, sendo comum células localizadas na periferia no *spot*.

A combinação MIP-1 β e CXCL10 (Fig. 16) resultou no aumento no diâmetro e grânulos de algumas células. Porém, estas características morfológicas não foram mantidas em 24 horas de cultivo (Fig. 16C), sendo observada a fragmentação das células, à semelhança do encontrado em cultivo controle.

Nas combinações de quimiocinas com a citocina IL-15 foi observado que a MIP-1 β (Fig. 17A), CXCL10 (Fig. 17B) ou MIP-1 β + CXCL10 (Fig. 17C) apresentaram resultados semelhantes aos observados no cultivo feito somente com IL-15. Isto é, as células tornaram-se maiores, com citoplasma contendo maior quantidade de grânulos. Na combinação IL-15 com CXCL10, as células apresentaram um diâmetro maior do que foi observado nos outros tratamentos. Neste tratamento havia uma maior quantidade de células aderidas após as 24 horas de cultivo.

A combinação de IL-15 e MIP-1 β promoveu a dispersão das células, à semelhança do que foi observado nas células cultivadas apenas com MIP-1 β . Este padrão não foi observado na combinação MIP-1 β + CXCL10 e nem em células cultivadas com IL-15 + MIP-1 β + CXCL10.

4.2.4 - Avaliação da viabilidade celular

As células uNK semeadas na proporção de 5×10^3 em micro-spots com substrato de fibronectina e sob o efeito da citocina IL-15 combinada com as quimiocinas CXCL10 e MIP-1 β foram avaliadas quanto a viabilidade pela quantificação, preservação da expressão do glicoconjugado contendo N-acetil-D-galactosamina terminal na superfície celular detectada pela lectina DBA e integridade do mRNA, nos períodos de 1, 12 e 24 horas de cultivo.

4.2.4.1- Quantificação das células uNK

As células uNK semeadas na concentração de 5×10^3 células e mantidas nas condições de cultivo estabelecidas foram tratadas com tripsina e a suspensão celular quantificada em câmara de Neubauer (Gráfico 1). No tempo inicial (1h), sem a adição das citocinas, a média de células aderidas foi de 4800 células por micro-spot, com tendência à redução da quantidade de células no decorrer dos períodos, porém sem diferenças significativas.

Com a adição das citocinas e quimiocinas isoladas ou em combinações, as análises estatísticas pelo ANOVA ($p \leq 0,05$), não demonstraram diferenças significativas na

quantidade de células mantidas no cultivo, exceto para células cultivadas com as combinações de CXCL10 + IL-15, no tempo de 24h, onde quase a totalidade das células uNK semeadas permaneceram viáveis no cultivo. Embora não apresente diferenças estatísticas em relação ao controle, efeito oposto pode ser constatado com a quimiocina MIP-1 β que após 24 horas mostrou tendência de redução de células viáveis, sendo esta significativamente menor em relação ao cultivo com CXCL10 + IL-15.

4.2.4.2 - Citoquímica com a lectina DBA

As células uNK de camundongos cultivadas no substrato de fibronectina foram avaliadas quanto a sua reatividade a lectina DBA nos períodos de 1, 12 e 24 horas após à adição das combinações de citocinas e/ou quimiocinas (Figs 18-22) Todos os tratamentos (IL-15, CXCL10, MIP-1 β e suas combinações) apresentaram células uNK positivas à lectina DBA. Nas células controle, apesar da reatividade da lectina DBA na membrana celular, não foram observados reações positivas no citoplasma das células (Fig. 18). Nas células cultivadas com IL-15 (Fig. 19), além da marcação na membrana, foi observada a intensa marcação de grânulos citoplasmáticos, assim como com o tratamento com MIP-1 β (Fig. 20) mas nestes últimos os grânulos eram menores.

Nas células cultivadas com a quimiocina CXCL10 (Fig. 21 e 22) a reatividade para lectina DBA estava presente tanto na membrana plasmática como nos grânulos, porém os grânulos apresentam-se menores que os encontrados nas células tratadas com IL-15. Além disso, observou-se a presença de restos celulares após 24h de cultivo.

Com as combinações IL-15 + MIP-1 β ; IL-15 + CXCL10; MIP-1 β + CXCL10; IL-15 + MIP-1 β + CXCL10 a reatividade para lectina DBA estava presente na superfície celular no período inicial e nos tempos de 12 e 24 horas, as marcações foram observadas também nos grânulos citoplasmáticos (dados não demonstrados).

4.2.4.3 - Imunocitoquímica com anti-PCNA

As células uNK cultivadas no substrato com fibronectina e com adição das IL-15, MIP-1 β , ou CXCL10 e as combinações IL-15 + MIP-1 β ; IL-15 + CXCL10; MIP-1 β + CXCL10; IL-15 + MIP-1 β + CXCL10, analisadas pela reação imunocitoquímica com anti-PCNA não apresentaram qualquer marcação nuclear positiva (dados não ilustrados).

4.2.5 - Avaliação da motilidade das células uNK sob a ação das quimiocinas MIP-1 β e CXCL10

O ágar depositado num dos cantos da câmara mantém as quimiocinas concentradas no seu interior, enquanto as células foram semeadas na extremidade oposta da lâmina previamente revestida com fibronectina distribuem-se de forma aleatória nesta superfície. No controle, onde as células foram mantidas com o ágar contendo somente o meio RPMI 1640 (Fig. 23A), observaram-se as células distribuídas aleatoriamente sem que houvesse uma concentração em um local específico. Observações semelhantes foram constadas com as células semeadas nas câmaras com o ágar contendo CXCL10 (Fig. 23B), ou CXCL10 +MIP-1 β (Fig. 23D). No cultivo contendo ágar com MIP-1 β (Fig. 23C) ocorreu a dispersão inicial das células até 6 horas, à semelhança dos demais testes, porém após 12 horas ocorre uma concentração de células junto ao limite do ágar em proporção visivelmente maior em relação aos demais cultivos.

4.2.6 - RT-PCR

4.2.6.1 - Testes da extração do RNA total

As amostras de RNA total extraídas a partir de 15.000 células uNK obtidas segundo o protocolo convencional de extração e purificação com Trizol, apresentaram uma variação bastante grande de valores na quantificação pela espectroscopia de duplo comprimento de onda ($\lambda = 260\text{nm}$ e 280nm). Na eletroforese em gel de agarose não foram observadas as formações das bandas características, sugerindo a degradação do RNA e/ou que a quantidade de RNA total isolado não estava dentro do limiar de sensibilidade dos métodos convencionais (dados não ilustrados).

Com o objetivo de aperfeiçoar a técnica de extração de RNA total para poucas células, foram realizados testes com linfócitos isolados do baço e estes demonstraram que para a quantidade de até 15.000 células linfocitárias, os protocolos convencionais não apresentam sensibilidade suficiente para identificação do RNA extraído, especialmente nas eletroforeses com gel denaturante. Da mesma forma, após as tentativas de obtenção do cDNA a partir destes RNA totais e realizado o PCR com a β -actina, verificou-se que amplificação gênica ocorre de forma reprodutível com o cDNA sintetizado a partir do RNA total isolado de 10^7 linfócitos, mas não com 15×10^3 células (dados não ilustrados),

demonstrando que os métodos convencionais não são sensíveis o suficiente para o isolamento do RNA e obtenção do cDNA em quantidade necessária para as análises em PCR.

Mesmo com a adoção do Kit RNAeasy Micro Kit (Qiagen), seguindo o protocolo e instruções recomendados pelo fabricante para extração do RNA total a partir de 15×10^3 linfócitos esplênicos ou de 15×10^3 uNK isoladas, a reação de PCR do cDNA obtido não apresentou amplificação de β -actina (dado não ilustrado).

Com a adoção da precipitação do RNA pela poliacrilamida linear na etapa de extração e com a análise em espectrometria de alta sensibilidade (NanoDrop-100 Spectrophotometer) foi possível quantificar o RNA total extraído de 5×10^3 células uNK recém isoladas e do cDNA produzido a partir deste, foi possível amplificar a β -actina (Fig. 24). Na quantificação do RNA total destas amostras observou-se uma grande variação na concentração do RNA extraído que repercute nos resultados do PCR. Estas variações aparentemente independem do tratamento das células uNK em cultivo sendo a amplificação do transcriptoma para β -actina é possível de ser detectado a partir de 500ng (Fig. 25).

Fundamentado neste protocolo de extração do RNA total e obtenção do cDNA, fez-se a extração de RNA total de 5×10^3 células uNK em cultivo de *micro-spot*, submetidos aos diversos tratamentos de citocinas e quimiocinas, conforme o protocolo 3 do item 3.3.5.1 de todas as amostras. As análises foram realizadas em triplicata.

5.DISSCUSSÃO

O cultivo primário de células *Natural Killer*-uterinas uNK foi descrito por CROY e colaboradores (1997), adotando o explante total do endométrio de camundongos prenhes para os ensaios *in vitro*. Embora o isolamento e cultivo de linfócitos de diversos tipos tenha sido amplamente relatado (CRELLIN *et al.*, 2007; FAUCE *et al.*, 2007; MONTECINO-RODRIGUEZ & DORSHKIND, 2006), inclusive com linhagens estabelecidas de células NK de humanos (TÖRNROOS *et al.*, 2007, RAHMAN *et al.*, 2007), não há, até o momento, relatos sobre o isolamento e manutenção de linfócitos uNK de camundongos em cultivo, de forma sensível e reprodutível.

Os indícios das diferenças funcionais *in vivo* existentes entre as cNK e uNK presumem que estas sejam subpopulações distintas e, portanto, parte das avaliações realizadas com as cNK não seriam passíveis de serem extrapoladas para as uNK. Deste modo, neste trabalho foram realizadas análises visando a padronização das condições de cultivo primário das células uNK, descrevendo de forma pioneira e original a viabilidade de cultivo primário de células uNK isoladas de camundongos.

Os procedimentos de isolamento das células uNK foram desenvolvidos inicialmente por LIMA (2002), com o uso de esferas biomagnéticas recobertas com estreptoavidina e associadas com lectina DBA. De acordo com PAFFARO JR e colaboradores (2003), a lectina DBA é altamente seletiva para células uNK presentes em ambiente uterino de camundongos gestantes, reagindo com glicocojugados contendo N-acetil-D-galactosamina (NAc-Gal) na superfície celular, permitindo, portanto, um procedimento eficiente e altamente específico para a obtenção destas células (LIMA, 2002). No presente trabalho, a adoção desta metodologia confirma a reprodutibilidade do método, sendo um procedimento rápido e eficiente, porém de rendimento ainda limitado.

Os testes realizados com as esferas Dynal e Bioestapor, revestidas com estreptoavidina para conjugação com a lectina biotinada, permitiram o isolamento de células uNK de camundongos e demonstraram que alguns fatores podem interferir tanto no rendimento quanto na viabilidade das células obtidas. O tamanho da esfera parece interferir de forma crítica, visto que as partículas menores, mesmo com conteúdo paramagnético maior, como no caso da Bioestapor de 2,37µm, que favoreceriam uma maior aderência na superfície da célula e carregariam as células com maior eficiência no campo magnético, não apresentaram o rendimento esperado. De fato, com estas esferas magnéticas o rendimento máximo não ultrapassou $2,5 \times 10^3$ células/sítio de desenvolvimento embrionário de camundongos no 8ºdg, enquanto que com as esferas CeLLection 450 da Dynal, o

rendimento atingiu 7×10^3 células/sítio. Tal fato pode estar relacionado à peculiaridade da célula e da molécula utilizada para o acoplamento esfera-célula. A lectina DBA, que tem alta afinidade a glicoconjugados na superfície das células uNK, tem um efeito deletério sobre as mesmas (FONSECA, 2000), levando à lise celular em intervalos de tempo próximos a 30 minutos após a interação. Desta forma, a imediata remoção da lectina da superfície das uNK é um procedimento crítico, inerente ao protocolo desenvolvido, que preconiza isolamentos parciais sucessivos com tempo de associação no limite máximo de 15 minutos para cada isolamento. A remoção induzida por competição estequiométrica do sítio reativo da lectina pela adição de NAc-Gal ocorre de forma relativamente eficiente com a esfera da Dynal. Porém, as esferas menores da BioEstapor são mais resistentes, dificultando a remoção das mesmas da superfície celular. Não foram realizados testes específicos para se comprovar os mecanismos desta interação, porém, a forma como a estreptoavidina é conjugada na superfície da esfera e a sua subsequente interação com a biotina da lectina podem interferir no arranjo estereológico da disposição dos sítios ativos da lectina. Cumpre lembrar que os sítios ativos da lectina, que reagem com os terminais oligossacarídicos dos glicoconjugados presentes na superfície das células uNK, devem ser acessíveis para a NAc-Gal, utilizada para competir com estes sítios ativos e reverter a ligação para liberar as esferas da superfície das células. De acordo com as informações técnicas da Dynal, a ligação da estreptoavidina na superfície das esferas CeLLection apresentam um pequeno segmento de cDNA. Este segmento poderia constituir um espaço adicional entre o glicoconjugado alvo da lectina na superfície das células uNK e a superfície da própria esfera. Isso permitiria maior acessibilidade e fluxo das moléculas de NAc-Gal no momento da desassociação. O maior espaço poderia favorecer um rendimento final maior com o uso destas esferas em relação àquelas que não apresentam este ligante de cDNA.

A dificuldade de se isolar grande quantidade de células uNK viáveis é um fator limitante para realização de ensaios, uma vez que, 10^5 células tem sido a quantidade média idealizada para monitorar o comportamento e realizar bioensaios na maioria das manipulações *in vitro* de células em cultivo (FRESHNEY, 2000).

