UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

KARINA YUMI DEGAKI

Identificação de fenótipos funcionais de células *natural killer* uterina-DBA positiva de camundongo

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

Orientador: Prof. Dr. Aureo Tatsumi Yamada

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

D363i

Degaki, Karina Yumi, 1980-
Identificação de fenótipos funcionais de células natural killer uterina-DBA positiva de camundongo / Karina Yumi Degaki. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

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

1. Células natural killer uterinas. 2. Gestação. 3. Camundongo. 4. Citometria de fluxo. I. Yamada, Áureo Tatsumi, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Identification of mice DBA positive uterine natural killer cell functional phenotypes
Palavras-chave em Inglês:
Uterine natural killer cells
Pregnancy
Mice
Flow cytometry
Área de concentração: Histologia
Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural
Banca examinadora:
Aureo Tatsumi Yamada [Orientador]
Marcia Cristina Bizinotto de Assunção
Silvia Daher
Maria Laura Costa Nascimento
Paulo Pinto Joazeiro
Data da defesa: 29-01-2013
Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

KARINA YUMI DEGAKI

"Identificação de fenótipos funcionais de células *natural killer* uterina-DBA positiva de camundongo"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Karina Yumi Degaki e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientador: Prof. Dr. Aureo Tatsumi Yamada

Campinas, 2013

Campinas, 29 de janeiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Aureo Tatsumi Yamada (Orientador) _____ Assinatura

Dra. Silvia Daher _____ Assinatura

Dra. Márcia Cristina Bizinotto _____ Assinatura

Dra. Maria Laura Costa do Nascimento _____ Assinatura

Dr. Paulo Pinto Joazeiro _____ Assinatura

Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos _____ Assinatura

Dra. Egle Cristina Couto de Carvalho _____ Assinatura

Dr. Sergio Ferreira de Oliveira _____ Assinatura

Este trabalho é dedicado aos meus pais: Jorge e Toyomi

que sempre me estimularam e que me deram

condições para eu estar aqui neste momento.

As minhas irmãs, Karin, Carla e Theri que sempre

estiveram ao meu lado, me apoiando sempre.

A eles sou eternamente grata.

"Sua razão e sua paixão são o leme e a vela de sua alma navegante. Se um dos dois quebrar, você pode adernar e ficar a deriva ou ficar imóvel no meio do mar, porque a razão andando sozinha restringe todo o impulso e a paixão deixada a si é fogo que arde até a sua própria destruição."

Khalil Gibran (1883-1931)

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, UNICAMP, por permitir acesso ao conhecimento.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado, que proporcionaram a execução deste trabalho.

Ao Programa DFAIT/CAPES pela concessão de bolsa para a execução deste trabalha na Queen's University.

Ao Programa de Estágio Docente da Pró-Reitoria de Pòs-Graduação pela concessão de bolsa para ministrar aulas para a Graduação (PED A) e assim contribuiu para a execução da minha formação acadêmica e deste trabalho no meu primeiro ano de doutorado.

Aos Laboratórios Citoquímica, Imunocitoquímica e Criométodos e ao Laboratório Genômica e Expressão onde este trabalho foi realizado.

Ao meu orientador, Prof. Áureo Tatsumi Yamada pela oportunidade de cursar o doutorado, pela orientação na minha formação acadêmica. Pelo exemplo de seriedade, dedicação, segurança e profissionalismo. Pelas inúmeras oportunidades que me proporcionou nestes últimos quatro anos de convivência. Muito obrigada.

À Dra Croy, pela hospitalidade e contribuição científica, e principalmente pelo incentivo à pesquisa durante o meu intercâmbio. Obrigada pelo carinho, por acreditar no meu trabalho em um curtíssimo tempo em seu laboratório.

Ao Prof. Fernando Costa, que permitiu o meu acesso ao Hemocentro/UNICAMP para a utilização de equipamentos para a realização deste trabalho.

À Profa Leonilda Maria Barbosa dos Santos, que disponibilizou a utilização de seu laboratório, equipamentos e reagentes.

Ao Prof. Anibal Eugenio Vercesi que permitiu o acesso ao Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) para a utilização de equipamentos para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Alexandre Nowill para a utilização de equipamentos para a realização deste trabalho.

Ao Zhilin Chen pelo enorme ajuda para realização deste trabalho. Com certeza, sem a sua colaboração esta tese não teria saído.

À Irene, Ana Leda, Janine. Sem vocês este trabalho não teria realizado! Obrigada pela disponibilidade, pelo enorme apoio na Citometria de Fluxo, com as inúmeras idas ao equipamento cresceu uma bela amizade! Obrigada.

Ao Alessandro, Adriel, Fernando, Daniela, Ana Leda, Marcia, Bruno pela enorme ajuda na parte experimental da minha tese.

Ao Prof Paulo P. Joazeiro, pela amizade, pela dedicação e preocupação à minha formação acadêmica e pessoal.

À Profa Maria Alice da Cruz –Höfling, Profa. Sarah Arana, Profa. Ivanira José Bechara, Profa. Carla Beatriz Collares Buzato, Profa Lúcia Elvira Álvares, Prof. Luis Antônio Violin Dias Pereira e Prof . Henrique Marques de Souza pela agradável convivência, apoio e terem participado de inúmeras maneiras da minha formação acadêmica e até pessoal.

Ao grupo de pesquisa do Prof Áureo, pelas discussões e crescimento intelectual que cada um me proporcionou.

Aos funcionários do DHE/IB/UNICAMP, Baltazar, Marta, Raquel, Cintia, Célia pelo auxílio técnico e convivência.

Aos técnicos do DHE/IB/UNICAMP, Junavi, Stephanie e Natalia pela amizade, pela enorme eficiência e pelo carinho.

À secretária PBCE/IB/UNICAMP, Líliam, sempre me ajudou com muita simpatia, pelo carinho nos momentos difíceis e por toda a sua compreensão.

À amiga Pati, pelo carinho, pelos conselhos, sinceridade, pela ajuda. Por ter estado ao meu lado sempre nesta jornada profissional e pessoal, muito obrigada pelo ombro amigo.

À amiga Carla, que não tem como agradecer por toda a sua ajuda. Um anjo, é o que a define.

A Debora, uma amiga de longa data... sempre ao meu lado, me dando muita força, cumplicidade, coragem para encarar os desafios que vieram...

À Amanda, pelo carinho e dedicação. Pelas risadas, pelas conversas, por me ajudar sempre.

À Angel, uma amizade que cresceu aos poucos, cumplicidade sempre, uma pessoa incrível!

À Lucimara, amiga, obrigada por ter estado e estar ao meu lado, pelo apoio, pelas risadas, pela cumplicidade, por tudo.

À Leticia, sempre será minha aluna, mas com todo respeito de uma grande profissional. Sempre a lembrei pelo seu auto-astral... pelas risadas, pela sinceridade.

Á amiga Marcia, pela amizade, pelo carinho, pela força, pelos conselhos.

Aos colegas de departamento pelo apoio e agradável convivência nos últimos anos.

Aos colegas da Queen's University: Elly, Allison, Matt, Mahmoud, Zhilin, Richard, Alex , Ashley que me acolheram no laboratório e me ajudaram em tudo que precisava.

Aos amigos brasileiros de Kingston que me acolheram e fizeram com que a minha estadia no Canadá fosse maravilhosa: Ricardo, Carol, Dilton, Gigi, Lucas, Kamary, Raquel.

A Kelly e Jeff obrigada pela hospitalidade, pelo carinho, pelo cuidado que vocês me deram. Nunca esquecerei isso, tenho um carinho e gratidão por vocês.

À Tânia, Ana Luisa, Renata que me ajudaram e ajudam no meu equilíbrio mental. Com certeza sem a ajuda de vocês não teria conseguido enfrentar com mais serenidade os meus desafios.

Aos queridos amigos Fabiana Andrade, Pati Lima, Lú Barbi, Hellen Abreu, Carol Gigli, Sol Jennings, Dani Melo, Nívea Dias, Fernando Longo, Li Pacey, Robertinha Petinari, Marikota Portella, Carol Scultori, Milena Martins, Ana Deckman, Ramon Vidal, Joana Schosslers, Fernanda Cabral, Camila Jau, Iara Niero, Jacira Rabelo, Junia Silva, Thiago Mendes, Amanda Carniato, Angélica Vasconcelos, Lucimara Sensiate, Natalia Santos, Debora Sobreira, Carla Grade, Ana Teixeira, Thais Postalli, Vini Pascoal, Marcela Salazar, Silvia Missawa, Hozana Castillo, Cristiane Fachini, Leticia Garcia, pela amizade, por estarem ao meu lado sempre, me apoiando nos momentos difícies e dando muitas risadas para enfrentar o dia-a-dia desta empreitada. Amigos intensamente presentes em minha vida, mesmo distantes.

As minhas irmãs Karin, Carla, Theri e meu cunhado Ricardo que sempre me ajudaram em tudo nesta minha árdua caminhada desde a minha vinda a Campinas. Muito obrigada, sempre! A minha pequena e mais valiosa, Melissa, minha querida sobrinha, que veio trazer muita alegria e paz a mim.

Aos meus pais Jorge e Toyomi. Agradeço não só por tudo que significam em minha vida, por todo o carinho, amor, dedicação, entrega e sacrifícios por esses anos. Obrigada!

Há sempre o receio e a real possibilidade de que alguém muito importante não tenha sido mencionado, uma vez que foram muitas pessoas envolvidas e que, de alguma forma, mesmo que não o saibam, contribuíram ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Obrigada a todos que torceram por mim.

À Tica, da maneira dela, uma fiel companheira canina, um amor incondicional, que me proporciona muitas alegrias.

E aos camundongos que juntamente com as suas crias tiveram suas vidas sacrificadas para a realização deste trabalho.

Obrigada!!!!

Resumo Geral

Células *natural killer* específicas do útero (uNK) gestante acumulam-se em grande número e desempenham múltiplas funções durante a gestação, As uNK podem atuar tanto como produtoras de fatores angiogênicos que contribuem para a remodelação vascular materna imprescindível para a irrigação placentária ou como células efetoras da resposta imune inata pela produção de citocinas pró-inflamatórias e o acúmulo de proteínas líticas nos grânulos. Contudo, se estas múltiplas funções são desempenhadas cada qual por subtipos funcionais específicos, ou ainda, se é uma única célula multifuncional não está definido. Uma das dificuldades no esclarecimento destas questões está na falta de critérios para a identificação destas células adotados nas diferentes formas de investigação. O presente trabalho propôs no capítulo I, estabelecer uma correlação entre, o fenótipo morfológico das células uNK de camundongos identificadas *in situ* através de métodos citoquimicos/imunocitoquímicos, com os imunofenótipos das células uNK isoladas do útero que apresentem os perfis de células citotóxico e/ou angiogênico, através da citometria de fluxo. Os métodos citoquímicos de PAS (*periodic acid Schiff*) e lectina DBA(*Dolichos biflorus*) e imunocitoquímica para perforina constatou que os três métodos identificam igualmente as células uNK no útero em diferentes dias de gestação (dg) e nas duplas marcações, a maioria das células uNK são $DBA^+/PAS^+/perforina^+$ e, estas ainda apresentando variações entre grandes e ricas em grânulos e pequenas isentas/pobres em grânulos. Pela citometria de fluxo, as células uNK isoladas do útero no 9ºdg eram predominantemente $DBA^+/DX5^+$ (>90%) e negativas para NK1.1. Estas células $uNKDBA^+/DX5^+$ eram $CD3^-$, porem surpreendentemente expressavam CD8a (>97%). Este imunofenótipo de célula $uNKDBA^+/DX5^+/CD3^-/CD8a^+$ eram $perforina^+/TNFa^+$ (>98%) com expressão do receptor de ativação Ly49H na maioria das células uNK grandes e granulares (64%) e poucas células com receptor de inibição Ly49I+ (~10%), confirmando o perfil citotóxico deste imunofenótipo. Por outro lado, estas célula $uNKDBA^+/DX5^+/CD3^-/CD8a^+$ eram também $DLL1^+/VEGF\text{-}A^+$ e portanto, com perfil de células angiogênicas. Quando confrontado o perfil citotóxico com o angiogênico, as células uNKDBA+ co-expressam o TNFa e o Dll1, confirmando que uma mesma célula compartilha ambos os fenótipos funcionais. O capítulo II avaliou a expressão cronológica e a localização da molécula Dll1, relacionado com a remodelação vascular, nas células $uNKDBA^+$ de camundongos nos períodos de 6,5, 9,5 e 11,5dg. A imunomarcação detectou o fenótipo $uNKDBA^+/Dll1^+$ como células pequenas agranulares no 6,5dg que coincidente com o inicio da remodelação vascular do endométrio mesometrial e, atingem o maior numero entre 9,5 e 11,5dg na região central da decídua basal onde ocorre a intensa remodelação das artérias espiraladas. Este conjunto de dados sugerem que as células uNKDBA+ podem apresentar fenótipos funcionais e pode ser adotado como referência para identificação e correlações nas análises *in-utero* e *exo -utero*.

Abstract

A huge number of pregnancy specific natural killer cell (uNK) accumulates in the uterus and plays multiple functions, such as angiogenic factors, producing cell contributing to the maternal vascular remodeling critical for blood flow to placental and as innate immune responsive cells,producing pro-inflammatory cytokines and storage of lytic protein in the granules.However, it is still unknown if these multiple functions are played each one by specific cell subset, or, by one single multifunctional cell. The difficulty to solve this question is mainly due to the lack of standard criteria for identification of these cells in the different experimental approach.The present study aimed in the chapter I, to establish the relationship between the morphological phenotype of mouse uNK cells identified *in situ* by cytochemical/immunocytochemical methods and, the immune-phenotype of uNK cells isolated from the uterus showing cytotoxic and angiogenic profile by flow cytometry analysis.All the three, PAS (periodic acid Schiff) and DBA (*Dolichos biflorus*) lectin cytochemical and anti-perforin immunocytochemical methods equally identified the uNK cells in the uteri of different gestational day (gd) and by using combinations of double staining, the majority of uNK cells showed $DBA^+/PAS^+/perforin^+$ profile and distinguished the incidence of large granule rich and small granule less $uNKDBA^+/PAS^+/perforin^+$ cell subsets.By flow cytometry, most of uNK cells isolated from the uterus at gd9 were $DBA^+/DX5^+$ (>90%) and $NK1.1^-$. and $CD3^-$. Unexpectedly, this $uNKDBA^+/DX5^+/CD3^-$ was $CD8a^+$ (>97%) and also $perforina^+/TNFa^+$ (>98%). The large granule rich $uNKDBA^+/DX5^+/CD3^-/CD8a^+$/ $perforina^+/TNFa^+$ cells were mostly $Ly49H^+$ (64%) and poorly $Ly49I^+$ (~10%). This immunophenotype confirms the uNK cell cytotoxic profile. Conversely, these $uNKDBA^+/DX5^+/CD3^-/CD8a^+$ were also $DLL1^+/VEGF\text{-}A^+$ and therefore, angiogenic cell profile. When crossed the $uNKDBA^+/TNFa^+$ cytotoxic and $uNKDBA^+/DLL1^+$ angiogenic profile, majority were $uNKDBA^+/TNFa^+/DLL1^+$. This result confirms the uNKDBA+ cell share both cytotoxic and angiogenic functional phenotype.In the chapter II, was evaluated the time dependent expression and localization of Dll1 molecule related to vascular remodeling in the pregnant mice uterus. The immune-stain detected the expression of this angiogenic activator in the $uNKDBA^+$ cell that showed changes in the number and localization at the maternal-fetal interface.Markedly, the $uNKDBA^+/Dll1^+$ phenotype appear initially like small granule less cells at gd6.5, coincidental to the beginning of mesometrial endometrium vascular remodeling and reach the peak number around 9.5 to 11,5gd in the central area of decidua basalis. These are the place and time of extensive spiral artery remodeling. Taken all together, there are varieties of uNK cell functional phenotype, but most of them being $uNKDBA^+$, this phenotype could be adopted as reference for uNK cell identification to perform the correlation between in-uterus and exo-uterus analysis.

ÍNDICE

Agradecimentos 6
Resumo 8
Abstract 9
CAPITULO 1 - Perfil do fenótipo da célula uNK citotóxica e angiogênica ao microscópio e citometria de fluxo 11

Lista de acronônimos e abreviaturas 12
1- Introdução 13
2- Objetivos 23
2.1- Objetivo geral 24
2.2 - Objetivos específicos 24
3- Materiais e métodos 25
3.1 - Animais 26
3.2 – Coleta de material 26
3.2.1 - Citoquímica com Lectina *Dolichos biflorus* aglutinina (DBA) e PAS (Ácido Periódico-Schiff) 26
3.2.2 - Citoquímica com Lectina *Dolichos biflorus* aglutinina (DBA) e Imunocitoquimíca com Perforina. 28
3.3 - Isolamento das células uNK DBA+, extração do seu RNA e RT-PCR 28
3.3.1 - Isolamento de células uNK 29
3.3.2- Extração do RNA 29
3.3.3 - RT-PCR 30
3.4 - Imunofenotipagem das células uNK DBA$^+$ 31
3.4.1 - Obtenção de suspensão celular 31
3.4.2 - Citometria de fluxo 32
3.4.2.1 - Imunomarcação de antígenos de superfície da suspensão celular uterina 33
3.4.2.2 - Imunomarcação de antígenos intracitoplasmáticos da suspensão celular uterina 34
3.4.2.3 - Analise estatística 35
4- Resultados 36
4.1 - Identificação e localização de células uNK nos sítios de desenvolvimento embrionário pelos métodos citoquímicos de PAS e lectina DBA e imunocitoquímico anti-perforina 37
4.2 - Identificação das células uNK DBA$^+$ pela citometria de fluxo 38
4.3 - Sub-populações de células uNK DBA$^+$ isoladas em gradientes de Percoll 39
4.3.1 - Fenótipo citotóxico das células uNKDBA$^+$ 40
4.3.2 - Fenótipo angiogênico das células uNKDBA$^+$ 41
4.3.3 - Fenótipo citotóxico vs angiogênico das células uNKDBA$^+$ 41
4.4 - Expressão dos genes de receptores Ly49H, Ly49I e CD8a relacionado com a atividade citotóxica das uNKDBA$^+$ 41
5- Discussão 43
6- Conclusão 51
7- Figuras 53
8- Referências 62
CAPITULO 2 – Delta-like ligand (DLL1) expression in early mouse decídua and its localization to uterine Natural Killer cells. PLoS ONE 7(12): e52037. doi:10.1371/journal.pone.0052037 74
ANEXOS 84

Capítulo 1

Perfil do fenótipo da célula uNK citotóxica e angiogênica ao microscópio e citometria de fluxo

Lista de acrônimos e abreviaturas

APC: aloficocianina

BSA: albumina sérica bovina

CD: *cluster of differentiation*

DC: *Dendritic cell* (Células dendríticas)

dg: dia de gestação

eNK : células NK endometriais

Fig: figura

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GalNAc: N-acetil D-galactosamina

Grz: granzimas

h: hora

HLA: *human leukocyte antigen*

IFNg: interferon-gama

IL: Interleucina

iNK: células Natural Killer imaturas

KAR: *killer activator receptor*

KIR: *killer inhibitory receptor*

DBA: *Dolichos biflorus agglutinin*

MHC: *major histocompatibility complex*

min: minutos

MLAp: *mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy*

MMP: Metaloproteínases

mNK: células natural killer maduras

NK: célula *natural killer*

NKPs: células *Natural Killer* precursoras

NKR- receptores *Natural Killer*

NO: óxido nítrico

PAS: ácido periódico de Schiff's

PBS: tampão fosfato salina

PE: ficoeritrina

PECy5: ficoeritrina-cianina 5

PFA: paraformaldeído

PGF:p*Placental growth factor*

pNK: célula *Natural Killer do sangue periférico*

PRF: perforina

seg: segundos

TA: temperatura ambiente

TNF: fator necrose tumoral

uNK: células *Natural Killer* uterinas

VEGF:*vascular endothelial growth fator*

λ: comprimento de onda de luz

1-INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

A gestação é um processo dinâmico que aciona respostas do sistema imune materno, alterações hormonais e intensa remodelação tecidual do ambiente uterino. Em mamíferos com placentação hemocorial, como em humanos e camundongos, ao lado da reação decidual do endométrio (Herington *et al*. 2009; Ramathal *et al*., 2010) e a remodelação das artérias espiraladas (Sheikhi *et al.,* 2007; Zhang *et al*., 2008, 2011) para que haja o adequado suprimento nutricional e troca de gases concomitantemente com a organogênese da placenta, além do grande influxo e acúmulo transitório de leucócitos (Moffet-King 2002, Zhang *et al*., 2010).

O acúmulo de células leucocitárias , que, em outro ambiente pode promover uma reação inflamatória, no endométrio auxilina no sucesso da implantação do blastocisto e a continuidade do desenvolvimento embrionário/fetal no interior do útero (Drayton *et al*, 2006; Sargent *et al*, 2006).

Em humanos, a célula Natural Killer uterina (uNK) $CD3^{-}/CD56^{bright}/CD16^{dim}$ é a população leucocitária mais abundante (70-80%) encontrado no endométrio decidualizado no primeiro trimestre (Vassiliadou, 1998; Slukvin, 1996; Bulmer and Lash, 2005, Lash *et al*, 2010) ao lado de linfócitos T, macrófagos e células dendríticas (DCs) que somam outros 20% (Vassiliadou, 1998; Slukvin, 1996). Em camundongos, ocorre igualmente a incidência de populações leucocitárias transitórias no útero gestante sendo identificada a predominância das células uNK, em detrimento de outras populações leucocitárias (Croy *et al*, 1997, Paffaro Jr *et al*, 2003, van den Heuvel *et al*, 2005). As atividades conhecidas destas células no útero gestante são a capacidade de secretar fatores angiogenicos que modulam as mudanças que ocorrem no útero, principalmente a remodelação das artérias espiraladas, a imunotolerancia e a regulação da invasão do trofoblasto (Tuckerman *et al,* 2010, Burke *et al*, 2010).

Porém, as razões que levam ao grande acúmulo de linfócitos uNK, uma célula efetora da resposta imune inata, no ambiente uterino predominantemente durante a gestação e quais os mecanismos envolvidos na sua regulação permanecem ainda em grande parte como um enigma na imunologia da reprodução.

Fenótipo das células pNK (*NK do sangue periférico*) vs uNK (NK uterinas)

Atualmente, com o avanço da tecnologia e a altas sensibilidades das técnicas experimentais utilizadas (como a da citometria de fluxo e estudos de maturação), a funcionalidade das células NK periférica, permite identificar e caracterizar o perfil de receptores relacionados a este processo e isolar as diferentes populações celulares (Chiossone *et al*, 2009). Sabe-se que as funções das células NK são controladas por um balanço de sinais determinados por diferentes receptores de membrana e não apenas por um conjunto único e simples de receptores (Lanier, 2005; Moretta *et a*l., 2004; Viviér e Anfossi, 2004).

Assim, pode-se determinar o perfil de receptores das células NK presentes no sangue periférico, órgãos linfóides e não linfóides que originam de células troncos progenitoras $CD34^{+}$IL-2Rβ-cadeia positiva do sistema hematopoiético (Colucci *et al*, 2003). Foram observadas que dependendo do órgão residente, estas células apresentam fenótipo e funções diferentes. As células NK do sangue periférico (pNK) constituem aproximadamente 8-10% da população mononuclear do sangue periférico em circulação (Kalkunte *et al*, 2009).