Utilizando recipientes de cultivo disponíveis no mercado para cultivo primário de uNK, procurou-se adaptar condições de redução na quantidade de células e meios para a realização dos ensaios *in vitro*. A alternativa de se realizar cultivos em micro escalas baseou-se nas metodologias adotadas em micro-manipulações de ovócitos e embriões precoces (blastocisto) (HOGAN *et al.*, 1986). Os testes realizados para se estabelecer a menor concentração de células em cultivo, passíveis de serem observadas e acompanhadas ao

microscópio, foi de 5×10^3 células, manipuladas e mantidas num volume de 50µL de meio. Uma gota de meio de cultura de 50µL mantém as células limitadas a uma pequena área e concentradas na região central do *spot*, facilitando a sua observação ao microscópio. O recobrimento do *spot* com o óleo mineral facilita sobremaneira a manipulação do cultivo, mantendo o *micro-spot* delimitado e estável, com o mínimo de movimentação e distúrbio das células. Nos diversos experimentos realizados nestas condições e asseguradas as condições padrões de assepsia e esterilidade dos instrumentos, não foram constatadas contaminações por fungos ou bactérias, mesmo após sete dias de cultivo, o que assegura a reprodutibilidade do método para os diferentes ensaios pretendidos.

O cultivo das células uNK sobre substrato de matriz extracelular (MEC) foi idealizado a partir do fato que estas células, no ambiente uterino, encontram-se distribuídas em meio ao estroma, embebidas e em íntimo contato com a matriz extracelular (PAFFARO JR *et al.*, 2003). Estas células estão confinadas ao limite territorial do MLAp no ambiente uterino gestante (CROY *et al.*, 1997). Portanto, alguns componentes locais do MEC devem contribuir para o comportamento peculiar destas células no ambiente gestante, inclusive favorecendo a sua proliferação e diferenciação. De fato, os testes realizados com fibronectina, laminina e colágeno afetam diretamente o comportamento das células uNK em cultivo, favorecendo a sua sobrevida *in vitro* em relação às células cultivadas sem qualquer substrato de MEC, sendo cultivadas até sete dias sobre substrato de fibronectina. Esta constatação corrobora com os relatos de CROY & KISO (1993) que ao utilizarem cultivo de explantes de úteros de camundongos gestantes constataram o efeito benéfico da matriz extracelular na manutenção das células uNK. Cumpre salientar que o cultivo de explantes de fragmentos uterinos contendo uNK constituem um sistema complexo influenciado por diversos fatores produzidos pelas diferentes células que o compõem (FONSECA, 2000). Neste modelo, verificava-se a migração das células uNK para fora do explante, que se mantinham aderidas aos recipientes de cultivo, mesmo sem qualquer tratamento prévio com substratos de MEC (FONSECA, 2000). Pelos resultados dos nossos ensaios com os diferentes componentes da MEC, verificou-se que na ausência destes substratos, após seis horas de cultivo, havia poucas células aderidas na superfície do recipiente de cultivo. A grande maioria se mantinha em suspensão no meio de cultivo e eram células inviáveis ou já degeneradas. Desta forma, o experimento utilizando componentes da MEC demonstra de forma inequívoca o efeito dos mesmos sobre o comportamento das células uNK *in vitro*, comprovando a necessidade de um meio contendo componentes da MEC para a sua sobrevida.

De acordo com os resultados dos experimentos com a fibronectina, viu-se mais células aderidas quando comparado com células cultivadas sobre laminina, colágeno I ou diretamente na placa de cultivo. A fibronectina é amplamente distribuída no estroma endometrial e está presente ao longo da gestação (BARBIAZ, *et al.*, 1996, PAFFARO JR, comunicação pessoal), enquanto as células uNK apresentam as integrinas $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$, moléculas que interagem com a fibronectina e a integrina $\alpha_1\beta_1$ com laminina (BURROWS *et al.*, 1995). Desta forma, presume-se que as uNK podem interagir tanto com a fibronectina quanto com a laminina, promovendo a sua adesão e estabilização nas superfícies dos recipientes de cultivo. A adesão destas células através destes componentes da matriz extracelular favorece também a viabilidade destas células, uma vez que nos cultivos sem estes substratos as células uNK não aderentes apresentam viabilidade substancialmente menor.

Por outro lado, o colágeno I não apresentou igual eficiência na manutenção das células uNK. O colágeno purificado induz uma aderência inicial, porém, após 24 horas, restam poucas células aderidas e viáveis. Este fato pode estar relacionado com os relatos de SPIESS e colaboradores (2007) que verificaram a não existência de colágeno tipo I na decídua madura no 8ºdg, estando presente na pré-decídua e no estroma não decidualizado. Portanto, o colágeno tipo I pode estar envolvido na migração das células uNK para o estroma endometrial, mas não estaria envolvido na sobrevida destas células no útero durante a prenhez.

O maior tempo de sobrevida para uma maior proporção de células uNK foi constatado quando mantidas sobre a fibronectina e, portanto, este componente da MEC foi adotado como condição padrão para os ensaios subseqüentes visando a avaliação dos efeitos combinados de citocinas e quimiocinas. A MEC apresenta inúmeros outros componentes que devem ter influência no comportamento das células (MANGALE & REDDY, 2007). Estudos específicos, a partir do presente experimento, merecem ser aprofundados e estendidos, visando a melhor compreensão dos possíveis efeitos destes outros componentes e suas combinações nos mecanismos relacionados com o comportamento das células uNK no útero gestante.

O condicionamento dos meios de cultivo com a adição das citocinas IL-15, IL-2 e GM-CSF, isoladamente e em suas combinações, resultam em diferentes respostas das células uNK mantidas sobre o substrato de fibronectina. Dentre estes, os resultados da ação da IL-15 mostram que as células uNK apresentaram tempo de sobrevida maior e com aumento de grânulos citoplasmáticos, sugerindo a diferenciação destas células *in vitro*. Os resultados do

efeito da IL-15 após 24h demonstraram que as células tornavam-se maiores, com o citoplasma nitidamente com maior quantidade de grânulos, enquanto que no cultivo das uNK com as outras citocinas testadas isoladamente, poucas células apresentavam tais características neste período. Este fato sugere que a viabilidade das células uNK é mantida e sua diferenciação estimulada sob o efeito da IL-15 *in vitro*. A biogênese e acúmulo dos grânulos lisosomo-secretorios nas células NK é um dos parâmetros que demarcam o processo de diferenciação destas células (CROY, 1999; PAFFARO JR *et al.*, 2003).

A IL-15 é comprovadamente expressa no ambiente uterino humano a partir da fase secretora do ciclo menstrual (OKADA *et al.*, 2000) e em camundongos entre o 6º e 11º dg (YE *et al.*, 1996). As células uNK expressam receptores para IL-15 (CARSON *et al.*, 1994) e a ação da citocina IL-15 induz sua proliferação e diferenciação (BARBER & POLLARD, 2003; GUIMOND *et al.*, 1998; CROY *et al.*, 2003b). A IL-15 é comprovadamente crucial para as uNK, uma vez que animais *knockout* para IL-15 não apresentam células uNK maduras (KENNEDY *et al.*, 2000).

SATO e colaboradores (2007) verificaram que a IL-15, após se ligar ao seu receptor na superfície celular, é internalizada pela via endossômica, mas persiste após a degradação no lisossomo. Isso permite que o complexo seja novamente reciclado para a superfície celular e a IL-15 liberada para o meio. Assim, o complexo IL-15R/IL-15 serviria como uma fonte persistente de IL-15 para o ambiente. Deste modo, seu efeito se torna mais prolongado quando comparado às outras citocinas. Este mecanismo parece ser efetivo mesmo *in vitro*, nas células uNK isoladas e mantidas nas condições de cultivo aqui estabelecidas sob o efeito da IL-15, preservando uma das principais características fenotípicas das células uNK.

A IL-2 não induziu, aparentemente, uma resposta detectável sobre as células uNK nas análises realizadas neste experimento, já que estas se mantiveram com características semelhantes às células que não foram submetidas à ação de qualquer citocina. A resposta das células uNK à IL-2 é controversa, uma vez que as mesmas apresentam receptores para IL-2 (SAITO *et al.*, 1993) mas, aparentemente, a citocina não consegue induzir ativação da proliferação, diferenciação ou mesmo a citotoxicidade das uNK, ao contrário do que é verificado para as células cNK (WALDMANN, 2006). A pouca influencia da IL-2 sobre as uNK no ambiente uterino pode ser inferida indiretamente pela ausência da expressão do mRNA de IL-2 neste meio (JOKHI *et al.*, 1994; KING *et al.*, 1995). A citocina GM-CSF, de acordo com os nossos resultados, aparentemente, tem pouco efeito sobre as uNK mantidas *in vitro*. A GM-CSF é conhecida por propiciar a diferenciação e proliferação de várias células hematopoiéticas (JASPER *et al.*, 2000), de células NKT (SATO *et al.*, 1999) e levar à

ativação de células NK (RICHARD *et al.*, 1995). No ambiente uterino gestante foram descritas a presença da GM-CSF na placenta e na decídua (ROBERTSON *et al.*, 1992, 1996) durante toda a gravidez. Animais *knockout* para GM-CSF desenvolvem prenhez normal, indicando que esta citocina não é essencial para o sucesso da gravidez (ROBERTSON *et al.*, 1999). As ações da GM-CSF sobre as células NK, e em outras linhagens de linfócitos, e a sua presença no ambiente uterino (COOPER *et al.*, 2001) faz presumir que esta citocina apresente efeito direto sobre as células uNK. A GM-CSF é produzida inclusive pela própria uNK (SAITO *et al.*, 1993), podendo ter uma ação autócrina durante a gestação. Contudo, de acordo com os nossos resultados, a GM-CSF não induz isoladamente alterações detectáveis sobre as uNK nas condições adotadas no experimento, ou mesmo quando em combinação com IL-2. Este fato, não exclui a possibilidade de ativação ou inibição de várias vias metabólicas das células uNK sob a ação desta citocina.

As quimiocinas CXCL10 (SENTMAN *et al.*, 2004) e MIP-1 β (JONES *et al.*, 2004; KITAYA *et al.*, 2003) estão comprovadamente presentes no ambiente uterino e foram atribuídas a elas o processo de migração das células uNK no ambiente uterino (MACKAY, 2001, SENTMAN *et al.*, 2004, RED-HORSE *et al.*, 2004).

A quimiocina MIP-1 β pertence à família CC (MAURER & VON STEBUT, 2004). Embora a presença da MIP-1 β no ambiente uterino em humanos e camundongos esteja estabelecida, seus efeitos no útero gestante ainda são pouco conhecidos. Supõe-se que esteja envolvida no recrutamento de linfócitos, à semelhança do que é observado em locais de inflamação (MAGHAZACHI *et al.*, 1994; MAURER & VON STEBUT, 2004). A MIP-1 β é uma molécula capaz de induzir uma resposta quimiotática nas células NK periféricas, especificamente células NK CD56^{bright} CD16^{dim} (CAMPBELL *et al.*, 2001). Na gestação a MIP-1 β produzida pelas células do estroma uterino tem sua produção estimulada pela progesterona, mas não sob o estímulo do estradiol (KITAYA *et al.*, 2003). Esta expressão hormônio dependente da MIP-1 β coincide com a intensificação da migração das células uNK, tanto em camundongos (PAFFARO JR *et al.*, 2003, WU, *et al.*, 2006), quanto em humanos (KOOPMAN *et al.*, 2003; VAN DER MEER *et al.*, 2004). Os ensaios de mobilidade celular dos nossos experimentos comprovam que as células uNK tornam-se mais ativas frente à quimiocina MIP-1 β , demonstrando que a capacidade migratória detectável após 12h em direção à maior concentração da mesma está na sua dependência direta.

Por outro lado, a quimiocina CXCL10 aparentemente não estimulou a migração das células uNK nos ensaios realizados. Esta não migração das células, poderia ser decorrente da presença de uma maior expressão de receptores de inibição da família Ly49 (CROY *et*

al., 2003b). Ly49 é uma subfamília de receptores de expressão mais significativa em células da linhagem NK (ANDERSON *et al.*, 2001) e que contribui para modulação das respostas celulares. INNGJERDINGEN e colaboradores (2003), demonstraram que enquanto a expressão de Ly49D (receptor de ativação) leva à migração das células via aumento da concentração de CXCL10, a expressão de Ly49A (receptor de inibição) inibe a migração das células estimuladas com CXCL10 via ITIM (*immune receptor tyrosine-based inhibitory motif*). Na gestação ocorre um ganho de receptores Ly49 inibidores nas células uNK (CROY *et al.*, 2003b) e este fato pode estar diretamente relacionado com a não ativação da migração celular via CXCL10 dependente nas células uNK *in vitro* (ORTALDO *et al.*, 2001).

Interessante observar que a ação simultânea da CXCL10 e MIP-1 β , assim como, a combinação de CXCL10 e MIP-1 β e IL-15 inibiram a migração das células uNK nos ensaios realizados *in vitro*. Isto demonstra que CXCL10 tem um efeito inibidor da ação do MIP-1 β no ambiente uterino de camundongos. Estudos recentes demonstraram que a quimiocina CXCL11 apresenta ação supressora ao receptor CCR5 da quimiocina ligante ao seu receptor (PETKOVIC *et al.*, 2004). Considerando a grande similaridade entre CXCL10 e CXCL11, e que por muitas vezes estas quimiocinas apresentam as mesmas funções (MACKAY, 2001), presume-se pelos resultados do experimento da migração das células uNK, que a CXCL10 esteja desempenhando um papel inibidor no receptor CCR5.

De acordo com JONES e colaboradores (2004), foram identificadas a expressão de 21 quimiocinas no endométrio de humanos em diferentes fases do ciclo menstrual. Dentre as quimiocinas encontradas foram destacadas nove que apresentavam expressões mais significativas: FKN, MIP-1 β , 6CKine, HCC-1, HCC-4, IL-8, MDC, eotaxina e MCP-3. Já os estudos desenvolvidos por SENTMAN e colaboradores (2004) mostraram que as quimiocinas CXCL10 e CXCL11, ambas representantes da subfamília CXC, estão presentes no ambiente uterino de humanos. Deste modo, as várias quimiocinas expressas no útero gestante podem atuar de forma simultânea e/ou sequencial em várias células alvo. O fato da migração das células uNK, quando cultivadas sob a ação das duas quimiocinas, ter sido inibida, sugere uma dominância da CXCL10 sob o MIP-1 β . Contudo, esta ação pode ser concentração dependente limitada aos microambientes de domínios restritos no endométrio gestante. A existência de tais domínios ditados pela concentração local de quimiocinas pode ser, inclusive, o fator limitante para as células uNK serem encontradas em áreas restritas da região mesometrial, não atingindo a região anti-mesometrial do estroma decidualizado em camundongos.

No ambiente uterino, as células uNK apresentam reatividade seletiva à lectina DBA, permitindo a sua identificação e localização, além de distinguir morfologicamente os estágios de diferenciação no ambiente uterino gestante (PAFFARO JR *et al.*, 2003).

As células uNK, após isoladas e cultivadas em *micro-spots*, nos períodos de uma, 12 e 24 horas sob efeito das citocinas IL-15, MIP-1 β e CXCL10 e suas combinações, mantêm sua reatividade pela lectina DBA, com marcação tanto na superfície celular quanto no citoplasma. A reatividade desta lectina no citoplasma está relacionada com o conteúdo dos grânulos lisosomo-secretores e a presença de marcação nas células uNK em cultivo, o que sinaliza para o processo de diferenciação destas células. A detecção de maior intensidade de reação no citoplasma das células uNK mantidas em cultivo nos períodos de 12 e 24 horas, confirma o gradual incremento de grânulos citoplasmáticos, observado nas células uNK em cultivo por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). Esta ação indutora da maturação das células uNK pode ser atribuída à citocina IL-15, uma vez que as quimiocinas MIP-1 β e CXCL10, isoladamente ou em combinações, não revelaram um efeito significativo. Ressalta-se que as células uNK expressam receptores para IL-15 (CARSON *et al.*, 1994) e a ação da citocina IL-15 induz tanto a diferenciação quanto a proliferação das células uNK (BARBER & POLLARD, 2003, GUIMOND *et al.*, 1998; CROY *et al.*, 2003b). No entanto, a avaliação da possível proliferação destas células *in vitro*, sob o efeito da IL-15, isolada e em combinações com as quimiocinas, realizada pelas reações imunocitoquímicas para o PCNA, não detectou qualquer marcação nos núcleos das células uNK. Comprovam ainda esta inabilidade das células uNK em desencadear o seu processo proliferativo nas diversas condições de cultivo adotadas, os resultados das quantificações de células que não demonstram aumento no número de células uNK no decorrer dos intervalos de cultivos analisados. Ao contrário, de acordo com as condições de cultivo, a quantidade de células tende a diminuir, sendo esta tendência menos acentuada sob o efeito da IL-15 com a CXCL10.

De acordo com PAFFARO JR e colaboradores (2003), no útero de camundongos estão presentes células uNK imaturas ou pouco diferenciadas e com capacidade proliferativa (PCNA positivas), em proporções consideráveis na região do MLAp ao redor do 8º e 9ºdg em camundongos. De fato, as observações a fresco das células uNK isoladas no 8ºdg mostraram a presença de células pequenas e com poucos grânulos, tipicamente um fenótipo de células uNK imaturas, ao lado de células maiores, plenamente diferenciadas, com o citoplasma repleto de grânulos. O cultivo destas formas imaturas com potencial de proliferação *in situ*, fez presumir a possibilidade de viabilizar condições *in vitro* com

manutenção do seu potencial proliferativo. Contudo, as condições experimentais adotadas no presente experimento não reproduziram os meios necessário e/ou adequados para esta capacidade celular.

Por outro lado, a manutenção da integridade e viabilidade funcional das células uNK em cultivo primário torna-se vital visando a adoção deste sistema como potencial modelo para ensaios *in vitro*. Os relatos anteriores de CROY e colaboradores (1991), que adotaram o explante de útero para avaliar o comportamento das células uNK em camundongos, evidenciam uma sobrevida prolongada de até duas semanas destas células em cultivo sobre substrato de matriz extracelular, suplementadas com citocinas. No entanto, estes autores relataram que o DNA isolado destas células em cultivo apresentavam grau de degradação acentuado, impossibilitando o uso destas moléculas na avaliação do comportamento das células em cultivo.

Os ensaios realizados em nossos experimentos demonstraram que as células uNK isoladas positivamente com esferas magnéticas e mantidas em cultivo apresentavam fenótipo compatível com a de células viáveis e híginas em cultivo. A manutenção da reatividade com a lectina DBA na superfície celular configura a manutenção de um dos principais marcadores seletivos destas células e o gradual aumento na marcação citoplasmática caracteriza a diferenciação destas células com a biogênese dos seus grânulos lisossomo-secretores. Além disso, os ensaios que demonstraram, de forma inequívoca, a migração celular *in vitro* sob a ação do MIP-1 β revelaram a manutenção de uma das principais características inerentes a qualquer leucócito, que é a sua mobilidade quimiotática.

A recuperação de mRNA íntegro de 5×10^3 células uNK isoladas, determinado pelo PCR para a molécula de β -actina, comprova a integridade destas células e o potencial de manutenção de suas habilidades funcionais nas condições de cultivo estabelecidas.

Cumprе salientar os diversos procedimentos testados para aprimorar métodos de detecção da expressão gênica destas células mantidas em cultivo em *micro-spots*. A comprovação da capacidade de expressão gênica e a integridade do mRNA isolado destas células exigiram diversos ajustes e aprimoramento de técnicas para preservação e recuperação do RNA total para a execução do RT-PCR. A comprovada possibilidade de se obter o RNA íntegro de células uNK em cultivo na escala de 5×10^3 células, traz expectativas promissoras para futuros ensaios adotando este modelo experimental. Neste sentido, os procedimentos de cultivo em *micro-spots* desenvolvidos no decorrer do presente estudo constituem um conjunto de aprimoramentos técnicos que resultou num protocolo inovador, contemplando o uso racional de animais doadores para cultivo primário de células uNK, além

do uso de quantidades reduzidas de reagentes, que permitem reprodutibilidade e sensibilidade suficientes para bioensaios *in vitro*. Finalmente, este modelo de cultivo e manipulação de células isoladas em micro-escala deverá contribuir sobremaneira na evolução dos conhecimentos acerca das células uNK, podendo ainda ser adotada para cultivos e ensaios *in vitro* de outras populações celulares que necessitam de manipulações em micro-escala.

6. CONCLUSÕES

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Os resultados dos experimentos realizados neste trabalho permitem concluir que:

- 1 – Células *natural killer*-uterinas (uNK) de camundongos obtidas pelo método de isolamento positivo com esferas magnéticas conjugadas com lectina DBA apresentam viabilidade para serem destinadas ao cultivo primário.
- 2- O cultivo em *micro-spots* mostrou-se adequado para manipular as células uNK em número reduzido e confinadas em áreas restritas para o acompanhamento das respostas destas células em condições experimentais.
- 3- Dentre os componentes da matriz extracelular (MEC) utilizadas a fibronectina favoreceu a manutenção de maior número e maior tempo de sobrevivência das células uNK em cultivo, em relação à laminina e colágeno I, demonstrando que componentes da MEC são determinantes para a sobrevivência destas células *in vitro*.
- 4- A ação da citocina IL-15 sobre células uNK cultivadas no substrato de fibronectina aumenta a viabilidade e induz a diferenciação das células uNK *in vitro*, enquanto a IL-2 e GM-CSF, isoladamente ou em combinações, não apresentam ação direta sobre as células uNK.
- 5 – A quimiocina MIP-1 β ativa a migração das células uNK confirmando a manutenção desta característica funcional das uNK mesmo *in vitro*, enquanto CXCL10 tem um efeito antagônico, inibindo a ação da MIP-1 β .
- 6- A ação combinada da citocina IL-15 e da CXCL10 favorece a diferenciação das células uNK mantidas no substrato de fibronectina. Porém, nenhuma das citocinas isoladamente ou mesmo as quimiocinas nas combinações testadas, induziram a proliferação das células uNK *in vitro*.
- 7- A viabilidade das células uNK isoladas e mantidas nas condições *in vitro* pode ser comprovada pela preservação da expressão do glicoconjugado de superfície celular reativo à lectina DBA e pela integridade do mRNA para β -actina avaliado pelo RT-PCR.

7. ILUSTRAÇÕES

Quadro 1: Avaliação semi-quantitativa de células uNK isoladas de camundongo mantidas em cultivo sobre diferentes componentes da matriz extracelular, ao longo de sete dias.

	Período (dias)							
	0*	1	2	3	4	5	6	7
Controle	+	+	+	+	+	+	+	+
Colágeno I	+++	+++	+	+	+	+	-	-
Laminina	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+
Fibronectina	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++	+++	++

0*: 6 horas após o plaqueamento celular

+: avaliação visual das células uNK viáveis mantidas aderidas após substituição do meio de cultivo.

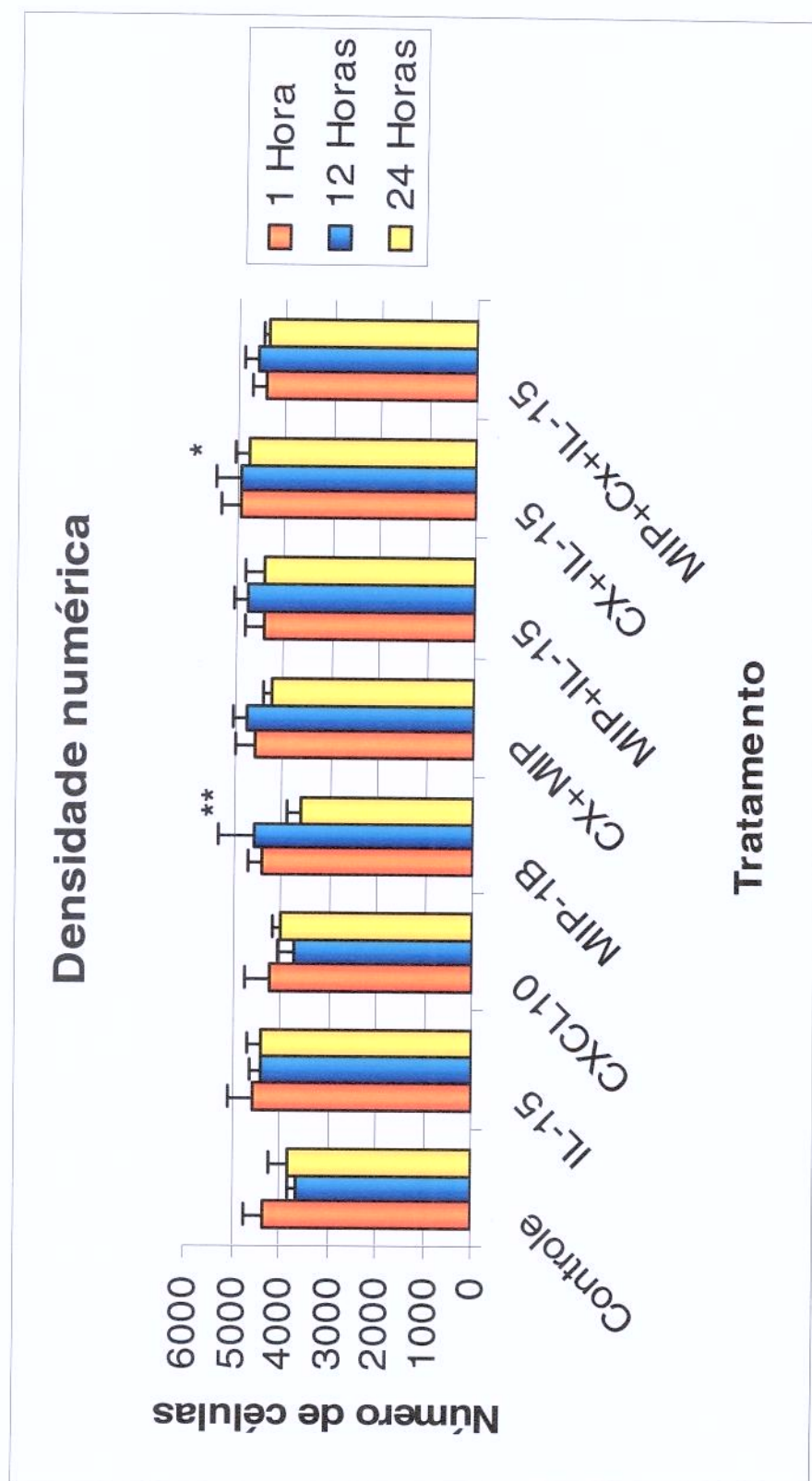
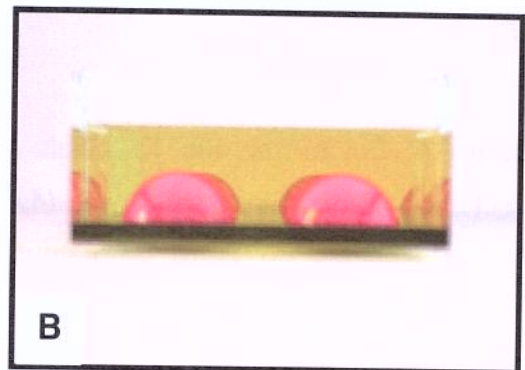
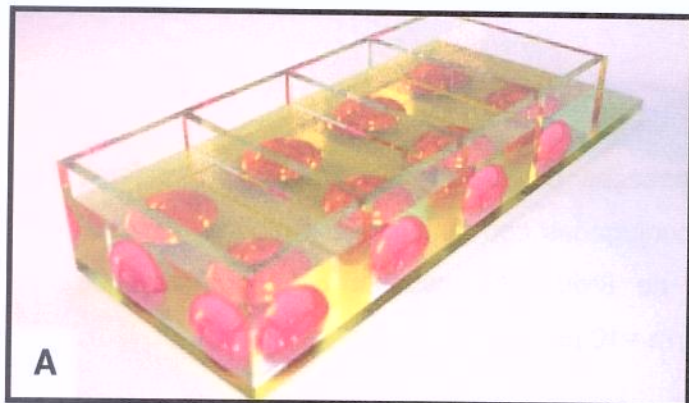


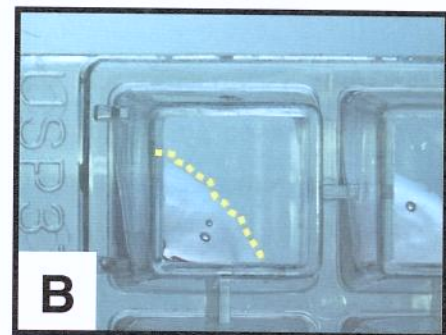
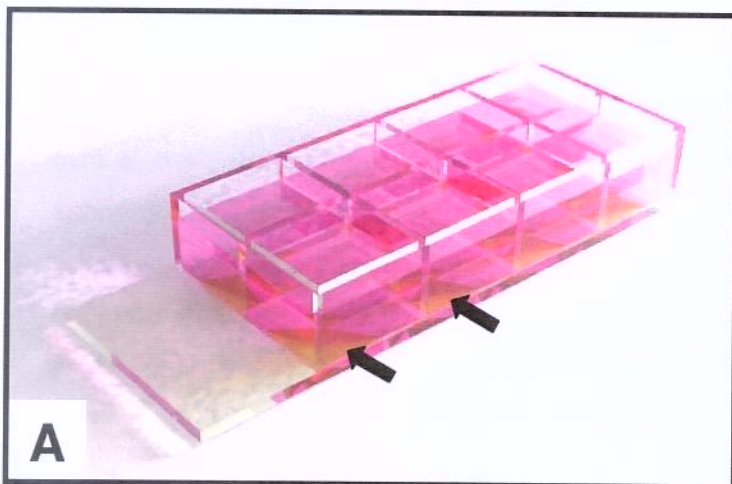
Gráfico 1 - Histograma da densidade numérica de células uNK de camundongos viáveis após 1, 12 e 24h mantidas em cultivo com meio contendo IL-15, MIP (MIP-1β) e CX (CXCL-10).