Em humanos, a maioria das células NK é caracterizada pela ausência de CD3 e pela presença de CD56. Baseado na intensidade do antígeno CD56, as células NK em humanos são divididas em duas populações $CD56^{bright}$ e $CD56^{dim}$ (Miaza *et al*, 1993).

Estudos de imunofenotipagem e funcionalidade revelaram que as células uNK se assemelham às células pNK, porém, apresentam algumas diferenças. Primeiro: a diferença na quantidade de células, como 15% dos linfócitos circulantes são células NK, enquanto as células uNK representam ~80% do número total das células imunes presentes no ambiente uterino. Segundo, subpopulações diferentes de células NK definido pela expressão de CD56, CD16 também diferem entre as células pNK e uNK. As células pNK contém dois subtipos diferentes $CD56^{dim}$ e $CD56^{bright}$ constituindo ~90 e 10%, respectivamente, funcionalmente distintas. O subconjunto maior ($CD56^{dim}$) que constitui principalmente as células Natural Killers é também $CD16^{+}$, e perforina^{+} (Miaza *et al*, 1993, Tuckerman *et al.,* 2010). CD16 tem alta afinidade no receptor *FcRIII* responsável pela citotoxicidade celular dependente de anticorpo (Lanier, 2003). E o subconjunto menor $CD56^{bright}$ produzem e secretam principalmente citocinas. Enquanto as uNK são $CD56^{bright}$ $CD16^{dim}$(Cooper *et al*, 2001, Leonard *et al*., 2006; Hanna *et al*., 2003; Barrientos *et al*.,

2009; Blois *et al*., 2010), portanto com baixa atividade citotóxica e grande produtoras/secretoras de citocinas auxiliando na modulação da homeostasia da interface materno-fetal.

A presença ou a ausência de FcγRIII ou $CD56^{dim}$ acrescenta as diferenças entre as subpopulações de células NK. Deste modo, a maioria das células pNK apresentam o fenótipo $CD56^{dim}$ $CD16^{+}$, enquanto o restante das células apresentam o fenótipo $CD56^{dim}$ $CD16^{-}$. Nos nódulos linfóides, as expressão de células NK predominantes são $CD56^{dim}$ $CD16^{-}$ (Drayton *et al*, 2006, Mselle *et al*, 2007). No trato reprodutivo feminino em humanos a maioria das células NK endometriais (eNK) e as células NK presentes na cervix e tubo de falopiam possuem o fenótipo $CD56^{bright}$ $CD16^{-}$ $CD9^{+}CD94^{+}$. Por outro lado na ectocervix e na vagina as células NK expressam $CD56^{dim}CD16^{+}$ $CD9^{+}CD94^{-}$ (Mselle *et al*, 2007).

As células uNK $CD56^{bright}$ são portanto fenotipicamente distinguíveis das populações das células pNK $CD56^{bright}$, baseado na expressão de CD9, CD103, NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, receptores inibidores KIR (*killer inhibitory receptor*) (Huntington *et al*, 2007; Hanna *et al* 2007) e um arsenal de grânulos citotóxicos repleto de perforina, granzima A e B ao lado de uma grande produção de citocinas que as células uNK sintetizam na interface materno-fetal (Kopcow *et al*, 2005).

Estudos iniciais para identificaram das células uNK em camundongo foram reconhecidos pela sua forma linfóide e a reatividade de seus grânulos citoplasmático com o reagente ácido periódico de Schiff's (PAS) pela citoquimica que reage com glicoproteínas contindos nos grânulos (Chantakru *et al*., 2002; Stewart e Peel, 1977; Paffaro Jr *et al*., 2003; Zhang *et al.,* 2008, Croy *et al*., 2010). As células uNK podem ser identificadas das demais células NK no útero gestante *in situ* pela expressão de glicoconjugados contendo N-acetil D-galactosamina (GalNAc) na superfície celular que reagem com a lectina DBA (*Dolichos biflorus*), enquanto as pNK não expressam tais glicoproteínas (Paffaro Jr *et al*, 2003; Bianco *et al*., 2008), sugerindo que as uNK sejam fenótipos funcionais distintos de células pNK. A reatividade da lectina DBA nas células uNK de camundongo ocorre na membrana celular e nos seus grânulos citoplasmáticos. Esta reatividade dupla não é observada em outros linfócitos ou em outros órgãos ou mesmo nu útero gestante do 1º ao 6º dg

Entre o 6º ao 12º dg ocorre a proliferação das células uNK na decídua basal e tem sido proposto quatro estágios de maturação baseado nos parâmetros morfológicos de

reatividade à lectinan DBA.. São estes: (i) células agranulares; (ii) poucos grânulos no citoplasma; (iii) numerosos grânulos citoplasmáticos e aumento de diâmetro e (iv) senescentes quando as células são fortemente granuladas e há alterações no núcleo. (Paffaro *et al.*, 2003). Por estes critérios, no 9º dg estes quatro estágios são encontrados regionalizados na decídua basal de camundongos (Paffaro *et al.*, 2003), onde as (i) e as (ii) estão localizadas mais próximas do miométrio (região proliferativa, agregado linfóide mesometrial da gestação (MLAp) e as (iii) e (iv) estão mais próxima das células trofoblásticas (células maiores, pós mitóticas) (Zhang *et al.*, 2011). Após o 12º dg inicia-se um gradual declínio na incidência desta população celular até o final da gestação, desaparecendo do útero pós-parto (Croy *et al.*, 1997, Paffaro *et al.*, 2003). Assim, estas diferenças dos subtipos morfológicos de uNK determinadas pela citoquímica de lectina DBA sugerem que haja um gradiente de estágio de maturação e um ciclo de vida das células uNK no útero, cujo mecanismos de regulação não é conhecido.

As informações de imunofenotipagem das células uNK em camundongos são limitadas. Estudos sugerem que as células B220+CD11c+NK1.1+ podem ser análagos as células NK $CD56^{bright}$ em humanos (Blasius *et al,* 2007) sendo identificadas em útero virgem de camundongo (Mallidi *et al*, 2009). No útero gestante, o extenso trabalho de Yadi e colaborados (2008) que avaliaram vários períodos gestacionais demonstram que as células uNK são B220+ CD11c+ NK1.1+ DX5+ (fenótipo similar de células NK presentes no sangue periférico e no baço) e predominantemente lectina DBA^{+}. Esta população de uNK é identificada ainda como sendo $CD3^{-}DX5^{+}$ (Saito *et al*, 2008; Yadi *et al*, 2008) o ainda como, $CD3^{-}CD122^{+}$, o que a distingue dos linfócitos T citotóxico $CD3^{+}CD8^{+}CD122^{+}$, (Colluci *et al.,* 2003, Chen *et al*, 2012,)

Apesar da lectina DBA ter sido amplamente utilizada tanto para a identificação e localização das células uNK de camundongos através do método citoquímico (Paffaro Jr *et al.*, 2003, Croy *et al.*, 2010, Bianco *et al.*, 2008), quanto em suspensões de células do útero de camundongo pela citometria de fluxo (Yadi *et al,* 2008; Croy *et al.,* 2010; Zhang *et al.*, 2011, Chen *et al*, 2012), recentemente, Croy et al (2010) reportou a incidência de grande proporção de células uNK DBA-/PAS+ positivas, sugerindo que a lectina DBA não identifica todas as populações de céulas uNK no útero gestante de camundongos. Estes dados remetem para uma revisão dos dados e a identificação das discrepâncias, considerando que Paffaro Jr et al (2003) reportaram que a lectina DBA apresentava

células positivas em maior proporção em relação àquelas identificadas pela citoquímica de PAS.

Funções das células uNK na gestação

Todos os linfócitos têm a habilidade de distinguir o *self* do *non-self*, onde as células NK da resposta imune inata têm a capacidade de interagir e eliminar as células alvos sem a expansão clonal ou imunomodulação prévia. As células NK podem também influenciar a via da resposta imune adaptativa através das interações com as células dendríticas (Cooper *et al*, 2004; Moretta 2002) e através da sua capacidade de produz citocinas e quimiocinas (Di Santo *et al*, 2006a). Durante a maturação das células precursoras das células NK (NKPs) da medula óssea, as células NK imaturas (iNK) originárias da medula óssea adquirem receptores envolvidos no reconhecimento de células alvos e receptores de ativação e inibitórios que controlam as funções efetoras das células NK (Colucci *et al*, 2003; Di Santo *et al*, 2006b). Esta dinâmica de expressão de receptores da superfície celular permite a identificação fenotípica destas fases, assim como, subpopulações que se destinam ou localizam no diferentes órgãos.

Deste processo, as células pNK podem ser distinguidas em: imaturas (iNK) e as maduras (mNK) competentes, anérgicas e ativadas de órgãos periféricos como o fígado, baço e mucosas, Portanto, as células pNK não são homogêneas e existe uma ampla variedade de subtipos destas células em camundongos (Di Santo *et al*, 2006b) e por conseguinte, presume-se que as células uNK também possam apresentar heterogeneidade fenotípica e funcional no ambiente uterino durante a gestação.

Em humanos as células uNK $CD56^{bright}$ podem ser encontradas na fase progestacional e aumentando gradativamente ao longo da fase secretória no útero não gestante. Diminuem para os níveis basais durante a mestruação e são recompostas durante a fase proliferativa (Kalkunte *et al*, 2008). Mantido o endométrio com o sucesso da implantação, a população de células uNK aumentam rapidamente no endométrio decidualizado atingindo o pico ao final do primeiro trimestre (Kitaya *et al*, 2007). Uma cinética similar ocorre com as células uNK no útero de roedores durante a gestação. Porém, diferente dos seres humanos pelo fato das células uNK estarem ausentes no endométrio não-gestante de camundongo (Paffaro Jr et al, 2003; Kalkunte *et al*, 2008).

O conteúdo dos grânulos citolíticos das uNK são semelhante ao das células pNK, sendo identificadas as perforinas, proteoglicanos e uma gama variada de enzimas hidrolíticas lisossomais tanto em roedores (Parr *et al.*, 1990; Lima *et al*, 2012), quanto em humanos (Konno *et al.*, 1999; Rukavina *et al.*, 2000; Sakai *et al.*, 2004) que constituem o arsenal citolítico em potencial para atuar na resposta imune do tipo inata. Porém, não há ainda dados experimentais que expliquem a aquisição dos grânulos contendo as proteínas líticas da resposta imune inata. De acordo com Lima e colaboradores (2012) a aquisição de grânulos com conteúdo citolítoco que resulta na competência funcional para resposta imune inata é precedida da expressão de VEGF pelas c[elulas células uNK DBA^+ ainda destituída de grânulos.

A perforina é o mediador citolítico principal dos linfócitos T citotóxicos e das células NK (Liu *et al.*, 1995; Croy e Kassouf, 1989; Parr *et al.*, 1990). Estudos que envolveram a ativação das células pNK por IL-2 e IL-12 (Lenhmann *et al.*, 2001) demonstraram o aumento da ligação de perforina com a célula alvo e consequentemente o aumento da lise pela ação desta molécula citotóxica. Com relação às células uNK esperava-se igual competência funcional das pNK, porém as uNK não medeiam espontaneamente a lise da célula alvo em ensaios citolíticos comumente utilizado para pNK (Croy e Kassouf, 1989; Parr *et al.*, 1990). Em humanos, esta baixa citotoxicidade natural apresentada pelas uNK tem sido atribuída à baixa expressão do receptor CD16 em relação às pNK, cujo estímulo induz a atividade lítica das NK (Biassoni *et al.*, 1999). Por conseguinte, os dados experimentais disponíveis na literatura até o momento não comprovam a atividade citotóxica das células uNK na gestação. Tal fato deve-se à dificuldade na obtenção de materiais humanos na gestação normal e, sobretudo, em situações que antecipem uma perda gestacional.

Na gestação normal, a atividade citotóxica das céulas uNK aparentemente não é mobilizada e não há relatos comprovados experimentalmente sobre os mecanismos de regulação que mantêm as células uNK com perfil não citotóxico, ou sobre os mecanismos que possam ativar as diversas vias de resposta citotóxica tanto pela secreção das sua proteínas líticas (perforina/granzimas) ou das citocinas pró-inflamatórias (TNFa, IFNg, etc) durante a gestação. O aumento nos níveis de TNF-a estão associados com abortos (Babbage *et al*, 2001) e pré-eclampsia (Anim-Nyame *et al,* 2003), porém o que pode levar o aumento desta citocina pro-inflamatório na interface materno-fetal é ainda especulativo.

As células NK de humanos e camundongos apresentam uma combinação do repertório de receptores ativatórios e inibitórios (NKR- receptores *Natural Killer*) próprios da resposta imune inata, muitos dos quais são expressos aleatoriamente, resultando em diferentes subpopulações funcionais de células NK (Symons *et al., 2010*). A ativação da sua ação citotóxica baseia-se na expressão dos receptores conhecidos como inibidores KIR (*killer inhibitory receptor*) e/ou ativadores KAR (*killer activator receptor*) (Lainer, 1998).

As células uNK de humanos expressam os receptores KIR, os quais reconhecem como ligantes as moléculas dos HLA-C, HLA-G e HLA-E do MHC-II não clássicas expressas pelo trofoblasto (Lainer, 1998). Esse reconhecimento entre as células uNK e o trofoblasto constitui o principal mecanismo envolvido na tolerância materno-fetal, pelo qual a mãe controla a implantação da placenta alogênica (King *et al*, 2000), uma vez que esta interação é do tipo inibidora da atividade citolítica. As moléculas Ly-49 e CD94/NKG2 são os receptores correspondentes do KIR expresso em camundongos e provavelmente estaria envolvida no reconhecimento das células trofoblásticas, sem induzir a atividade citotóxica das uNK nesta interação (King *et al*, 2000, Carretero *et al*., 1997; Brooks *et al*., 1997). Outros receptores presentes nas células NK são: NKG2D, *Natural cytotoxicity receptor* (NCR) e de baixa afinidade FcR CD16 (Lanier, *et al*, 2005).

Fenotipicamente, as células uNK em humanos expressam CD56, CD38 e CD69 e não expressam CD3, CD4, CD8, CD16 e CD57 (Arcuri *et al*., 2006, Bulmer *et al*., 1991; Moffett-King, 2002). Yadi e colaboradores (2008) descreveram dois subtipos distintos de células uNK $CD3^{-}CD122^{+}$ presentes na decídua e no MLAp em camundongos. Um subtipo de uNK $CD3^{-}CD122^{+}$ que não foi encontrado no sangue periférico, expressa os receptores de ativação das células uNK NKp46, NKG2D e Ly49H, mas não expressam NK1.1 ou DX5.

Lima e colaboradores (2012) comprovaram a expressão de perforina nos grânulos das células uNK lectina DBA^{+} em camundongos. Seus estudos mostraram o esvaziamento do seu conteúdo, entre elas a perda da imunomarcação para perforina após indução da eutanásia embrionária, provavelmente como resposta à alteração da homeostasia da interface mateno-fetal, o que comprova a competência citolítica das células uNK presentes no útero gestante.

Por outro lado, vários relatos salientam que as células uNK atuam favoravelmente para o desenvolvimento pleno da gestação, contribuindo, entre outros, com o

desenvolvimento da placenta (Croy *et al.*, 2003), na manutenção da decídua, na angiogênese da interface materno-fetal (Guimond *et al.*, 1998) e no controle da invasão do trofoblasto (Moffett-King, 2002). A primeira evidência experimental do benefício das células uNK na gestção foi elegantemente demostrado pelo grupo da B A Croy (Queen`s University, Canada and former Uiversity of Guelph, Canada) utilizando animais imunodeficientes depletados de células NK (Croy et al, 1999) e geneticamente modificado com *knockout* do gene *Ifn-g* (Ashkar, 2001) atribuindo às células uNK a função de remodelação das artérias espiraladas mediada pela citocina pro-inflamatório IFNγ (Zhang *et al* 2011).

Desde então, acumulam-se as evidências A do papel regulador das células uNK durante a gestação pela atividade angiogênica atuando na remodelação das artérias espiraladas do útero gestante de humanos e camundongos. As células uNK em humanos, nas primeiras semanas de gestação produzem o VEGF C (*Vascular Endothelial Growth Fator C*), PGF (*Placenta Growth Factor*) e angiopoietinas I/II, óxido nítrico (NO) e interferon-gama (IFNg) proteínas relacionadas com a angiogênese (Ashkar *et al.*, 2003; Leonard *et al.*, 2006; Hanna *et al.,* 2003; Barrientos *et al.,* 2009; Blois , *et al.*, 2010; Lash *et al.*, 2010, Hatta, *et al.*, 2011). E mediadores como as metaloproteínases 7 e 9que ajudam na sua infiltração na túnica muscular das artérias espiraladas e desempenham o papel na remodelação destes vasos (Smith *et al.*, 2009, Naruse *et al*, 2009). Zhang e colaboradores (2011) sugerem que as células uNK localizadas próximas ao vasos sanguíneos uterinos são as que produzem IFNg e PGF. Havendo assim, uma diferenciação nas células uNK desprovidas de grânulos são as que produzem estes fatores (Tayade *et al*, 2007), enquantoLima e colaboradores (2012) verificaram que tanto as células uNK agranulares pequenas como as granulares maduras do 7ºdg ao 14ºdg produzem VEGF-A constitutivamente.

Desta forma, são crescentes as evidências das múltiplas funções das células uNK durante a gestação. Porém, se estas funções são desempenhadas por dferentes subtipos funcionais de células uNK, ou se são modulações funcionais desempenhada por uma única subpopulação é uma questão a ser esclarecida. Os dados discrepantes da literatura frequentemente e de difícil correlação advêm do fato de serem adotados diferentes marcados para identificar supostamente a mesma célula. Esta correlação é dificultada ainda mais quando se compara os experimentos *in situ* no útero que adotam predominantemente técnicas de citoquímicos ou imunocitoquímicos, com os estudos

realizados exo-útero com a imunofenotipagem de células isoladas para ensaios *in vitro*. Portanto, para avaçar no conhecimento sobre a influência das células uNK na gestação, há a necessidade premente de se estabelecer os parâmetros de referência para identificar estas células, além de permitir a correlação entre as diferentes estratégias metodológicas para tornar os resultados comparáveis entre as mesmas.

2 – OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

2.1. - Objetivo Geral

Identiicar se as múltiplas funções atribuídas para as células uNK são desempenhadas por diferentes subitpos funcionais e estabelecer a correlação entre o padrão do fenótipo morfológico das células uNK *in situ* no útero gestante com os fenótipos funcionais angiogenico e citotóxico das células uNK isoladas avaliadas em citometria de fluxo.

2.2 – Objetivos Específico

- Correlacionar quantitativamente as proporções de células uNK identificadas simultaneamente pelos métodos citoquímicos de lectina DBA e PAS e, imunocitquímico com anti-perforina, no útero de camundongo no 9º, 11º e 15º dias de gestação (dg).

- Identificar e quantificar os imunofenótipos das células uNK DBA^+ através dos marcadores convencionais das células NK NK1.1 e DX5 e avaliar a presença da células NKT através da coexpressão do receptor CD3 e CD8a em citometria de fluxo.

- Identificar e quantificar subpopulações de células uNK DBA^+ com perfil citotóxico na citometria de fluxo, pelas coexpressões de perforina, TNF-a e dos receptores regulatórios da resposta imune inata Ly49I e Ly49H.

- Identificar e quantificar subpopulações de células $uNKDBA^+$ com perfil angiogênico na citometria de fluxo, pelas coexpressões do Dll1 ligante, VEGF;

- Identificar a ocorrência de subpopulações duplamente funcionais (citotóxico e angiogênico) entre as células $uNKDBA^+$.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 com idade entre 12 e 16 semanas, provenientes do CEMIB/UNICAMP, foram mantidas em gaiolas com temperatura e iluminação controladas, com acesso à água e alimentação *ad libitum.*

As fêmeas virgens foram acasaladas com machos de mesma linhagem e a data do período da manhã em que foi encontrado o tampão vaginal foi considerada como sendo o primeiro dia de gestação (dg). (Protocolo 2921-1)

3.2 - Coleta de material

Foram coletadas amostras dos sítios de desenvolvimento embrionários de animais no 9º, 11º e 15º dias de gestação (n=3). Os animais foram anestesiados com uma solução de ketamina e cloridrato de xilazina (ANASEDAN - Sespo), e sacrificados através de perfusão da solução fixadora constituída de paraformoldeído 4% em tampão fosfato salina 0,1M pH 7,4. Os cornos uterinos foram removidos e os sítios de desenvolvimento embrionários dissecados. Posteriormente as amostras foram incluídas em parafina, seccionadas (5 μm de espessura) e coletadas em lâminas silanizadas.

3.2.1 - Citoquímica de Lectina *Dolichos biflorus* aglutinina (DBA) e PAS (Ácido Periódico-Schiff)

Os cortes desparafinizados e hidratados foram submetidos à técnica citoquímica de lectina *Dolichos biflorus* aglutinina (DBA) de acordo com Paffaro Jr *et al* (2003) modificado ede PAS de acordo com Zhang *et al* (2009) modificado para dupla marcação, como segue.

Os cortes reidratados foram equilibrados com PBS 0,1M pH 7,4 durante 5 minutos (min) a temperatura ambiente (TA). Fez-se o bloqueio com albumina sérica bovina (BSA tipo V, Sigma, St Louis, USA) a 1% em PBS 0,1M por 30 min a TA. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com lectina DBA biotinada (1mg/mL – Sigma, St Louis, USA) diluída 1:200 em PBS 0,1M pH 7,4, durante12h a 4ºC em câmara úmida. Incubação com estreptoavidina conjugado com AlexaFluor 488 (1mg/ml, Invitrogen; Carlsbad, CA) na concentração de 1:300 em PBS 0,1M; pH 7,4 durante 1 hora (h) a TA e em câmara úmida. Após lavados em PBS 0,1M pH 7,4, Oos cortes foram incubados com amilase (diástase) a 2% em água destilada durante 1 h a 37ºC. Foram lavados com água destilada três vezes e adicionou-se ácido periódico 1% durante 20 min a TA. Após a lavagem fez-se o tratamento com reativo de Schiff durante 30 min a TA. Lavou-se com água destilada e adicionou-se bissulfito de sódio a 0,5% durante 10 min a TA. Após lavados com água destilada, fez-se a contra coloração com hematoxilina de Harris por 30 seg a TA, seguido do tratamento com solução saturada de carbonato de lítio por 15 segundos (seg) seguida de desidratação e montagem permanente entre lamínula com resina, ou montados com solução de Vectashield (Vector Lab, USA) contendo DAPI (1mg/mL, Sigma, St Louis, USA).

Os controles negativos da reação para lectina DBA foram realizados omitindo-se a incubação de lectina DBA e do ácido periódico para a reação de PAS nos cortes dos materiais analisados

.Analisou-se 4 campos aleatórios da região mesometrial de pelo menos dois sítios de desenvolvimento embrionário (n=3 animais) para cada período gestacional em estudo. Foram digitalizadas imagens utilizando objetiva de 20x no microscópio Eclipse 800 (Nikon, Japan) acoplado com sistema de epifluorescência.Para o AlexaFluor 488 usou-se o filtro de emissão verde λ= 465-495 nm e para o reativo de Schiff usou-se o filtro de emissão λ = 528-553 nm (Changaris *et al* 1977, Schaart *et al*, 2004) e,, câmara Cool-Snap e o programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA).

De cada região mesometrial foram quantificadas as células PAS^+ e/ou lectina DBA^+ para determinar o número total de células uNK DBA^+, PAS^+ e DBA/PAS^+ e, cálculo da relação percentual de cada uma destas subpopulações.

3.2.2 - Citoquímica com Lectina *Dolichos biflorus* aglutinina (DBA) e Imunocitoquimíca com Perforina.

Os cortes obtidos em 3.2 foram desparafinizados e reidratados para reações imunocitoquímicas. Os cortes histológicos foram submetidos ao tratamento em tampão Tris 0,01M EDTA 0,001M 85°C, para a recuperação de epítopo pelo calor (heat induced *epitope* retrieval – HIER). Os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio 0,3% seguido do bloqueio com leite desnatado a 5% em Tris/ Tween 1% pH 7,4. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-perforina de rato feito em coelho (Upstate Biotechnology- 1mg/ml) *overnight*. Incubou-se com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com HRP (SAB – 1mg/mL). A revelação foi com diaminobenzidina (DAB – Sigma, St. Louis, USA). Os cortes histológicos foram lavados com PBS 0,1M pH 7,4 e submetidos à incubação com lectina DBA biotinilada na diluição de 1:200 por 1 hora em temperatura ambiente(TA) e revelada com estreptoavidina-FITC (Sigma St Louis, USA). Os cortes foram lavados e contra-corados com hematoxilina de Harris e fez-se a marcação com DAPI (Santa Cruz 1mg/ml). As lâminas foram montadas em meio anti-fading (Vecta-Schield -Vector, Laboratories).

Foi analisada aleatoriamente a região mesometrial de cada sítio de desenvolvimento embrionária/fetal (n=3) de cada período gestacional. Estes foram fotografados digitalmente com aumento de 60x no microscópio Olympus IX71 (Olympus) acoplado com sistema de fluorescência (a excitação da luz verde, AlexaFluor 488, foi obtida usando o filtro de emissão verde λ= 465-495 nm) câmara *Q-Color 5* para captura e digitalização das imagens através do programa *Image Pro-Plus* (Media Cybernetics, USA).

De cada região fotografada foram quantificadas as células perforina positivas ou, Lectinas DBA^+ e das células que apresentaram a dupla marcação, para determinar o número total de células uNK DBA^+, $Perforina^+$ e $DBA^+Perforina^+$ em cada período analisado, para o cálculo da relação percentual de cada uma destas subpopulações.

3.3 – Isolamento das células uNK DBA+, extração do seu RNA e RT-PCR

3.3.1 - Isolamento de células uNK

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

Os animais no 9º dg foram sacrificados por deslocamento cervical, laparotomizados e os cornos uterinos removidos. Estes foram imersos em meio Hank's (Sigma Co, St Louis/USA) a 4ºC, para rápida dissecção dos sítios de desenvolvimento embrionário e remoção da região mesometrial, isenta de tecidos embrionários.

Os fragmentos da região mesometrial foram recortados em pequenos fragmentos com auxílio de lâminas de barbear e dissociados em 200ul de DNase (500UN/mL) (Roche, Alemanha) por pipetagens sucessivas e agitados no vórtex em baixa rotação para as células se desprenderem dos tecidos. Esta suspensão celular foi filtrada em telas de nylon com malhas de 80 -100µm e o filtrado recuperado com 1,5~2,5 mL de meio Hank's contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA typeV, Sigma St.Louis, USA) para um microtubo de 2,0 mL. Após centrifugação da suspensão em 200g, por 10 min a 4ºC, o sedimento celular foi lavado duas vezes com meio Hanks contendo 1% BSA e a concentração celular foi quantificada em câmara de Neubauer.

Foram adicionadas 10 esferas CelLecion 450 (Dynal Co, Invirogen) previamente conjugadas com lectina DBA de acordo com o fabricante e mantida em agitação constante em rotor orbital (Dynal Co, Oslo), por 15 min, a 4ºC e em seguida, o microtubo foi acoplado no concentrador de partículas magnéticas (MPC, Dynal Co,Oslo) para imobilização das esferas no campo magnético e remoção das células livres por lavagem em meio Hank's contendo 0,1% BSA. As células livres em suspensão foram submetidas a duas associações adicionais em iguais condições, enquanto as células imobilizadas eram rapidamente recolhidas, lavadas em meio Hanks contendo 0,1% BSA e suspendeu-se em PBS 0,1M contendo BSA 0,1% e N-acetil galactosamina 0,1M (Sigma Co, St Louis/USA) por 15 min a 4ºC. As esferas destacadas das células foram removidas no MPC para recuperação das células livres.. As células livres foram centrifugadas em PBS 0,1M e BSA 0,1% e ressuspendidas na mesma solução em volume conhecido para quantificação de células viáveis em câmara de Neubauer.

3.3.2- Extração do RNA

Para a extração do RNA total das células uNK isoladas o item 3.3.1 utilizou-se Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Na suspensão de células uNK DBA^+ isoladas adicionou-se 1 ml de Trizol e foram homogeneizadas no vórtex e mantidas em repouso por 5 min a TA. Adicionou-se 100 ul de clorofórmio (JT Baker) e homogeneizado em Vórtex durante 30 seg. Após 3 min de repouso em TA foram centrifugadas por 15 min a 12.000g a 4ºC. A fase aquosa foi transferida para tubo de 1,5ml. Nesta fase aquosa acrescentou-se 500 ul de álcool isopropílico (J.T.Baker) e 1,5 ul de acrilamida linear (20ug/ml), para obter uma maior eficiência na precipitação do RNAtotal, e após homogeneização suave, as amostras foram mantidas em repouso por 12 h a -20°C.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 10 min a 4° C e após completa remoção do sobrenadante, adicionou-se 500 ul de etanol (J.T.Baker) a 70% e H_20/DEPC (Sigma) gelada para nova centrifugação por 10 min a 7.500g a 4°C. Os sobrenadantes das amostras foram descartados e ao sedimento foram adicionados 500ul de etanol absoluto (J.T.Baker) a - 20°C e constatada a soltura do sedimento do fundo do tubo após agitação no Vortex, centrifugou-se a 7500 g a 4°C por 10 min. O sedimento obtido foi solubilizado em 14 µl de H_20/DEPC e a solução foi congelada a a -80°C até o momento do uso.

3.3.3 – RT-PCR

Para o PCR foram utilizados o Kit Taq-DNA polimerase (Invitrogen) com protocolo ajustado para uso de volume final de 10µl para cada reação, no termociclador (GeneAmp PCR System 9700 – Applied Biosystems). Os ajustes no protocolo visaram a realização da reação na concentração final de 1x para o tampão de reação da enzima *Taq* (Invitrogen), 1,5mM de $MgCl_2$, 0,2mM de dNTP (1,2MmM, Invitrogen), 3 pmol/µl dos *primer sense* e *anti-sense*, 1µl da enzima *Taq Polimerase* e 0,6 µl cDNA. O programa de ciclagem utilizado nas reações foi de 94°C por 2 min. O número de ciclos foi de 40 vezes realizados a 94°C por 45 seg, a temperatura de anelamento dos *primers* de 57°C por 45 seg, 72°C por 1 min e, após os ciclos a 72°C por 5 min.

Foram avaliadas as expressões dos seguintes genes: Ly49I, Ly49H, CD8a, perforina, TNF-α e o gene ciclofilina como controle endógeno utilizando sequências *sense* e *anti-sense* dos respectivos genes descritos na Tabela 1.

O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose de 2% e este foi corado com brometo de etidio. Alíquotas de 3μL do produto de PCR e 0,5μL de *Loading buffer* foram aplicadas no gel. As corridas foram realizadas no aparelho de eletroforese (Bio-Rad Laboratories) a 75 volts. Utilizou-se 6μL marcador λ-*Hind* III (1mg/12μL).

Para a captura de imagem digital da banda utilizou-se o fotodocumentador *Image Master VDS – Pharmacia Biotech e o programa Image Master VDS Software* – Pharmacia Biotech, respectivamente.

Tabela 1- Sequência de primers desenhados para o PCR.

Gene	Sense	Anti-sense	Pares de bases de nucleotídeos
Ly49h	5' AGGCATCCATTCTTTCTACC 3'	5' ACTCTTGGTTTCACTGTCCC 3'	482
Ly49i	5' GTCTTCAGGGTTGCAGAAAT 3'	5'AGACTTTGTTCTTTAACTCTG 3'	567
CD8a	5' TCAGTTCTGTCGTGCCAGTC 3'	5' TCTCTGAAGGTCTGGGCTTG 3'	464
Tnf-a	5'GGCCTCCCTCTCATCAGTT3'	5'GCTACGACGTGGGCTACA3'	92
Perforina	5' AGCTGAGAAGACCTATCAGGACC 3'	5' CTTTGTATTCACTGGAGACGCTGG 3'	360
Ciclofilina	5' CAGGTCCTGGCATCTTGT 3'	5' GCCATCCAGCCATTCAGT 3'	100

3.4- Imunofenotipagem das células uNK DBA$^+$

3.4.1 - Obtenção de suspensão celular e padronização da população leucocitária para análise.

Os camundongos no 9º dg foram sacrificadas por deslocamento cervical e os cornos uterinos foram removidos para dissecção dos sítios de implantação embrionária.para obtenção da região do mesometrial em solução de *Hanks* refrigerado a 4ºC. Os tecidos foram cortados em fragmentos de 1mm^2 em meio *Hanks* contendo 1000U de DNAse I e estes foram homogenizados por sucessivas pipetagens. Esta suspensão celular foi filtrada em telas de nylon com malhas de 100μm.

Para obter-se a população de leucócitos totais da região mesometrial adotou-se gradientes de densidade de Percoll, segundo protocolo de Wu e colaboradores (2007) modificado, como segue.

Foram testados gradientes de densidade de Percoll de 20, 30, 40, 70% e combinações destes em meio Hanks a partir de Percoll comercial (Cultilab-SP). Em um tubo cônico de 3 mL depositou-se 500ul de cada gradiente de Percoll do maior para o de menor concentração. Colocou-se a suspensão de células lentamente sobre a solução de Percoll de menor densidade, e foi centrifugado a 750g por 30 min a 4º C. As células seletivamente recolhidas por sua densidade diferencial foram lavadas em solução de Hanks por centrifugação e em seguida marcadas com os anticorpos específicos e levadas para Citometria de Fluxo para caracterização do fenótipo de superfície e observação ao microscópio de campo claro

Após as análises no microscópio e análise no citômetro, estabeleceu-se os gradientes de densidade de Percoll de 30% e 40%, por conterem, respectivamente, maior concentração de células pequenas pouco granulares e maiores com citoplasma rico em grânulos, além de concentrar maior proporção de células viáveis e sem restos celulares.

3.4.2- Citometria de fluxo

Analisou-se a expressão de marcadores de superfície e intracelulares relacionados com o perfil funcional das células uNK de camundongos isoladas de úteros no 9º dg conforme descrito no protocolo do item 3.4.1. Na tabela 2 consta a lista de anticorpos utilizados no experimento.

Foram preparadas as amostras controles junto ao experimento para que haja uma configuração experimental adequada. As amostras consistem em:

Microtubo controle negativo (CN): apenas as células uNK sem a associação de anticorpos;

Microtubo controles positivos (CP): tubo contendo células marcadas com apenas um dos anticorpos conjugados com o fluorocromo a ser analisado separadamente (ou seja; para um experimento com FITC + PE, um tubo foi preparado usando apenas o anticorpo marcado com FITC, e um outro tubo contendo apenas o anticorpo marcado com PE);

Microtubo teste: Tubo contendo células marcadas com os anticorpos conjugados com o fluorocromo a serem analisados.

Tabela 2- Relação dos anticorpos primários e secundários utilizadas em citometria de fluxo

Anticorpo primário	Origem	Conjugado	Concentração e Procidência
Anti-NK1.1	Mono, camundongo	PE	0,2mg/ml (BD Pharmingen™)
Anti-DX5	Mono, camundongo	PECy5	0,2mg/ml (BD Pharmingen™)
Anti-CD3	Mono, camundongo	APC	0,5mg/ml (BD Pharmingen™)
Lectina DBA	horse gram	FITC	1mg/ml (Sigma St.Louis, USA)
Anti-Ly49I	Mono, camundongo	PE (	0,2mg/ml (BD Pharmingen™)
Anti-Ly49H	Mono, camundongo	biotina	0,2mg/ml (BD Pharmingen™)
Anti-CD8a	Mono, camundongo	PE	0,2mg/ml (BD Pharmingen™)
Anti-TNF-a	Mono, camundongo	APC	0,2mg/ml(BD Pharmingen™)
Anti-VEGF	Poli, cabra		1mg/ml (Abcan)
Anti-Perforina	Poli, rato		1mg/mlAbcan
Anti-Dll1	Mono, camundongo	PE (Biolegend)	0,2mg/ml (Biolegend)
Anti-cabra IgG	Poli, Coelho	biotina	1mg/ml (BD Pharmingen™)
Anti-rato IgG	Poli, Coelho	biotina	1mg/ml (BD Pharmingen™)
Estreptoavidina–		APC	1mg/ml (BD Pharmingen™)

PE: ficoeritrina; FITC: isotiocianato de fluoresceína; APC: aloficocianina, PECy5: ficoeritrina-cianina 5

3.4.2.1 – Imunomarcação de antígenos de superfície

Dividiu-se em microtubos as células isoladas de cada animal em aproximadamente $2,5x10^4$ células uNK em 200uL de solução de Hank's balanceado com 1% de BSA. Para reação de marcação direta com o anticorpo primário conjugado ao fluorocromo, estes foram diluídos a uma concentração de 1:300 e incubou-se por 30 min a 4°C. Após a marcação, lavou-se o excesso de anticorpo acrescentando 1,5 mL de Hank's balanceado com 1% de BSA a cada tubo. Centrifugou-se a 200g durante 10 min. Removeu-se o sobrenadante e ressupendeu-se com 200uL de Hank's balanceado com 1% de BSA.

Para reação de marcação indireta, após a incubação com o anticorpo primário não conjugado a fluorocromos e lavagens por centrifugação, adicionou-se o anticorpo secundário conjugado com fluorocromo de afinidade específica ao anticorpo primário, nas concentrações de 1:300 e incubou-se por 20 min a 4°C sob agitação leve, seguida de lavagens por centrifigações.

A marcação com a lectina DBA na concentração de 1:200 a 4°C foi feita após completada a reação com os anticorpos, pois este reage intensamente em tempo menor de incubação (5 min). Após a marcação, lavou-se o excesso do reagente acrescentando 1,5 mL de Hank's balanceado com 1% de BSA a cada tubo. Centrifugou-se a 200g durante 10 min. Aspirou-se o sobrenadante cuidadosamente para não romper ou deslocar o pellet de células. Incubou-se com estreptoavidina na concentração de 1:500 a 4°C por 15 min. lavou-se o excesso do reagente acrescentando 1,5 mL de Hank's balanceado com 1% de BSA a cada tubo. Centrifugou-se a 200g durante 10 min. Fixou-se as células utilizando paraformaldeído 2% em PBS 0,1M pH 7,4 durante 10 min a TA. Adicionou-se nas células fixadas 1,5uL de PBS 0,1M pH 7,4 e centrifugou-se a 200g durante 10 min. Ressupendeu-se as células a 300ul de PBS 0,1M pH 7,4, para a leitura no citometro de fluxo (BD FACSCAlibur™ e BD FACSCanto) conforme instruções específicas do fabricante e analisou-se com o programa BD*CellQuest*™-Pro *(Applied) ou Flowing Softwarw 2 (Turku Centre for Biotechnology).*

3.4.2.2 – Imunomarcação de antígenos intracitoplasmáticos da suspensão celular uterina

Nas células isoladas em 3.3.1, adicionou-se 10μl de Brefedildina A (1ug/mL_Sigma) em 1mL de suspensão celular, incubando-a por 1h a 37ºC. Centrifugou-se a 200g durante 10 min. Fixou-se as células com 1ml de paraformaldeído 2% em PBS 0,1M pH 7,4 por 15 min a TA. Lavou-se três vezes com PBS 0,1M pH 7,4 com 0,2% de Tween 20, centrifugando a 400g por 5 min. Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 100μl de solução permeabilizante (90% metanol gelado) no microtubo durante 30 min no gelo. Lavou-se três vezes com PBS 0,1M pH 7,4 centrifugando a 400g por 5 min. Fez-se o bloqueio com 5% de BSA em PBS 0,1M pH 7,4 durante 30 min a TA.

Realizaram-se inicialmente as marcações de antígenos intracitoplasmáticos seguidas de antígenos de superfície adotando-se os mesmos procedimentos descritos no item 3.4.2.1.

3.4.2.3- Analise estatística

Os dados de Citometria de fluxo foram expressos com médias±SEM. As analises estatísticas foram feitas utilizando-se o software Prism4 (GraphPad Software, Inc.) e pelo Teste T de Student foi considerado significativo para $P \leq 0,05$.

4 – RESULTADOS

4- Resultados

4.1- Identificação e localização de células uNK nos sítios de desenvolvimento embrionário pelos métodos citoquímicos de PAS e lectina DBA e imunocitoquímico anti-perforina (Figuras 1 e 2)

Pelas análises dos sítios de desenvolvimento embrionário/fetal do útero de camundongos nos três períodos avaliados constataram-se células com reação positiva para lectina DBA na superfície celular e no conteúdo de grânulos correspondentes às células uNK presentes na região mesometrial do útero gestante, à semelhança das descrições de Paffaro Jr e colaboradores (2003). Pela reação de PAS em dupla marcação com a lectina DBA avaliada em microscopia de fluorescência, constatou-se igualmente a ampla distribuição de células granulosas PAS positivas-amilase resistentes na região mesometrial dos sítios uterinos, corroborando com as descrições de Peel (1989), Paffaro (2003) e Zhang (2009) e estas, na sua grande maioria apresentavam co-marcação com a lectina DBA (Figs 1D-F). Algumas poucas células apresentavam reação positiva somente para a lectina DBA no 9º e 11º dg (Figs 1 A-B). Estas células uNK lectina DBA^+ e PAS^- estavam localizadas predominantemente na região MLAp do sítio de desenvolvimento embrionário. No 15ºdg (Fig 1C) todas as células PAS^+ com marcação nos grânulos eram lectina DBA^+ presentes em células maiores de citoplasma repleto de grânulos e típicas das formas senescentes (Croy *et al*, 1997; Paffaro *et al*, 2003, Zhang *et al*, 2009).

Algumas células PAS^+ e DBA^- foram encontradas lateralmente no endométrio da região mesometrial (dado não demonstrado), correspondentes provavelmente às células deciduais ricas em grânulos PAS^+ produtoras de prolactina (Candeloro *et al*, 2007).

Pelas análises quantitativas, as células DBA^+/PAS^+ duplamente marcadas são as que predominam na região mesometrial na proporção de 89,82%; 96,09% e 100%, respectivamente, nos 9º, 11º e 15º dg (Fig 1G). As células DBA^+/PAS^- presentes nos sítios de desenvolvimento embrionário estavam presentes na área do MLAp e corresponderam a 4,45% e 2,60% do total das células nestas áreas no 9º e 11º dg, respectivamente (Fig 1G), enquanto que nos sítios de 15º dg não foram observadas células exclusivamente pela lectina DBA^+ (Fig 1C).

A imunocitoquímica de perforina apresentou reação positiva nos grânulos das células uNK presentes no endométrio da região mesometrial (Figs. 2A-J) corroborando com as descrições de Parr (1987), Kusakabe (2005) e Lima *et al* (2012). A dupla marcação com a lectina DBA identificam as células uNK granulosas com forte reatividade para perforina em seus grânulos citoplasmáticos e nas células menores do MLAp, marcações da perforina mais difusa pelo citoplasma nas células agranulares.

Pelas análises quantitativas em valores relativos (Fig 2K), a grande maioria das populações das células totais analisadas são células uNKDBA$^+$/Perforina$^+$, porém, correm 7,82% de células uNKDBA$^+$/Perforina$^-$ na região do MLAp no 9ºdg ao lado de 0,83% de células apenas Perforina$^+$. No 11º dg pela reação de perforina observou-se células uNK contendo grânulos Perforina$^+$ na região MLAp e na decídua basal (Figs. 2 E-H). Observou-se pelas análises quantitativas (Fig 2K), em valores absolutos nos cortes analisados, 33,54% da população das células totais analisadas são células uNKDBA$^+$/perforina$^+$. Apenas 0,95% de todas as células analisadas são exclusivamente perforina$^+$ e neste período gestacional não observou células somente DBA$^+$. No 15º (Figs. 3 I-J) observou--se uma redução da reatividade da perforina nas células uNKDBA$^+$ na região mesometrial quando comparado com os períodos anteriores. Observou-se que o padrão de marcação da perforina nos grânulos DBA$^+$ estavam poucos reativos, dificultando muito a identificação das células perforina$^+$ neste período de gestação (Fig 3J).

Estas análises citoquimicas e imunocitoquímicas qualitativas e quantitativas amplamente utilizadas para a identificação e localização das células uNK de camundongos, confirmam incialmente que as células uNK presentes no útero gestante destes animais são células predominantemente lectina DBA$^+$, além de PAS$^+$ e perforina$^+$. Porém, a ocorrência de células DBA$^-$/perforina$^+$ indicam a incidência de outras células potencialmente citotóxicas com expressão de perforina, que não se enquadram no perfil de células uNK DBA+. Isto é, estas células podem supostamente corresponder aos linfócitos T citotóxicos que também podem acumular grânulos de perforina sob estímulo específico da reação imune adaptativa e estes grânulos apresentarem reação positiva ao PAS.

4.2 – Identificação das células uNK DBA$^+$ pela citometria de fluxo

Para estabelecer uma correlação fenotípica entre as células uNKDBA$^+$ presentes nos sítios uterinos identificadas em cortes histológicos com as células isoladas deste órgão em citometria de fluxo, foram avaliadas inicialmente a co-expressão de receptores NK1.1 e DX5 convencionais das células NK nas células uNK DBA$^+$ isoladas no útero de camundongos no 9ºdg.

Pela imunofenotipagem constatou-se que cerca de 1,3% dentre as células isoladas do útero eram reativas à NK1.1 (Fig 3B), porém estas não co-expressavam o ligante de GalNac reativo à lectina DBA. Por outro lado, pela dupla-marcação com DX5 foram constatadas que 98,67% das células uNKDBA$^+$ eram também DX5$^+$ (Figs 3 E). Dentre esta população uNKDBA$^+$/DX5$^+$/NK1.1$^-$, não foram constatadas co-expressão de CD3 (Fig 3D) e portanto, definiu-se como sendo células uNK, aquelas células com o fenótipo DBA$^+$/DX5$^+$/NK1.1$^-$/CD3$^-$, cujos parâmetros foram utilizados para os ensaios subsequentes.

4.3 – Sub-populações de células uNK DBA$^+$ isoladas em gradientes de Percoll

Nas avaliações qualitativas das distribuições e dispersões dos eventos nos *dotplots* obtidos na citometria de fluxo para definir as populações celulares alvos em meio à totalidade de células isoladas do útero de camundongo gestante, foram constatadas variações de tamanho e granulosidade (Figs 4A-B). Presumindo-se que houvesse correlações entres estas variações de tamanho/granulosidade com os subtipos morfológicos das células uNKDBA$^+$ encontrados nas análises histológicas, procurou-se um meio de separar duas grandes populações para análise em citometria de fluxo.