*: Densidade numérica significativamente maior que o observado no controle

**: Tendência a redução quando comparado ao cultivo 24h com CXCL10 + IL-15



Figuras 2A,B: (A) Desenho ilustrativo de uma lâmina com quatro câmaras de cultivo em perspectiva mostrando as micro-gotas (em rosa) contendo as células em cultivo cobertas com óleo mineral e, (B) vista lateral das micro-gotas cobertas com óleo de parafina (em amarelo) em uma das câmaras .



Figuras 3A,B. A) Esquema ilustrativo em perspectiva da lâmina com 8 câmaras de cultivo. A seta indica o ágar (amarelo) depositado de forma inclinada em um dos cantos das câmaras e recoberto com meio de cultura (em rosa). Em (B) Fotografia em vista superior de uma câmara mostrando no seu interior o ágar num dos cantos e o seu limite (em amarelo).

Figura 4: Fotomicrografia de célula uNK (cabeças de setas) associadas com esferas CELLection Biotin Binder Kit Dynal ($4,5\mu\text{m}$), conjugadas com lectina DBA biotinada (seta). Células isoladas do útero de camundongo no 8ºdg. Microscopia DIC (contraste de interferência diferencial)-Nikon Eclipse 800. Barra = $10\mu\text{m}$.

Figura 5: Fotomicrografia de célula uNK (cabeças de setas) associadas com esferas (seta) BioEstapor Merk ($2,37\mu\text{m}$), conjugadas com lectina DBA biotinada. Células isoladas do útero de camundongo no 8ºdg. Microscopia DIC, Nikon Eclipse 800. Barra = $10\mu\text{m}$.

Figuras 6-9: Fotomicrografia de células uNK isoladas de camundongo em cultivo observadas a fresco em microscopia DIC. Em (6) observar a presença de células aderidas em pequena quantidade na superfície da placa em cultura controle após 48h da semeadura. Em (7) notar a maior proporção de células aderidas quando cultivadas durante 48h em placa previamente recoberta com fibronectina, em relação àquelas cultivadas em laminina (8) e colágeno tipo I (9). Microscópio invertido Olympus IX71. Barras = $30\mu\text{m}$.

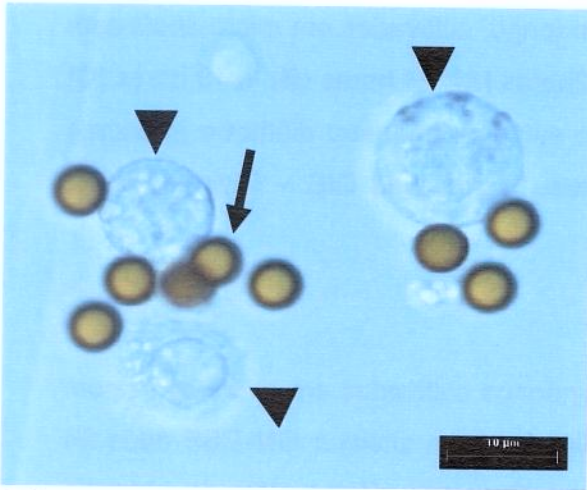


Fig 4

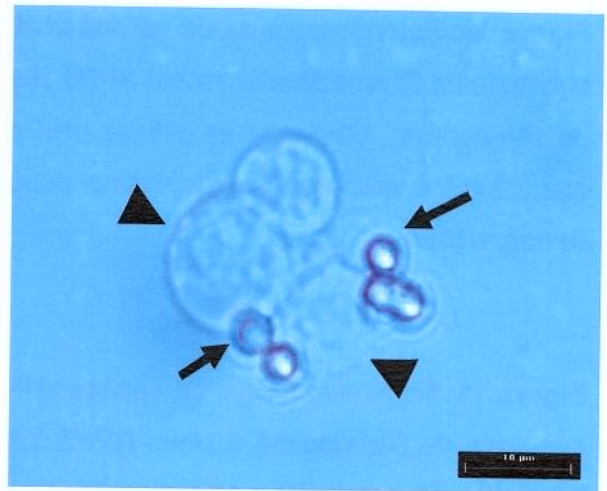


Fig 5

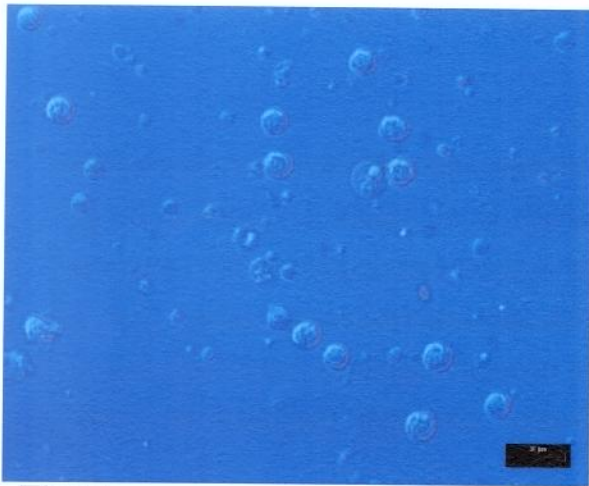


Fig 6

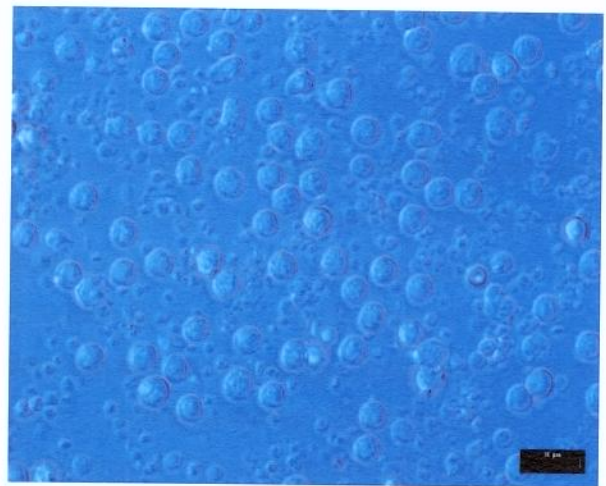


Fig 7

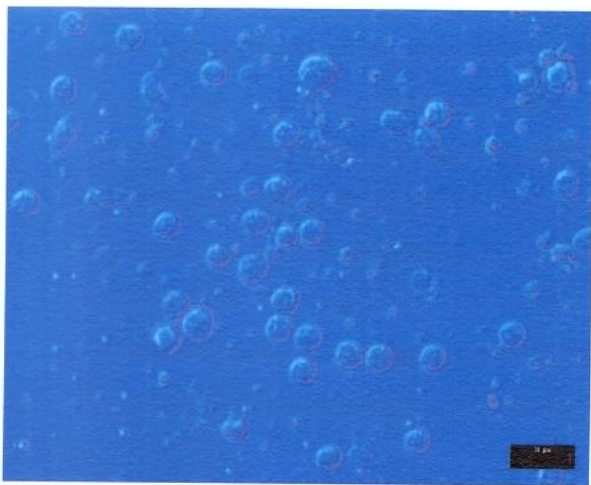


Fig 8

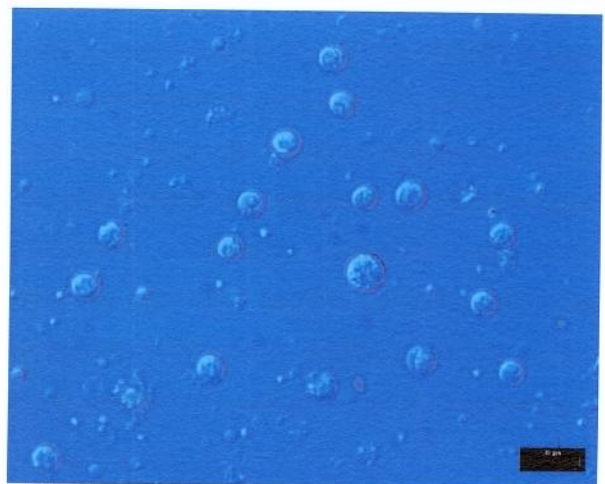


Fig 9

Figura 10: Fotomicrografias de células uNK de camundongo, cultivadas em *micro-spots* com substrato de fibronectina em meio RPMI 1640 após 12 horas **(A)**; 24 horas **(B)** e 48 horas **(C)** da semeadura. Observar as células uNK de formato esférico, pequeno diâmetro (menores que 10µm) e grânulos no citoplasma pouco evidentes. Microscopia DIC – Olympus IX71. Barras = 10µm.

Figura 11: Fotomicrografias de células uNK de camundongo cultivadas em *micro-spots* com substrato de fibronectina e meio RPMI 1640 condicionado com citocina GM-CSF após 24 horas **(A)**, 48 horas **(B)** e seis dias **(C)** da semeadura. Observar células uNK de pequeno diâmetro (menores que 10µm), de formato esférico e grânulos no citoplasma pouco evidentes. Hemácias e restos celulares (cabeças de seta). Microscopia DIC – Olympus IX7. Barras = 10µm.

Figura 12: Fotomicrografias de células uNK de camundongo, cultivadas em *micro-spots* com substrato de fibronectina e meio RPMI 1640 condicionado com citocina IL-2 após 24 horas **(A)**, 48 horas **(B)** e seis dias **(C)** da semeadura. Notar a presença de células uNK maiores (diâmetro ~10µm) com grânulos citoplasmáticos já nos períodos iniciais de cultivo. Com o avanço do período a maioria das células apresentavam pequeno diâmetro (menor que 10µm) e poucos grânulos citoplasmáticos. Hemácias e restos celulares (cabeças de seta). Microscopia DIC – Olympus IX7. Barra = 10µm.

Figura 13: Fotomicrografias de células uNK de camundongo, cultivadas em *micro-spots* com substrato de fibronectina e meio RPMI 1640 condicionadas com IL-15. **(A)** A maioria das células após 24 horas da semeadura apresentam um diâmetro igual ou maior que 10µm, com citoplasma repleto de grânulos (seta) e frequentemente apresentando projeções citoplasmáticas (cabeça de seta). **(B)** Com 48 horas de cultivo a maioria das células apresentam diâmetro avantajado, com citoplasma repleto de grânulos (setas) e inúmeras projeções citoplasmáticas (cabeças de seta). **(C)** após seis dias de cultivo as células estão em menor quantidade, mas estas apresentam diâmetro grande e grânulos citoplasmáticos. Hemácias e restos celulares (cabeças de seta). Microscopia DIC – Olympus IX7. Barras = 10µm.

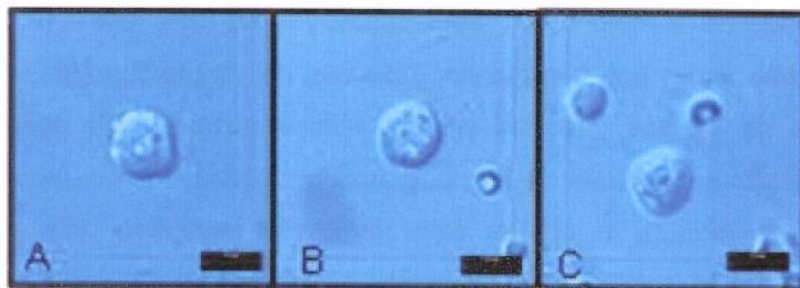


Fig 10

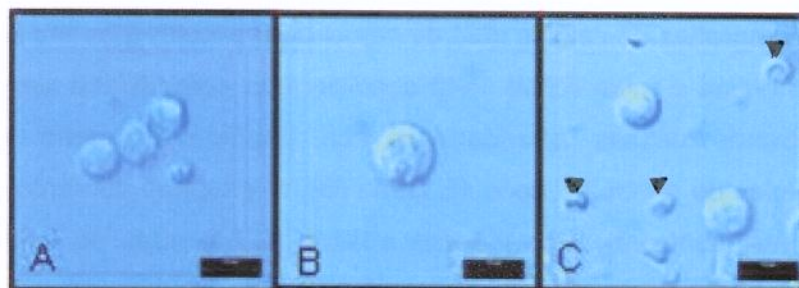


Fig 11

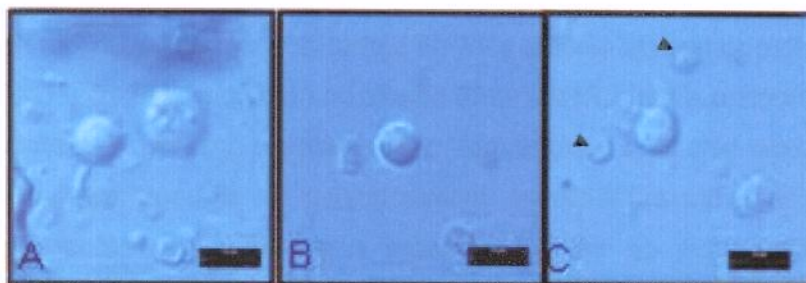


Fig 12

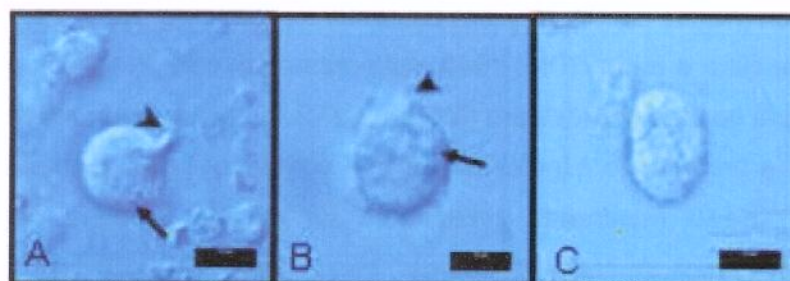


Fig 13

Figura 14: Fotomicrografias de células uNK de camundongo, cultivadas em *micro-spots* com substrato de fibronectina e meio RPMI 1640 condicionadas com CXCL10. **(A)** após uma hora, as células uNK com o seu formato arredondado, de dimensões iguais ou inferiores a 10µm e presença de poucos grânulos citoplasmáticos (setas); **(B)** após 12 horas há considerável aumento no volume celular e grânulos citoplasmáticos mais evidentes de diferentes diâmetros (setas), e células com dimensões variadas. **(C)** após 24 horas predominância de células menores, semelhantes ao observado no controle. Presença de restos celulares (setas). Microscopia DIC – Olympus IX71. Barras = 10µm.

Figura 15: Fotomicrografias de células uNK de camundongo, cultivadas em *micro-spots* com substrato de fibronectina e meio RPMI 1640 condicionada com MIP-1β após uma hora de cultivo **(A)** mostrando células arredondadas, de pequeno diâmetro e agranulares, semelhante às células do controle; após 12 horas **(B)** há pequeno aumento no diâmetro de algumas células mas sem grandes variações quando comparadas ao controle, após 24 horas **(C)** há predominância de células pequenas. Microscopia DIC – Olympus IX71. Barras = 10µm

Figura 16: Fotomicrografias de células uNK de camundongo, cultivadas em *micro-spots* com substrato de fibronectina e meio RPMI 1640 condicionadas com MIP-1β e CXCL10. **(A)** após uma hora mostrando células arredondadas de pequeno diâmetro e agranulares; **(B)** após 12 horas apresentando um aumento no volume celular de algumas células e, **(C)** após 24 horas com predominância de células menores e presença de restos celulares (setas). Microscopia DIC – Olympus IX71. Barras = 10µm

Figura 17: Fotomicrografias de células uNK de camundongo, cultivadas em *micro-spots* com substrato de fibronectina e meio RPMI 1640 suplementadas com IL-15 e a quimiocina MIP-1β em **(A)** mostrando células grandes em **(B)** com CXCL10 ocorrendo predomínio de células de maior diâmetro e granulação citoplasmática em comparação as figuras A e C e em **(C)** com MIP-1β e CXCL10 mostrando predomínio de células grandes com granulações citoplasmáticas e presença de restos celulares. Microscopia DIC – Olympus IX71. Barras = 10µm.

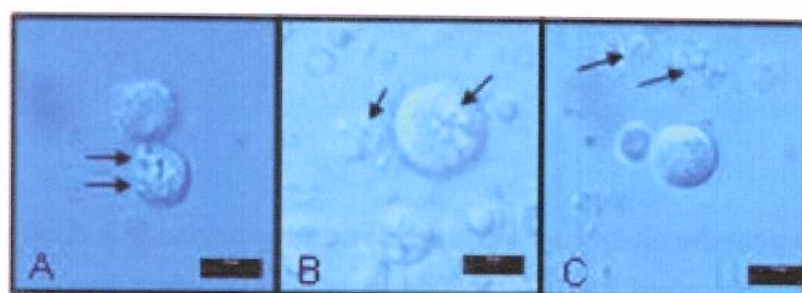


Fig 14

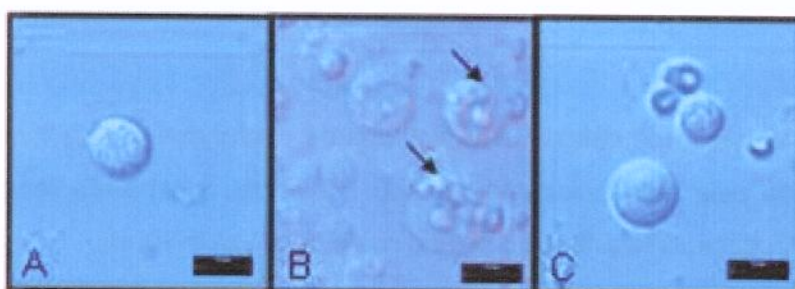


Fig 15

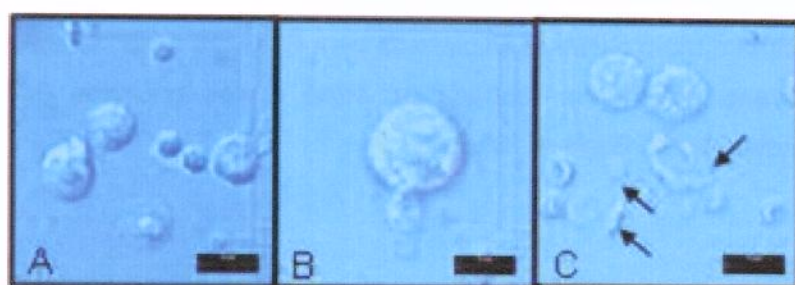


Fig 16

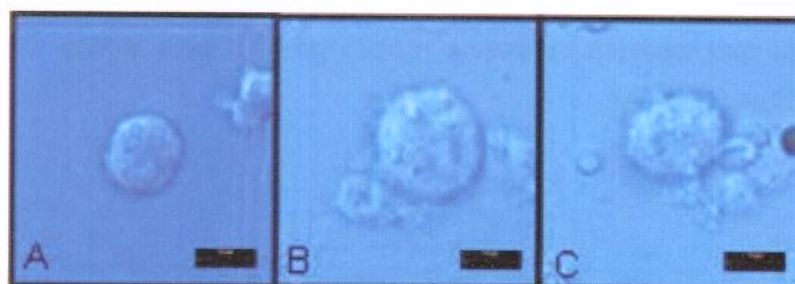


Fig 17

Figura 18: Fotomicrografia de células uNK isoladas de camundongo e cultivadas em *micro-spots* com fibronectina e meio RPMI 1640 (Controle) após 12 horas mostrando reação positiva na superfície celular, porém ausente no citoplasma. Citoquímica com lectina DBA. Barra = 10µm

Figura 19: Fotomicrografia de células uNK isoladas de camundongo e cultivadas em *micro-spots* com fibronectina e meio RPMI condicionada pela IL-15 após 12 horas. Notar reação positiva na membrana plasmática e nos grânulos (seta) de células grandes. Citoquímica com lectina DBA. Barra = 10µm

Figura 20: Fotomicrografia de células uNK isoladas de camundongo e cultivadas em *micro-spots* condicionados pela quimiocina MIP-1 β por 12 horas, mostrando reação positiva da membrana citoplasmática. Citoquímica com lectina DBA. Barra = 10µm

Figura 21: Fotomicrografia de células uNK isoladas de camundongo e cultivadas em *micro-spots* com fibronectina e meio RPMI condicionada pela CXCL10 após 12 horas. Notar reação positiva na membrana plasmática (cabeça de seta) e nos grânulos (seta) de células. Citoquímica com lectina DBA. Barra = 10µm

Figura 22: Fotomicrografia de células uNK isoladas de camundongo e cultivadas em *micro-spots* com fibronectina e meio RPMI condicionada pela CXCL10 após 24 horas. Notar reação positiva na membrana plasmática das células. Notar a presença de fragmento celular (seta), indicado pela seta, que também apresenta reação positiva pela lectina DBA. Citoquímica com lectina DBA. Barra = 10µm

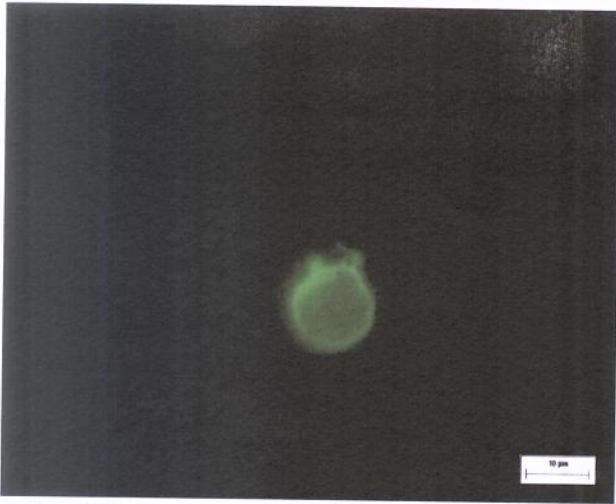


Fig 18

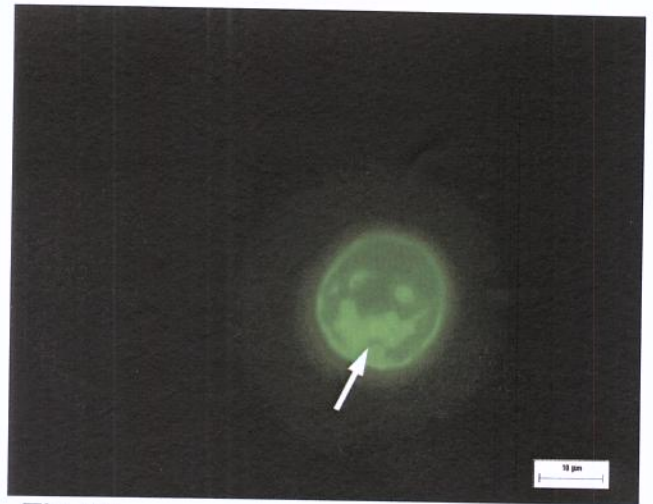


Fig 19

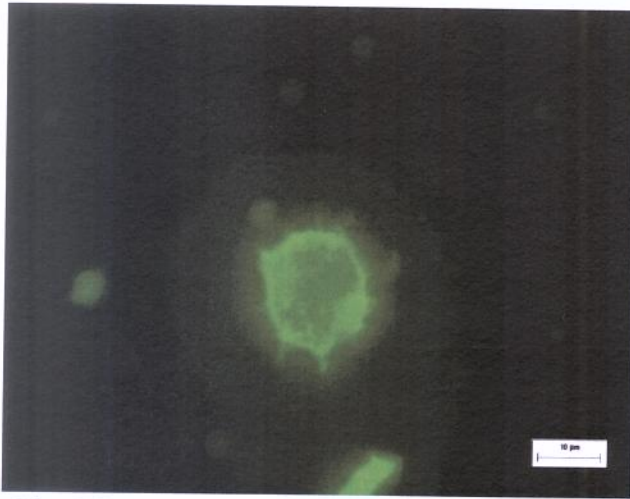


Fig 20

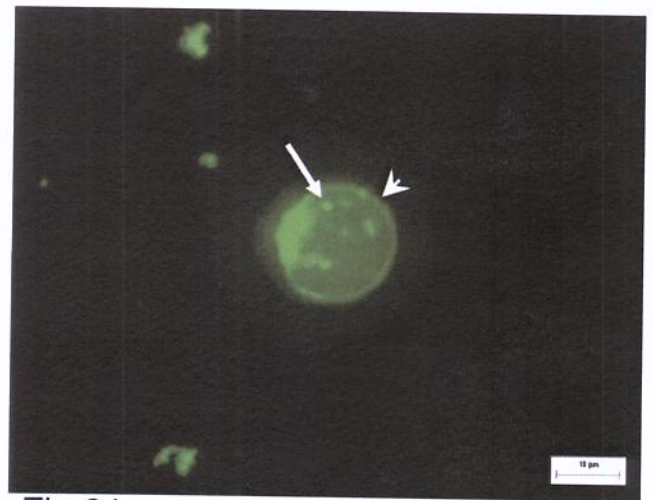


Fig 21

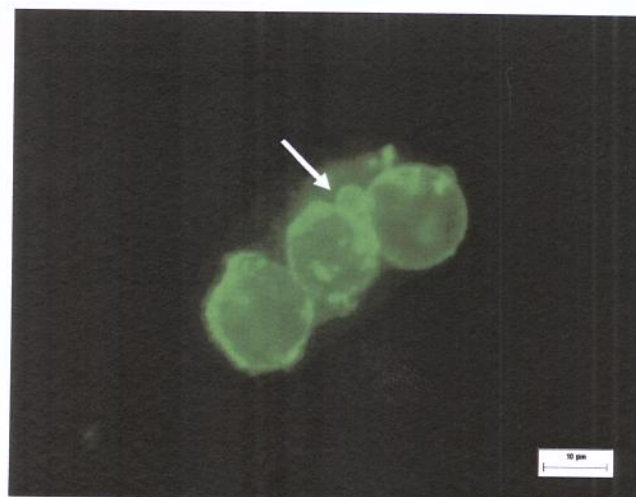
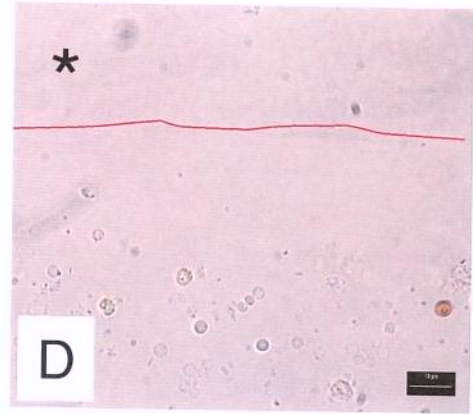
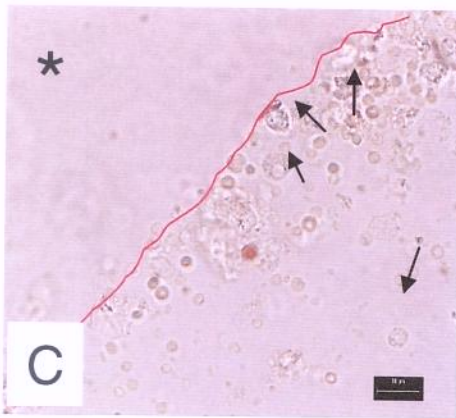
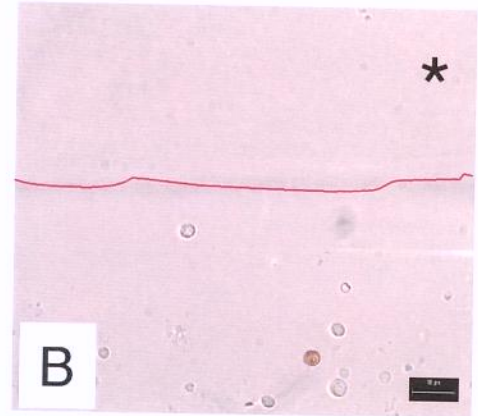