Foram utilizadas diferentes combinações de gradiente de densidade de Percoll para separar populações de leucócitos da suspensão celular obtidas da região mesometrial do útero gestante de camundongos no 9ºdg. Foram identificadas células pequenas com poucos grânulos ou ausência destes no citoplasma, características das células uNK do subtipo I e II (Paffaro *et al*, 2003) presentes no gradiente de 40 a 70% de Percoll (Fig 4B). Células grandes repletas de grânulos citoplasmático, característica das

células uNK do subtipo III e IV segundo Paffaro *et al*, 2003 foram localizadas no gradiente de 20 a 30% de Percoll (Fig 4A). A maior concentração de células DBA$^+$ foi encontrada na combinação de Percoll 30% (células grandes e granulosas) e 40% (células pequenas agranulosas ou com poucos grânulos) e estas concentrações de Percoll foram utilizadas para as análises de imunofenotipagens subsequentes pela citometria de fluxo (Fig 4A,B).

4.3.1 – Fenótipo citotóxico das células uNKDBA$^+$ (Figuras 4 e 5)

A maioria das células uNKDBA$^+$ (>90%) apresentaram co-expressão de perforina tanto nas populações de células grandes granulosas quanto nas pequenas agraunulosas (Fig 4C,D) e surpreendentemente, a co-expressão do receptor CD8a nestas mesmas populações de uNKDBA$^+$ (Fig 4E,F), as quais expressam também a citocina pro-inflamatória TNF-a (Figs 4G,H). Pela analise quantitativa, o perfil majoritário das células uNKDBA$^+$ foram CD8a$^+$/Perforina$^+$ (Percoll 30-91,50%, Percoll 40-96,31%) e CD8a$^+$/TNFa$^+$ (Percoll 30 -98,91% e Percoll 40 -92,50%), com raras células (<1%) uNKDBA$^+$/CD8a$^+$/perforina$^-$ ou TNFa$^-$ (Figs 4I-J).

As células uNKDBA$^+$/Ly49H$^+$ estavam presentes em maior proporção no Percoll 30% (64,02%), enquanto no Percoll 40% é bem menor (10,84%) (Figs 5A-C). Foram constatadas também a ocorrência de pequena proporção de células uNKDBA$^+$/Ly49H$^-$ representadas por 1,58% e 1,19% na concentração de Percoll 30 e 40%, respectivamente. Ao lado destas, foram identificadas células Ly49H$^+$DBA$^-$ na proporção de 10,44% e 10, 90% nas concentrações de Percoll 30 e 40%, respectivamente (Figs 5A-C). Este perfil de expressão do receptor de ativação LY49H em maior proporção das células uNKDBA$^+$ maiores e granulosas do Percoll 30% e menor proporção o Percoll 40% demonstra que as células uNKDBA$^+$ menores e agranulares tenham a sua atividade citotóxica menos efetiva.

A maior proporção de células uNKDBA$^+$/Ly49I$^+$ estavam presentes no Percoll 30% (35,54%) enquanto no Percoll 40% era bem menor (9,43%) (Figs 5D-E) . Foram encontradas células uNKDBA$^+$/Ly49I$^-$ na proporção de 6,48% e 7,27% nas concentração de Percoll 30 e 40%, respectivamente. Foram encontradas também células DBA$^-$/Ly49I$^+$ na proporção de 24,40% e 16,87% em Percoll 30% e 40%, respectivamente. Este perfil de

expressão do receptor inibitório Ly49I nas células uNKDBA$^+$, demonstra que apenas uma parcela destas células tanto granulosas quanto agranulosas são controladas por este receptor inibitório da atividade citotóxica.

4.3.2 – Fenótipo angiogênico das células uNKDBA$^+$ (Figura 6)

A co-expressão de dois fatores angiogênicos atribuídas às células uNK foram avaliadas em citômetria de fluxo na população uNKDBA$^+$/DX5$^+$. O ligante Dll1 era co-expresso em 99,84% e 98,51% das células uNKDBA+ isoladas no gradiente Percoll 30 e 40%, respetivamente (Figs 6A-C). Estas células uNKDBA$^+$/DLL1$^+$ apresentavam ainda uma proporção acima de 98% de co-expressão do VEGF-a (Figs 6D-F), confirmando que as células uNKDBA$^+$, independente do tamanho ou da granulosidade expressam ambos os fatores angiogênicos.

4.3.3 – Fenótipo citotóxico vs angiogênico das células uNKDBA$^+$ (Figura 7)

A avaliação da competência funcional simultânea da atividade angiogênica pela expressão do Dll1 e potencial citotóxica pela expressão do TNF-a das células uNKDBA$^+$ na citômetria de fluxo, demonstrou que 94,97% das células no Percoll 30% e 97,95% no Percoll 40% co-expressam o Dll1 e TNF-a, enquanto células uNKDBA$^+$/DLL1$^+$/TNF-a$^-$ correspondem a 4,53% e 1,08% em Percoll 30 e 40%, respectivamente (Figs 7A-C). Estes resultados indicam que a maioria das células uNKDBA$^+$ podem compartilhar o potencial citotóxico mediado por citocina pró-inflamatória (TNF-a e a atividade anigiogênica estimulada pelo Dll1 ligante de forma constitutiva).

4.4 – Expressão dos genes de receptores Ly49H, Ly49I e CD8a relacionado com a atividade citotóxica das uNKDBA$^+$ (Figura 8)

As análises de transcritos dos genes dos receptores Ly49H, Ly49I e CD8a amplificados pelo PCR confirmaram a expressão dos mesmos, ao lado dos genes de perforina e TNF-a, utilizando células uNKDBA$^+$ purificadas pelo isolamento positivo com esferas magnéticas. A identificação coincidente tanto do gene amplificado pelo PCR, quanto das proteínas pela imunofenotipagem dos receptores Ly49H, Ly49I e CD8a, asseguram a identificação destes receptores de forma inédita para as células uNKDBA$^+$ de camundongos.

5 - DISCUSSÃO

5 - Discussão

A identificação das células uNK de camundongos através da citoquímica de PAS (*periodic acid Schiff*) introduzida por Peel (1989), assim como, a citoquíca de lectina DBA (Dolichos biflorus) introduzida por Paffaro Jr et al (2003), são métodos clássicos amplamente utilizados tanto para a identificação, quanto localização e quantificação destas células no útero ao longo da gestação. No presente trabalho foi reavaliada a coincidência entre estes dois métodos em dupla marcação para a identificação das células uNK, alterando-se a forma de análise. Isto é, foi adotado a microscopia de fluorescência para análise da emissão de fluorescência vermelha (λexitação=540nm / λemissão=640nm) pelo reativo de pararosanilina/Schiff (Changaris *et al* 1977, Schaart *et al*, 2004), simultaneamente com a emissão da fluorescência verde do FITC utilizado para revelar a reação pela lectina DBA.

A sobreposição de marcação da dupla reação PAS/DBA demonstrou coincidência em no mínimo de 90% das células uNK encontradas no 9ºdg e atingindo 100% no 15ºdg. Estes dados são divergentes daquele relatado anteriormente (Zhang *et al*, 2009) no qual a proporção de células uNKPAS$^+$ era superior às células uNKDBA$^+$. Esta divergência entre os resultados pode ser decorrente de vários fatores, tais como variações na metodologia, ou reagentes utilizados, ou ainda, como neste caso, o método de análise. Tanto Paffaro Jr e colaboradores (2003) que primeiro relataram a coincidência de marcação do PAS e da lectina DBA nas células uNK, quanto Zhang e colaboradores (2009) que realizaram a quantificação, utilizaram a microscopia de campo claro para as análises. Embora o fundamento de reação do PAS que preconiza a reação do reativo de Schiff junto ao aldeído formado pela ação do periodato na ligação 1-2 glicol das hexoses, seja totalmente diferente da afinidade das lectinas por carboidratos específicos (ex: DBA tem afinidade por GalNAc), ambas reagem coincidentemente com glicoconjugados presentes nas células uNK de camundongos, em particular naqueles contidos nos seus grânulos citoplasmáticos. Esta coincidência da localização das moléculas alvos dos reagentes provoca a sobreposição do produto de reação como a deposição do precipitado insolúvel diaminobenzidina pela ação da peroxidase (precipitado castanho), ao lado do reagente de Schiff (púrpura) pode dificultar a análise de forma mais acurada em microscopia convencional de campo claro.

Por outro lado, ao optar pela análise em microscopia de fluorescência, que permite o uso de reagentes com escolha dos fluorocromos conjugados com a emissão da fluorescência em comprimentos de ondas (λ) específicos, favorece a escolha de combinações que não concorrem entre si na geração de imagens especificas em cada comprimento de onda, isto é, no presente experimento a emissão da fluorescência vermelha pelo reativo de Schiff é perfeitamente distinguida da fluorescência verde emitida pelo FITC utilizado para identificação do sítio de reação da lectina DBA (Figs 1D-F).

Apesar destas nuances metodológicas, as quantificações das células uNK ao longo da gestação demonstram perfis semelhantes. Isto é, nos períodos mais precoces da gestação, o número total de células uNK é menor, aumentando e atingindo o maior número por volta do 10º ao 12ºdg e reduzindo gradualmente a partir do 15ºdg (Delgado *et al*, 1996, Paffaro Jr *et al*, 2003, Zhang *et al*, 2009, Croy *et al*, 2010). A análise morfológica distingue ainda subtipos de células uNK. Ou seja, nos períodos iniciais há maior incidência de células pequenas e agranulares, as quais aumentam de tamanho com concomitante aumento no conteúdo de grânulos citoplasmáticos. Estas formas maiores repletas de grânulos são consideradas células maduras ou diferenciadas que estão presentes em maior proporção entre o 10º e 12ºdg. Após este período notam-se aumentos das formas senescentes que se caracterizam pelo aumento nas dimensões das células e apresentam fragmentação do conteúdo cromatinico própria da apoptose celular (Delgado *et al*, 1996, Paffaro Jr *et al*, 2003).

Cumpre salientar que a lectina DBA reage também com glicoconjugados contendo GalNAc terminal presentes na superfície das células uNK de camundongos (Paffaro Jr, *et al* 2003). Esta característica favorece tanto na identificação de células uNK, mesmo naquelas que não contêm grânulos citoplasmáticos quanto na possibilidade de utilizar este reagente como marcador de superfície.

O conteúdo de perforina nas células uNK é uma das características do fenótipo funcional relacionado com a resposta imune inata. É também uma característica morfológica, pelo fato da proteína lítica ser acumulada nos grânulos citoplasmáticos e portanto, amplamente utilizada como marcador de células uNK (Kusakabe *et al* 2005, Lima *et al*, 2012). O processo de diferenciação destas células é caracterizado morfologicamente pelo aumento no número e tamanho dos grânulos citoplasmáticos, acompanhadas da alta expressão de perforina (Parr *et al* 1990; Zheng *et al* 1991) e

identificam células uNK plenamente diferenciadas ou maduras. Os nossos resultados demonstram que esta proteína está presente quase que exclusivamente (acima de 90%) nas células uNK DBA$^+$ nos períodos de 9 e 11dg e em 100% das uNKDBA$^+$ no 15ºdg.

Desta forma, confrontando-se os dados qualitativos e quantitativos das análises morfológicas das células uNK presentes no útero gestante de camundongos conclui-se que o fenótipo morfológico destas células seja uNKDBA$^+$/PAS$^+$/Perforina$^+$. Estas células podem ainda ser distinguidas como sendo pobres ou ricas em grânulos citoplasmáticos, onde as primeiras localizam-se predominantemente na área do MLAP e nos períodos iniciais da gestação e, as ricas, em grânulos que predominam na área do endométrio decidualizado (decídua basal) e são encontradas até os períodos mais tardios da gestação. Portanto, no útero gestante de 9ºdg, coexistem células uNKDBA$^+$/PAS$^+$/Perforina$^+$ com poucos ou sem grânulos e ricos em grânulos citoplasmáticos.

Assim, é evidente que a lectina DBA é capaz de identificar a população majoritária das células uNK de camundongos, além de distinguir subpopulações morfológicas e funcionais de células uNK.

O presente estudo propôs estabelecer uma correlação entre as células uNK identificadas *in situ* no útero gestante com aquelas isoladas deste órgão para os estudos funcionais através da identificação de um fenótipo comum pela reatividade destas células com a lectina DBA.

Pela análise das células isoladas do útero no 9ºdg utilizando os marcadores comuns às células NK, constatou-se que o receptor NK1.1 não é comumente coexpresso nas células uNK DBA$^+$, enquanto a maioria das células uNKDBA$^+$ coexpressam o receptor DX5. Estes dados corroboram com os relatos de Yadi e colaboradores (2008) que demonstram a superioridade da lectina DBA na identificação de populações de células uNK dentre células NKCD122$_+$CD3$^-$ isoladas do útero de camundongos ao longo da gestação e que estas raramente expressam o receptor NK1.1.

O NK1.1 é um aloantígeno expresso em células NK limitadas a poucos camundongos isogênicos, incluindo o C57BL/6 (Koo and Peppard, 1984) o qual foi utilizado no presente experimento. Contudo, não foi identificada expressão deste antígeno nas células uNKDBA$^+$ e a população de células NK1.1$^+$ está ao redor de 1% da totalidade

de células isoladas do útero no 9ºdg, o que representa uma população minoritária se comparada com as células uNKDBA$^+$ ao redor de 50%.

O receptor DX5 também conhecido como CD49b ou integrina α2 (Arase *et al*, 2001) tem afinidade pelo colágeno e laminina (Plow *et al* , 2000) e o aumento da expressão do DX5 nas células NK NK1.1$^-$ caracteriza a regulação positiva do aumento da atividade citotóxica (Arase *et al*, 2001). Este aumento tem sido utilizado para definir a população de células uNK com potencial citotóxico (Saito *et al* 2008). Desta forma, as células uNKDBA$^+$DX5$^+$ isoladas no 9ºdg majoritariamente devem representar a população de células uNK e estas seriam potencialmente efetoras da resposta citotóxica.

De fato, estas células uNKDBA$^+$/DX5$^+$ coexpressam, na sua grande maioria, a perforina e TNF-a, dois dos mediadores da resposta imune inata. Supreendentemente, estas células uNKDBA$^+$/DX5$^+$/perforina$^+$/TNF-a$^+$ expressam também o receptor CD8a. Este último é conhecido como sendo receptor do linfócito T citotóxico CD3$^+$/CD8$^+$ derivados do timo. Em humanos há uma pequena população de células NK (CD3$^-$CD56$^+$ que expressam o CD8. Estas células NK CD8$^+$ tem uma maior função citolitica quando comparadas com as células NK CD8$^-$ (Srour, 1990) e quando ambas são ativadas com IL-2 em cultura celular (Fuschuber *et al* 1992).

Cumpre salientar que estas células uNKDBA$^+$/DX5$^+$/NK1.1$^-$ não expressão o receptor CD3 dos linfócitos T, comprovando que estas células uNK não pertencem à categoria das células NKT. Contudo, a expressão do receptor CD8a identificado pela citometria de fluxo nas células uNK isoladas tanto no Percoll 30% (97,38%) quanto no 40% (95,59%) é um dado inédito, uma vez que em camundongo fêmea as células NK não expressam CD8a (Kieffer *et al* 1996). As razões da expressão deste receptor CD8a nas células uNK é uma incógnita que merece investigações futuras, considerando que nos linfócitos T citotóxicos a aquisição do CD8a aumenta a resposta citotóxica destas células se comparadas com aquelas CD8a$^-$ (Addison *et al*, 2005), enquanto as células uNK expressam constitutivamente este receptor, elas não apresentam atividade citotóxica espontânea na gestação normal.

A síntese de proteínas líticas como a perforina e granzima e o seu acúmulo em grânulos supostamente está relacionada com a diferenciação das células NK, na aquisição da sua competência como célula efetora citotóxica da resposta imune inata (Fehninger *et al.,* 2007; Meade *et al.*, 2009; Lima *et al*, 2012). Estas proteínas foram

identificadas nas células uNK de camundongos, porém, estão localizadas em grânulos distintos, o que sugere um mecanismo de ativação próprio (Lima *et al*, 2012), cuja regulação mantêm estas células quiescentes no útero gestante. A resposta imune inata envolvendo a atividade citotóxica das células NK está relacionada com a expressão de receptores inibidores KIR (*killer inhibitory receptor*) e/ou ativadores KAR (*killer activator receptor*), que reconhecem antígenos da categoria dos MHC-I (Lainer, 1998, King *et al* 2000). Em camundongos os receptores da família Ly49 pertencem à categoria de receptores reguladores da resposta imune inata das células NK. O presente estudo demonstra as expressões do receptor de ativação-Ly49H e do receptor de inibição-Ly49I nas células uNKDBA$^+$/DX5$^+$/CD8a$^+$/CD3$^-$, as quais não são expressas uniformemente entre as células uNK. As populações de uNKDBA$^+$/DX5$^+$/CD8a$^+$/CD3$^-$ isoladas no Percoll 30%, isto é, aquelas maiores e com grânulos, apresentam maior proporção de Ly49H$^+$(64,02%) e Ly49I$^+$(35,54%) em relação às células menores e agranulares isoladas no Percoll 40% com 10,84% de Ly49H$^+$ e 9,43% de Ly49I$^+$. Este perfil de expressão dos receptores Ly49H e Ly49I demonstra a heterogeneidade das células uNK quanto à capacidade de reconhecimento de antígenos MHC-I e compreensivamente, a maior competência está entre as células uNKDBA$^+$ maiores e com grânulos, consideradas diferenciadas para a resposta imune inata, em relação à população minoritária entre as células uNKDBA$^+$ menores e agranulares. Dentre estas populações de células uNKDBA$^+$ isoladas no Percoll 40%, certamente ocorre uma heterogeneidade de células entre aquelas isentas de grânulos e aquelas que iniciam a biogênese desta organela. A expressão dos receptores Ly49H e I podem estar relacionadas com a aquisição gradual da competência na resposta imune inata.

Por outro lado, mesmo entre as uNKDBA$^+$ maiores com grânulos, verificam-se populações consideráveis destas células que não expressam os receptores Ly49H ou Ly49I. As razões desta heterogeneidade devem ser alvo de investigações futuras, em particular nas situações de gestação anômala. Ao contrário de outros receptores avaliados neste estudo, como o DX5 e o CD8a, que aparentemente são expressos constitutivamente em todas as células uNKDBA$^+$, os receptores Ly49 diretamente relacionados com a competência destas, como células efetoras da resposta imune inata, foram as que apresentaram diversidade de expressão.

A atividade angiogênica das células uNK no útero gestante tem sido amplamente relatada tanto em camundongos (Croy *et al*, 2012, Hatta *et al*, 2012) como em humanos

(Quenby *et al*, 2008; Li, *et al*, 2008). No presente estudo, confirmaram-se a expressão do VEGF-A e do DLL1 ligante nas células uNKDBA$^+$ investigada em citometria de fluxo. A presença do DLL1 ligante na superfície da maioria das células uNKDBA$^+$, comprova a envolvimento e a importância desse mediador angiogênico pela via de sinalização *Notch*, que pode ativar produção do VEGF nas células uNK (vide detalhe capítulo II). De fato, 100% das células uNKDBA$^+$/Dll1$^+$ expressam o VEGF-A nas células isoladas em Percoll 30 e 40, comprovando que estas células detêm a capacidade angiogênica independentemente da aquisição dos grânulos citoplasmáticos, como já relatado anteriormente (Lima *et al*, 2012).

A correlação entre a heterogeneidade morfológica e as funções citotóxicas e angiogências das células uNKDBA$^+$ não está completamente estabelecida. Lima e colaboradores (2012) demonstraram que a expressão das proteínas líticas perforina/granzima e o mediador angiogênico VEGF podem ser coexpressos nas células uNKDBA$^+$ através da imunomarcação em cortes histológicos. Porém, esta coexpressão do VEGF e perforina nas células uNKDBA+ estava restrita cerca de 50% destas células, assim como, pela imunocitoquímica, a presença da perforina ou do VEGF nas células uNK estavam ao redor de 50% do total das células uNKDBA$^+$. A avaliação da possível heterogeneidade das células uNKDBA$^+$ quanto às coexpressões de fatores angiogênicos e citocinas pró-inflamatórias Th1 pela citometria de fluxo, comprovaram que a maioria das células uNKDBA$^+$ podem coexpressar o DLL1 ligante e o TNF-a, independentemente se ricas ou pobres em grânulos.

Fato intrigante é a expressão da citocina pro-inflamatório TNF-a de forma constitutiva nas células uNKDBA$^+$, independente do seu perfil de receptores de membrana. Diversos experimentos relatam a necessidade de estimulo inflamatório das células para a síntese e secreção desta citocina (Jokhi *et al*, 1994, Naruse *et al*, 2009a), assim como, há relatos de aumento desta citocina no ambiente uterino em gestações anômalas (Mueller-Eckhardt et al, 1994; Christiansen *et al*., 2006; J.Calleja-Agius *et al*, 2012). Em nossos estudos, as células coletadas provenientes do útero de animais normais sem qualquer estímulo representam o perfil de células com atividades normais. Esta expressão constitutiva do TNF-a, pode, por outro lado, estar relacionada com a função angiogênica das células uNKDBA+. Sainson e colaboradores (2008) verificaram que o TNF-a atua inicialmente bloqueando a sinalização o receptor 2 do VEGF(VEGFR2), mas ativa as células *tip* dos vasos sanguíneos pela via de sinalização *Notch* promovendo

a angiogenese e a migração de células endoteliais com aumento da expressão de VEGFR2.

O conjunto destes dados comprovam que as células uNKDBA$^+$ constituem a maior população de células NK do útero gestante de camundongos e esta população celular pode ser identificada tanto *in situ* nos cortes histológicos, quanto em suspensão celular do útero através da lectina DBA, enquanto outros marcadores como o NK1.1 revelam apenas uma população bastante restrita de células uNK. Esta população majoritária das células uNK pode ser identificada como sendo: uNKDBA$^+$/DX5$^+$/NK1.1$^-$/CD3$^-$/CD8a$^+$.

Quanto ao perfil funcional, esta pode ser complementada como sendo majoritariamente: uNKDBA$^+$/Perforina$^+$/TNFa$^+$/VEGFa$^+$/DLL1$^+$, isto é, estas células apresentam o perfil citotóxico e angiogênico simultaneamente.

Quanto aos receptores de regulação da resposta imune inata, as células uNKDBA$^+$ apresentam heterogeneidade de expressão. Isto está relacionado com a diferenciação destas células com combinações do receptor Ly49H e Ly49I que podem ser: uNKDBA$^+$/DX5$^+$/NK1.1$^-$/CD3$^-$/CD8a$^+$/Ly49H$^+$ ou /Ly49H$^-$ e; uNKDBA$^+$/DX5$^+$/NK1.1$^-$/CD3$^-$/CD8a$^+$/Ly49I$^+$ ou /Ly49I$^-$. E, esta variação na expressão destes receptores deve ser um fator chave para manter a resposta equilibrada no ambiente uterino no decorrer da gestação.

6 - CONCLUSÃO

6 - Conclusão

- A utilização dos três marcadores clássicos (lectina DBA, PAS e anti-perforina) para células uNK de camundongos em métodos citoquímicos e imunocitoquímicos combinados *in situ* no útero, demonstram que a grande maioria das células uNK são DBA^+ com poucos ou muitos grânulos e este perfil morfológico de marcação é igualmente constatado pelo PAS e anti-perforina, quando as reações simultâneas são analisadas em microscopia de fluorescência.