Fig 22

Figura 23: Fotomicrografias de células uNK de camundongo cultivadas por 12 horas no teste de quimiotaxia conforme ilustrado na figura 3a. A linha vermelha representa o limite entre o meio de cultura contendo as células e o ágar contendo as quimiocinas (*). **(A)** Controle – células plaqueadas em substrato de fibronectina e com meio de cultura contendo IL-15, sem a adição de quimiocinas no ágar mostrando uma distribuição dispersa e poucas células junto ao ágar. **(B)** Células plaqueadas em substrato de fibronectina e com meio de cultura contendo IL-15 e ágar contendo CXCL10, mostrando células dispersas e pouco concentradas junto ao ágar. **(C)** células plaqueadas em substrato de fibronectina e com meio de cultura contendo IL-15 e ágar contendo MIP-1 β mostrando a presença de grande quantidade de células (setas) junto às bordas do ágar, devido a migração das células em direção ao gradiente de concentração de MIP-1 β . **(D)** Idem C, com o ágar contendo MIP-1 β e CXCL10, com poucas células junto à área limite do ágar. Barras = 10 μ m



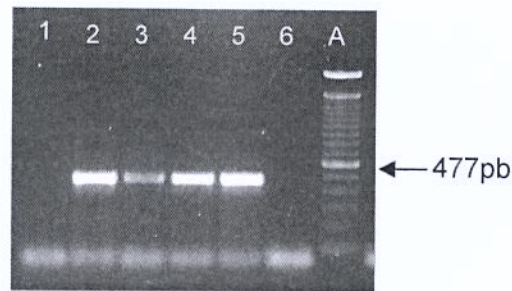


Figura 24: Gel de agarose (1%) da reação de PCR de β -actina (1-6) à 59°C. (1) Reação de PCR utilizando 1000 linfócitos, (2) utilizando $5 \cdot 10^3$ linfócitos e (3 - 5) utilizando $5 \cdot 10^3$ células uNK. Controle negativo em 6. (A) Track I 100bp *DNA Ladder*.

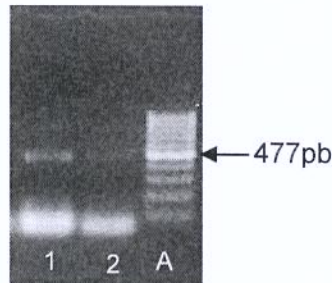


Figura 25: Gel de agarose (1%) da reação de PCR de β -actina à 59°C, resultante de 700ng (1) e 500ng (2) de cDNA. Notar que a expressão do transcriptoma é possível de ser detectada a partir de 500ng nas condições de amplificação adotadas (A) Track I 100bp *DNA Ladder*.

8. Referências Bibliográficas

- ABRAHAMSOHN PA, ZORN TM. 1993. Implantation and decidualization in rodents. **J Exp Zool.** **266**: 603-28.
- ANCELIN M, BUTEAU-LOZANO H, MEDURI G, OSBORNE-PELLEGRIN M, SORDELLO S, PLOUET J, PERROT-APPLANAT M. 2002. A dynamic shift of VEGF isoforms with a transient and selective progesterone-induced expression of VEGF189 regulates angiogenesis and vascular permeability in human uterus. **Proc Natl Acad Sci USA.** **99**: 6023-28.
- ANDERSON SK, ORTALDO JR, MCVICAR DW. 2001. The ever-expanding Ly49 gene family: repertoire and signaling. **Immunol Rev.** **181**: 79-89.
- APLIN JD. 1997. Adhesion molecules in implantation. **Rev Reprod.** **2**: 84-93
- ASHKAR AA, CROY BA. 1999 Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. **Biol Reprod.** **61**: 493-502.
- ASHKAR A, SANTO JP, CROY BA. 2000. Interferon- γ contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J Exp Med.** **192**: 259-69.
- ASHKAR AA, BLACK GP, WEI Q, HE H, LIANG L, HEAD JR, CROY BA. 2003. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. **J Immunol.** **171**: 2937-44.
- BABIARZ B, ROMAGNANO L, AFONSO S, KURILA G. 1996. Localization and expression of fibronectin during mouse decidualization in vitro: mechanisms of cell: matrix interactions. **Dev Dyn.** **206**: 330-42
- BAGGIOLINI M. Chemokines and leukocyte traffic. 1998. **Nature.** **392**: 565-68.
- BARBER EM, POLLARD JW. 2003. The uterine NK cell population requires IL-15 but these cells are not required for pregnancy nor the resolution of a *Listeria monocytogenes* infection. **J Immunol.** **171**: 37-46
- BAZAN JF, BACON KB, HARDMAN G, WANG W, SOO K, ROSSI D, GREAVES DR, ZLOTNIK A, SCHALL TJ. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. **Nature.** **385**: 640-4
- BIANCO JER. 2006. **O modelo de pseudogestação em camundongos para o estudo *in situ* das células natural killer uterinas.** Tese (mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Instituto de Biologia- Universidade Estadual de Campinas.
- BURROWS TD, KING A, LOKE YW. 1993. Expression of adhesion molecules by human decidual large granular lymphocytes. **Cell Immunol.** **147**: 81-94.
- BURROWS TD, KING A, LOKE YW. 1995. The roles of integrins in adhesion of decidual NK cells to extracellular matrix and decidual stromal cells. **Cell Immunol.** **166**: 53-61
- BUTCHER EC, PICKER LJ. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. **Science.** **272**: 60-6

- CAMPBELL JJ, BUTCHER EC. 2000. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. **Curr Opin Immunol.** **12**: 336-41
- CAMPBELL JJ, QIN S, UNUTMAZ D, SOLER D, MURPHY KE, HODGE MR, WU L, BUTCHER EC. 2001. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. **J Immunol.** **166**: 6477-82.
- CARBONE K, PINTO NM, ABRAHAMSOHN PA, ZORN TM. 2006. Arrangement and fine structure of collagen fibrils in the decidualized mouse endometrium. **Microsc Res Tech.** **69**: 36-45.
- CARSON WE, GIRI JG, LINDEMANN MJ, LINETT ML, AHDIEH M, PAXTON R, ANDERSON D, EISENMANN J, GRABSTEIN K, CALIGIURI MA. 1994. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of IL-2 receptor. **J Exp Med.** **180**: 1395-403
- CASTRO-RENDON WA, CASTRO-ALVAREZ JF, GUZMAN-MARTINEZ C, BUENO-SANCHEZ JC. 2006. Blastocyst-endometrium interaction: intertwining a cytokine network. **Braz J Med Biol Res.** **39**: 1373-85.
- CHANTAKRU S, MILLER C, ROACH LE, KUZIEL WA, MAEDA N, WANG WC, EVANS SS, CROY BA. 2002. Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. **J Immunol.** **168**: 22-8
- CHANTAKRU S, WANG WC, VAN DEN HEUVEL M, BASHAR S, SIMPSON A, CHEN Q, CROY BA, EVANS SS. 2003. Coordinate regulation of lymphocyte-endothelial interactions by pregnancy-associated hormones. **J Immunol.** **171**: 4011-9
- CHANUT-DELALANDE H, FICHARD A, BERNOCCHIO S, GARRONE R, HULMES DJ, RUGGIERO F. 2001. Control of heterotypic fibril formation by collagen V is determined by chain stoichiometry. **J Biol Chem.** **276**: 24352-9.
- CHEN HL, KAMATH R, PACE JL, RUSSELL SW, HUNT JS. 1996. Expression of the interferon -gamma receptor gene in mouse placentas is related to stage of gestation and is restricted to specific subpopulations of trophoblast cells. **Placenta.** **15**: 109-21.
- COLOGNATO H, YURCHENCO PD. 2000. Form and function: the laminin family of heterotrimers. **Dev Dyn.** **218**: 213-34.
- CONSTANTIN G, MAJEED M, GIAGULLI C, PICCIO L, KIM JY, BUTCHER EC, LAUDANNA C. 2000. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. **Immunity.** **13**: 759-69.
- COOPER MA, FEHNIGER TA, TURNER SC, CHEN KS, GHAHERI BA, GHAYUR T, CARSON WE, CALIGIURI MA. 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. **Blood.** **97**: 3146-51
- COPI C. 2006 **Efeito da lesão embrionária nos grânulos lisossomosecretórios das células natural killer uterinas de camundongos.** Tese (mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Instituto de Biologia- Universidade Estadual de Campinas.

- CRELLIN NK, GARCIA RV, LEVINGS MK. 2007 Flow cytometry-based methods for studying signaling in human CD4+CD25+FOXP3+ T regulatory cells. **J Immunol Methods**. **324**: 92-104.
- CROY BA, REED N, MALASHENKO BA, KIM K, KWON BS. 1991. Demonstration of YAC target cell lysis by murine granulated metrial gland cells. **Cell Immunol**. **133**: 116-26
- CROY BA, KISO Y. 1993. Granulated metrial gland cells: a natural killer cell subset of pregnant murine uterus. **Microsc Res Tech**. **25**: 189-200
- CROY BA, MCBEY BA, VILLENEUVE LA, KUSAKABE K, KISO Y, VAN DEN HEUVEL M. 1997. Characterization of the cells that migrate from metrial glands of the pregnant mouse uterus during explant culture. **J Reprod Immunol**. **32**: 241-63.
- CROY BA. 1999. Hasn't the time come to replace the term the metrial gland? **J Reprod Immunol**. **42**: 127-9.
- CROY BA, HE H, EADEG S, WEI Q, MCCARTNEY D, ZHANG J, BORZYCHOWSKI A, ASHKAR AA, BLACK GP, EVANS SS, HEUVEL M, PAFFARO JR, VA, YAMADA AT. 2003a. Uterine Natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modeling. **Reproduction**. **126**: 149-60
- CROY BA, ESADEG S, CHANTAKRU S, VAN DEN HEUVEL M, PAFFARO VA, HE H, BLACK GP, ASHKAR AA, KISO Y, ZHANG J. 2003b. 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**. **59**: 175-91
- DALBETH N, CALLAN MF. 2002. A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. **Arthritis Rheum**. **46**: 1763-72
- DALBETH N, GUNDLE R, DAVIES RJ, LEE YC, MCMICHAEL AJ, CALLAN MF. 2004. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. **J Immunol**. **173**: 6418-26.
- DE MORAES AA, HANSEN PJ. 1997. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes development of in vitro produced bovine embryos. **Biol Reprod**. **57**:1060-5.
- DEVICO AL, GALLO RC. 2004. Control of HIV-1 infection by soluble factors of the immune response. **Nat Rev Microbiol**. **2**: 401-13.
- DIMITRIADIS E, WHITE CA, JONES RL, SALAMONSEN LA. 2005. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. **Hum Reprod Update**. **11**: 613-30.
- DOSIOU C, GIUDICE LC. 2005. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. **Endocr Rev**. **26**: 44-62.
- DRAKES ML, ZAHORCHAK AF, TAKAYAMA T, LU L, THOMSON AW. 2000. Chemokine and chemokine receptor expression by liver-derived dendritic cells: MIP-1alpha

- production is induced by bacterial lipopolysaccharide and interaction with allogeneic T cells. **Transpl Immunol.** **8:** 17-29.
- DUQUE N, GÓMEZ-GUERRERO C, EGIDO J. 1997. Interaction of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor-kappa B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-inducible protein 10. **J Immunol.** **159:** 3474-82.
- ENGEL J, ODERMATT E, ENGEL A, MADRI JA, FURTHMAYR H, ROHDE H, TIMPL R. 1981. Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. **J Mol Biol.** **150:** 97-120.
- FAUCE SR, YANG OO, EFFROS RB. 2007 Autologous CD4/CD8 co-culture assay: A physiologically-relevant composite measure of CD8(+) T lymphocyte function in HIV-infected persons. **J Immunol Methods.** **327:** 75-81.
- FAZLEABAS AT, KIM JJ, STRAKOVA Z. 2004. Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment. **Placenta.** **25:** 26-31.
- FONSECA PM. 2000. **Efeito das condições de cultivo primário sobre células NK uterinas (NKu) e avaliação da viabilidade *in vitro*.** Tese (mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Instituto de Biologia- Universidade Estadual de Campinas.
- FRESHNEY I. 2000. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, *Wiley-Liss*; 4th edition.
- FREY M, PACKIANATHAN NB, FEHNIGER TA, ROSS ME, WANG WC, STEWART CC, CALIGIURI MA, EVANS SS. 1998. Differential expression and function of L-selectin on CD56^{bright} and CD56^{dim} natural killer cell subsets. **J Immunol.** **161:** 400-8
- GAGA V, REMOLI ME, GIACOMINI E, GAGLIARDI MC, LANDE R, SEVERA M, GRILLOT R, COCCIA EM. 2007. *In vitro* infection of human dendritic cells by *Aspergillus fumigatus* conidia triggers the secretion of chemokines for neutrophil and Th1 lymphocyte recruitment. **Microbes Infect.** **9:** 971-80.
- GARCIA-LLORET MI, MORRISH DW, WEGMANN TG, HONORE L, TURNER AR, GUILBERT LJ. 1994. Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. **Exp Cell Res.** **214:** 46-54.
- GATTASS CR, KING LB, LUSTER AD, ASHWELL JD. 1994. Constitutive expression of interferon gamma-inducible protein 10 in lymphoid organs and inducible expression in T cells and thymocytes. **J Exp Med.** **179:** 1373-8.
- GIRI JG, AHDIEH M, EISENMAN J, SHANEBECK K, GRABSTEIN K, KUMAKI S, NAMEN A, PARK LS, COSMAN D, ANDERSON D. 1994. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. **Embo J.** **13:** 2822-30.
- GUIMOND MJ, LUROSS JA, WANG B, TERHORST C, DANIAL S, CROY BA. 1997. Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in Tg26 mice. **Biol Reprod.** **56:** 169-79

- GUIMOND MJ, 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.** **187**: 217-23
- HANNAN NJ, JONES RL, CRITCHLEY HOD, KOVACS GJ, ROGERS PAW, AFFANDI B, SALAMONSSSEN LA. 2004. Coexpression of fractalkine and its receptor in normal human endometrium from users of progestin-only contraception supports a role for fractalkine in leukocyte recruitment and endometrial remodeling. **J Clin Endocrinol Metab.** **89**: 6119-29
- HAZLETT LD, LI Q, LIU J, MCCLELLAN S, DU W, BARRETT RP. 2007. NKT cells are critical to initiate an inflammatory response after *Pseudomonas aeruginosa* ocular infection in susceptible mice. **J Immunol.** **179**: 1138-46.
- HEAD JR. 1996. Uterine natural killer cells during pregnancy in rodents. **Nat Immunol.** **15**: 7-21
- HELLER EA, LIU E, TAGER AM, YUAN Q, LIN AY, AHLUWALIA N, JONES K, KOEHN SL, LOK VM, AIKAWA E, MOORE KJ, LUSTER AD, GERSZTEN RE. 2006. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. **Circulation.** **113**: 2301-12.
- HENNEKEN M, DORNER T, BURMESTER GR, BEREK C. 2005. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res Ther.** **7**: R1001-13.
- HOGAN B, COSTANTINI F, LACY E. 1986. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory CSA.** USA. 103p.
- HUANG Z, HA GK, PETITTO JM. 2007. IL-15 and IL-15R alpha gene deletion: effects on T lymphocyte trafficking and the microglial and neuronal responses to facial nerve axotomy. **Neurosci Lett.** **417**: 160-64.
- HUNT JS, ROBY KF. 1994. Implantation factors. **Clin Obstet Gynecol.** **37**: 635-45.
- INNGJERDINGEN M, ROLSTAD B, RYAN JC. 2003. Activating and inhibitory Ly49 receptors modulate NK cell chemotaxis to CXC chemokine ligand (CXCL) 10 and CXCL12. **J Immunol.** **171**: 2889-95
- JACOBS R, HINTZEN G, KEMPER A, BEUL K, KEMPF S, BEHRENS G, SYKORA KW, SCHMIDT RE. 2001. CD56^{bright} cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. **Eur J Immunol.** **31**: 3121-7
- JASPER MJ, ROBERTSON SA, VAN DER HOEK KH, BONELLO N, BRANNSTROM M, NORMAN RJ. 2000. Characterization of ovarian function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. **Biol Reprod.** **62**: 704-13
- JOKHI PP, KING A, SHARKEY AM, SMITH SK, LOKE YW. 1994. Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. **J Immunol.** **153**: 4427-35.

- JONES RL, HANNAN NJ, KAITU'U TJ, ZHANG J, SALAMONSEN LA. 2004. Identification of chemokines important for leucocytes recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. **J Clin Endocrinol Metab.** **89**: 6155-67.
- KAGI D, LEDERMANN B, BURKI K, SELLER P, ODERMATT B, OLSON KJ, PODACKER, ZINKERNAGEL RM. 1994. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killers cells in greatly impaired in perforin deficient mice. **Nature.** **369**: 31-7.
- KATOH S, FUKUSHIMA K, MATSUMOTO N, EHARA N, MATSUMOTO K, YAMAUCHI A, HIRASHIMA M. 2005. Accumulation of CXCR3-expressing eosinophils and increased concentration of its ligands (IP10 and Mig) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with chronic eosinophilic pneumonia. **Int Arch Allergy Immunol.** **137**: 229-35.
- KELLY RW, KING AE, CRITCHLEY HO. 2001. Cytokine control in human endometrium. **Reproduction.** **121**:3-19.
- KENNEDY MK, GLACCUM M, BROWN SN, BUTZ EA, VINEY JL, EMBERS M, MATSUKI N, CHARRIER K, SEDGER L, WILLIS CR, BRASEL K, MORRISSEY PJ, STOCKING K, SCHUH JC, JOYCE S, PESCHON JJ. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. **J Exp Med.** **191**: 771-80
- KIMBER SJ. 2005. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. **Reproduction.** **130**:131-45.
- KING A, JOKHI PP, SMITH SK, SHARKEY AM, LOKE YW. 1995. Screening for cytokine mRNA in human villous and extravillous trophoblasts using the reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Cytokine.** **7**: 364-71.
- KING A. 2000. Uterine leukocytes and decidualization. **Hum Reprod Up.** **6**:28-36
- KISHIMOTO T, TAGA T, AKIRA S. 1994. Cytokine signal transduction. **Cell.** **76**: 253-62.
- KITAYA K, YASUDA I, YAGI Y, TADA S, FUSHIKI S, HONJO H. 2000. IL-15 expression at human endometrium and decidua. **Biol Reprod.** **63**: 683-7
- KITAYA K, NAKAYAMA T, OKUBO T, KUROBOSHI H, FUSHIKI S, HONJO H. 2003. Expression of macrophage inflammatory protein-1beta in human endometrium: its role in endometrial recruitment of natural killer cells. **J Clin Endocrinol Metab.** **88**: 1809-14.
- KOOPMAN LA, KOPCOW HD, RYBALOV B, BOYSON JE, ORANGE JS, SCHATZ F, MASCH R, LOCKWOOD CJ, SCHACHTER AD, PARK PJ, STROMINGER JL. 2003. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. **J Exp Med.** **198**: 1201-12.
- KORGUN ET, CAYLI S, ASAR M, DEMIR R. 2007. Distribution of laminin, vimentin and desmin in the rat uterus during initial stages of implantation. **J Mol Histol.** **38**: 253-60.
- LAVERGNE E, COMBADIÈRE B, BONDUELLE O, IGA M, GAO JL, MAHAO M, BOISSONNAS A, MURPHY PM, DEBRÉ P, COMBADIÈRE C. 2003. Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. **Cancer Res.** **63**: 7468-74.

- LAZZERI E, ROTONDI M, MAZZINGHI B, LASAGNI L, BUONAMANO A, ROSATI A, PRADELLA F, FOSSOMBRONI V, LA VILLA G, GACCI M, BERTONI E, SERIO M, SALVADORI M, ROMAGNANI P. 2005. High CXCL10 expression in rejected kidneys and predictive role of pretransplant serum CXCL10 for acute rejection and chronic allograft nephropathy. **Transplantation**. **79**: 1215-20
- LIMA EAA. 2002. **Padronização do método de isolamento de células Natural Killer uterinas (NKu) de camundongos através de biomagnetos conjugados com lectinas Dolichus biflorus (DBA)**. Tese (mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Instituto de Biologia- Universidade Estadual de Campinas.
- LINNEMEYER PA, HAMILTON MS. 1990. A monoclonal antibody, 4H12, recognizes a surface antigen found on granulated metrial gland cells in the murine decidua. **J Reprod Immunol**. **17**: 279-94.
- LONG EO, BURSHTYN DN, CLARK WP, PERUZZI M, RAJAGOPALAN S, ROJO S, WAGTMANN N, WINTER CC. 1997. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. **Immunol Rev**. **155**: 135-44
- LUSTER AD, RAVETCH JV. 1987. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). **J Exp Med**. **166**: 1084-97.
- LUTHER SA, CYSTER JG. 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. **Nat Immunol**. **2**: 102-7.
- LYON M, RUSHTON G, ASKARI JA, HUMPHRIES MJ, GALLAGHER JT. 2000. Elucidation of the structural features of heparan sulfate important for interaction with the Hep-2 domain of fibronectin. **J Biol Chem**. **275**: 4599-606.
- MACKAY CR. 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. **Nat Immunol**. **2**: 95-101.
- MAGHAZACHI AA, AL-AOUKATY A, SCHALL TJ. 1994. C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins. **J Immunol**. **153**: 4969-77.
- MAGHAZACHI AA. 2005. Compartmentalization of human natural killer cells. **Mol Immunol**. **42**: 523-9.
- MANGALE SS, REDDY KV. 2007. Expression pattern of integrins and their ligands in mouse feto-maternal tissues during pregnancy. **Reprod Fertil Dev**. **19**: 452-60.
- MAURER M, VON STEBUT E. 2004. Macrophage inflammatory protein-1. **Int J Biochem Cell Biol**. **36**: 1882-6.
- MENTEN P, WUYTS A, VAN DAMME J. 2002. Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine Growth Factor Rev**. **13**: 455-81.
- MIYAJIMA A, HARA T, KITAMURA T. 1992. Common subunits of cytokine receptors and the functional redundancy of cytokines. **Trends Biochem Sci**. **17**: 378-82.

- MOFFETT-KING A. 2002. Natural killer cells and pregnancy. **Nat Rev Immunol.** **2**: 656-63
- MONTECINO-RODRIGUEZ E, DORSHKIND K. 2006. Stromal cell-dependent growth of B-1 B cell progenitors in the absence of direct contact. **Nat Protoc.** **1**: 1140-4
- MUKHTAR DD, STEWART I. 1988. Migration of granulated metrial gland cells from cultured explants of mouse metrial gland tissue. **Cell Tissue Res.** **253**: 413-7.
- MUKHTAR DD, STEWART IJ, CROY BA. 1989. Leucocyte membrane antigens on mouse granulated metrial gland cells. **J Reprod Immunol.** **15**: 269-79.
- MULHOLLAND J, APLIN JD, AYAD S, HONG L, GLASSER SR. 1992. Loss of collagen type VI from rat endometrial stroma during decidualization. **Biol Reprod.** **46**:1136-43.
- MURDOCH C, FINN A. 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood.** **95**: 3032-43.
- MURDOCH C, READ RC, ZHANG Q, FINN A. 2002. Choline-binding protein A of *Streptococcus pneumoniae* elicits chemokine production and expression of intercellular adhesion molecule 1 (CD54) by human alveolar epithelial cells. **J Infect Dis.** **186**: 1253-60.
- NIEDBALA W, WEI X, LIEW FY. 2002. IL-15 induces type 1 and type 2 CD4⁺ and CD8⁺ T cells proliferation but is unable to drive cytokine production in the absence of TCR activation or IL-12 / IL-4 stimulation in vitro. **Eur J Immunol.** **32**: 341-7.
- OKADA H, NAKAJIMA T, SANEZUMI M, IKUTA A, YASUDA K, KANZAKI H. 2000. Progesterone enhances interleukin-15 production in human endometrial stromal cells in vitro. **J Clin Endocrinol Metab.** **85**: 4765-70.
- ORTALDO JR, BERE EW, HODGE D, YOUNG HA. 2001. Activating Ly-49 NK receptors: central role in cytokine and chemokine production. **J Immunol.** **166**: 4994-9.
- OTTAVIANI C, NASORRI F, BEDINI C, DE PITÀ O, GIROLOMONI G, CAVANI A. 2006. CD56^{bright} CD16⁻ NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. **Eur J Immunol.** **36**: 118-28.
- PADOVAN E, SPAGNOLI GC, FERRANTINI M, HEBERER M. 2002. IFN-alpha2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8⁺ effector T cells. **J Leukoc Biol.** **71**: 669-76.
- PAFFARO VA JR, BIZINOTTO MC, JOAZEIRO PP, YAMADA AT. 2003. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. **Placenta.** **24**: 479-88
- PANZER U, STEINMETZ OM, PAUST HJ, MEYER-SCHWESINGER C, PETERS A, TURNER JE, ZAHNER G, HEYMANN F, KURTS C, HOPFER H, HELMCHEN U, HAAG F, SCHNEIDER A, STAHL RA. 2007. Chemokine receptor CXCR3 mediates T cell recruitment and tissue injury in nephrotoxic nephritis in mice. **J Am Soc Nephrol.** **18**: 2071-84.