- As células uNK isoladas do útero gestante de camundongos avaliadas pela citometria de fluxo são reativas à lectina DBA e a grande maioria destas compartilha a expressão do receptor DX5, porém não o NK1.1, ou o CD3 e portanto, não são subpopulações de linfócitos NKT. Este perfil de células $uNKDBA^+/DX5^+/NK1.1^-/CD3^-$ pode ser separado em células pequenas agranulares/poucos grânulos ou células grandes ricas em grânulos no gradiente de Percoll 40% e 30%, respectivamente.

- As células $uNKDBA^+/DX5^+$ apresentam fenótipo funcional tanto citotóxico ($uNKDBA^+/DX5^+/perforina^+/TNFa^+$), quanto angiogênico ($uNKDBA^+/DX5^+/Dll1^+/VEGF^+$) e portanto, dualidade funcional configurando o fenótipo $uNKDBA^+/DX5^+/perforina^+/TNFa^+/Dll1^+/VEGF^+$).

- As células $uNKDBA^+/DX5^+$ apresentam os receptores regulatórios ativador (Ly49H) e inibitor (Ly49I) da reposta imune inata em proporções variadas, confirmando a ocorrência de estágios de maturidade funcional entre as populações agranulares e granulares das uNKDBA+.

- Surpreendentemente, as células $uNKDBA^+/DX5^+/CD3^-$ coexpressam também o receptor CD8a, sugerindo controle regulatório e capacidade de reconhecimento de sinalizações externas incomuns às células NK.

7- FIGURAS

Figura 1

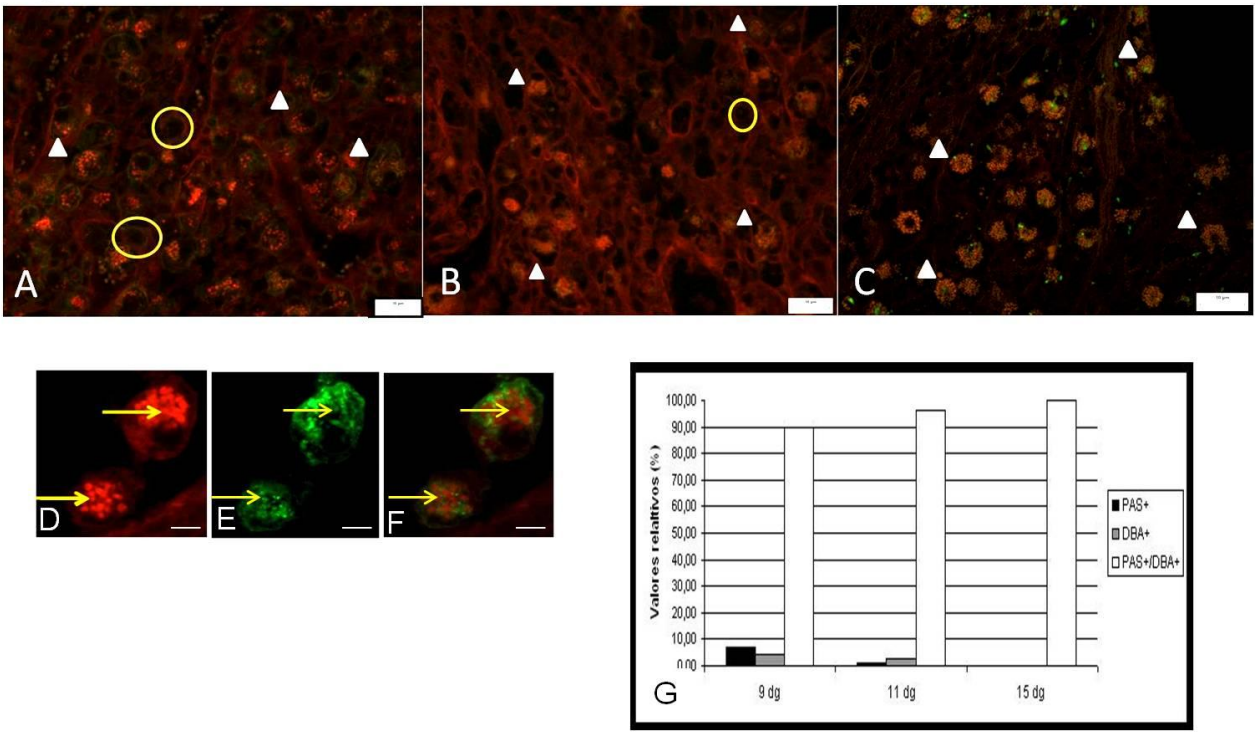

Figura 1: (**A-F**) –Dupla marcação em microscopia de fluorescência das reações citoquímicas de PAS (vermelha) e lectina DBA (verde) na região mesometrial dos sítios de desenvolvimentos embrionários identificando e localizando as células uNK no 9º (**A**), 11º(**B**) e 15º (**C**) dg de camundongo. Notar a colocalização das reações PAS^+/DBA^+ (cabeça de setas) com raras células uNK apenas DBA^+ (aro amarelo) e detalhes do padrão de reação PAS^+ (**D**), DBA^+ (**E**), imagem superposta (merge) PAS^+/DBA^+ (**F**) de uma células uNK (setas). Barras: **A-C** =30um; **D,E,F** = 10um.**G** –Histograma da proporção relativa (percentual) de células uNK quantificadas pela citoquímica de PAS e lectina DBA em reação simultânea ilustradas em A,B e C. Notar a proporção superior a 90% de células $uNKDBA^+/PAS^+$ em relação às células uNKDBA+/PAS^- e $uNKDBA^-/PAS^+$, nos três dias de gestação analisados.

Figura 2

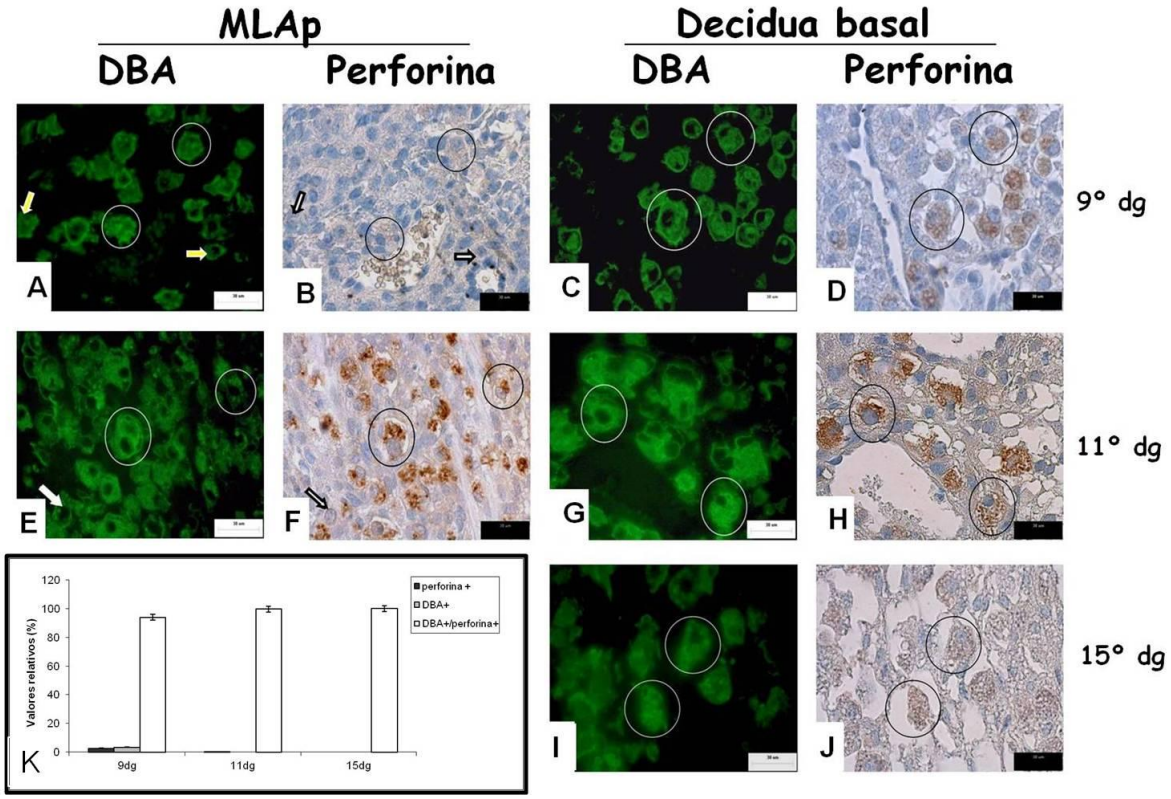

Figura 2: Dupla marcação de perforina em imunoperoxidase (microscopia de campo claro) e citoquimica de lectina DBA (microscopia de fluorescência) nas áreas do MLAp (mesometrial lymphoid Aggregate associated to pregnanancy) e da decídua basal da região mesometrial do sítio de desenvolvimento do embrião no 9º (**A-D**), 11º (**E-H**) e 15º (**I,J**) dg de camundongo. Notar as raras células uNKDBA+/Perforina- (cabeça de seta) encontradas apenas nas áreas do MLAP no 9 e 11ºdg e o predomínio de células uNKDBA+/perforina+ (circulos) cujas quantificações em proporções relativas (percentuais) no histograma (**K**) demonstram que a grande maioria (superior a 90% das células uNKDBA$^{+)}$ são também perforina^{+}. Barras = 30um

Figura 3

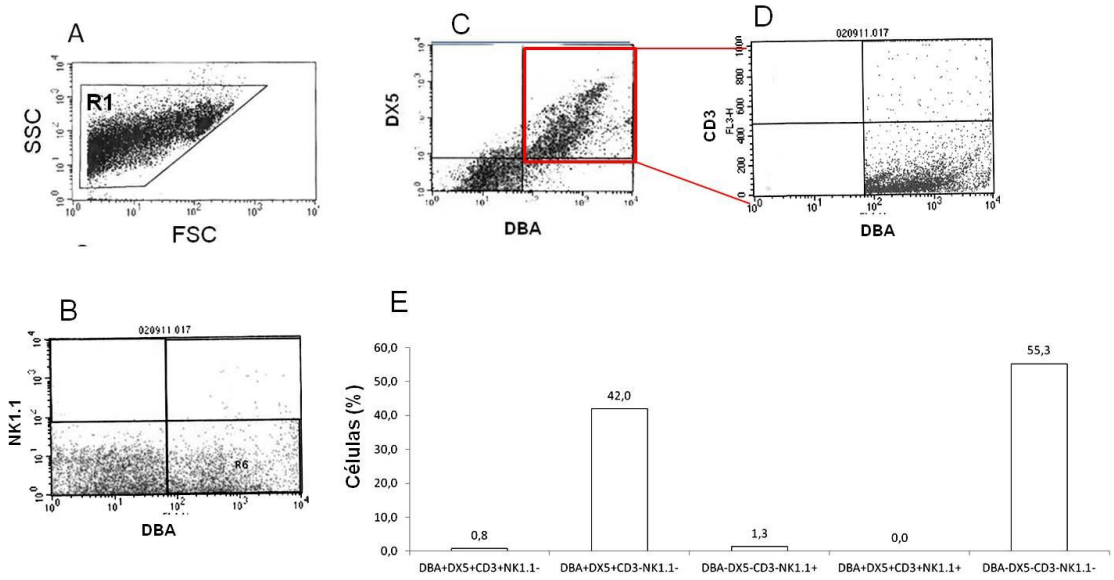

Figura 3: Citometria de fluxo da suspensão celular obtida da região mesometrial do sítio uterino no 9ºdg com delimitação do conjunto de células analisadas (**A**) determinado pelo tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (seleção R1). *Dotplot* representativos da expressão dos receptores de NK/uNK - lectina DBA *vs* NK.1.1 (**B**) e DBA *vs* DX5 (**C**). Expressão do receptor CD3 dentre as células $DBA^{+}DX5^{+}$ (**D**). (**E**) histograma da quantificação destas populações em valores relativos (percentuais) obtidos de três experimentos independentes demonstrando a população majoritária de células uNK $DBA^{+}/DX5^{+}/CD3^{-}/NK1.1^{-}$ (42%) em meio a 55,3% de células DBA^{-}.

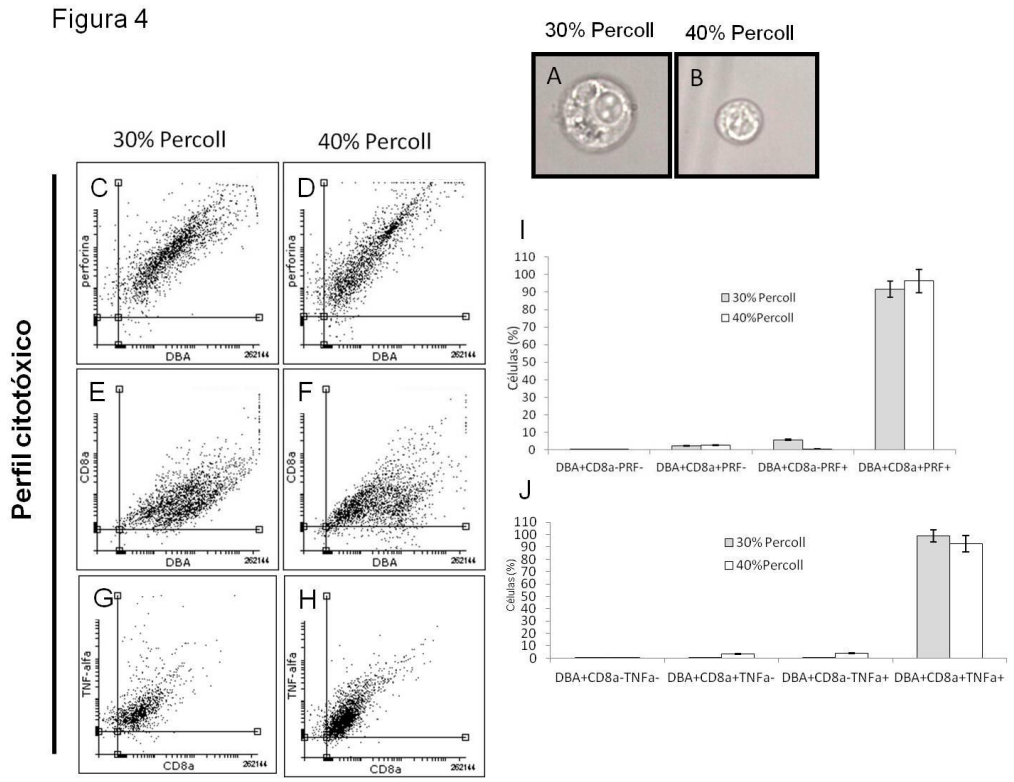

Figura 4: Citometria de fluxo da suspensão celular obtida no gradiente de percoll a 30% (**A**) e 40% (**B**), da região mesometrial do sítio uterino no 9ºdg. *Dotplot* representativos da expressão de perforina, TNFa e receptor CD8a nas células uNK DBA+ (**C-H**) e, histogramas (**I,J**) da quantificação destas populações em valores relativos (percentuais) obtidos de três experimentos independentes, demonstrando a população majoritária de células uNKDBA+ duplamente positivas para perforina e receptor CD8a (Percoll 30-91,50%, Percoll 40-96,31%-) e, as células uNKDBA+CD8a+ predominantemente TNFa+ nos gradientes de Percoll 30 (98,91%) e Percoll 40 (92,50%).

Figura 5

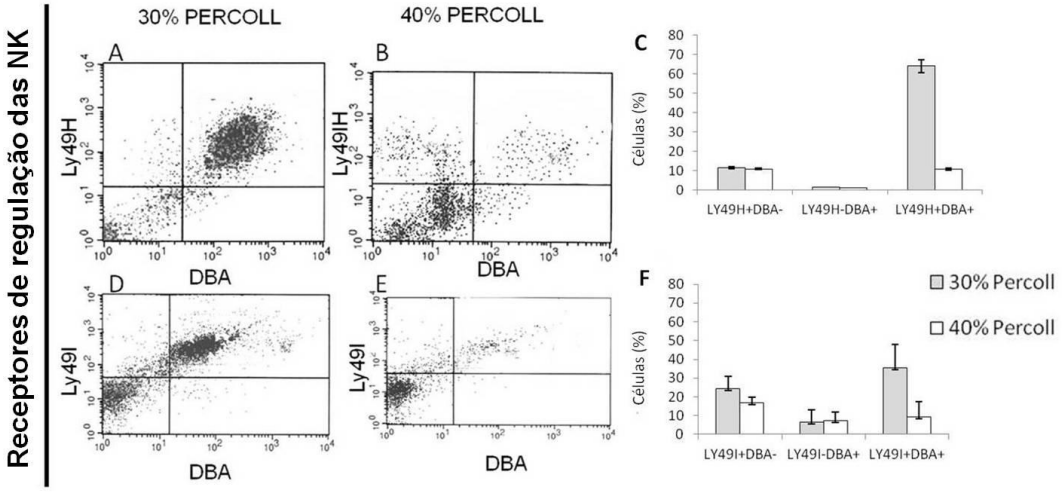

Figura 5 – Citometria de fluxo da suspensão celular obtida no gradiente de percoll a 30% e 40%, da região mesometrial do sítio uterino no 9ºdg. *Dotplot* representativos da expressão de receptores Ly49H (A,B) e Ly49I (D-E) nas células uNKDBA^{+} e os respectivos histogramas de quantificação de três experimentos independentes (C-F). Os valores representam à média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Figura 6

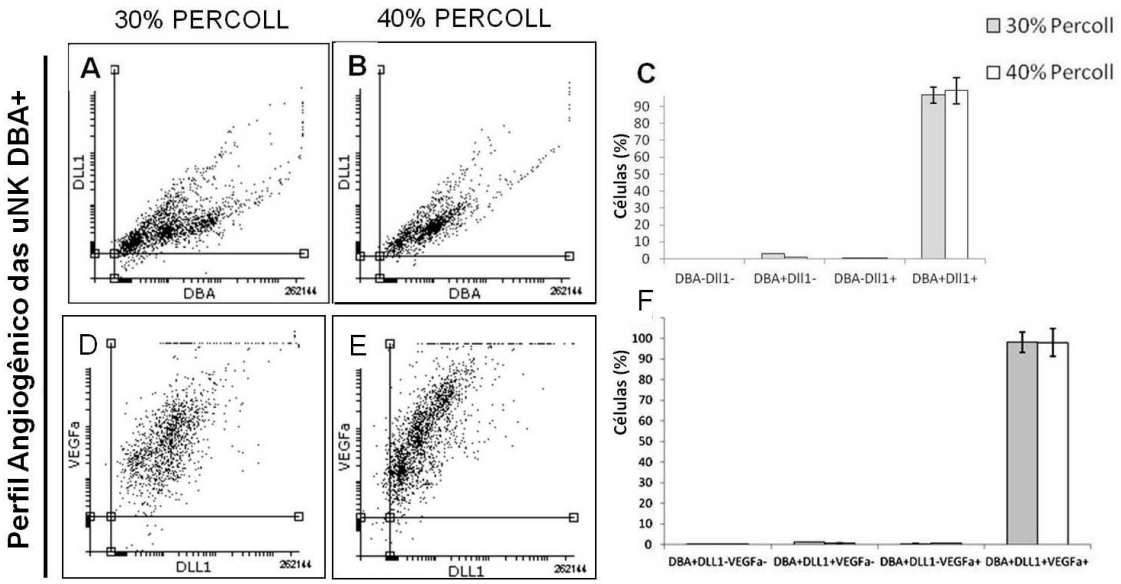

Figura 6: Citometria de fluxo da suspensão celular obtida no gradiente de percoll a 30% e 40%, da região mesometrial do sítio uterino no 9ºdg. *Dotplot* representativos da expressão do Dll1 (A,B) e VEGFa (D-E) nas células uNKDBA$^+$ e os respectivos histograma (C, F) apresentando a proporção relativa de células uNKDBA$^+$/Dll1$^+$ e uNKDBA$^+$/VEGFa$^+$ com coincidência em 100% de células uNKDBA$^+$/Dll1$^+$/VEGFa$^+$. Os valores representam à média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Figura 7

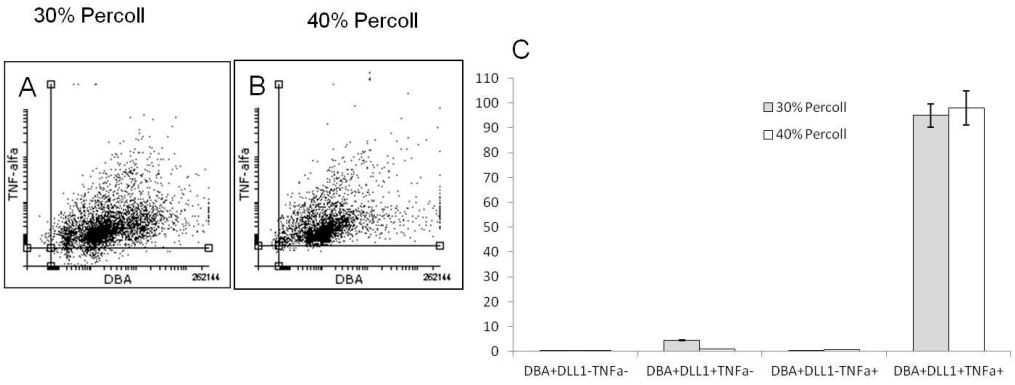

Figura 7: Citometria de fluxo da suspensão celular obtida no gradiente de Percoll a 30% e 40%, da região mesometrial do sítio uterino no 9ºdg. (A-B) *Dotplot* representativos da co-expressão do Dll1 e TNF-a nas células uNKDBA$^+$ e, o respectivo histograma (C) com os valores relativos (percentuais de n=3) mostrando a ocorrência de 4,533% de células uNKDBA$^+$/Dll1$^+$/TNF-a$^-$ no Percoll 30% e 1,08% de células uNKDBA$^+$/Dll1$^+$/TNF-a$^-$ no Percoll 40% , enquanto 94,97% são células uNKDBA$^+$/Dll1$^+$/ TNF-a$^+$ no Percoll 30% e 97,95% são células uNKDBA$^+$/Dll1$^+$/ TNF-a$^+$ no Percoll 40%. Os valores representam à média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Figura 8

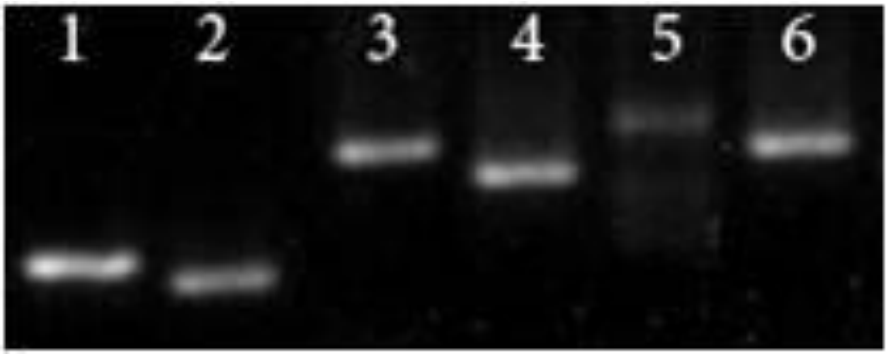

Figura 8 - Gel de agarose corado com brometo de etídio com o produto das reações de PCR de ciclofilina (1), TNF-a (2), Ly49h (3), Perforina (4), Ly49i (5) e CD8a (6) utilizando os cDNA obtidos das amostras de RNA extraídas das células uNK isoladas.

8 - REFERÊNCIAS

8 - Referências

ADDISON EG, NORTH J, BAKHSH I, MARDEN C, HAQ S, AL-SARRAJ S, MALAYERI R, WICKREMASINGHE RG, DAVIES JK, LOWDELL MW. (2005) - Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity.**Immunology**.116(3):354-61.

ANIM-NYAME N, GAMBLE J, SOORANNA SR, JOHNSON MR, STEER PJ. (2003) - Microvascular permeability is related to circulating levels of tumour necrosis factor-alpha in pre-eclampsia. **Cardiovasc Res.** 1;58(1):162-9.

ARASE H, SAITO T, PHILLIPS JH, LANIER LL.(2001) - Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2).**J Immunol**. 1;167(3):1141-4.

ARCURI F, CINTORINO M, CARDUCCI A, PAPA S, RIPARBELLI MG, MANGIONI S, DI BLASIO AM, TOSI P, VIGANÒ P. (2006) - Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor.**Reproduction.**;131(1):175-82.

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

BABBAGE SJ, ARKWRIGHT PD, VINCE GS, PERREY C, PRAVICA V, QUENBY S, BATES M, HUTCHINSON IV.(2001) - Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. **J Reprod Immunol**. ;51(1):21-7.

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

BIANCO, J.; STEPHENSON, K; YAMADA, A.T.; CROY, B.A.(2008) - Time-course analyses addressing the acquisition of DBA lectin reactivity in mouse lymphoid organs and uterus during the first week of pregnancy. **Placenta.** v29(12). 1009-15.

BIASSONI R, BOTTINO C, MILLO R, MORETTA L, MORETTA A. (1999) - Natural killer cell-mediated recognition of human trophoblast. **Semin Cancer Biol**. v. 9, 13-8.

BIZINOTTO M.C., TAMASHIRO W.M, GABRIEL D.L, YAMADA A.T (2008) - Uterine natural killer cells are immunogenic in syngeneic male mice. **J Reprod Immunol**.;79(1):18-25.

BLOIS, S. M.; KLAPP, B. F.; BARRIENTOS, G.(2010) - Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: unravelling the functions of DC and NK cells. **Journal of reproductive immunology.** v.88(2), p.86-96.

BROOKS A.G.; POSCH P.E.; SCORZELLI C.J.; BORREGO F.; COLIGAN J.E (1997) - NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. **J Exp Med**, v.85, 795–800

BULMER JN, LASH GE. (2005) - Human uterine natural killer cells: a reappraisal. **Mol Immunol.**;42(4):511-21. Review.

BULMER, J.N.; MORRISON, L.; LONGFELLOW, M.; RITSON, A.; PACE, D.(1991) - Granulated lymphocytes in human endometrium: histochemical and immunohistochemical studies. **Hum. Reprod**. v.6, p.791-798.

BURKE SD, BARRETTE VF, BIANCO J, THORNE JG, YAMADA AT, PANG SC, ADAMS MA, CROY BA. (2010) - Spiral arterial remodeling is not essential for normal blood pressure regulation in pregnant mice Hypertension. **Hypertension**.;55(3):729-37

CALLEJA-AGIUS J., E. JAUNIAUX, A.R. PIZZEY, S. MUTTUKRISNA (2012) - Investigation of systemic inflammatory response in first trimester pregnancy failure **Human Reproduction**, 27, pp. 349–357

CANDELORO L, ZORN TM (2007) - Distribution and spatiotemporal relationship of activin a and follistatin in mouse decidual and placental tissue.**Am J Reprod Immunol**. 58(5):415-24

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

CHANGARIS DG, COMBS J, SEVERS WB (1977) - A microfluorescent PAS method for the quantitative demonstration of cytoplasmic 1,2-glycols. **Histochemistry**. 20;52(1):1-15.

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**. 1;168(1):22-8

CHEN Z, ZHANG J, HATTA K, LIMA PD, YADI H, COLUCCI F, YAMADA AT, CROY BA. (2012) - DBA-lectin reactivity defines mouse uterine natural killer cellsubsets with biased gene expression. **Biol Reprod**. 4;87(4):81.

CHIOSSONE L., CHAIX J. , FUSERI N., ROTH C., VIVIER E., WALZER T., (2009) - Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. **Blood** 113: 5488-5496

CHRISTIANSEN O.B., H.S. NIELSEN, A.M. KOLTE (2006) - Inflammation and miscarriage **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, pp. 302–308

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

COOPER M.A.; FEHNIGER T.A.; TURNER S.C.; CHEN K.S.; GHAHERI B.A.; GHAYUR T.; CARSON W.E.; CALIGIURI M.A (2001) - Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. **Blood, 97**:3146-51

COOPER MA, FEHNIGER TA, FUCHS A, COLONNA M, CALIGIURI MA. (2004) - NK cell and DC interactions. **Trends Immunol**; **25**:47–52.

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

CROY BA, ASHKAR AA, FOSTER RA, DISANTO JP, MAGRAM J, CARSON D, GENDLER SJ, GRUSBY MJ, WAGNER N, MULLER W, GUIMOND MJ. (1997) - Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy**. J Reprod Immunol**. v. 35:111–133. 14.

CROY BA, CHEN Z, HOFMANN AP, LORD EM, SEDLACEK AL, GERBER SA (2012) - Imaging of vascular development in early mouse decidua and its association with leukocytes and trophoblasts. **Biol Reprod**. 29;87(5):125.

CROY BA, ESADEG S, CHANTAKRU S, VAN DEN HEUVEL M, PAFFARO VA, HE H, BLACK GP, ASHKAR AA, KISO Y, ZHANG J..(2003) - Update on pathways regulating the activation of uterine Natural Killer cells, their interactions with

decidual spiral arteries and homing of their precursors to the uterus. **J Reprod Immunol**.v.59, 175-91(2003).

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

CROY, B.A. & KASSOUF, S.A. (1989) - Evaluation of the murine metrial gland for immunological function. **J Reprod Immunol.** v. 15, 51-69.

DELGADO, S.R., MCBEY, B, YAMASHIRO, S., FUJITA, J. KISO, Y., CROY, B.A. (1996) – Accounting the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J. Leuk. Biol*. **59**:262-269.

DI SANTO JP. (2006a) - Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. **Annu Rev Immunol**; **24**:257–286.

DI SANTO,JP, VOSSHENRICH CAJ. (2006b) - Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development **Immunological** Reviews **214**: 35–46

DRAYTON DL, LIAO S, MOUNZER RH (2006) - Ruddle NH:Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. **Nat Immunol**; 7:344–353.

FEHNIGER T.A.; CAI S.F.; CAO X.; BREDEMEYER A.J.; PRESTI R.M.; FRENCH A.R.; LEY T.J. (2007) - Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. **Immunity**;26: 798–811.

FUCHSHUBER PR, LOTZOVÁ E (1992) - Differential oncolytic effect of NK-enriched subsets in long-term interleukin-2 cultures. **Lymphokine Cytokine Res**. ;11(5):271-6.

GRANOT I, GNAINSKY Y, DEKEL N.(2012) - Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. **Reproduction**.;144(6):661-8.

GUIMOND M-J.; WANG B; CROY BA. (1998) - Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell-deficient tg epsilon 26 mice. ***J. Exp. Med***.; v.187:217–223

HANNA J, MANDELBOIM O: (2007) - When killers become helpers. **Trends Immunol**; **28**:201–206.

HANNA, J.; WALD, O.; GOLDMAN-WOHL; D.(2003) - CXCL12 expression by invasive trophoblasts in-duces the specific migration of CD16- human natural killer cells. **Blood**. v.102, p.1569-1577.

HATTA K, MACLEOD RJ, GERBER SA, CROY BA (2012) - .Emerging themes in uterine natural killer cell heterogeneity and function. **Am J Reprod Immunol.**;68(4):282-9.

HATTA K, CARTER AL, CHEN Z, LENO-DURÁN E, RUIZ-RUIZ C, OLIVARES EG, TSE MY, PANG SC, **CROY** BA (2011) - Expression of the vasoactive proteins AT1, AT2, and ANP by pregnancy-induced mouse uterine natural killer cells.**Reprod Sci**. 18(4):383-90.

HERINGTON J.L.; UNDERWOOD T.; MCCONAHA M.; BANY B.M (2009) - Paracrine signals from the mouse conceptus are not required for the normal progression of decidualization. **Endocrinology.** v.150:4404– 4413.

HUNT JS, CHEN HL, MILLER L.. (1996) - Tumor necrosis factors: pivotal components of pregnancy? **Biol Reprod**. Mar;54(3):554-62

HUNTINGTON ND, VOSSHENRICH CA, DI SANTO JP: (2007) - Developmental pathways that generate natural-killercell diversity in mice and humans. Nat **Rev Immunol**;

JOKHI P.P., A. KING, A.M. JOKHI PP, KING A, SHARKEY AM, SMITH SK, LOKE YW.S.K. SMITH, Y.W. LOKE (1994) - Screening for cytokine messenger ribonucleic acids in purified human decidual lymphocyte populations by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction **J. Immunol**., pp. 4427–4435

JOKHI PP, KING A, LOKE YW (1994) - Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human trophoblast cells and by decidual large granular lymphocytes. **Hum Reprod.**; 9(9):1660-9.

KALKUNTE S, CHICHESTER CO, GOTSCH F, SENTMAN CL., ROMERO R, SHARMA S (2008) - Evolution of Non-Cytotoxic Uterine Natural Killer Cells **American Journal of Reproductive Immunology** - **59**; 5: 425–432

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

KING A, WOODING P, GARDNER L, LOKE YW. (1993) - Expression of perforin, granzyme A and TIA-1 by human uterine CD56+ NK cells implies they are activated and capable of effector functions.**Hum Reprod.** 8(12):2061-7.

KING, A., BURROWS, T.D., HIBY, S.E., BOWEN, J. M., JOSEPH, S., VERMA, S., LIM, P.B., GARDNER, L., LEBOVTEILLER, P., ZIEGLER, A., UCHANSKA-ZIEGHER, B. LOKE, Y.M. (2000) – Surface expression of HLA-C human extravillous trophoblast. **Placenta**, **21**:376-387.

KITAYA K, YAMAGUCHI T, YASUO T, OKUBO T, HONJO H: (2007) - Post-ovulatory rise of endometrial CD16 natural killer cells: In situ proliferation of residual cells or selective recruitment from circulating peripheral blood? **J Reprod Immunol**; **76**:45–53.

KONNO R, IGARASHI T, OKAMOTO S, SATO S, MORIYA T, SASANO H, YAJIMA A. (1999) - Apoptosis of human endometrium mediated by perforin and granzyme B of cells and cytotoxic T lymphocytes.Tohoku **J Exp Med**;187(2):149-55.

KOO GC, PEPPARD JR (1984) - Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody. **Hybridoma**. Fall;3(3):301-3

KOPCOW HD, ALLAN DS, CHEN X, RYBALOV B, ANDZELM MM, GE B, STROMINGER JL (2005) - Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. **Proc Natl Acad Sci USA**; **102:**15563– 15568.

KUSAKABE K, LI ZL, KISO Y, OTSUKI Y (2005) - Perforin improves the morphogenesis of mouse placenta disturbed by IL-2 treatment.**Immunobiology**.; 209(10):719-28.

LANIER, L. L. (1998) – NK cell receptor. **Ann. Revs. Immunol**. **16**:359-393.

LANIER, LEWIS L. (2005) - NK cell recognition. **Annual review of immunology**.;v. 23 (225-74).

LANIER, LEWIS L.(2003) - Natural killer cell receptor signaling. **Curr Opin Immunol**.v 15(3).; p.308-314.2003.

LASH G.E.; ROBSON S.C.; BULMER J.N. (2010) - Review: functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. **Placenta** , v. 31: S87–S92.

LASH GE, OTUN HA, INNES BA, PERCIVAL K, SEARLE RF, ROBSON SC, BULMER J N. (2010) - Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine **natural killer cells** is dependent on gestational age. **Hum Reprod.** ; 25(5):1137-45

LEONARD, S.; MURRANT, C.; TAYADE, C.; VAN DEN HEUVEL; M .; WATERING; R ; CROY, B.A.(2006) - Mechanisms regulating immune cell contributions to spiral artery modification—facts and hypotheses—a review. **Placenta**, V.27, p.40-46.

LI G, HUANG W, XIA Q, YANG K, LIU R, ZHU H, JIANG W. (2008) - Role of uterine natural killer_cells_in_angiogenesis_of_humandecidua of the first-trimester pregnancy. **Sci China C Life Sci**.; 51(2):111-9.

LIMA PD, CROY BA, DEGAKI KY, TAYADE C, YAMADA AT.(2012) - Heterogeneity in composition of mouse uterine natural killer cell granules. **J Leukoc Biol.**; 92(1):195-204.

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

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

MOFFETT-KING (2002) - A. Natural killer cells and pregnancy. **Nat Rev Immunol** v.2, 656-63.

MORETTA A. (2002) - Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. **Nat Rev Immunol**;2: p.957–964.

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

MSELLE TF, MEADOWS SK, ERIKSSON M, SMITH JM, SHEN L, WIRA CR, SENTMAN CL.(2007) - Unique characteristics of NK cells throughout the human female reproductive tract**.Clin Immunol**.124(1):69-76.

MUELLER-ECKHARDT, P. MALLMANN, J. NEPPERT, A. LATTERMANN, A. MELK, O. HEINE, R. PFEIFFER, J. ZINGSEM, N. DOMKE, A. MOHR-PENNERT (1994) - Immunogenetic and serological investigations in nonpregnant and in pregnant

women with a history of recurrent spontaneous abortions. **Journal of Reproductive Immunology**, 27, p. 95–109.

NARUSE K, LASH GE, BULMER JN, INNES BA, OTUN HA, SEARLE RF, ROBSON SC (2009a) - The urokinase plasminogen activator (uPA) system in uterine natural killer cells in the placental bed during early pregnancy. **Placenta**.;30(5):p.398-404.

NARUSE K, LASH GE, INNES BA, OTUN HA, SEARLE RF, ROBSON SC, BULMER JN.(2009) - Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2,_MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy.**Hum Reprod**. ;24(3):p.553-61.

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

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

PEEL, S. (1989) - Granulated metrial gland cells. Adv. Anat Embriol. Cell Biol., v.115, p.1-112.

PLOW EF, HAAS TA, ZHANG L, LOFTUS J, SMITH JW.(2000) - Ligand binding to integrins.**J Biol Chem**. 21;275(29):p.21785-8.

QUENBY S, NIK H, INNES B, LASH G, TURNER M, DRURY J, BULMER J (2009) - Uterine natural killer_cells_and_angiogenesis_in recurrent reproductive failure. **Hum Reprod.** 24(1):p.45-54.

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

ROSMARAKI, E.E.; DOUAGI, I.; ROTH C.; COLUCCI F.; CUMANO A.; DI SANTO J.P. (2001) - Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. **Eur J Immunol**. v.31(6): p.1900-1909.

RUKAVINA D, PODACK ER (2000) - Abundant perforin expression at the maternal-fetal interface: guarding the semiallogeneic transplant? **Immunol** 21(4):160-3. Review

SAINSON RC, JOHNSTON DA, CHU HC, HOLDERFIELD MT, NAKATSU MN, CRAMPTON SP, DAVIS J, CONN E, HUGHES CC (2008) - TNF primes

endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype.**Blood**. 5;111(10): p.4997-5007.

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- CD56bright natural killer cells. **Cell Immunol** 152, p. 605-13.

SAITO S, MURAKOSHI K, KOTAKE S, KAMATANI N, TOMATSU T.(2008) - . Granzyme B induces apoptosis of chondrocytes with natural killer cell-like cytotoxicity in rheumatoid arthritis J **Rheumatol.** ;35(10):1932-43.

SAKAI M, OGAWA K, SHIOZAKI A, YONEDA S, SASAKI Y, NAGATA K, SAITO S. (2004) - Serum granulysin is a marker for Th1 type immunity in pre-eclampsia. **Clin Exp Immunol** 136, 114-9.

SARGENT IL, BORZYCHOWSKI AM, REDMAN CW: (2006) - NK cells and human pregnancy–an inflammatory view. **Trends Immunol**; 27:399–404

SCHAART G, HESSELINK RP, KEIZER HA, VAN KRANENBURG G, DROST MR, HESSELINK MK. (2004) – A___modified___PAS_stain_combined_with immunofluorescence for quantitative analyses of glycogen in muscle sections. **Histochem Cell Biol.**;122(2):161-9.

SHEIKHI A.K.; TAYADE C.; PAFFARO V.A.; CROY B.A. (2007) - Are natural killer cells distributed in relationship to nerve fibers in the pregnant mouse uterus? **J Biol Sci.** v.1;10(17):2885-9.

SLUKVIN II, MERKULOVA AA, VODYANIK MA, CHERNYSHOV VP. (1996) - Differential expression of CD45RA and CD45RO molecules on human decidual and peripheral blood lymphocytes at early stage of pregnancy. **Am J Reprod Immunol**. v 35 (1):16-22.

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

SROUR EF, LEEMHUIS T, JENSKI L, REDMOND R, JANSEN J. (1990) - Cytolytic activity of human natural killer cells subpopulations by four-colour immunofluorescence flow cytometric sorting. **Cytometry**. 11:442–

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

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

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

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

TUCKERMAN, E.; MARIEE, N.; PRAKASH, A.; LI, T.C.; LAIRD, S.; (2010). - Uterine natural killer cells in peri-implantation endometrium from women with repeated implantation failure after IVF. **J. Reprod. Immunol.** v.87, 60–66.

VAN DEN HEUVEL MJ, XIE X, TAYADE C, PERALTA C, FANG Y, LEONARD S, PAFFARO VA JR, SHEIKHI AK, MURRANT C, CROY BA.(2005) - A review of trafficking and activation of uterine natural killer cells. **Am J Reprod Immunol**. 54(6):322-31. Review.

VASSILIADOU, N. & BULMER, J.N. (1998) - Characterization of tubal and decidual leukocyte populations in ectopic pregnancy: evidence that endometrial granulated lymphocytes are absent from the tubal implantation site**. Fertil Steril** 69, 760-7

VIVIER, E.; ANFOSSI, N. (2004) - Inhibitory NK-cell receptors on Tcells: witness of the past, actors of the future. **Nat. Rev. Immunol**. v.4, 190–198

YADI H, BURKE S, MADEJA Z., HEMBERGER M, MOFFETT A, COLUCCI F. (2008) - Unique Receptor Repertoire in Mouse Uterine NK cells. **The Journal of Immunology** 181: 6140–6147.

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

ZHANG JH, YAMADA AT, CROY BA.(2009) - DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua.**Placenta**; 30(11):968-73.

ZHANG J, CHEN Z, SMITH GN, CROY BA.(2010) - Natural killer **cell**-triggered vascular transformation: maternal care before birth? **Cell** Mol Immunol.;8(1):1-11.

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

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

Capítulo 2

Delta-like Ligand (DLL)1 Expression in Early Mouse Decidua and Its Localization to Uterine Natural Killer Cells

OPEN ACCESS Freely available online PLOS | ONE

Delta-Like Ligand (DLL)1 Expression in Early Mouse Decidua and Its Localization to Uterine Natural Killer Cells

Karina Y. Degaki[1,2], **Zhilin Chen[1]**, **Aureo T. Yamada[2]**, **B. Anne Croy[1]***

1 Department of Biomedical and Molecular Sciences, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada, 2 Institute for Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Abstract

Uterine vascular changes, critical for pregnancy success, occur at each implant site during endometrial decidualization. Mesometrial decidualization recruits high numbers of angiogenic, uterine Natural Killer (uNK) cells that trigger midpregnancy spiral arterial remodeling. We postulated that uNK cells contribute to early decidual angiogenesis as endothelial-cell extrinsic sources of Delta-like ligand 1 (DLL1), a molecule that induces endothelial tip cell differentiation and orthogonal vascular growth in other tissues. Virgin uteri expressed *Dll1* mesometrially and anti-mesometrially and relative expression increased in both anatomic regions as pregnancy progressed. Analyses of transcripts from gd10.5 uNK cells flow sorted on the basis of expression of *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) lectin revealed that DBA+ but not DBA- uNK cells expressed *Dll1*. Immunostaining at gd4.5 found DLL1-expressing cells rare. At gd6.5, DBA+ uNK cells at all stages of maturation expressed DLL1. By gd10.5, DLL1 immunoreactivity was strongly expressed by some but not all DBA+ uNK cells and more weakly by DBA- cells. DLL1+ cells were mesometrially stratified and concentrated within central decidua basalis. Our data suggest that uNK cells have the potential to induce endothelial tip cell differentiation and to promote non-planar vascular growth within early decidua basalis.

Citation: Degaki KY, Chen Z, Yamada AT, Croy BA (2012) Delta Like Ligand (DLL)1 Expression in Early Mouse Decidua and Its Localization to Uterine Natural Killer Cells. PLoS ONE 7(12): e52037. doi:10.1371/journal.pone.0052037

Editor: Hyunjung Lim, Konkuk University, Republic of Korea

Received September 27, 2012; **Accepted** November 13, 2012; **Published** December 28, 2012

Copyright: © 2012 Degaki et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: These studies were supported by awards from the Natural Sciences and Engineering Research Council, Canada, the Canadian Institutes for Health Research, the Canada Research Chairs Program, the Canada Foundation for Innovation, Foreign Affairs and International Trade Canada and CAPES (Brazil). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: croya@queensu.ca

These authors contributed equally to this work.

Introduction

The mammalian Notch signaling pathway is composed of four receptors (Notch 1–4) and five ligands (Jagged1 and 2 and Delta-like ligand (DLL) 1, 3 and 4). Notch uses cell contact-dependent signaling mechanisms triggered by the binding of Notch ligands to their receptors [1]. Signal transmission generally occurs between neighboring cells that express high levels of either the receptor or the ligand, although receptor-ligand co-expression occurs in some cell types, such as endothelium [2]. Notch activity in endothelial cells is essential for mouse development and successful pregnancy with the receptors Notch1 and Notch4 and the ligands Jagged1, DLL1 and DLL4 having major expression [2,3]. Notch1 and Notch4 have similar roles promoting arterial cell-fate selection and angiogenesis [4]. Jagged1 plays roles in vascular smooth muscle development essential for postnatal survival [5,6]. Loss of one copy of *Dll4* is a midpregnancy, embryonic lethal due to arterial-venous malformations [7] while heterozygosity at *Dll1* results in a microscopic vascular anomaly compatible with life [1]. Studies of neonatal retinal vessels using *Dll1* heterozygotes identified reduced endothelial tip cell development and impaired vascular branching in deeper layers compared with +/+ controls. That is, orthogonal branching was more impaired than planar branching. Of importance, DLL1 was shown to be a product of extravascular cells [1].

Another tissue with rapid centrifugal advancement of a vascular plexus is the mouse implantation site [8]. Shortly after hatched blastocyst implantation on the anti-mesometrial (AM) side of the uterus, late on gestation day (gd)3, decidualization of the uterine stroma begins. Maternal neoangiogenesis commences after about 24 h later at gd5.0 [9] radiating from the embryonic crypt [8,10]. Successful decidual development, including decidual microvascular development, is essential for completion of implantation in mice [11–13], humans [14,15] and other species with hemochorial placentation [16,17]. Steroid hormone regulation of Notch signaling pathways is implicated in uterine decidualization and decidual vascular development in mice, human and baboons [18,19]. Roles for the Notch ligands have received less attention. [20–22].

Onset of decidualization in mice is followed rapidly by a massive influx of extravascular and intravascular Natural Killer lymphocytes (uNK cells) into each implant site [23,24]. UNK cells and other leukocyte subtypes localize to the mesometrial (M) decidua basalis and would be present in the decidual samples in which Notch signaling has been demonstrated. At gd6.5, 50% of uNK cells express the surface lectin *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA).

The proportion of this uNK cell phenotype increases to 90% by gd10.5 when the effects of uNK cells on the promotion of structural changes in spiral arteries are quantifiable [25]. From adoptive cell transfer studies, DBA+ uNK cells were shown to be a subset that homes to the uterus from peripheral organs [25]. At midpregnancy (gd10.5), the DBA+ rather than DBA- subset contains the strongly angiogenic uNK cells [26]. The DBA+ uNK cell subset synthesizes vascular endothelial growth factor (VEGF) [27,28], placenta growth factor (PGF) [29], ephrin B2 (EFNB2) [30], CD31 [8] and other molecules important to endothelial cells. UNK cells are found only at implant sites and not between them. At implant sites, uNK cells are found only mesometrially where they surround major branches from the uterine artery that supply each placenta. Both whole mount *in situ* immunohistochemistry and immunohistochemical staining of decidual tissue sections indicate that the highest density of new vessels in mouse implant sites is in the uNK cell-enriched, decidua basalis [8,27]. The special angiogenic functions attributed to uterine but not to blood NK cells [26,31] led us to postulate that uNK cells may be a source of endothelial cell-extrinsic DLL1 and that their recruitment to early decidua basalis would elevate numbers of endothelial tip cells to prepare a rich, 3-dimensional, vascular network to support the disc-shaped mouse placenta that completes its development in this region at approximately gd9.5–10. Molecular and immunohistochemical findings support this hypothesis.

Materials and Methods

Animals

Animal use was carried out in compliance with recommendations of the Canadian Council on Animal Care's Guide to the Care and Use of Experimental Animals under protocols approved by University Animal Care Committee (UACC), Queen's University. Inbred C57BL/6 (B6) and randombred CD1 mice were purchased from Charles River (St. Constant, QU). All mice were maintained with water and food "ad libitum" and 12 h light cycles. For pregnancies, 8-to 10-wk old females were caged overnight with syngeneic males, and vaginal plug detection was called gd0.5. Mice were euthanized by cervical dislocation and uteri were dissected and prepared distinctly for each protocol as described below. Vaginal smears and ovarian observation at post mortem were used to determine stage of estrus in virgin mice.

Whole Mount *in situ* Immunohistochemistry

For whole mount staining, B6 uterine dissections were conducted under dissection microscope magnification as previously reported [8]. For gd4.5, uteri were bisected at the cervix and mid uterine horn then halved longitudinally to give M or AM tissue. For gd6.5 or 7.5, the AM uterine wall was incised, reflected mesometrially and trimmed to leave only a small tag of landmark myometrium. Decidual capsules were then halved midsagittally to open the embryonic crypt. Dissected tissues were then placed into 200 µL PBS supplemented with 1% bovine serum albumen (BSA) and 0.1% sodium azide (PBA) in a 5 mL tube on ice, 10 ug/mL of a blocking antibody to the IgG Fc receptor (anti-CD16/CD32 (supernatant of hybridoma 2.4G2, ATCC Bethesda MD)) were added and then CD45-FITC (1.5 µg/mL, 25-0451-81, eBioscience) and CD31-PE (0.8 µg/mL, 553373, BD Pharmingen) or DLL1-PE (0.8 µg, 128307, BioLegend, Cedar Lane Laboratories, Burlington ON, Canada) were added. After 1 h of incubation with rotation at 4°C, an excess of PBA was added to each tube and tissues were removed, placed on microscope slides, cover slipped, examined using epifluorescence microscopy and photographed.

RNA Analysis

Virgin, gd4.5 and gd5.5 B6 uteri were dissected into M and AM tissue as described above for gd4.5 whole mounts. In separate dishes containing PBS, M or AM tissue was placed, lumen side up and small curved forceps were used to gently scrape the mucosa away from the uterine wall. At gd4.5 and 5.5, conceptus cells would be present predominantly in AM scrapings. At gd6.5, the decidual capsule containing the early primitive streak embryo can be dissected from the uterine wall. Dissected deciduas were opened under microscopic observation using #5 watchmaker's forceps (Fine Science Tools, North Vancouver, B.C.), and the egg cylinder was removed. Then each decidual capsule was halved transversely into M and AM samples and similar samples from one pregnancy were pooled for RNA isolation. By gd10.5, AM decidua has regressed and was not studied while the M region has developed a second area distinct from decidua basalis. This transient region forms between the layers of uterine muscle only at implant sites, is enriched for dividing uNK cells [24] and is known as the mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy (MLAp). To dissect gd10.5 uteri, the uterus was incised anti-mesometrially and the fetus and its membranes were discarded. The placenta was removed from the uterine wall, placed with the umbilical cord remnant down and the upper, whitish decidua basalis was removed. MLAps were harvested from the uterine wall with fine curved iridectomy scissors. For both tissues, all samples from a single litter were pooled. At least two females were independently prepared at each time point and their uterine samples were analyzed in multiple independent experiments.

Total RNA was prepared from M and AM virgin endometrium, gd4.5, gd5.5 and gd6.5 B6 M and AM decidua and from gd10.5 B6 decidua basilis and MLAp using Qiagen RNeasy Mini Kit. cDNA was synthesized from 0.5 µg total RNA using Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System. The resulting cDNA was used as template for qRT-PCR. qRT-PCR used the ABI Prism 7500 system with TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). TaqMan® Gene Expression Assays containing *Hprt1*primer and TaqMan probe (Mm01545399_m1) were purchased from ABI. PrimeTime® qPCR Assays containing primers and TaqMan probes were purchased from Integrated DNA Technologies, Inc. for Mm.PT.51.8548995 (*Dll1*). PCR conditions were initial incubation (2 min; 50°C), enzyme heat activation (10 min; 95°C), 40 cycles (15 s at 95°C; 1 min at 60°). Relative expression of target transcripts was normalized to hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase-1 (*Hprt1*) transcripts.

Separation of DBA+ and DBA- uNK Cell Subsets and their Gene Expression Analysis by Quantitative qRT-PCR

Gd10.5 decidua basalis and MLAp were dissected as above, mechanically prepared as pooled cell suspensions and sorted by flow cytometry as previously described and validated [26]. Randombred CD1 mice that have large litters were used since neither adequate cell numbers nor RNA of sufficient quality was obtained after several gd10.5 B6 cell sorts. Two independent CD1 cell sorting experiments were conducted. Washed cells were incubated in 1% BSA, then stained (30 min, 4°C) with FITC-conjugated DBA (0.1 µg/mL; Sigma-Aldrich) and antibodies from eBioscience (San Diego, CA, USA): PE-conjugated anti-mouse CD122 (1/100; clone 5H4;) and PE-Cy5-conjugated anti-mouse CD3 (1/100; clone 145-2C11). Forward and side scatter properties were used to set the initial gates, then CD3-CD122+ cells were gated, sorted as DBA- or DBA+ cells and collected using an EPICS Altra Flow Hy-PerSort Cytometer (Beckman Coulter, Mississauga ON). Sorted cells were lysed and RNA was isolated

using a PicoPure isolation kit (Molecular Devices; Toronto, ON) following manufacturer's instructions. RNA was reverse transcribed and amplified using the Ovation Pico WTA System (NuGEN, San Carlos, CA) to PCR template cDNA.

Immunohistochemistry for Detection of DLL1 and DBA Lectin Reactive Cells

Six-micrometer cryostat sections were cut from O.C.T.-embedded gd6.5 and gd10.5 B6 and CD1 implant sites, mounted onto coated slides (Superfrost Plus, Fisher Scientific, Toronto ON) and fixed (100% acetone, 15 min, 4°C). Sections were blocked (1% BSA, 30 min, 20°C), before overnight incubation (4°C) with anti-DLL1-PE (0.8 µg/mL, 128307, BioLegend). Sections were washed (PBS), incubated (1 h, 20°C) with FITC-DBA lectin (2 µg/mL, Sigma, Oakville, ON, Canada) then cover slipped with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) supplemented mounting medium (DAPI Gold with Anti-Fade Agent, Molecular Probes; Burlington, ON, Canada). Sections were photographed under epifluorescence with reference alignment using Zeiss Axiomat and Axiovision image analysis software (Zeiss; Toronto, ON, Canada). Archived, gd10.5 B6 paraffin embedded tissue sections co-stained for DBA lectin and periodic Acid Schiff's reagent (PAS) [25], a reagent that recognizes all granulated uNK cells, were studied microscopically for orientation and photographed.

Statistical Analyses

Data are expressed as means±SEM. Statistical analyses were performed using Prism 4 software (GraphPad Software, Inc.). Statistical significance of the difference between two sets of data was assessed by one away ANOVA with Tukey's post test. $P<0.05$ was considered significant.

Results

Mesometrial Decidual Vessels Differ to Vessels in Anti-mesometrial Decidua

Whole mount immunohistochemistry was used to demonstrate that vessels in early M decidua differ from vessels in AM decidua. These differences are illustrated in Fig. 1 for gd7.5 B6 mice. Even at low power (Fig. 1A), the greater density of CD31+ vessels in the M versus AM or lateral decidua is visible. At higher power, vessels of the M region are seen to be broader and more web-like than in the AM region (compare Fig. 1B to 1C). The webbed appearance is representative of a plexus of immature vessels before pruning and lumen formation in other tissues and in tumors. Under CD31 imaging, the vessels in the secondary AM decidua give the appearance of small, honeycomb-like structures (Fig. 1C), in comparison to the larger distances between related vessels in M decidua (Fig. 1B).

CD45+ cells are present in both M and AM decidua but they are more numerous and more uniformly of lymphoid appearance mesometrially (compare Fig. 1D to 1E). Irregularly shaped CD45+ cells are present throughout decidua but are more noticeable in lateral and AM decidua due to lower CD45+ cell numbers in these regions. The irregularly shaped CD45+ cells were previously classified as CD11b+CD11c-F4/80-Gr-1-CD3-NK1.1-CD31- immature monocytes [8]. When image colors are merged, it is evident that CD45+CD31+ cells are common in M decidua and rare in AM decidua (compare Fig. 1F to 1G). These data illustrate that in live M decidua, leukocytes are abundant and co-localized with vessels in a manner supportive of the hypothesis that they promote angiogenesis. These data also suggest that mechanisms supporting angiogenesis in M decidua differ from those in AM decidua.

Dll1 Expression in Mouse Uterine Mucosa and Early Decidua

To address *Dll1* expression in the M and AM regions of the virgin uterus, RNA was isolated from diestrous B6 uterine horns that had been transected into M and AM halves. *Dll1* transcripts were detected in both M and AM mucosa (Fig. 2A, 2B). To address whether *Dll1* expression in the uterus was altered by pregnancy, a time course of M and AM *Dll1* expression was conducted using B6 mice. At gd4.5, before decidual angiogenesis is initiated, relative transcript abundance was lower mesometrially than in virgin M uterus. Relative transcript abundance in M decidua then returned to virgin levels at gd5.5 and increased after gd6.5 (Fig. 2A). At gd10.5 when two M regions enriched in uNK cells are present (ie the MLAp and decidua basalis), *Dll1* expression was elevated in each subregion, relative to gd4.5 decidua basalis (Fig. 2A).

In AM tissue, relative abundance of *Dll1* transcripts was similar between virgin and gd4.5 uteri but increased between gd4.5 and 6.5 (Fig. 2B). Studies of AM decidua were not undertaken at gd10.5 due to advanced AM decidual regression at this time. Thus, *Dll1* expressing cells are present in the virgin uterus and in early post-implantation decidua in both M and AM regions. The virgin and AM data indicate that uterine *Dll1* is transcribed by uterine cells other than uNK cells, since classically-characterized uNK cells are absent from these tissues [24].

Dll1 Expression in gd10.5 DBA+ and DBA- uNK Cells

To determine whether uNK cells are amongst the M decidual cells expressing *Dll1*, uNK cells were isolated from pooled suspensions of gd10.5 CD1 decidua basalis and MLAp by flow sorting. Transcripts for *Dll1* were detected in RNA from the DBA+ but not the DBA- uNK cells (Fig. 2C). Thus, the uNK cell subset that was previously shown to home to the uterus during pregnancy and to include highly angiogenic uNK cells [26], is the subset that, at gd10.5, contains cells expressing *Dll1*.

Some DBA+ uNK Cells Express DLL1

To localize DLL1 expressing cells, whole mount studies were undertaken at gd4.5 and 6.5. Rare, small cells very weakly reactive with DLL1+ were observed anti-mesometrially at both times (data not shown). Because intact, unfixed tissue begins to deteriorate upon an extended antibody incubation that requires agitation, cryostat sections of acetone-fixed gd6.5 and gd10.5 B6 and CD1 implant sites were used for extended overnight antibody incubations to improve the detection of reactive cells. Using PE-anti-DLL1, FITC-DBA lectin and DAPI, DBA+DLL1+ cells were identified in both strains with the only noticable difference between the strains being greater numbers of DBA+ uNK cells in CD1 than in B6. At gd6.5 (Fig. 3A–D), a few cells in decidua basalis were DLL1+ (Fig. 3D). The DLL1+ cells were a mixture of DBA+ (Fig. 3A, 3C) and DBA- (Fig. 3B, 3C) cells. Both the DLL1+ and DBA+ cells had a range of sizes and appeared to be within tissue rather than vessel-associated since DAPI+ nuclei closely abutted cells reactive with either or with both reagents.

At gd10.5, cells strongly reactive for DLL1 were readily identified in B6 and in CD1 (Fig. 4A–N show B6; Fig. 4O shows CD1). Importantly, the DLL1+ cells were not uniformly distributed but appeared to be stratified into "layers" or "bands" within decidua basalis (Fig. 4M). In the most external band, "layer 1", shown in Fig. 4M(i), DLL1+ cells were absent from the myometrium (not shown) and very rare (Fig. 4B) in the MLAp in comparison to DBA+ uNK cells (Fig. 4A). The rare DLL1+ cells in the MLAp were vessel associated (Fig. 4B, 4C). Decidua basalis

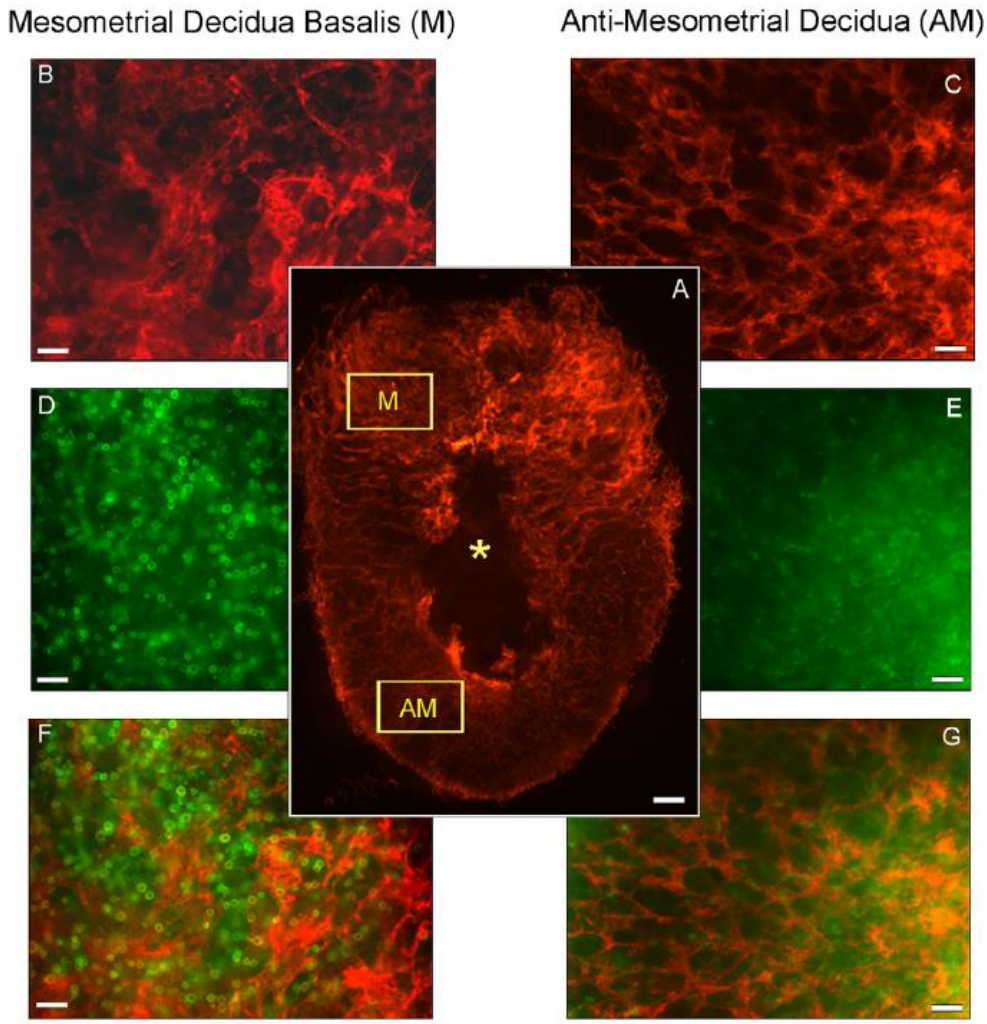

Figure 1. Whole mount in situ immunohistochemistry of gd7.5 B6 implantation sites co-stained with PE-CD31 (red) and FITC-CD45 (green). Low power image (A) is a for orientation. The mesometrial side of the uterus is uppermost; the central black region (*) represents the embryonic crypt. More CD31 expression is present mesometrially than anti-mesometrially or in lateral (L) decidua. Images B, D, F are of the same field (represented by the boxed M) of the mesometrial uterus. Images C, E, G are of the same field (represented by the boxed AM) from the anti-mesometrial uterus. Image (B) illustrates the larger, web-like, less linked vessels of the decidua basalis. These are distinctly different to the narrower, more frequently linked anti-mesometrial vessels shown in (C). (B) but not (C) contains high numbers of CD31+ leukocytes. Image (D) shows the enrichment of leukocytes in decidua basalis while image (E) shows that leukocytes present anti-mesometrially are less frequent and more heterogeneous in shape and size. Red and green are merged in images (F) and (G). Image (F) shows that many cells with co-expression of CD31+ and CD45+ are present mesometrially while image (G) shows their absence anti-mesometrially. Magnification bar in (A) is 200 µm; in B-G 50 µm.
doi:10.1371/journal.pone.0052037.g001

was subdivided into two layers on the basis of DLL1 expression (labeled 2 and 3 in Fig. 4M(i)). The decidua basalis more distal to the placenta (pdDB) contained numerous large cells with bright expression of DLL1 (Fig. 4E). These cells co-expressed DBA lectin (Fig. 4D, 4F showing B6; Fig. 4O showing CD1), identifying them as DLL1+ uNK cells. The DLL1+DBA+ uNK cells appeared to be aligned around vessels. This is a typical position for DBA+ and DBA- uNK cells in paraffin-embedded sections (Fig. 4N). DBA- uNK cells are identified by PAS staining which reveals all uNK cells with cytoplasmic granules. DBA- cells of undefined lineage(s) with dim DLL1 expression were also present in M decidua of B6 and CD1 (Fig. 4F, 4O) indicating that uNK cells are an abundant but not exclusive source for this ligand. Decidua basalis proximal to the placenta (ppDB) contained the highest frequency of uNK cells (Fig. 4G) but lacked DLL1 expressing cells (Fig. 4H, 4I). Additionally, AM decidua lacked detectable DLL1 expression

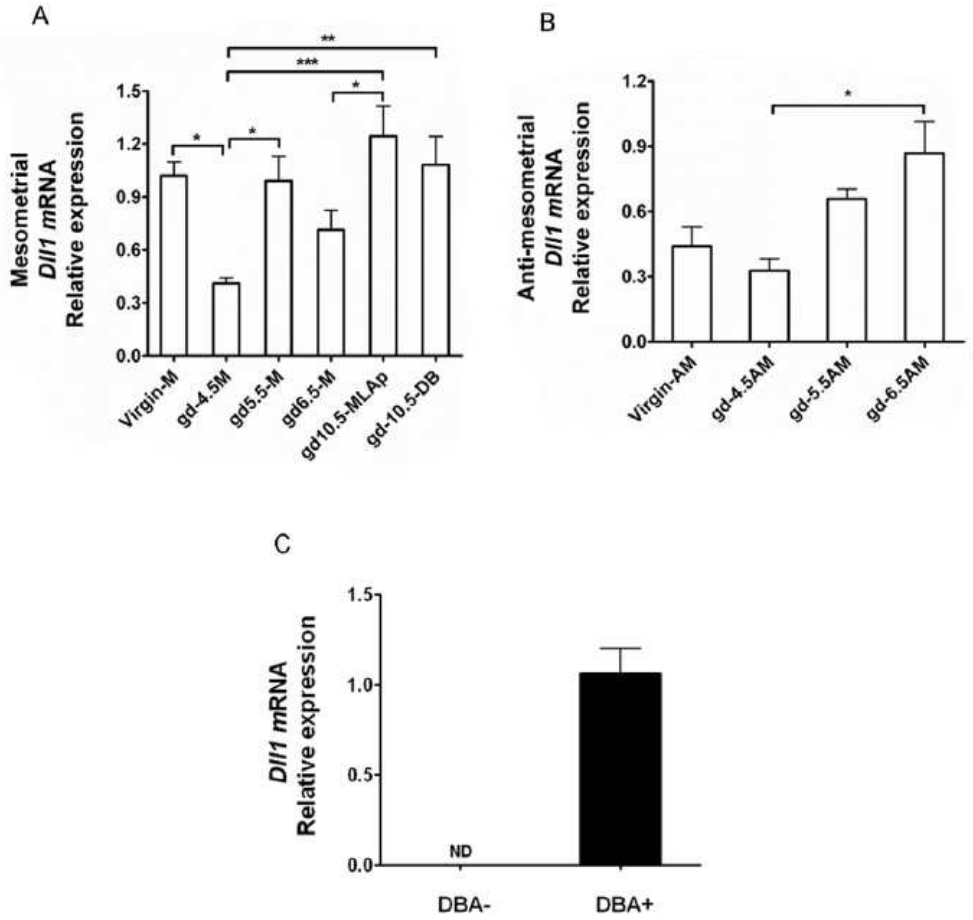

Figure 2. Quantitative realtime PCR analyses of Dll1 in mesometrial and anti-mesometrial uterine samples and in flow sorted uNK cells. Relative mRNA expression of *Dll1* by the mesometrial side (M) of the virgin, gd4.5, gd5.5 and gd6.5 uterus of of the gd10.5 mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy (MLAp) and decidua basalis (DB) is shown in (A). Relative mRNA expression of *Dll1* by anti- mesometrial (AM) virgin uterus and by gd4.5, gd5.5 and gd6.5 anti-mesometrial decidua is shown in (B). Relative mRNA expression of *Dll1* at gd10.5 by CD3-CD122+DBA- (DBA-) and CD3-CD122+DBA+ (DBA+) CD1 decidual cells normalized to *Hprt1*(C) is shown in (C). Data are means±SEM from all replicate analyses of two independent experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.
doi:10.1371/journal.pone.0052037.g002

(Fig. 4K, 4L) and lacked DBA+ uNK cells (Fig. 4J). The only DBA+ cells in AM regions were endothelial cells of the yolk sac (arrows in Fig. 4J, 4K).

Discussion

Application of whole mount *in situ* immunohistochemistry to mouse uterus between implantation and mid pregnancy (gd9.5) was recently reported [8]. In that study, no direct interactions were observed between decidual CD45+ cells and trophoblast cells that ubiquitously expressed a fluorescent gene tag. That observation made in intact, viable implant sites challenged a number of widely held ideas concerning direct receptor-ligand and cell contact interactions between trophoblasts and the uNK cells recruited to early decidua basalis. In contrast, the whole mount study provided positional information suggesting early decidual CD45+ cells act on the autologous vasculature of the mesometrial decidua. Neoangiogenesis accompanies decidual development and is crucial for normal gestational development [16,32,33]. Both human and mouse uNK cells produce the angiogenic molecules VEGF and PGF that regulate endothelial cell division. Time course and uNK cell subset analyses of VEGF expression further showed that between gd7.5–9.5, 50% of DBA lectin+ uNK cells express VEGF. By gd14.5, VEGF+DBA+ uNK cells were 30% of the DBA lectin+ uNK cells and total uNK cell numbers had dropped suggesting the angiogenic roles of uNK cells regress after mid gestation [28]. Recently, microarray analyses and validations were reported that reached the conclusion that mouse uNK cells do not contribute to decidualization and angiogenesis [34]. In that study, decidua from CD1 mice with and without *Il15*, the gene for an essential growth

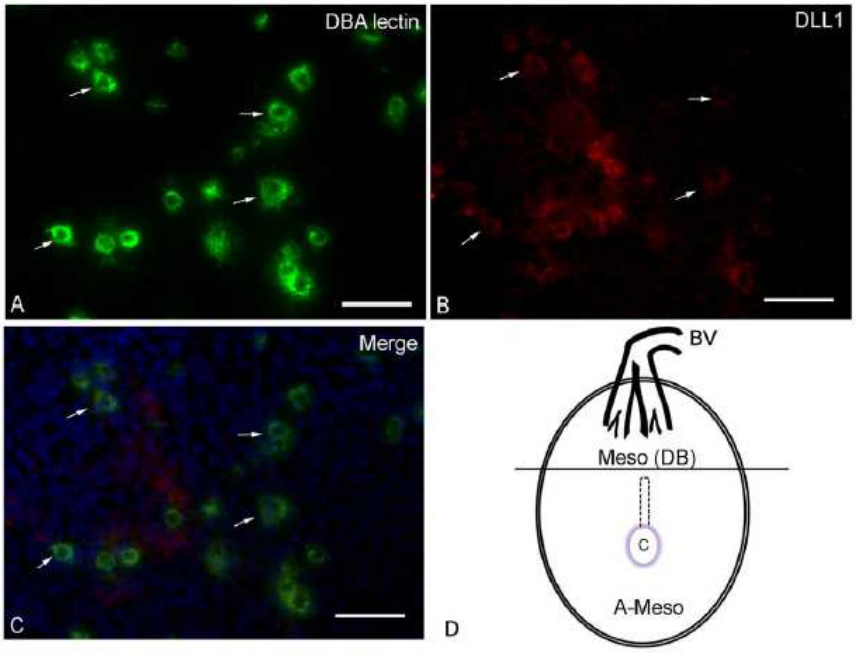

Figure 3. Histological analysis of gd6.5 B6 decidua basalis for expression of DLL1. Photomicrographs of gd6.5 B6 decidua basalis stained with DBA lectin-FITC (green), anti-DLL1-PE (red) and DAPI (blue) demonstrate in (A) DBA lectin-reactive small, agranular uNK cells and immature uNK cells with a few cytoplasmic granules. In (B), the same field is imaged showing cells reactive with DLL1. In the merged image (C), the co-expression of DBA lectin and DLL1 is shown (B and C; arrows mark representative cells). Additional cells that were DBA- and not identified expressed DLL1. The 6.5gd DBA+DLL1+uNK cells were found in the mesometrial decidua basalis (Meso DB) a region indicated as above the horizontal line in drawing (D). BV, entry of major blood vessel branches from the uterine artery; C conceptus, including ectoplacental cone. The area enclosed by dashed lines represents the residual uterine lumen. Bars: A, B and C are 40 µm.
doi:10.1371/journal.pone.0052037.g003

factor in uNK cell differentiation, were compared at gd7.5. Other studies, including ultrastructural studies, of uNK cell deficient mice [35], conducted between gd 6.5 to 14.5 [28,35–37], suggest that gd7.5 was at least one day too early to observe effects from absence of uNK cells on decidual cell numbers or decidual vessels. DLL1 has a critical, non-mitogenic role in neoangiogenesis because it triggers the induction of tip cells, in a cell contact-dependent process that is central to the initiation of arterial branching angiogenesis. This allows proliferation in cells next to the differentiated tip cell, the stalk cells, to extend the vessel. The direction of new growth is determined by factors that influence the tip cells [38]. Studies of neonatal mouse retinal vascular development indicate that DLL1 is secreted by non-endothelial cells and leads to orthogonal/perpendicular vascular growth. We found DLL1 expressing cells at a very low frequency in mouse decidua at gd4.5 by whole mount staining as might be expected prior to onset of angiogenesis. Given the report of significant decidual angiogenesis including sprouting angiogenesis at gd6.5 [8], an unexpectedly small increase in DLL1+ cells was seen in whole mounts at gd6.5 and again, only in AM decidua. One explanation of these results could be that the AM angiogenesis was not arterial since DLL1 is strongly associated with arterial differentiation [39]. An alternate explanation could be that the 1 h incubation used in whole mount staining to maintain tissue viability was insufficient for strong binding of this antibody. For extension of the antibody incubation time to an overnight staining protocol, cryostat sections of fixed implant sites rather than viable hemisections were used. Cryostat sections were prepared from both B6 mice in which we had molecular evidence for *Dll1* expression in M decidua and from CD1 mice in which we had evidence for *Dll1* expression in uNK cells. With this approach, DLL1 expression was detected at gd6.5 in DBA+ uNK cells in decidua basalis. The data of Paffaro et al., [24] suggest that >90% of the DBA+ uNK cells present in M decidua at gd6.5 (7.5 in the counting of their study), are immature. The remaining DBA+ uNK cells are larger, more mature cells containing numerous cytoplasmic granulates that are also DBA-reactive. Both smaller, non-granulated and larger, lightly granulated DBA+ uNK cells expressed DLL1 (Fig. 3) suggesting DLL1 expression is a hallmark of this lineage subset and not a protein acquired late during uNK cell maturation. The absence of significant DLL1 staining at gd10.5 in similar early stages of uNK cells found in the MLAp (Fig. 4 A–C) shows that DLL1 expression is dynamic during pregnancy and suggests influences from the stromal micro-environment or gestational length.

Previous comparative studies on cultured NK cells isolated from first trimester human termination decidua and from blood showed that uNK cells but not blood NK cells elevate production of interferon gamma (IFNG) but not of interleukin 8 (IL8) in response to exogenous DLL1 [22]. When combined with our data, this finding potentially suggests that autocrine DLL1 responses may occur in mouse uNK cells, as in endothelial cells [2]. Analysis of

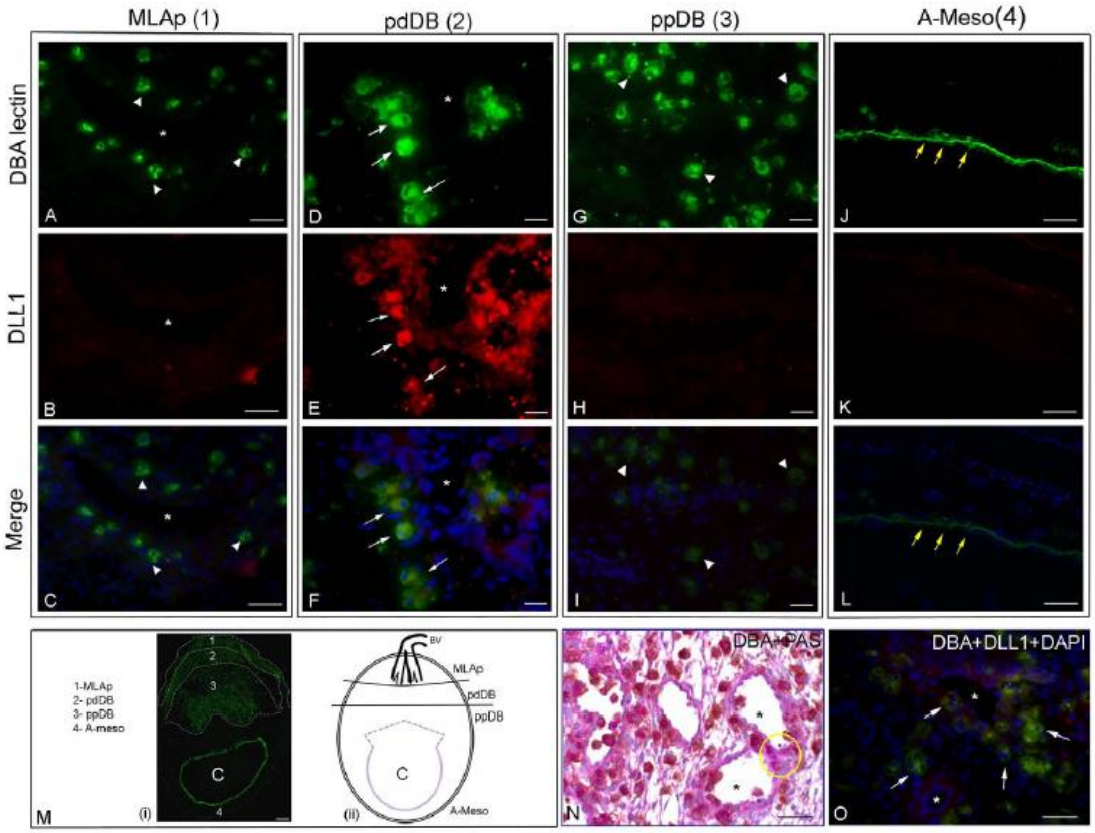

Figure 4. Histological analysis of DLL1 expression in mesometrial sections of gd10.5 B6 and CD1 implant sites. Photomicrographs A-L and O show gd10.5 implant site cryosections co-stained with DBA lectin-FITC (green) to identify uNK cells and anti-DLL1-PE (red). Panel M(i) is stained with only DBA lectin-FITC (green). Panels A–M(i) are B6 implant sites and panel O is a CD1 implant site. Panel M(ii) provides a diagram of the regions images were collected from for the other panels and has been marked to show the banding pattern seen for DLL1 expression. This should be compared to low power image M(i) that shows DBA lectin-stained uNK cell distribution in each banded area. These are labeled region "1" for the MLAp, region 2 for decidua basalis distal to the placenta (pdDB) and region 3 for decidua basalis proximal to the placenta (ppDB). Region 4, the AM decidua, is at the bottom of the image. "C" represents the conceptus, including the placenta and the green ring around "C" is DBA lectin-stained yolk sac endothelium surrounding the fetus. The black space between the yolk sac and the region labeled "3" is the placenta which is uNK cell deficient. Expression of DLL1 by gd10.5 DBA+ cells was stratified within the mesometrial side of the implant sites in both strains and no significant differences were noted. In B6 MLAp (A–C; labeled "1" in M(i) and diagrammed in M(ii)), DLL1 was strongly expressed only infrequently (B) and not by the smaller, immature uNK cells that proliferate in this region (arrow heads in A, C). In decidua basalis of B6 that was distal to the placenta (D–F) and CD1 (O), DBA+ uNK cells brightly expressed DLL1 (arrows in D–F; O). DBA+DLL1+ uNK cells appeared to surrounded vessels (*). Additional perivascular DLL1 staining was present that was not associated with DBA+ cells. The decidual region proximal to the placenta was devoid of DLL1+ cells but abundantly populated by DBA+ uNK cells (G). Neither DLL1+ nor DBA+ uNK cells were present in the highly regressed anti-mesometrial decidua (A-Meso; J-L). DBA-stained yolk sac endothelium was present in this region (arrows in J, L). N is a photomicrograph of the placenta distal decidua basalis in a section from an archived paraffin-embedded gd10.5 B6 implant site double stained using DBA lectin-horseradish peroxidase and Periodic Acid Schiff's reagent [25]. The latter stain reveals all granulated uNK cells and shows cells of the DBA-PAS+ subset (yellow circle). This image shows the typical strong association of uNK cells with arterioles and with microvessels, including intravascular positions and supports interpretations of the fluorescence images. In M(ii), BV indicates entry of major blood vessel branches from the uterine artery. Bars: A, B, C, J, K, L, O: 40 µm; D, E, F, G, H, I: 20 µm; M: 200 µm.
doi:10.1371/journal.pone.0052037.g004

IFNG was important since its production by uNK cells initiates spiral arterial remodeling at mid pregnancy [40]. However, IFNG regulation in mouse uNK cells cannot be achieved by autocrine regulation since DBA- uNK cells that lack DLL1 expression are the mouse IFNG-producing uNK cell subset [26]. From studies of human hematopoietic stem cell cultures, it was found that exogenous DLL1, DLL4 or Jagged2 but not DLL3 or Jagged1 promoted differentiation of NK cells with the decidual CD56+CD16- phenotype [41]. Thus, the most probable interpretation of our data would be that angiogenic, DBA+ uNK cells expressing DLL1+ and having autocrine capacity act on DBA-DLL1- uNK cells that express Notch receptors to elevate IFNG production [26,42]. Peak IFNG production in mouse decidua basalis is at gd10.5–12.5 [43], consistent with the transient high expression of DLL1 in DBA+ uNK cells at gd10.5.

NK cells are now grouped under the umbrella of innate lymphoid cells (ILC). This cell category, important in mucosal tissues, includes lymphoid tissue inducer (LTi), NK22 and nuocytes or ILC2 cells [44]. Exactly how uNK cells relate to these various lineages is at present unclear. LTi contribute to the development of lymph nodes and intestinal lymphoid structures including Peyer's Patches and are characterized by their cytokine profile. UNK cells, like LTi cells, express IL22 [26] and IL7RA [45] and are associated with development of a lymphocyte-enriched region. Our finding that DLL1 is a product of immature and mature uNK cells suggests it would be profitable to explore the roles of other ILC subsets in the promotion of angiogenesis and in particular in the induction of endothelial tip cell differentiation. Early angiogenic actions could be major roles of ILCs essential in the promotion of secondary lymphoid tissue development.

Acknowledgments

We thank Dr. Scott Gerber, University of Rochester, Rochester, NY for assisting us in development of the application of whole mount *in situ* immunohistochemistry to mouse implantation sites and for critical review of this manuscript. We thank Dr. Patricia Lima, Queen's University for helpful discussions and for her assistance in image preparation. We also thank Mr. Matt Gordon, Queen's University Cancer Research Centre for support of our cell sorting studies.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AC ZC KYD ATY. Performed the experiments: ZC KYD. Analyzed the data: AC ZC KYD ATY. Wrote the paper: AC ZC KYD ATY.

References

1. Napp LC, Augustynik M, Paesler F, Krishnasamy K, Woiterski J, et al. (2012) Extrinsic notch ligand delta-like 1 regulates tip cell selection and vascular branching morphogenesis. Circ Res 110: 530 535.
2. Kume T (2012) Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation. Adv Exp Med Biol 727: 210 222.
3. Laranjeiro R, Akobia I, Neves H, Gomes AC, Saavedra P, et al. (2012) The notch ligand delta-like 4 regulates multiple stages of early hemato-vascular development. PLoS One 7: e34553. 10.1371/journal.pone.0034553 [doi].
4. Villa N, Walker L, Lindsell CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, et al. (2001) Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. Mech Dev 108: 161 164.
5. Robert-Moreno A, Guiu J, Ruiz-Herguido C, Lopez ME, Ingles-Esteve J, et al. (2008) Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand Jagged1. EMBO J 27: 1886 1895.
6. Clark DB, Tran LT, Brateng DA, Kawamura C, Shofer JB, et al. (2009) Hemodynamically-directed atenolol therapy is associated with a blunted rise in maternal sFLT-1 levels during pregnancy. Hypertens Pregnancy 28: 42 55.
7. Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, Honjo T, Stark KL, et al. (2004) Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. Genes Dev 18: 2469 2473.
8. Croy BA, Chen Z, Hofmann AP, Lord EM, Sedlacek AL, et al. (2012) Imaging of vascular development in early mouse decidua and its association with leukocytes and trophoblasts. Biol Reprod 10.1095/biolreprod.112.102830 [doi].
9. Matsumoto H, Ma WG, Daikoku T, Zhao X, Paria BC, et al. (2002) Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. J Biol Chem 277: 29260 29267.
10. Das A, Mantena SR, Kannan A, Evans DB, Bagchi MK, et al. (2009) De novo synthesis of estrogen in pregnant uterus is critical for stromal decidualization and angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 12542 12547.
11. Robb L, Li R, Hartley L, Nandurkar HH, Koentgen F, et al. (1998) Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. Nat Med 4: 303 308.
12. Stewart CL (1994) The role of leukemia inhibitory factor (LIF) and other cytokines in regulating implantation in mammals. Ann N Y Acad Sci 734: 157 165.
13. Kubota Y, Hirashima M, Kishi K, Stewart CL, Suda T (2008) Leukemia inhibitory factor regulates microvessel density by modulating oxygen-dependent VEGF expression in mice. J Clin Invest 118: 2393 2403.
14. Dimitriadis E, Nie G, Hannan NJ, Paiva P, Salamonsen LA (2010) Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface. Int J Dev Biol 54: 313 322.
15. Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, Lavery S, Trew G, et al. (2010) Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. PLoS One 5: e10287. 10.1371/journal.pone.0010287 [doi].
16. Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegaard M, et al. (2007) Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune and angiogenic modulators. Biol Reprod 76: 102 117.
17. Bondarenko GI, Durning M, Golos TG (2012) Immunomorphological changes in the rhesus monkey endometrium and decidua during the menstrual cycle and early pregnancy. Am J Reprod Immunol 68: 309 321.
18. Afshar Y, Miele L, Fazleabas AT (2012) Notch1 is regulated by chorionic gonadotropin and progesterone in endometrial stromal cells and modulates decidualization in primates. Endocrinology 153: 2884 2896.
19. Afshar Y, Jeong J-W, Roqueiro D, DeMayo FJ, Lydon JP, et al. (2012) Notch1 mediates uterine stromal differentiation and is critical for complete decidualization in the mouse. FASEB J 26: 282 294.
20. Mazella J, Liang S, Tseng L (2008) Expression of Delta-like protein 4 in the human endometrium. Endocrinology 149: 15 19.
21. Mikhailik A, Mazella J, Liang S, Tseng L (2009) Notch ligand-dependent gene expression in human endometrial stromal cells. Biochem Biophys Res Commun 388: 479 482.
22. Manaster I, Gazit R, Goldman-Wohl D, Stern-Ginossar N, Mizrahi S, et al. (2010) Notch activation enhances IFNgamma secretion by human peripheral blood and decidual NK cells. J Reprod Immunol 84: 1 7.
23. Croy BA, van den Heuvel MJ, Borzychowski AM, Tayade C (2006) Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. Immunol Rev 214: 161 185.
24. Paffaro VA, Jr., Bizinotto MC, Joazeiro PP, Yamada AT (2003) Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. Placenta 24: 479 488.
25. Zhang JH, Yamada AT, Croy BA (2009) DBA-lectin reactivity defines natural killer cells that have homed to mouse decidua. Placenta 30: 968 973.
26. Chen Z, Zhang J, Hatta K, Lima PD, Yadi H, et al. (2012) DBA-lectin reactivity defines mouse uterine Natural Killer cell subsets with biased gene expression. Biol Reprod 87: 81. 10.1095/biolreprod.112.102293 [doi].
27. Wang C, Tanaka T, Nakamura H, Umesaki N, Hirai K, et al. (2003) Granulated metrial gland cells in the murine uterus: localization, kinetics, and the functional role in angiogenesis during pregnancy. Microsc Res Tech 60: 420 429.
28. Lima PDA, Degaki KY, Tayade C, Croy BA, Yamada AT (2012) Heterogeneity in composition of mouse uterine Natural Killer cell granules. J Leukoc Biol 92: 195 204.
29. Tayade C, Hilchie D, He H, Fang Y, Moons L, et al. (2007) Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine NK cells. J Immunol 178: 4267 4275.
30. Zhang J, Dong H, Wang B, Zhu S, Croy BA (2008) Dynamic changes occur in patterns of endometrial EFNB2/EPHB4 expression during the period of spiral arterial modification in mice. Biol Reprod 79: 450 458.
31. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, et al. (2006) Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. Nat Med 12: 1065 1074.
32. Plaisier M (2011) Decidualisation and angiogenesis. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 25: 259 271.
33. Yinon Y, Kingdom JC, Odutayo A, Moineddin R, Drewlo S, et al. (2010) Vascular dysfunction in women with a history of preeclampsia and intrauterine growth restriction: insights into future vascular risk. Circulation 122: 1846 1853.
34. Bany BM, Scott GA, Eckstrum KS (2012) Analysis of uterine gene expression in interleukin-15 knockout mice reveals uterine natural killer cells do not play a major role in decidualization and associated angiogenesis. Reproduction 143: 359 375.
35. Greenwood JD, Minhas K, di Santo JP, Makita M, Kiso Y, et al. (2000) Ultrastructural studies of implantation sites from mice deficient in uterine natural killer cells. Placenta 21: 693 702.
36. Ashkar AA, Black GP, Wei Q, He H, Liang L, et al. (2003) Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. J Immunol 171: 2937 2944.
37. 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.
38. De SF, Segura I, De BK, Hohensinner PJ, Carmeliet P (2009) Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29: 639 649.
39. Sorensen I, Adams RH, Gossler A (2009) DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. Blood 113: 5680 5688.
40. Ashkar AA, di Santo JP, Croy BA (2000) Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. J Exp Med 192: 259 270.

41. Beck RC, Padival M, Yeh D, Ralston J, Cooke KR, et al. (2009) The Notch ligands Jagged2, Delta1, and Delta4 induce differentiation and expansion of functional human NK cells from CD34+ cord blood hematopoietic progenitor cells. Biol Blood Marrow Transplant 15: 1028–1037.
42. Yadi H, Burke S, Madeja Z, Hemberger M, Moffett A, et al. (2008) Unique receptor repertoire in mouse uterine NK cells. J Immunol 181: 6140–6147.
43. Ashkar AA, Croy BA (1999) Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. Biol Reprod 61: 493–502.
44. Cherrier M, Ohnmacht C, Gording S, Eberl G (2012) Development and function of intestinal innate lymphoid cells. Curr Opin Immunol 24: 227–283.
45. Zhang J, Chen Z, Fritz JH, Rochman Y, Leonard WJ, et al. (2012) Unusual timing of CD127 expression by mouse uterine natural killer cells. J Leukoc Biol 91: 417–426.

ANEXOS

COMITE DE ÉTICA

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto **"Investigação das subpopulações de células uNK no ambiente uterino gestante de camundongo"** (protocolo nº **2921-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Aureo Tatsumi Yamada / Karina Yumi Degaki**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **12 de dezembro de 2012**.

ad hoc

Campinas, 12 de dezembro de 2012.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

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

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