- PARR EL, YOUNG LH, PARR MB, YOUNG JD. 1990. Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. **J Immunol.** **145**: 2365-72.
- PARR EL, CHEN HL, PARR MB, HUNT JS. 1995. Synthesis and granular localization of tumor necrosis factor-alpha in activated NK cells in pregnant mouse uterus. **J Reprod Immunol.** **28**: 31-40
- PARR MB, TUNG HN, PARR EL. 1986. The ultrastructure of the rat primary decidual zone. **Am J Anat.** **176**: 423-36.
- PEEL S. 1989. Granulated metrial gland cells. **Adv Ana Embriol Cell Biol.** **115**: 1-112.
- PELLETIER M, GIRARD D. 2005. Interleukin-15 increases neutrophil adhesion onto human respiratory epithelial A549 cells and attracts neutrophils *in vivo*. **Clin Exp Immunol.** **141**: 315-25.
- PETKOVIC V, MOGHINI C, PAOLETTI S, UGUCCIONI M, GERBER B. 2004. I-TAC/CXCL11 is a natural antagonist for CCR5. **J Leukoc Biol.** **76**: 701-8
- PETRAGLIA F, FLORIO P, NAPPI C, GENAZZANI AR. 1996. Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms. **Endocr Rev.** **17**:156-86.
- PICKER LJ, BUTCHER EC. 1992. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. **Annu Rev Immunol.** **10**: 561-91.
- PLATT JS, HUNT JS. 1997. Isolation of INF-gamma protein and messenger RNA in cycling and pregnant mouse uteri. **J Reprod Immunol.** **34**: 61-2
- PLATT JS, HUNT JS. 1998. Interferon-gamma gene expression in cycling and pregnant mouse uterus: temporal aspects and cellular localization. **J Leukoc Biol.** **64**: 393-400.
- POPOVICI RM, KAO LC, GIUDICE LC. 2000. Discovery of new inducible genes *in vitro* decasualized human endometrial stromal cells using microarray technology. **Endocrinology.** **141**: 3510-3.
- PROCKOP DJ, KIVIRIKKO KI. 1995. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. **Annu Rev Biochem.** **64**: 403-34.
- PROUDFOOT A E I, POWER CA, ROMMEL C, WELLS TNC. 2003. Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. **Sem Immunol.** **15**: 57-65.
- RAHMAN M, NARA H, ONODA T, ARAKI A, LI J, HOSHINO T, ASAO H. 2007. Cloning and characterization of an isoform of interleukin-21. **FEBS Lett.** **581**:4001-9.
- RED-HORSE K, DRAKE PM, FISHER SJ. 2004. Human pregnancy: the role of chemokine networks at fetal-maternal interface. **Exp Reviews.** **6**: 1-14

- REGAMEY N, OBREGON C, FERRARI-LACRAZ S, VAN LEER C, CHANSON M, NICOD LP, GEISER T. 2007. Airway epithelial interleukin-15 transforms monocytes into dendritic cells. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 37: 75-84.
- RICHARD C, BARO J, BELLO-FERNANDEZ C, HERMIDA G, CALAVIA J, OLALLA I, ALSAR MJ, LOYOLA I, CUADRADO MA, IRIONDO A. 1995. Recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rhGM-CSF) administration after autologous bone marrow transplantation for acute myeloblastic leukemia enhances activated killer cell function and may diminish leukemic relapse. **Bone Marrow Transplant.** 15: 721-6.
- RIVIECCIO MA, JOHN GR, SONG X, SUH HS, ZHAO Y, LEE SC, BROSNAN CF. 2005. The cytokine IL-1 β activates IFN response factor 3 in human fetal astrocytes in culture. **J Immunol.** 174: 3719-26
- ROBERTSON SA, MAYRHOFER G, SEAMARK RF. 1992. Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice. **Biol Reprod.** 46:1069-79.
- ROBERTSON SA, MAYRHOFER G, SEAMARK RF. 1996. Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. **Biol Reprod.** 54: 183-96.
- ROBERTSON SA, ROBERTS CT, FARR KL, DUNN AR, SEAMARK RF. 1999. Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. **Biol Reprod.** 60: 251-61.
- ROBERTSON SA, SJOBLUM C, JASPER MJ, NORMAN RJ, SEAMARK RF. 2001. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. **Biol Reprod.** 64: 1206-15.
- ROSSI D, ZLOTINIK A. 2000. The biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev. Immunol.** 18: 217-42.
- RUOSLAHTI E, PIERSCHBACHER MD. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. **Science.** 238: 491-7.
- SAITO S, MORII T, ENOMOTO M, SAKAKURA S, NISHIKAWA K, NARITA N, ICHIJO M. 1993. The effect of interleukin-2 and transforming growth factor-beta 2 (TGF-beta 2) on the proliferation and natural killer activity of decidual CD16⁺ CD56^{bright} natural killer cells. **Cell Immunol.** 152: 605-13.
- SAITO S. 2000. Cytokine network at the feto-maternal interface. **J Reprod Immunol.** 47:87-103.
- SARRIS AH, BROXMEYER HE, WIRTHMUELLER U, KARASAVVAS N, COOPER S, LU L, KRUEGER J, RAVETCH JV. 1993. Human interferon-inducible protein 10: expression and purification of recombinant protein demonstrate inhibition of early human hematopoietic progenitors. **J Exp Med.** 178: 127-32
- SATO H, NAKAYAMA T, TANAKA Y, YAMASHITA M, SHIBATA Y, KONDO E, SAITO Y, TANIGUCHI M. 1999. Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature Valpha14

- NKT cells by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **Proc Natl Acad Sci USA**. **96**: 7439-44.
- SATO N, PATEL HJ, WALDMANN TA, TAGAYA Y. 2007. The IL-15/IL-15R α on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. **104**: 588-93.
- SAVINO W, DARDENNE M. 1995. Immune-neuroendocrine interactions. **Immunol Today**. **16**: 318-22.
- SAWAI K, MATSUZAKI N, KAMEDA T, HASHIMOTO K, OKADA T, SHIMOYA K, NOBUNAGA T, TAGA T, KISHIMOTO T, SAJI F. 1995. Leukemia inhibitory factor produced at the fetomaternal interface stimulates chorionic gonadotropin production: its possible implication during pregnancy, including implantation period. **J Clin Endocrinol Metab**. **80**: 1449-56.
- SCHALL TJ, BACON KB. 1994. Chemokines leukocytes trafficking and inflammation. **Curr Opin Immunol**. **6**: 865-73.
- SCHLUNS KS, STOKLASEK T, LEFRANCOIS L. 2005. The roles of interleukin-15 receptor alpha: trans-presentation, receptor component, or both? **Int J Biochem Cell Biol**. **37**: 1567-71.
- SCHWARZBAUER JE, SECHLER JL. 1999. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. **Curr Opin Cell Biol**. **11**: 622-7.
- SENTMAN CL, MEADOWS SK, WIRA CH, ERIKSSON M. 2004. Recruitment of uterine NK cells: Induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. **J Immunol**. **173**: 6760-76.
- SHARKEY AM, KING A, CLARK DE, BURROWS TD, JOKHI PP, CHARNOCK-JONES DS, LOKE YW, SMITH SK. 1999. Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy. **Biol Reprod**. **60**: 355-64.
- SHEPPARD D. 2000. *In vivo* functions of integrins: lessons from null mutations in mice. **Matrix Biol**. **19**: 203-9.
- SHIMIZU H, ICHIKAWA Y, YOSHIDA M, TAKAHASHI K, ARIMORI S. 1990. Lymphocyte subsets of the peripheral blood in myasthenia gravis determined by two-color flow cytometry. **Autoimmunity**. **6**: 173-82.
- SIMON C, PELLICER A, POLAN ML. 1995. Interleukin-1 system crosstalk between embryo and endometrium in implantation. **Hum Reprod**. **10**: 43-54.
- SLADKOVA T, KOSTOLANSKY F. 2006. The role of cytokines in the immune response to influenza A virus infection. **Acta Virol**. **50**: 151-62.
- SPIESS K, TEODORO WR, ZORN TM. 2007. Distribution of collagen types I, III, and V in pregnant mouse endometrium. **Con Tis Res**. **48**: 99-108.

- STAUN-RAM E, SHALEV E. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. **Reprod Biol Endocrinol**. **3**: 56-68.
- STEVCEVA L, MONIUSZKO M, FERRARI MG. 2006. Utilizing IL-12, IL-15 and IL-7 as mucosal vaccine adjuvants. **Lett Drug Des Discov**. **3**: 586-92.
- STEWART I, PEEL S. 1977. The structure and differentiation of granulated metrial gland cells of the pregnant mouse uterus. **Cell Tis Res**. **184**: 517-27.
- STEWART I, PEEL S. 1980. Granulated metrial gland cells at implantation sites of the pregnant mouse uterus. **Anat Embryol**. **160**: 227-38.
- STEWART CL. 1994. Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo. **Mol Reprod Dev**. **39**: 233-8.
- SZCZUCINSKI A, LOSY J. 2007. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. Potential targets for new therapies. **Acta Neurol Scand**. **115**: 137-46
- THOMAS T, DZIADEK M. 1993. Expression of laminin and nidogen genes during the postimplantation development of the mouse placenta. **Biol Reprod**. **49**: 1251-9.
- TIMPL R, ROHDE H, ROBEY PG, RENNARD SI, FOIDART JM, MARTIN GR. 1979. Laminin--a glycoprotein from basement membranes. **J Biol Chem**. **254**: 9933-7.
- TIMPL R, DZIADEK M. 1986. Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. **Int Rev Exp Pathol**. **29**: 1-112.
- TORNROOS H, NORDSTROM T, LINDQVIST C. 2007. Thymic stromal lymphopoietin augments the cytolytic activity of the human natural killer cell line NK-92. **APMIS**. **115**: 948-55.
- TRANGUCH S, STEUERWALD N, HUET-HUDSON H. 2003. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. **Biol Reprod**. **68**: 1538-44.
- TUNGGAL P, SMYTH N, PAULSSON M, OTT MC. 2000. Laminins: structure and genetic regulation. **Microsc Res Tech**. **51**: 214-27.
- VAN DER MEER A, LUKASSEN HG, VAN LIEROP MJ, WIJNANDS F, MOSSELMAN S, BRAAT DD, JOOSTEN I. 2004. Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells. **Mol Hum Reprod**. **10**: 189-95.
- VAN DEN HEUVEL MJ, XIE X, TAYADE C, PERALTA C, FANG Y, LEONARD S, PAFFARO VA, SHEIKHI AK, MURRANT C, CROY BA. 2005. A review of trafficking and activation of uterine natural killer cells. **Am J Reprod Immunol**. **54**: 322-31
- VANDAY GG, FRANITZA S, SCHOR H, HECHT I, BRILL A, CAHALON L, HERSHKOVIZ R, LIDER O. 2001. Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix. **J Leukoc Biol**. **69**: 885-92

- VERMA S, HIBY SE, LOKE YW, KING A. 2000. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. **Biol Reprod.** **62**: 959-68.
- VON ANDRIAN UH, MEMPEL TR. 2003. Homing and cellular traffic in lymph nodes. **Nat Rev Immunol.** **3**: 867-78.
- XIE X, KANG Z, ANDERSON LN, HE H, LU B, ANNE CROY B. 2005. Analysis of the contributions of L-selectin and CXCR3 in mediating leukocyte homing to pregnant mouse uterus. **Am J Reprod Immunol.** **53**: 1-12.
- WALD O, WEISS ID, WALD H, SHOHAM H, BAR-SHAVIT Y, BEIDER K, GALUN E, WEISS L, FLAISHON L, SHACHAR I, NAGLER A, LU B, GERARD C, GAO JL, MISHANI E, FARBER J, PELED A. 2006. IFN-gamma acts on T cells to induce NK cell mobilization and accumulation in target organs. **J Immunol.** **176**: 4716-29.
- WALDMANN TA. 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. **Nat Rev Immunol.** **6**: 595-601.
- WANG C, TANAKA T, NAKAMURA H, UMESAKI N, HIRAI K, ISHIKO O, OGITA S, KANEDA K. 2003. Granulated metrial gland cells in the murine uterus: localization, kinetics, and the functional role in angiogenesis during pregnancy. **Microsc Res Tech.** **60**: 420-9.
- WARNOCK RA, CAMPBELL JJ, DORF ME, MATSUZAWA A, MCEVOY LM, BUTCHER EC. 2000. The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. **J Exp Med.** **191**: 77-88.
- WENZEL J, WORENKAMPER E, FREUTEL S, HENZE S, HALLER O, BIEBER T, TUTING T. 2005. Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. **J Pathol.** **205**: 435-42.
- WEWER UM, DAMJANOV A, WEISS J, LIOTTA LA, DAMJANOV I. 1986. Mouse endometrial stromal cells produce basement-membrane components. **Differentiation.** **32**: 49-58.
- WOLF M, CLARK-LEWIS I, BURI C, LANGEN H, LIS M, MAZZUCHELLI L. 2003. Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha, macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer. **Am J Pathol.** **162**: 1183-90.
- WOOD GW, DE M, SANFORD T, CHOUDHURI R. 1992. Macrophage colony stimulating factor controls macrophage recruitment to the cycling mouse uterus. **Dev Biol.** **152**: 336-43.
- WU X, WEI H, ZHANG J, TIAN Z. 2006. Increased uterine NK-derived IFN-gamma and TNF-alpha in C57BL/6J mice during early gestation. **Cell Mol Immunol.** **3**: 131-7.
- YE W, ZHENG LM, YOUNG JD, LIU CC. 1996. The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. **J Exp Med.** **184**: 2405-10.
- YONEYAMA H, MATSUNO K, ZHANG Y, NISHIWAKI T, KITABATAKE M, UEHA S, NARUMI S, MORIKAWA S, EZAKI T, LU B, GERARD C, ISHIKAWA S, MATSUSHIMA K. 2004.

Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. **Int Immunol.** **16:** 915-28.

ZHENG LM, OJCIUS DM, YOUNG JD. 1991. Role of granulated metrial gland cells in the immunology of pregnancy. **Am J Reprod Immunol** **25:** 72-6.

ZLOTNIK A, MORALES J, HEDRIK JA. 1999. Recent advances in chemokines and chemokines receptors. **Crit Rev Immunol.** **19:** 1-47.

ZLOTNIK A, YOSHIE O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity.** **12:** 121-7.

Anexo

DECLARAÇÃO

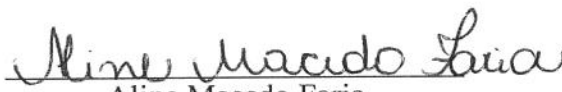
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada “Análises dos efeitos da matriz extracelular, citocinas e quimiocinas na manutenção *in vitro* das células *natural killer*-uterinas isoladas de camundongos”:

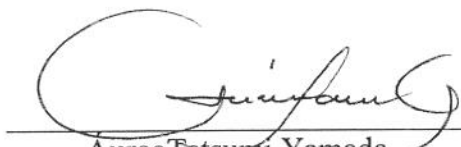
() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1145-1).

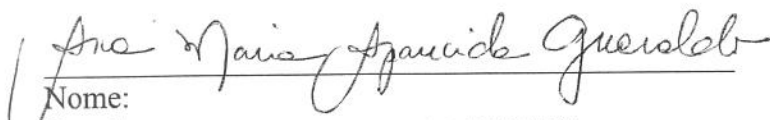
() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos(?) (Protocolo nº _____).


Aline Macedo Faria
Aluna


Aureo Tatsumi Yamada
Orientador

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome: _____
Função: Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP