UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

PATRÍCIA DANIELE AZEVEDO LIMA

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO 70 (HSP70) NAS CÉLULAS uNK DE CAMUNDONGOS NA GESTAÇÃO NORMAL E SOB ESTRESSE INDUZIDO PELA LESÃO EMBRIONÁRIA

Este exen	nplar corresp	onde à re	adação final
da tese Patulcia	Jefendida pe Daniele	ilo(a) ca	ndidato (a)
e aprovad	a pela Comis	são Julg	adora.

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

SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

I. B.

Orientador: Prof. Dr. Aureo Tatsumi Yamada

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

L628e	Lima, Patricia Daniele de Azevedo Expressão de proteínas de choque térmico 70 (HSP70) nas células uNK de camundongos na gestação normal e sob estresse induzido pela lesão embrionária / Patrícia Daniele de Azevedo Lima. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.
	Orientador: Áureo Tatsumi Yamada. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Prenhez. Células natural killer uterinas. Proteínas de choque térmico HSP70. Stress (Fisiologia). Útero. Yamada, Áureo Tatsumi. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Heat Shock Protein 70 (HSP70) expression in the mouse uNK cells in normal pregnancy and under stress induced by embryon injury. **Palavras-chave em inglês:** Pregnancy; Uterine natural killer cells; HSP70 heat-shock proteins; Stress (Physiology); Uterus. **Área de concentração:** Histologia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural. Banca examinadora: Áureo Tatsumi Yamada, Francesco Langone, Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua. .

Data da defesa: 29/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 29 de fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada (Orientador)

Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

Prof. Dr. Francesco Langone

Profa. Dra. Andréa Mollica do Amarante Paffaro

Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares

Assinatura Assinatura pe Assinatura

Assinatura

Assinatura

"Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos." **Albert Einstein**

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos." *Albert Einstein* Dedico este trabalho

Aos meus pais Helvécio e Geralda, aos meus aos meus irmãos Larissa, Jacqueline e Bruno, e ao meu querido Marcelo, minha família. Aquela que me proporciona paz, amor, conforto e aconchego ao coração...

Ao Professor Áureo, pela demonstração de dedicação à ciência, motivo de inspiração para minha vida, pelo conhecimento transmitido,ao apoio concedido, à confiança e motivação.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia, UNICAMP, pela realização deste mestrado.

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

Ao meu orientador Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, por confiar em mim, por ter dedicado grande parte do seu tempo me orientando, no trabalho e na vida. Por acreditar que posso crescer mais e mais... Por todas as conversas, que de alguma forma me fizeram pensar.

Dr. Paulo Pinto Joazeiro, pela contribuição científica, incentivo e apoio durante o andamento dos experimentos e atividades didáticas. Por me mostrar a importância da profissão de Professor, e de como é bom passar conhecimento.

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

Aos funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia: Rita, Baltazar e Raquel, por serem tão prestativos e atenciosos comigo.

Ao Laboratório de Genética e ao Professor Gonçalo, por possibilitar a realização dos experimentos de RT-PCR. Ao Javier, pela ajuda e paciência nas explicações.

Á Professora Maria Luiza pela concessão do Kit de TÚNEL, e por sua atenção na realização do experimento.

À secretária Lílian do Programa de Pós-Graduação pela colaboração e incentivo à realização deste trabalho. Por possibilitar a minha entrada na UNICAMP em 2005.

Aos professores Franscesco, Leonilda e Lúcia, que fizeram parte da pré banca, pelas contribuições que fizeram ao meu trabalho e pela disponibilidade.

Aos meus amigos de bancada: Juvani, Eliana, Renata, Claudinha, Aline, Juares, Maria Amália, Júlio, Renatinha, Silvio, Petra e Patrick, pelo aprendizado...não só no trabalho. Pelos momentos, os mais engraçados, os tristes, os de vitória e derrota. Por sempre de alguma forma se envolveram com meu trabalho, e por servirem de exemplo para mim.

À minha amiga de bancada, de casa, de conversa... minha amiga de trabalho, de risada, de choro... Karina. Aprendemos juntas, crescemos juntas... Sairemos desta juntas.

Aos meus pais Helvécio e Geralda, pela confiança em mim depositada. Pela responsabilidade em mim confiada. Sem vocês, eu nada seria.

Aos meus irmãos Larissa, Jacqueline e Bruno, pela compreensão de minha ausência. Pelo conforto que me passam.

Ao Marcelo por sua demonstração de imenso carinho e amor para comigo. Que se dedicou a minha tese, que me ouviu, que me animou e me deu forças.

Lista de abreviaturas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xvi
	1
1 1 0 A interface materne fetal come um ambiente de estresse	
1.2-Células <i>Natural Killer</i> uterina (uNK)	5
1.3-O modelo experimental de lesão cirúrgica do embrião	9
1.4-Proteína do Choque Térmico e os mecanismos de citoproteção	10
1.5-HSP70 na Gestação	16
2. OBJETIVOS	19
2.1- Objetivos Gerais	20
2.2- Objetivos Específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1- Animais	22
3.2- Indução de lesão cirúrgica do embrião	22
3.3- Coletas e Processamentos de materiais	23
3.3.1- Processamento para embebição em parafina	23
3.3.2- Processamento para embebição em resina Lowcryl K4M e resina epóxi	23
3.4- Reacões Citoquímicas e Imunocitoquímicas	
3.4.1-Citoquímica de lectina DBA (<i>Dolichos biflorus</i>)	24
3.4.2- Imunocitoquímica com anticorpo anti HSP72/73	25
3.4.3- Tripla marcação para quantificação para células uNK lectina DBA e anti HSP72/73 positivas	26

SUMÁRIO

3.4.4- Imunocitoquímica ultra-estrutural	27
3.4.5- Tripla marcação com Reação de TUNEL, imunictoquímica com anti- PCNA e citoquímica lectina DBA	27
3.5- Processamento para obtenção de homogeneizados teciduais	28
3.6- SDS-PAGE e Western Blot	29
3.6.1- SDS-PAGE	29
3.6.2- Western Blot	30
3.7- RT-PCR	30
3.7.1- Extração de RNA e obtenção do cDNA	30
3.7.2- Testes de otimização do RT-PCR	32
3.7.3- BT-PCB semi-quantitativo para HSP72 e 73	33
	34
4. TILOGETADOO	25
4.1.1 Animeia durente a gestação normal	25
4. 1. 1- Animais durante a gestação normal	
4.1.2- Animais submetidos a lesao cirurgica do embriao	35
4.2- Expressão das isoformas HSP72/73 na interface materno-fetal	36
4.2.1- Imunoperoxidase e imunofluorescência	36
4.2.2- Quantificação das células uNK-HSP72/73 positivas	37
4.2.3- Imunomicroscopia eletrônica para HSP72/73	40
4.2.4- Western Blot	40
4.2.5- Expressão dos transcriptomas das isoformas HSP72 e HSP73	40
4.3- Proliferação e Morte celular das células uNK em gestação normal e submetida a lesão cirúrgica do embrião	41
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	54

7.	ILUSTRAÇÕES	
8.	REFER~ENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
De	claração do Comitê de Ética	

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF- Apoptosis Inducing Factor, fator indutor de apoptose

Apaf-1- apoptotic protease activating factor 1, fator de ativação de proteases

apoptóticas 1

APC- Antigen-presenting cell, célula apresentadora de antígeno

BSA- Bovine Serum Albumin, albumina sérica bovina

DAB- Tetra -- hidroclorato de 3,3'-Diaminobenzidina

DBA- Dolichus biflorus agllutin

DEPC- Dietil Pirocarbonato

dg- dia de gestação

eNOS- Endothelial Nitric Oxide Synthase, óxido nítrico sintase endotelial

EtBr- Brometo de etídeo

GM-CSF- *Granulocyte monocyte colony stimulating factor,* fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos

GRP75- glucose-regulated protein 75, protein reguladora de glicose 75

GRP78- glucose-regulated protein 78, protein reguladora de glicose 78

HIF1a- Hypoxia-inducible factor-1 alpha, fator 1a induzido pela hipóxia

HSP- Heat Shock Protein, proteína do choque térmico

IFN- Interferons

IL-1 β - interleucina 1 β

IL-12- interleucina 12

IL-6- interleucina 6

iNOS- Inducible Nitric Oxide synthase, óxido nitrico sintase induzível

JNK 1- Jun N-terminal kinase1

MLAp- *Mesometrial lymphoid agregates of pregnancy*, Agragado linfóide mesometrial da prenhez

MOPS- ácido 3-(N-morfolino)propanesulfonica

nNOS- Neuronal Nitric Oxide Synthase, óxido nítrico sintase neuronal

NO- nitric oxide, óxido nítrico

PB- phosphate buffer, tampão fosfato

PBS- phosphate- buffered saline, tampão fosfato salina

PVDF- Polyvinylidene fluoride, decafluoreto de polivinil

RNS- Reactive nitrogen species, espécies reativas a nitrogênio

ROS- Reactive oxygen species, especial reativa a oxigênio

RT-PCR- *Reverse Transcription polymerasechain reaction,* reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

TBS- Tris-buffered saline, tampão Tris- salina

TBS-T- Tris-buffered salineTween, tampão Tris-Salina Tween

TNF- Tumor necrosis factor, fator de necrose tumoral

TNFR- Tumor-necrosis factor receptor, receptor do fator de necrose tumoral

uNK- uterus Natural Killer cell, célula Natural Killer uterine

VEGF- Vascular endothelial growth factor, fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

Durante a gestação em animais que possuem placentação hemocorial, a hipóxia no primeiro terço da prenhez é um dos fatores cruciais para indução da angiogênese e o adequado desenvolvimento da placenta. Contudo, esta hipóxia se contrapõe à intensa atividade das células que requerem elevado metabolismo, gerando um estresse fisiológico para estas células presentes na interface maternofetal. Presume-se que estas células necessitem de mecanismos apropriados de citoproteção para sua sobrevida enquanto comprometidos ativamente no suporte funcional do útero gestante. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo investigar a expressão e a distribuição da proteína de choque térmico 70 (HSP70) na interface materno-fetal durante a gestação normal em camundongos e a sua possível variação em condição de estresse adicional induzido experimentalmente através da lesão embrionária. Sítios de desenvolvimento embrionário/fetal de camundongos prenhes do dia de gestação (dg) 6 ao 17 e, após 30 minutos, 1, 6 e 12 h dos animais submetidos à lesão cirúrgida do embrião (LCE) no dg 9 foram coletados para: - processamento histotécnico convencional de embebição em parafina destinados às análises citoquímicas (lectina DBA e reação de TUNEL) e imunocitoquímicas (anti-HSP72/73, anti-PCNA); - embebição em resina Lowilcryl-K4M para imunocitoquímica ultraestrutural (anti-HSP72/73); - obtenção de homogenados teciduais destinados à SDS-PAGE das frações protéicas e Westernblot (anti-HSP72/73) e, - extração de RNA de homogenados teciduais e de células uNK isoladas para análise de transcritos (HSP72 e 73) com amplificação pelo RT-PCR. As análises imunocitoquímicas demonstraram que as células uNK eram as únicas células que expressavam de forma constante as isoformas HSP72/73 ao longo da gestação, sendo confirmada a expressão dos transcritos gênicos das isoformas HSP72/73 nas células uNK isoladas pelo RT-PCR. A imunomicroscopia eletrônica detectou marcação conspícua nas mitocôndrias das células uNK. A análise quantitativa demonstrou que a lesão do embrião reduz o número de células uNK positivas para HSP72/73 e, o SDS/PAGE/Western-blotting identificou as isoformas HSP72 e 73 presente nos homogenados teciduais do útero com uma perceptível redução na intensidade da banda correspondente ao HSP73 nas amostras de pós-lesão, sem afetar significativamente a isoforma HSP72.

As análises realizadas com a dupla marcação de TUNEL e PCNA demonstrarm redução de células uNK PCNA positivas no útero submetido a lesão embrionária e aumento de núcleos marcadas positivamente pelo TUNEL. Estes resultados demonstram de forma inédita a expressão de HSP72/73 nas células uNK, sendo inédita também a constatação em leucócitos, sugerindo um papel citoprotetor para estas células importantes na manutenção da gestação. A redução de células uNK HSP72/73 positivas no útero gestante desencadeada pela lesão embrionária, consubstancia a hipótese da atuação da HSP 72/73 como chaperona citoprotetora nas células uNK sendo crítica a atuação da isoforma HSP73 presente na mitocôndria através da regulação negativa das vias de morte celular por apoptose nas células uNK.

Palavras Chave: gestação; células *Natural Killer* uterina; proteína de choque térmico (HSP)70; estresse; útero

ABSTRACT

During the pregnancy of animals developing hemochorial placenta, the hypoxia in the first third of pregnancy is one of the crucial factor for induction of angiogenesis and adequate placental development. However, this hypoxia is contradictory to the great dynamism and metabolism of cells required in the pregnant uterus, conditioning a physiological stress for the cells present at the maternal-fetal interface. It is presumed these cells demand appropriate cytoprotective mechanism for their survival while are committed to actively support the pregnancy. In this way, the present work aimed to investigate the expression and distribution of the chapelone isoforms heat shock protein 72 and 73 (HSP72/73) at the maternal fetal-interface through the pregnancy in mice and its possible variations under additional stressing condition induced experimentally by embryo lesion. Embryo/fetus developing sites of pregnant mice from gestational days (gd) 6 to 17 and, after 30min, 1h and 6h of surgical embryo lesion (SEL) on gd 9 mice, were collected for: - conventional paraffin embedding for cytochemical (DBA lectin and TUNEL reaction) and immunocytochemical (anti-HSP72/73, anti-PCNA) analysis; - LR-white resin embedding for ultrastructural immunocytochemistry (anti-HSP72/73); - uterine tissue homogenates for SDS-PAGE of proteins fractions and Western-blot (anti-HSP7273) and; - RNA extratction form uterine tissue homogenates and isolated uNK cells for transcripts (HSP72 and 73) amplification by RT-PCR. The immunocytcchemical analysis showed the uNK cells as the only cell expressing constantly the HSP72/73 isoforms throughout the gestation, being confirmed the expression of both gene isoforms by RT-PCR in uNK cells. The immunoelectron microscopy detected conspicuous labeling in the mitochondria of uNK cells. The quantitative analysis demonstrated that embryo-lesion reduced the number of HSP72/73 positive uNK cells in the uterus and, SDS/PAGE and Westernblot identified the HSP72 and 73 isoforms present in the tissue homogenates with low reactive intensity of the band corresponding to HSP73 in the after-lesion samples, without affecting significantly the HSP72 isoform. The analysis of TUNEL and PCNA double labelling showed decreasing of PCNA positive-uNK cells in the

uterus after embryo-lesion and increasing of TUNEL positive nuclei. These results confirms the expression of HSP72 and HSP73 isoforms in the uNK cells through the gestation and to date, this is also the first report showing HSP70 in leukocytes, suggesting a cytoptotective function to this cell while working actively as important cells supporting the pregnancy. The decreasing of HSP72/73 positive uNK cells in the pregnant uterus triggered by embryo lesion consubstantiate the hypothesis of HSP72/73 working as cytoprotective chaperone in the uNK cells, and the HSP73 isoform in the mitochondria seems to be critical on down-regulation of apoptotic cell depth pathway.

Keywords: pregnancy; uterine Natural Killer cells; heat shock protein 70; stress; uterus

1- INTRODUÇÃO

1.1- A interface materno-fetal como um ambiente de estresse

A placentação do tipo hemocorial é um processo biológico ativo tipicamente invasiva por parte do tecido fetal, exigindo uma íntima relação com o tecido materno. Antes mesmo da implantação, e durante o desenvolvimento da gestação ocorrem drásticas modificações, morfo-funcionais como, a decidualização do estroma endometrial, a neovascularização e o acúmulo das células *natural killer* uterinas (uNK), mudanças no perfil hormonal e de outras substâncias importantes para a manutenção da gestação, como as citocinas. Tais modificações são importantes para a formação da placenta hemocorial (Croy *et al.*, 2003), que estabelece-se rapidamente no inicio da gestação e consolida-se como a fonte de suprimento de oxigênio e nutrientes para o crescimento do feto, com o sinciotrofoblasto placentário agindo como barreira entre o sangue materno e o tecido fetal (Aplin *et a.l*, 1991; Schneide, 2000). Estes eventos exigem das populações celulares presentes na interface materno-fetal uma capacidade de ajuste metabólico em resposta às rápidas e profundas alterações de estímulo deste microambiente.

Variações de tensões de oxigênio também são observadas na interface materno fetal e são necessárias para a organogênese da placenta (Caniggia *et al.*, 2000). Em humanos, durante o primeiro trimestre da gestação o útero é um ambiente de hipóxia o qual possui uma tensão de oxigênio (pO₂) menor que 20 mmHg (~2% O₂). Esta pressão aumenta progressivamente, atingindo valores maiores que 50mmHg (~7% O₂) no último trimestre da gestação, sendo que o inicio do aumento da pressão de oxigênio está associada com o início da circulação materna nos intervilos (Jauniaux *et al.*, 2000). Portanto, a condição de hipóxia inicial é necessária para o sucesso da gestação (Caniggia *et al.*, 2000).

Experimentos *in vitro* com explantes derivados de tecido gestacional demonstram que há uma alta incidência de apoptose (Huppertz *et al.,* 2003) nestes tecidos expostos à elevadas concentrações de oxigênio, quando comparados com

baixas (Reti *et al.*,2007). Os efeitos deletérios da elevada concentração de oxigênio nestes tecidos podem afetar a integridade da membrana celular, o consumo de glicose, a produção de lactose, além de causar a fragmentação do DNA e apoptose (Reti *et al.*, 2007). Estes dados demonstram a importância e a necessidade do ambiente gestante possuir uma baixa concentração de oxigênio, isto porque este elemento pode apresentar efeitos tóxicos em determinada situação (Reti *et al.*, 2007).

O oxigênio é um potente oxidante, e o estudo de Hoffman e colaboradores (2001) com células cancerígenas sugere que o potencial de oxi-redução (redox), evento diretamente relacionado com a quantidade de agentes oxidantes, como o oxigênio, pode influenciar a proliferação celular. Quando o potencial redox é alto gera-se um meio oxidante, as células permanecem em estágio quiescente, pela formação de pontes de dissulfeto (S-S) estabilizando a estrutura tridimensional das proteínas. Quando o potencial redox é baixo, o meio é redutor, ocorre a quebra das pontes S-S das proteínas, formando radicais –SH, proporcionando a proliferação celular. Uma das proteínas importante para a proliferação é a proteína de retinoblastoma (RBp), que é desfosforilada quando em meio oxidante, e inibe a transcrição necessária para o avanço do ciclo celular (Hoffman *et al.*, 2001). Já em um meio redutor há o rompimento dessas pontes permitindo que a RBp seja fosforilada e libere os fatores de transcrição que permitem às células entrarem na fase S do ciclo celular.

Ho Chen e colaboradores (2007) demonstraram que camundongos gestantes expostos a hipóxia em câmara hipobárica durante a metade inicial da gestação aumentavam a quantidade de células sanguíneas maternas, a concentração de hemoglobina, assim como, as concentrações de RNAm para proteínas chaves envolvidas na síntese de hemoglobina no baço materno. Segundo Semenza e colaboradores (1998), o HIF1a (Fator 1a Induzido pela Hipóxia) é um fator de transcrição expresso unicamente em resposta aos níveis fisiologicamente relevantes de hipóxia, com papel central na transcrição de genes que respondem a

hipóxia, como o VEGF que aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos (Mayhan *et al.,* 1999; Semenza *et al.,* 2000; Schoch *et al.,* 2002).

O útero gestante sob o efeito da hipóxia também pode desencadear a produção de óxido nítrico (NO) (Fantel *et al.*, 1998). O NO é um radical livre que em concentrações adequadas é benéfico, estimulando a angiogênese (Croy *et al.*, 2006), porém pode ser deletério, quando produzido em excesso (Touyz., 2004).

A hipóxia também induz a transcrição e expressão da enzima óxido nítricosintase induzido (iNOS) (Melillo *et al.*, 1995), e óxido nítrico-sintase neuronal (nNOS) (Black *et al.*, 1995), conduzindo a um aumento do radical livre, o óxido nítrico (NO).As isoformas da enzima óxido nítrico sintase: iNOS, nNOS e eNOS, podem ser expressas em diversas células presentes na interface materno-fetal durante a gestação (Ogando *et al.*, 2003), dentre as quais, as células Natural Killer uterinas (uNK) (Ogando *et al.*, 2003, Lippe, 2007). Na resposta imune inata, o NO está envolvido na ação citolítica das células NK (Subudhi *et al.*, 2001), e o recrutamento das células uNK neste processo na interface materno-fetal pode ser crucial, considerando que o IFN-γ produzido predominantemente por estas células no útero durante a gestação (Croy *et al.*,1997; Ashkar *et al.*, 1999) é também o sinalizador para ativação das três isoformas de NOS (Hilkens *et al.*, 2003).

Por outro lado, NO pode exercer um efeito pró-oxidante fraco ou se combinar com o superóxido para formar um oxidante mais potente, o peroxinitrito (ONOO⁻), como já demonstrado por Subudhi e colaboradores (2001), De fato, em grandes quantidades nos tecidos estimulados por reação inflamatória, sepsia, ou isquemia/reperfusão, o NO pode produzir efeito tóxico, mediado pela ação do ONOO⁻ que é produzido através da reação entre ânion superóxido O_2^- (principal espécie reativa ao oxigênio (ROS)) e NO (Ogando *et al.*, 2003). O ONOO⁻ é um potente oxidante de variadas biomoléculas (Beckman *et al.*, 1990) e seu potencial citotóxico está relacionado com a inibição do transporte de elétrons mitocondrial, resultando na inibição da respiração celular, oxidação de grupos sulfidrila em proteínas e o inicio da peroxidação lipídica (Radi *et al.*, 1994). O ambiente hipóxico do útero gestante está, portanto, sujeito ao desencadeamento do estresse oxidativo, podendo induzir necrose ou apoptose e desta forma ao colapso dos tecidos da interface materno-fetal. O termo estresse oxidativo é utilizado em circunstâncias nas quais o a produção de radicais livres resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos (Sies *et al.*, 1986). Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e anti-oxidantes, com o predomínio dos primeiros. Portanto, a produção de radicais livres como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e NO decorrente do estresse oxidativo e da possível peroxidação lipídica é fator determinante para as células, uma vez que estas moléculas em pequenas quantidades são importantes para a fisiologia celular, porém, podem ser deletérias em concentrações elevadas (Gayle *et al.*, 2002). Portanto, o balanço entre a produção de radicais livres e de enzimas anti-oxidantes é crucial para a homeostase da célula.

A modulação do ambiente uterino durante a gestação está sob a influência de outros fatores e mediadores químicos, envolvendo tanto as células maternas, quanto as fetais, em seqüências de interações ainda pouco conhecidas. O comando desta complexa rede de sinalização não pode ser atribuído a um único elemento presente na interface materno-fetal, uma vez que as interações resultantes decorrem de ações e reações recíprocas entre as células presentes, mediadas por combinações de sinalizadores de ação parácrina e/ou autócrina, como por exemplo, o balanço de citocinas Th1/Th2 (Wilczynski *et al.*,2005).

1.2- Células Natural Killer uterinas (uNK)

Em camundongos, ocorre a migração e o acúmulo transitório de células leucocitárias, com predomínio de células linfocitárias da linhagem *Natural Killer*, em áreas da região mesometrial de sítios de implantação embrionária (Croy *et al.*, 1989; Peel, 1989; Paffaro Jr, 2003) denominadas de glândula metrial ou de

agregado linfóide mesometrial da prenhes (MLAP-*mesometrial lymphoid agregates of pregnancy*). Estas células NK presentes no útero gestante são denominadas de *Natural killer* uterinas (uNK) (Chantakru *et al.*, 2002). Em camundongos, as células uNK aparecem por volta do 5º dg e aumentam gradualmente em número até atingirem um valor máximo ao 12º dg na decídua basal. Próximo ao parto entretanto, estas células diminuem e tornam-se escassas. (Stewart & Peel, 1980; Croy *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2006; Paffaro Jr, 2003). Em humanos, a população de células uNK apresenta um número bastante elevado nas regiões onde ocorre a implantação do embrião, representando cerca de 70% dos linfócitos totais residentes (Koopman *et al.*, 2003; Van Der Meer *et al.*, 2004).

Baseados no padrão de reatividade à lectina DBA (*Dolichos biflorus*) na membrana e nos grânulos citoplasmáticos das células uNK, Paffaro Jr e colaboradores (2003) descreveram 4 subtipos de morfológicos (fig 1) .Estes subtipos correspondem aos estágios de maturação desta população celular, quais sejam: subtipo 1: são as menores (9 ± 3µm) e não apresentam grânulos, porém com forte reatividade na membrana; subtipo 2: tamanho intermediário (13 ± 2µm), exibem já alguns grânulos em seu citoplasma e membrana com reação positiva à lectina DBA; subtipo 3: são as células diferenciadas (26 ± 7µm), apresentando muitos grânulos e membrana com reação positiva à lectina DBA e; subtipo 4: são células em senescência que apresentam vacúolos citoplasmático, com muitos grânulos e núcleo com condensação da cromatina irregular.



Figura 1: Subtipos de células uNK de camundongos identificados pela lectina DBA presentes na região mesometrial do sítio de implantação de 9° dg. (a) subtipo-I, (b) subtipo II, (c) subtipo III e, (d) subtipo IV (Paffaro Jr *et al*, 2003)

Segundo este mesmo autor, há um gradiente de distribuição destes subtipos de uNK na região mesometrial do sítio de implantação que varia de acordo com o período gestacional (fig 2). A maior incidência de uNK subtipo I e II encontra-se no endométrio próximo ao miométrio, nas regiões R1 e R2, enquanto os subtipos III e IV encontram-se no endométrio próximo ao embrião nas regiões R3 e R4. O acúmulo de células uNK deve-se ao recrutamento de células precursoras (pré-uNK) provenientes de órgãos linfóides, como baço e linfonodos, que devem chegar ao útero provavelmente em diferentes estágios de diferenciação/maturação (Chantakru, 2002).



Figura 2: Diagramas representativos de secções do útero de camundongos gestantes nos 5º dg (A), 10º dg(B) e 15º dg (C). O esquema ilustra as regiões da distribuição dos subtipos de uNK na região mesometrial (M). Do lado oposto à região mesometrial encontra-se a região anti-mesometrial (AM), onde corresponde ao sítio de implantação do embrião (E). Região 1 (R1), próxima ao miométrio (Mi), Região 2 (R2) está localizada no endométrio (En) entre a R1 e a região 3 (R3). R3 representa a maior área decidualizada e é a região que faz a interface materno fetal com a placenta fetal (FP). A região 4 (R4) é o endométrio decidualizado da R3. (TGC) camada de células trofoblásticas gigantes. (Paffaro Jr *et al*, 2003)

Pela caracterização imunofenotípica, as células uNK de humanos apresentam um perfil semelhante às das NK circulantes (cNK) em sua superfície (Croy & Kiso, 1993). Porém no útero estas células uNK apresentam predominantemente marcadores CD56^{brigh} CD16^{dim}, enquanto as cNK são CD56^{dim} CD16^{bright} (Koopman *et al.*, 2003), o que caracteriza células com maior atividade citotóxica (Cooper *et al.*, 2001; Jacobs *et al.*, 2001).

As uNK tanto em humanos como em camundongos apresentam pouca atividade citolítica *in vitro* (Parr *et al.*,1990; Croy *et al.*, 1991), porém participam ativamente na produção de citocinas que regulam positivamente o crescimento da placenta, do feto e da angiogênese na interface materno-fetal (Croy *et al.*, 1991; Ashkar *et al.*, 2000).

O reconhecimento das células trofoblásticas placentárias pelas células imunologicamente competentes do útero é um fator condicionante para o sucesso da implantação embrionária e posterior desenvolvimento fetal. As células trofoblásticas expressam em sua superfície moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I não-clássicos HLA-G e HLA-E, que são reconhecidos por CD94/NKG2, Ly49 (killer-cell-like receptors), ILT2 e ILT4 (Immunoglobulin–Like Transcript), KIR2DL4 e KIR2DL1 das células uNK (Perez *et al.*, 1996; Carretero *et al.*, 1997; Houchins *et al.*, 1997). Este reconhecimento acoplado ao ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-basead Inhibitory Motifs) resulta numa cascata de sinalização para a produção de citocinas e na inibição da atividade citotóxica (King *et al.*, 2002; Croy *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2005), ou, de ativação envolvendo o receptor NKG2C (Geraldine *et al.*, 2005). Estas interações, entre as células uNK e trofoblasto, resultam em última instância na inibição da atividade citolítica das uNK na gestação normal (Dieltil *et al.*, 2006).

1.3- O modelo experimental de lesão cirúrgica do embrião

O modelo experimental de lesão cirúrgica do embrião preconizado por Roman (2001) e utilizado por Roman (2001) e Copi (2006), descreveram a ocorrência de hemorragia na área do MLAP dos sítios uterinos lesionados. Nestes, segundo Copi (2006) constatam-se alterações evidentes nas células uNK, sendo sugestiva a ativação da citotoxicidade decorrente da liberação do conteúdo dos grânulos lisossomos- secretores. Esta ativação é acompanhada de alterações morfológicas evidenciadas pela citoquímica de lectina DBA (fig 3) e foram categorizadas em: - categoria I representa células com marcações descontínuas ou ausência na superfície celular e na marcação nos grânulos; - categoria II, células que apresentam marcação na superfície celular descontínua, porém com os grânulos positivos e; - categoria III as células reativas na membrana celular e parcialmente em seus grânulos citoplasmáticos. Estas alterações morfológicas nas células uNK nos sítios uterinos submetidos à lesão cirúrgica seriam decorrentes da resposta ao estresse sofrido no embrião, ocorrendo assim, a degranulação dos seus mediadores citolíticos frente ao desequilíbrio da homeostasia da interface materno-fetal devido ao colapso embrionário (Copi, 2006).



Figura 3: Categoria de células uNK de camundongos identificados pela lectina- DBA presentes na região mesometrial do sítio de implantação de 9º dg submetida a lesão mecânica do embrião. (a) categoria I, (b) categoria II, (c) e categoria III (Copi *et al* 2006).

Estas evidências sugerem que as células uNK respondem ao estímulo da adversidade do ambiente uterino gestante, podendo potencialmente desencadear uma resposta imune do tipo inata. Embora a produção de NO pelas células uNK tem sido relacionada com o processo de angiogênese da interface materno-fetal (Ogando *et al.*, 2003, Croy *et al.*, 2006), Lippe (2007) utilizando o modelo de lesão cirúrgica de embriões em camundongos gestantes, relatou uma intensa mobilização da iNOS nos períodos de 1 a 2 h pós-lesão embrionária, sugerindo um grande incremento na produção de NO através das células uNK.

Desta forma, o fato do ambiente uterino poder gerar constitutivamente teores consideráveis de radicais livres, particularmente o NO, faz presumir que as células presentes nesta interface que não sejam os alvos diretos do benefício destes radicais livres, necessitem de mecanismos de proteção eficientes que evite o desencadeamento da morte celular por apoptose ou necrose decorrentes do estresse oxidativo gerado neste ambiente.

1.4- Proteínas do choque térmico – (HSP) e os mecanismos de citoproteção

Proteínas do choque térmico (HSP-*heat shock proteins*) são chaperonas, altamente conservadas, presentes em procariotos e eucariotos que são expressas constitutivamente, ou, em resposta a uma ampla variedade de injúrias celulares

(Schmitt *et al.*, 2006). HSP podem interagir com múltiplos componentes chaves em vias de sinalizações intra e intercelulares que regulam o crescimento e o desenvolvimento das células. Chaperonas interagem com várias moléculas sinalizadoras incluindo receptores de hormônios, quinases, reguladoras do ciclo celular e de morte celular (Nollen & Morimoto, 2002). Habilidades celulares, como crescer, dividir, diferenciar ou morrer, são dependentes de sinais extracelulares e do reconhecimento destes sinais.

A contribuição das HSP na transdução de sinais decorre das evidências de que HSP90 e HSP70 estão associados com moléculas sinalizadoras v-Src, Raf1, Akt e receptores esteróides (Dittmar *et a.l,* 1998; Sato *et al.*, 2000; Xu & LIndquist, 1993). E de forma interessante, células que perderam a habilidade de regular o crescimento celular, como células tumorais, apresentam altos níveis de múltiplas HSP quando comparadas com células normais (Jaatela *et al.*, 1999).

Todas as atividades das chaperonas parecem estar relacionadas com sua capacidade de interagir com segmentos de peptídeos hidrofóbicos de proteínas, sendo estas ligações controladas pelo seu domínio ATPase (Mayer & Bukau, 2005). Diversas condições que alteram a estrutura da proteína resultam na exposição de regiões hidrofóbicas que estão normalmente escondidas na molécula, levando a sua agregação e perda da função. A família de HSP70 possui a característica de competir pela ligação dessas regiões hidrofóbicas, acoplado por um mecanismo dirigido por ATP, resultando na prevenção da agregação, conferindo uma conformação nativa de algumas proteínas (BaKau *et al.*, 1998.; Harlt *et al.*, 1996). A região de ligação com peptídeos está localizada próxima a região carboxi-terminal (COOH) de HSP70. A interação da HSP70 com outras proteínas é regulada por ATP e hidrólises que ocorrem na região de 44KDa amino terminal (NH2) do domínio ATPasico (Mosser *et al.*, 2000).

Dentre as famílias das HSP destaca-se a HSP70. São chaperonas citosólicas que podem ser expressas nas células sob duas formas distintas, quais sejam: a forma estresse-induzida HSP72 (HSP70) e a forma constitutiva, HSP73 (proteína do choque térmico cognata-HSC-70) (Lindquist *et al.*,1980). Além de prevenirem a

agregação e o dobramento errôneo de outras proteínas (Schimitt *et al.*, 2006), as isoformas HSP72 e HSP73 também auxiliam no tráfico de proteínas (Gething *et al.*, 1992; Nollen *et al.*, 1999). A proteína GRP78 (78kDa) localizada no retículo endoplasmático e a GRP75 (HSP75) mitocondrial e peso molecular 75KDa também pertencem à família HSP70, e ambas atuam como chaperonas (Jaattela *et al.*, 1999). A molécula HSP75 encontrada na mitocôndria também possui funções importantes na translocação de proteínas para dentro desta organela (Mizen *et al.*, 1991).

As funções executadas pelas chaperonas são de importância vital para as células, uma vez que mantém a homeostase com funções cruciais para a sobrevivência celular em resposta às condições do ambiente. Elevadas expressões de algumas chaperonas, como por exemplo a HSP70, podem bloquear o processo de morte celular (fig. 4) (Schmitt et al., 2006). A clivagem do substrato poly (ADPribose) polimerase pela caspase 3 é inibida nas células que expressam HSP70 (Buzzard et al., 1998, Gabai et al., 1997, Mosser et a.l, 1997). Segundo Mosser (1997) isto ocorre pela redução do processamento da pro-caspase 3, enquanto Jaattela e colaboradores (1999) sugerem que a HSP70 reduz a atividade da caspase 3. Proteção por HSP70 está relacionada também à inibição da liberação do citocromo c dATP desencadeada pela ativação da caspase 3 envolvendo a seqüência EEVD (Glu-Glu-Val-Asp) da região C-terminal de HSP 70 (Li, et al., 1997). HSP70 também tem sido relacionada com vias anti apoptóticas, ligando-se diretamente com o fator de ativação de proteases (Apaf-1) prevenindo o recrutamento de pró-caspases 9 (Beere et a.l, 2000). Corroboram estas funções como chaperona, os experimentos realizados com células transfectadas para expressão da HSP70, que tornam-se protegidas dos efeitos citotóxicos do TNF- α (Jaattela et al. 1998), através da prevenção da quebra no DNA, da proteção das estruturas mitocondriais e inibição da apoptose (Jaquier-Sarlin et al., 1994).

São distinguidas as vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas de acordo com os sinais de transdução acionados durante uma sinalização. A via extrínseca é iniciada através de proteínas da membrana plasmática, como a família de receptor

fator de necrose tumoral (TNF), que podem agir como receptores de morte celular induzindo uma ativação direta de caspases, em particular caspase 8. A via intrínseca envolve sinais de estresse intracelular pela ativação ou inativação de moléculas pró-apoptóticas que são direcionadas para a mitocôndria e iniciam a permeabilização da sua membrana. A permeabilização da membrana mitocondrial externa conduz à liberação de ativadores de caspases, em particular o citocromo c que interage com o fator-1 de ativação de proteases apoptóticas (Apaf-1) e a procaspase 9 para formar o apoptossomo (Li *et al.*, 1997). A flavoproteína, fator indutor de apoptose (AIF), é outra proteína inter-membrana mitocondrial liberada sob o estímulo apoptótico. Nestas condições, AIF é translocado para o núcleo e aciona mudanças relacionadas ao processo de morte celular independentes de caspases (Joza *et al.*, 2001).

HSP70 interage com vários destes fatores apoptóticos bloqueando a via apoptótica em diferentes pontos, principalmente àquelas associadas aos eventos mitocondriais (Garrido *et al.*, 2006). No citoplasma também pode inibir quinases específicas do estresse. HSP 70 liga-se e funciona como um inibidor natural da proteína c-Jun N-terminal quinase (JNK 1) (Park *et al.*, 2001). HSP70 também poderia ligar-se com a proteína não fosforilada quinase C (PKC), estabilizando a proteína. HSP 70 poderia atuar de maneira similar ao ligar-se à molécula sinalizadora Akt (Ruchalski *et al.*, 2006).

Na mitocôndria, HSP70 bloqueia a apoptose induzida pela temperatura por dificultar a translocação e inserção de *Bax* na membrana externa da mitocôndria, prevenindo sua permeabilização e assim, a liberação de citocromo c e AIF (Stankiewicz *et al.*, 2005).



Figura 4: HSP70 é um regulador decisivo na apoptose via mitocondrial, e pode bloquear a apoptose em diferentes níveis, como em estágios pré mitocondriais, inibindo a sinalização induzida pelo estresse; no estágio mitocondrial, prevenindo a permeabilização da membrana mitocondrial através do bloqueio da translocação de Bax, e finalmente em nível pós mitocondrial por interagir com AIF e Apaf -1 ou protegendo essencialmente proteínas nucleares da clivagem por caspase 3 (reproduzido de Schmitt *et al*, 2006).

Algumas proteínas mitocondriais iniciam sua síntese no citoplasma, e podem se complexar com formas citosólicas de HSP70 (72/73) para chegarem até a mitocôndria (Beckmann *et al.*, 1990). Em virtude da sua seqüência sinal mitocondrial amino-terminal e na presença de HSP70 citosólico ligante, proteínas recém sintetizadas destinadas à mitocôndria são mantidas em conformação inativa (Randall *et al.*, 1989). Translocação de polipeptídeos para o interior da mitocôndria é acompanhada pela liberação ATP-dependente de HSP72/73. Quando o polipeptídeo é translocado para a mitocôndria e ainda está inativo, ele complexa-se com HSP75, e a seqüência de sinal mitocondrial é removido por uma peptidase (fig.5) (Mizzen *et al*, 1991).



Figura 5: Um modelo descritivo do possível papel de HSP75 na importação de proteínas mitocondriais, dobramento e agregação. Proteínas recém sintetizadas destinadas à mitocôndria são mantidas inativas. A translocação destas proteínas é dependente da ligação com chaperonas citosólicas HSP72/73 dependente de ATP e depois de iniciada sua entrada na mitocôndria, de proteínas HSP75. Para algumas proteínas mitocondriais monoméricas podem ser dependentes da interação com HSP58. (Reproduzido de Mizzen, 1991).

Algumas proteínas HSP70 podem ser ativamente secretadas por uma variedade de tipos celulares em resposta ao estresse celular (Broquet, *et al.*, 2003). As evidências da presença da HSP no meio extra-celular advêm dos experimentos onde as células tumorais expostas à HSP70 solúvel sofrem ativações de várias funções celulares (Veres *et al.*, 2002; Menoret *et al.*, 2000). Células derivadas de glioma (Guztova *et al.*, 2001), que sofreram injúria térmica liberam níveis crescentes de HSP com o decorrer do tempo. A liberação ativa de HSP70 derivada de células tumorais é acentuada após estresses exógenos, incluindo citocinas pro - inflamatórias (Barreto *et al.*, 2003). A eHSP (HSP exógena) está relacionada com funções imunológicas, sendo sua participação no sistema imune inato o mais

notório (Chen *et al.*, 1999; Asea *et al.*, 2000; Basu *et al.*, 2000; Campisi *et al.*, 2003), como por exemplo, a indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e ativação do sistema complemento (Prohaszka *et al.*, 1999, 2002). Na resposta imune adaptativa, a HSP age como molécula adjuvante estimulada por várias substâncias microbianas (Srivastava *et al*, 2002; Binder *et al*, 2004). Além disso, a eHSP é capaz de aumentar a atividade fagocitária de macrófagos (Kakimura *et al.*, 2002).

As propriedades da eHSP 70 como chaperona peptídica antigênica e ativadora de células apresentadoras de antígenos (APCs) têm sido recentemente descrita como atividade "chaperocina" (Asea *et al.*, 2000; 2002). Outra evidência da relação da eHSP70 e a resposta imune inata são os estudos que demonstram a interação de peptídeos e HSP70 livres formando complexos com CD14 e TLR2/4, além de, competir com ligantes de CD40 em APCs. Esta interação inicia a liberação de citocinas pro - inflamatórias por células que apresentam tais receptores. Dentre as citocinas induzidas estão: TNF- α , interleucina 1 β (IL-1 β), inteleucina 12 (IL-12), inteleucina 6 (IL-6) e fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF) (Asea *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Lehner *et al.*, 2004).

1.5- HSP70 na Gestação

A presença de HSP tem sido demonstrada em diferentes tecidos do trato reprodutivo humano. Máximos valores de HSP70 no endométrio são expressos depois da ovulação, no início da fase secretória e na decídua durante o primeiro trimestre de gravidez (Neuer *et al.*,1996). Estas proteínas são descritas como constitutivamente expressas em várias células durante a gestação (Shah *et al.*, 1998) e, segundo Hightower (1989), também são secretadas por células embrionárias de ratas podem secretar a HSP70. Contudo não há relatos especificando quais células presentes na interface materno-fetal e em que momento expressam estas moléculas ao longo da gestação.

O envolvimento da HSP70 na gestação é de extrema relevância visto que os receptores de estrógenos e progesterona podem se associarem com HSP na modulação da função dos esteróides no endométrio (Renoir *et al.*, 1990; Bagchi *et al.*, 1991). A prevenção de efeitos citotóxicos de citocinas também tem sido proposto como uma possível função das HSP no endométrio (Tabibzadeh & Broome, 1999), uma vez que, os leucócitos locais podem produzir altos níveis de espécies reativas de oxigênio e citocinas e comprometerem as funções endometriais (Jaquier-Sarlin *et al.*, 1994;Tabibzdeh *et al.*, 1999).

O útero gestante possui uma grande variedade de tipos celulares que interagem entre si, executando uma série de vias de sinalização e o balanço de citocinas (Th1/Th2) é crucial para o desenvolvimento normal de uma gestação (Piccinnin *et al.*, 1996; Stewart-AKers *et al.*, 1998). O desequilíbrio nos níveis destas citocinas é determinante nos casos de abortos recorrentes (Wilczynski et al., 2005). Condições de estresse podem ocorrer em resposta aos mais variados fatores, incluindo a hipoxia e a produção de radicais livres como as espécies reativas ao oxigênio (ROS) (Ohyama et al., 1985, Allan et al., 1986; Lennon et al., 1991). Condições estas que o útero gestante pode estar sujeito, exigindo um mecanismo de proteção em nível celular tanto do próprio concepto, quanto dos tecidos uterinos. A tolerância ou resistência às situações de estresse em vários tecidos tem sido atribuída à presença constitutiva da HSP70 nas células e à sua capacidade em responder aos estímulos de estresse com maior produção destas proteínas (Campisi et al., 2003). Além disso as HSPs podem ser secretadas e podem atuar como um importante indutor de resposta celular exacerbando a produção de citocinas da categoria Th1 pelas células envolvidas na resposta imune do tipo inata (Srivastava et al., 2002; Binder et al., 2004; Delneste et al., 2004). Assim, a expressão de HSP70 durante a gestação poderia não só apresentar uma função citoprotetora, como também através do eHSP participar do diálogo entre as células, tanto em estados fisiológicos como em anomalias que resultam na interrupção da gestação

Presume-se, portanto, a participação desta família de proteínas na manutenção e sinalização celular da interface materno-fetal, um ambiente sujeito ao estresse contínuo decorrentes das interações dinâmicas e complexas entre uma diversidade grande de populações celulares. Pela literatura disponível até o momento, não há relatos precisos sobre quais são as células que expressam a HSP na interface materno-fetal ao longo da gestação e a sua importância na manutenção da gestação ou, o seu possível envolvimento em situações de gestações anômalas. Desta forma, os estudos do envolvimento da HSP70 na interface materno-fetal onde ocorre o grande afluxo de células uNK, um linfócito efetor da respostas imune inata, além do ambiente intrínseco de estresse oxidativo contínuo mesmo em condições de gestação normal, deverão contribuir na compreensão dos mecanismos envolvidos tanto na homeostasia quanto patologia da interface materno-fetal do útero gestante.

2- OBJETIVOS
2.1- <u>Geral</u>

O objetivo deste projeto consistiu em avaliar a expressão das proteínas de choque térmico 72 e 73 nas células *Natural Killer* uterina (uNK) presentes na interface materno fetal ao longo da gestação normal e anômala induzida através da lesão cirúrgica nos embriões em camundongos.

2.2- Específicos

- Identificar as populações celulares da interface materno-fetal com expressão da HSP 72/73 nos dias de gestação (dg) 6, 9, 12, 15 e 17 em camundongos através de reações de imunocitoquímicas

- Avaliar a expressão das isoformas HSP72 e HSP73 no dg 9 normal através da *Western-blotting* e RT-PCR.

 Avaliar quantitativamente a população de células uNK-HSP72/73 positivas no gd 9 normal e pós-lesão embrionária..

- Localizar a HSP72/73 nas células uNK através da imunomicroscopia eletrônica.

- Associar a expressão da HSP72/73 nas células uNK de gestação normal e pós-lesão embrionária com a proliferação e apoptose nestas células.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-<u>Animais</u>

Foram utilizados camundongos fêmeas *Mus musculus* da linhagem Swiss, com 12 a 16 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo – CEMIB/UNICAMP. Os animais foram mantidos em gaiolas com acesso à água e alimentação *"ad libittum"*. Fêmeas virgens foram acasaladas com machos da mesma linhagem, e o dia da constatação do tampão vaginal foi considerado o primeiro dia de gestação (dg). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia, UNICAMP (Proc. Nº1303-1) (anexo 1).

3.2-Indução de Lesão Embrionária

Fêmeas prenhes no dg 9 foram anestesiadas com injeção via intraperitoneal de cloridrato de xilasina nas doses de 5 -16 mg/kg (Anasedan-Sespo) e cloridrato de quetamina (Dopalen- Sespo) nas doses de 100-200 mg/kg em salina 0,15 M, na proporção de 1:1:3, e laparatomizadas em seguida. Constatada a presença de sítios de desenvolvimento embrionário ao longo dos cornos uterinos, foram realizadas lesões cirúrgicas introduzindo uma agulha hipodérmica (15X5) através da parede uterina na face anti-mesometrial do sítio de implantação, em profundidade suficiente para lesar o embrião sem atingir a região mesometrial. As lesões foram realizadas em sítios alternados, sendo no mínimo 2 sítios de apenas 1 dos cornos uterinos e padronizado nos horários entre 8 e 9 h da manhã. Como grupo controle, os animais foram manipulados de forma semelhante, com intervenção cirúrgica, mas sem a lesão embrionária.

3.3-Coletas e processamentos de materiais

3.3.1- Processamento para embebição em parafina

Foram coletadas amostras dos sítios de desenvolvimento embrionário nos dg 6, 9, 12, 15 e 17 de gestação . Os sítios de desenvolvimento embrionário no dg 9 submetidos à lesão mecânica do embrião nos períodos de 10 e 30 minutos (min) e 1, 6 e 12 horas (h) e seus respectivos controles também foram coletados. Os animais anestesiados foram perfundidos via ventrículo esquerdo com 30 a 50 mL de solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% em tampão fosfato salina (PBS) 0,15M em pH 7,4 acrescido de sacarose 0,1M. Foram coletadas amostras dos segmentos uterinos de três animais de cada um dos períodos gestacionais e dos períodos pós-lesão, sendo processados de acordo com as técnicas rotineiras para embebição em parafina (Histosec, Merck, Brasil).

Cortes semi-seriados de 5µm de espessura dos espécimes embebidos em parafina foram então obtidos em lâminas histológicas previamente silanizadas.

3.3.2- Processamento para embebição em resina Lowicryl- K4M e resina epóxi.

Animais em gestação normal no 9º dg e nos períodos de 1 e 6 h após lesão embrionária foram anestesiados e sacrificados através da perfusão com 30 a 50mLl de solução fixadora constituída de paraformaldeÍdo 4%, glutaraldeÍdo 0,1% e 0,1M de sacarose em tampão fosfato (PB) 0,1M, pH 7,4. Parte dos sítios de implantação embrionária foram individualizados e a região mesometrial foi dissecada. A desidratação das amostras foi realizada em gradiente crescente de N,N dimetil formamida (Aldrich Chemical Co, USA), em temperatura de -20°C, embebidas em resina Lowicryl -K4M (TAAB Laboratories, Berkshere, UK), e polimerizados em radiação UV à temperatura de -35°C, durante 48 h. Cortes ultra-finos de 100nm foram obtidos no ultra micrótomo (UltraCut, Leica) e coletados em telas de níquel (150 mesh).

A outra parte dos sítios dissecados e coletados dos animais perfundidos acima foi fixada adicionalmente por imersão com solução fixadora de paraformaldeído 2% e glutaraldeido 1,5% em PBS 0,1M (pH 7,4) durante 24 h a 4°C. Após lavagem em PBS 0,1M, os fragmentos da região mesometrial foram pós-fixados com tetróxido de ósmio (Ladd Research, USA) 1% em solução de cacodilato a 0,1M durante 1h à temperatura ambiente, desidratados em gradiente crescente de etanol e óxido de propileno (Aldrich Chemical Co, USA) e embebidos em resina epóxi (Epon 812 – Polyscience, USA). Após polimerização a uma temperatura de 60°C durante 72h, foram obtidos cortes semi-finos de 1µm em ultramicrótomo (UltraCut, Leica) e corados com azul de toluidina para seleção prévia de áreas de interesse. Os cortes ultra-finos de 70nm das áreas selecionadas foram obtidos em ultramicrótomo (UltraCut, Leica), coletados em telas de cobre (150 mesh), contrastados em acetato de uranila 2% (Rield-de Haenm, Alemanha) e citrato de chumbo a 0,5% (Ecibra, Brasil), revestidos com carbono e observados no microscópio eletrônico de transmissão EM906 (LEO Schot Zeiss)

3.4- Reações Citoquímicas e Imunocitoquímicas

3.4.1 - Citoquímica de lectina DBA (Dolichos biflorus)

A lectina DBA (Sigma Chemical - Co, St. Louis, USA) biotinada foi utilizada para identificação, localização e avaliação da morfologia das células uNK nos cortes histológicos dos sítios de desenvolvimento embrionários nos dg 6 ,9, 12, 15 e 17, e nos sítios de desenvolvimento embrionário com 9 dias de gestação submetidos à lesão embrionária, de acordo com os procedimentos descritos por Paffaro Jr e colaboradores (2003). Este procedimento consiste na desparafinização e hidratação dos cortes, tratamento com peróxido de hidrogênio 1%, seguido de bloqueio com

albumina sérica bovina (BSA tipo V, Sigma, St Louis, USA) a 1% em PBS 50mM e incubados com a lectina DBA biotinada (Sigma, USA) diluída 1:300 em PBS 100mM, pH 7,4 durante 12h a 4°C. Após a lavagem e incubação com complexo Avidina-Biotina conjugado com peroxidase (Vectastain Elite, Vector, USA), os cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB – Sigma, St. Louis, USA) 0,5mg/mL em tampão Tris-salina (TBS) 50mM pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3%. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e após montagem permanente em bálsamo sintético (Entellan, Merck, Br) foram observados e documentados no microscópio Eclipse 800 (Nikon, Japão), acoplado com sistema de captura de imagem (CoolSnap, USA) e tratamento de imagem digital (ImageProPlus, USA).

3.4.2 - Imunocitoquímica com anticorpo anti-HSP72/73

Os cortes obtidos em 3.3.1 de pelo menos dois sítios diferentes de cada um dos três animais de cada grupo experimental e seus respectivos controles foram desparafinizados e reidratados para reações imunocitoquímicas.

Os cortes histológicos foram submetidos ao tratamento com microondas em tampão citrato 10mM (pH 6.0) para a exposição de epítopo, seguido do tratamento com peróxido de hidrogênio 1% e do bloqueio com BSA a 1% em PBS 50mM, por 30 min. Após o bloqueio os cortes foram incubados 12h à temperatura de 4°C com o anticorpo primário anti-HSP72/73 de camundongos feito em coelho (Cedarlane, Canadá- 1mg/mL) na concentração 1:200 diluído em PBS/BSA 1% (Tampão fosfato 50mM e salina a 0,15M e pH 7,4). Após este procedimento foi realizada a lavagem do anticorpo primário, seguido do bloqueio com BSA a 1% durante 30 min. Após a incubação do anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (Chemicon, USA) diluída na concentração de 1:200, durante 1h, realizou-se a revelação da peroxidase com DAB 0,5mg/mL em TBS 50mM pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3%. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e após montagem permanente em bálsamo sintético (Entellan, Merck, Br) foram

observados e documentados no microscópio Eclipse 800 (Nikon, Japão), acoplado com sistema de captura de imagem (CoolSnap, USA) e tratamento de imagem digital (ImageProPlus, USA).

3.4.3 – Tripla marcação para quantificação das células uNK lectina DBA e anti-HSP72/73 positivas

Cortes histológicos das amostras dos dg 9 normal e daqueles submetidas à lesão embrionária nos períodos de, 1, 6 e 12 h pós-lesão foram preparados como descrito no item 3.3.1 e submetidos ao tratamento com microondas em tampão citrato 10mM (pH 6.0), para a exposição de epítopo. Os cortes histológicos foram submetidos ao bloqueio de reações inespecíficas com BSA a 1% em PBS 50mM, por 1 h. Após o bloqueio, houve a incubação simultânea do anticorpo primário anti-HSP 72/73 (Cedarlane, Canadá- 1mg/mL -1: 200) e da lectina DBA (1:800), durante 12 h, ambos diluídos em BSA 1% e, PBS 50mM, pH7,4. Após lavagem, foram submetidos ao segundo bloqueio com BSA a 1% por 1h, incubados com o anti-coelho conjugado com Cy3 (Pharmingen, USA -1mg/mL) em PBS/BSA na diluição de 1:200 e com estreptoavidina conjugada com Alexa fluor 488 (Invitrogen -1mg/mL) na diluição de 1:200 durante 1 h. Os cortes foram lavadas e tratados com DAPI (Invitrogen) diluída a 1:700 em PBS 0,05M durante 5 min, para contrastação dos núcleos. Os cortes foram lavados com PBS 0,05M, montados entre lamínulas com o meio de montagem Vectashiels (Vector, USA) e observados no microscópio Eclipse 800 (Nikon, Japan) acoplado com sistema de epifluorescência.

As imagens observadas em objetiva de 40X e documentadas em microscópio (Olympus IX71 iverted microscope, Japan) com excitação de UV e barreiras de filtro: DAPI- 330/385108 (UMWU2), azul-450/480 (U MWB2) e verde- 510/550 (U MWG2). As imagens foram capturadas com câmera digital Cool-Snap (Media Cybernatics, USA) e quantificadas com o programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA). Foi quantificada a totalidade de núcleos (DAPI positivos) de cada campo digitalizado (5,5mm² de área) e, as células lectina DBA positivas e HSP positivas. Os números absolutos de núcleos em 45 campos da região mesometrial dos cortes histológicos do útero obtidos de 3 animais diferentes, dos grupos controle de gestação normal no dg 9 e dos períodos de 1, 6 e 24 h póslesão.

3.4.4- Imunocitoquímica Ultra-estrutural

Os cortes de espécimes embebidos em resina Lowicryl -K4M obtidos em 3.3.2 e coletados em telas de níquel foram lavados em tampão Tris-HCI.50mM, pH 7,4 e tratados com BSA a 1% em Tris HCI 50mM, pH7,4 durante 1 h. Após lavagens em tampão Tris-HCI 50mM (pH 8.2) foram incubados com o anticorpo anti-HP72/73 (Cedarlene, Canadá- 1mg/mL - 1:200) diluído em Tris HCI 50mM, pH 8,2 durante 12 h em câmara úmida, a 4°C. Após lavagem com tampão Tris-HCI 50mM, pH 8.2, seguida da lavagem com tampão Tris-HCI 50mM, pH 7,4, os cortes foram incubados com anticorpo secundário anti-coelho feito em cabra conjugado com ouro coloidal (*Colloidal Gold-Conjugated- 10nm, Dako*) 1mg/mL na diluição de 1:100 durante 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados e contrastados com acetato de uranila 2% (Riedel-de Haenm, Alemanha) durante 2 min e citrato de chumbo (Ecibra,Brasil) a 0,5%, durante 20 seg e revestidos com película de carbono no "sputtering" (Balzers PLS500)

As análises ultra-estruturais foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão, LEO - EM902.

3.4.5- <u>Tripla marcação com reação de TUNEL, imunocitoquímica com</u> anti-PCNA e citoquímica de lectina DBA

Foram realizadas reações de TUNEL utilizando o kit "In situ Cell Death Detection- POD" (Roche Molecular Biochemicals, Germany) e imunofluorescência com anticorpo anti-PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular - Bethyl Laboratories, Canadá), nos cortes histológicos obtidos em 3.3.1.

Os cortes histológicos desparafinizados e hidratados foram equilibrados em PBS 0,1M pH 7,4 e incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% diluído em metanol por 10 minutos em temperatura ambiente. Depois de lavados em PBS, foram incubados em solução de permeabilização (0,1% Triton X-100 diluído em solução de citrato de sódio 0,1%) por 2 minutos em banho de gelo (4ºC), lavados em PBS e incubados com a solução de reação contendo a enzima e os nucleotídeos TdT e dUTP conjugada com fluoresceína por 1 hora em câmara úmida à 37ºC. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS 0,1M e incubados com o anticorpo anti-fluoresceína conjugada à peroxidase (POD), durante 1 hora à 37ºC As lâminas foram lavadas em PBS e a peroxidase foi revelada com DAB 0,5mg/mL em TBS 50mM pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3%. Após lavagem em TBS 50mM e PBS 0,1M, os cortes foram tratados com PBS/BSA a 1% por 30 min à temperatura ambiente e incubados com o anticorpo policional de coelho anti- PCNA (Bethyl Laboratories, Canadá- 1mg/mL) na diluição de 1:300 durante 2 h à 37ºC. Após lavagem em PBS 0,1M, os cortes foram incubados com o anticorpo de cabra anti-coelho conjugado com Cy3 (Pharmingen, USA -1mg/mL) na diluição de 1:200 durante 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS 0,1M e submetida à reação com a lectina DBA biotinada, conforme descrita no item 3.4.3. As observações foram realizadas no microscópio Eclipse 800 (Nikon, USA) acoplado com sistema de epifluorescência e as imagens digitalizadas utilizando-se o sistema de captura de imagem ImageProPlus (Media Cybernetics, USA), para identificação das células uNK PCNA positivas. O mesmo campo foi documentado em microscopia de campo claro para análise das células com núcleo TUNEL positivos, reveladas com DAB.

3.5 – Processamentos para obtenção de homogeneizados teciduais

Pelo menos três animais normais no dg 9 e dos grupos experimentais nos períodos de 1, 6 e 12 h pós-lesão embrionária foram anestesiados e perfundidos com salina 0,15M via ventrículo esquerdo. Os cornos uterinos foram removidos e as

regiões mesometriais da região MLAP dos sítios embrionários foram dissecados, pesados na proporção de 30g/100mL na solução de extração (EDTA 10mM pH 7,4; Tris-HCl 10mM pH 7,4; pirofosfato de sódio 10mM, fluoreto de sódio 100mM; ortovonadato de sódio 10mM, PMSF 2mM, aprotinina 0,1mg/mL; igepal 1%) e submetidos à trituração com Polytron-Aggregate (Kinematica, USA) em rotação máxima e banho de gelo, seguida de sonicação em banho de gelo. Os homogeneizados foram centrifugados a 12000g por 30 min a 4°C e o sobrenadante coletado para dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), aliquotados e mantidos congelados a -75° C, até o momento do uso.

3.6- SDS PAGE e Western-blotting

3.6.1- <u>SDS-PAGE</u>

Foi realizada eletroforese das proteínas dos homogeneizados obtidas conforme o descrito em 3.5. Para este processo aplicou-se de 30 µg de proteína em géis de poliacrilamida a 12,5%, preparadas segundo Laemmli (1970) em miniplacas verticais (8,5 x 7,3 cm) do sistema Mini Protean III (Bio-Rad). As corridas foram acompanhadas com padrão de peso molecular de proteínas pré-coradas (*Prestained SDS-PAGE Standards, Low Rang*e - Bio-Rad) empregando uma fonte de corrente contínua (*Power pac* 300 – Bio-Rad) ajustada com a amperagem constante em 25mA.

Os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue R 250 (Sigma Chemical Co, St Louis/ USA) a 0,25% para conferir o padrão de separação eletroforética ou, transferidos para membrana de PVDF (Immobilon-P-Transfer Membranes, Millipore Corporation, U.S.A).

3.6.2- WESTERN BLOTTING

A transferência para membrana de PVDF (Immobilon–P–Transfer Membranne Millipore Corporation, USA) dos géis de SDS-PAGE foi realizada em cuba de transferência (BioRad) com a corrente ajustada para 220mA/cm² durante 2 h, com trocas de gelo a cada 1 h, em tampão Tris base 0,06M, Glicina 0,2M e metanol a 20%.

Após a transferência, as membranas foram submetidas a 3 lavagens de 5 min cada, em tampão Tris-HCI 50 mM acrescido de 5mL de Tween 20 (TBS-T). Foram tratadas com solução bloqueadora de TBS-T e BSA a 1% durante 30 min a temperatura ambiente. Foram lavadas em TBS-T e em seguida incubadas com o anticorpo primário anti-HSP72/73 feito em coelho na diluição de 1:700 (Cedarlene-1mg/mL) durante 12 h. Decorrido o tempo de incubação foram submetidas a 3 lavagens de 5 min e incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (Chemicon, USA, 1mg/mL), na proporção de 1:1000 durante 1 h em temperatura ambiente. A revelação da reação foi realizada com DAB a 0,5% diluída em Tris HCL 50mM pH 7,4 e 1% de peróxido de hidrogênio.

3.7- RT-PCR

3.7.1 - Extração de RNA e obtenção do cDNA

Utilizou-se pelo menos três animais no dg 9 normal e nos períodos de 1, 6 e 12 h após a lesão embrionária. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os cornos uterinos removidos foram mantidos em meio HANKS. Os sítios de desenvolvimento embrionário individualizados eram dissecados com ajuda de bisturis para a obtenção dos fragmentos teciduais correspondentes à região mesometrial.

De cada animal foram coletados 3 fragmentos da região mesometrial dos sítios de implantação embrionária e macerados com 750 uL do reagente TRIZOL (Invitrogen) em homogeneizador rotativo (Glas-Col) por 15 seg em baixa rotação. Para dissociação completa dos complexos nucleoproteicos, as amostras permaneceram neste reagente por 5 min em temperatura ambiente. Adicionou-se 200 uL de clorofórmio (J.T. Baker) e as amostras foram homogeneizadas em vortex durante 30 seg e mantidos em repouso por 3 min à temperatura ambiente. Após centrifugação a 12000 g por 15 min a 4º.C, a fase aquosa foi transferida para outro mL de tubo eppendorf. Adicionou-se 0,5 álcool isopropílico е após homogeneização, a amostra permaneceu em repouso overnight a -20º.C. Após nova centrifugação a 12000 g por 10 min a 4ºC, e remoção do sobrenadante, o sedimento foi lavado següencialmente por centrifugação a 7500 g a 4ºC, 10 min com 1 mL de álcool etílico 70% a 4ºC e álcool 100%.

O sedimento foi solubilizado em 70 uL de água DEPC e quantificado em espectofômetro (NanoDrop-100 Spectrophotometer, USA) através da relação da densidade óptica nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. A concentração de RNA foi ajustada a 2µg/µL em água DEPC.

Para verificação da integridade do RNA, utilizou-se 2,0µL de solução de RNAtotal, 3,0µL de MOPS (10x), 5,0µL de formaldeído (Sigma), 12,5µL de formamida (Sigma), 2,5µL de brometo de etídeo (EtBr) acrescido de tampão de corrida, incubada por 10 min a 65°C seguida da incubação por 2 min a 0-4°C. Esta solução foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% (LGC Biotecnologia – Biologia Molecular/ Grupo Ciambarella) em 41,5mL DEPC, 5mL MOPS 10% e 3,5 mL de formaldeído. A partir do RNA total foram obtidos os cDNAs utilizando-se o kit SuperScript II (Invitrogen,Carlsbad, CA) conforme instruções do fabricante.

Foram utilizadas amostras de cDNA preparadas a partir de mRNA obtidos de células uNK isoladas de camundongos prenhes no dg 9, gentilmente cedidas por Karina Y.Degaki (lab.Citoquímica e Imunocitoquímica, DHE, IB, UNICAMP) para avaliação da expressão dos transcritos das isoformas da HSP72 e HSP73, pelo RT-PCR em iguais condições adotadas para os homogenados do MLAp.

3.7.2- Testes de Otimização do RT-PCR

Foi utilizado o banco de dados Ensembl para obter as següências dos genes HSP do genoma de camundongo e a partir do gene completo, procurou-se a região desenhar PRIMER codificante para 0 primer com 0 programa 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3 www.cgi). Para confirmar а especificidade dos *primers* foram realizadas consultas no NCBI Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/index.shtml) e confeccionados pela Imprint (USA) conforme as sequências as sequir:

HSP-72 com 322pb

sense (5'CGCCTACTTCAACGACTCTCA3')
anti-sense (5'GCTGATGTCCTTCTTGTGCT3');

HSP-73 com 554 pb

sense (5'CGGAAAGACCGTTACCAAC3')

anti-sense (5'CCTTCTCTACAGGGTCCAG3')

Ciclofilina com 660 pb,

sense (5'CTTGCTGCAGACATGGTC3') anti-sense (5'GCAATCCTGCTAGACTTG3')

A partir dos dados fornecidos pelo fabricante de cada *primer* confeccionado, testaram-se as temperaturas ideais e o número ideal de ciclos para cada conjunto de cDNA/*primer* a partir da curva de saturação utilizando-se Kit de Taq polimerase (Invitrogen, Carlbad, CA), estabelecendo-se os ciclos correspondentes a 75% do valor arbitrário do platô. Para determinar o número ideal de ciclos foram realizadas 16 reações de PCR para cada gene de interesse, sendo que 8 amostras eram de animais controles e 8 de animais tratados. A partir do ciclo 18, incluindo este, retirou-se um tubo a cada 3 ciclos até o ciclo de número 39. As amostras foram analisadas em eletroforese de gel de agarose e através da densitometria das respectivas bandas gerou-se a curva de saturação e determinou-se o número de

ciclos para as análises comparativas de cada gene.Para a captura de imagem digital da banda e a análise densitométrica utilizou-se o foto documentador Image Master VDS (Pharmacia Biotech) e o programa Image Master VDS (Pharmacia Biotech), respectivamente.

3.7.3- RT-PCR semi-quantitativo para HSP 72 e 73

A Taq-DNA polimerase, para RT-PCR, foi preparada de acordo com o protocolo do Kit Taq-DNA polimerase (Invitrogen), no termociclador (GeneAmp PCR System 9700 – Applied Biosystems). Para um volume final de 10µL foram utilizados 5,0µL de água ultra pura autoclavada,1,0µL 10X PCR Buffer minus Mg, 0,26µL (1,5uM) da solução de 50mM MgCl₂, 0,8µL da solução de dNTP (1,2mM), 0,1µL de Taq-polimerase, 2,0µL amostras do cDNA e 0,5µL (15pmol) de cada *primer* sense e antisense.

A amplificação do cDNA escolhido foi realizada no termociclador. A denaturação inicial foi realizada a 94°C por 2 min, em seguida iniciaram-se os ciclos de amplificação para cada gene alvo: desnaturação a 94°C por 45 seg, o anelamento foi feito em temperatura especifica de cada *primer* utilizado (TM) por 45 seg, a extensão da fita de DNA complementar ocorreu a 72°C por 1 min, extensão final foi realizada a 72°C por 5 min e as amostras foram mantidas a 4°C. As amostras do cDNA amplificados foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. Nas alíquotas de 3µL obtidas do produto de amplificação .para cada gene alvo adicionou-se 0,5µL de *Loading buffer* e foram aplicadas no gel a 1% agarose em 1xTAE acrescido de 1,5µL EtBr. As corridas foram realizadas no aparelho de eletroforese (Biorad Laboratories) a 75 volts. Utilizou-se 6µL marcador λ -Hind III (1mg/12µL) ou 2µL de TrackI100bp DNA Ladder (Invitrogen, USA) como referência. O gel foi foto documentado e a densitometria das bandas foi calculada utilizando o programa Image Master VDS (Pharmacia Biotech), tendo como controle interno a ciclofilina.

4- RESULTADOS

4.1- Distribuição das células uNK no útero gestante normal e pós-lesão embrionária

4.1.1- Animais em gestação normal

A reação citoquímica com lectina DBA permitiu a detecção de células uNK a partir do dg 6, e a sua distribuição ao longo do período de gestação na região do endométrio mesometrial. A incidência das células uNK aumenta rapidamente no decorrer da gestação, com a presença dos subtipos maduros (III e IV) a partir do 8º dg nas áreas do endométrio próximo ao embrião em desenvolvimento, enquanto os subtipos I e II estão localizados predominantemente em áreas da região mesometrial próximo ao miométrio. A partir do dg 12 ocorre uma redução substancial das células uNK do subtipo I e II, com predomínio dos subtipos III e IV e esta tendência acentua-se no períodos finais da gestação. No dg 15, com o crescimento da placenta fetal e redução da área da endométrio mesometrial, verificou-se a redução significativa da incidência das células uNK com visível predomínio do subtipo IV. Estas observações coincidem com aquela descrita previamente por Paffaro Jr e colaboradores (2003).

4.1.2. Animais submetidos à lesão cirúrgica do embrião

Nos sítios de desenvolvimento embrionário submetidos à lesão cirúrgica do embrião no dg 9, verificou-se colapso do embrião lesado com a perda da continuidade da membrana amniótica e infiltração de células sanguíneas no espaço do saco vitelino, acompanhado da desorganização dos tecidos embrionários. Foram constatadas ainda áreas com células sanguíneas extravasadas em meio ao estroma endometrial da região mesometrial. Pela reação com a lectina DBA, foram identificadas células uNK cuja morfologia era compatível com aquelas encontradas nos sítios de desenvolvimento gestacional normal, ao lado de outras, que

apresentavam alterações no padrão de reatividade à lectina DBA, que variavam de acordo com o período de lesão embrionária. Os padrões de alterações mais comuns encontrados nestes sítios de lesão embrionária nos períodos analisados foram agrupadas nas 3 categorias descritas anteriormente por Copi, (2005), como segue:

 Categoria I: células uNK apresentando marcação descontínua na superfície celular pela lectina DBA e ausência de marcação no citoplasma ou nos grânulos;

 Categoria II: células uNK apresentando marcação na superfície celular descontínua e conteúdo granular positivos;

-Categoria III: células uNK apresentando reação positiva à lectina DBA na superfície celular e parcialmente reativa nos grânulos citoplasmáticos

4.2- Expressão das isoformas HSP72/73 na interface materno-fetal

4.2.1- Imunoperoxidase e imunofluorescência

A reação imunocitoquímica com anti-HSP72/73 revelados com peroxidase, demonstraram marcações positivas intensas predominantemente nas células uNK (figs. 6a -f) presentes na região do MLAP ao longo dos períodos de gestações analisados e, de forma menos intensa e menos regular em outras células do estroma endometrial decidualizado e não decidualizado. As reações nas células uNK estavam localizadas no citoplasma dos 4 subtipos de maturação. A dupla marcação com lectina DBA e anti-HSP72/73 confirma a predominância da expressão destas isoformas de HSP70 nas células uNK (fig: 6g). O padrão de reação para HSP70 observados pela imunofluorescência, com dupla marcação com a lectina DBA mostrou grande parte das células uNK-HSP positivas, nas quais as marcações apresentavam aspecto granuloso ou pontual (fig.6h), freqüentemente concentradas numa determinada área do citoplasma.

Nos animais no dg 9 submetidos à lesão embrionária foram encontradas células uNK com marcações positivas em todos os períodos pós-lesão (figs 7 a-d), porém ocorreram diferenças na intensidade e freqüência de marcação nos subtipos de uNK. Na reação de imunoperoxidase, constatou-se que a intensidade da reação para HSP70 diminuía no interior das células, assim como, o número de células uNK-HSP positivas. Esta redução da intensidade de reação era perceptível já no período de 1 hora pós lesão, afetando a maioria das células uNK, sendo mais notória nas uNK dos subtipos III e IV, enquanto os subtipos mais imaturos mantinham reações positivas no seu citoplasma (figs 7a,b). Nos períodos mais tardio de 6 e 12 h pós-lesão, a redução na intensidade tornava-se mais evidente, com a maioria das células uNK apresentando ausência ou fraca reação no citoplasma (figs 7c, d). Pela imunofluorescência, com a dupla marcação lectina DBA e anti-HSP70 foram constatadas diferenças nas reações para as células uNK dos subtipos maduros (III) e senescentes (IV) que apresentaram redução na marcação dos grânulos citoplasmáticos com a lectina DBA e alterações aparentes na intensidade de reação HSP (fig 8a). A redução da reatividade com anti-HSP70 ficou mais evidente com 6 (fig 8b) e 12 h de pós lesão.

Os subtipos III e IV mostraram considerável redução de HSP 70 (fig 8c), sendo freqüentes células totalmente negativas nas amostras de 6 hora pós-lesão (fig 8d), enquanto as do subtipo I e II mantiveram uma maior intensidade de reação. Nos períodos de 6 e 12 h pós-lesão verificou-se declínio substancial na intensidade de marcação para HSP70 das células uNK localizadas no endométrio próximo ao embrião (figs. 8e-f), porém, aquelas presentes no endométrio próximo ao miométrio, onde se concentram as células uNK dos subtipos II e I mantinham reações positivas para lectina DBA e para HSP70.

4.2.2-Quantificação das células uNK-HSP 72/73 positivas.

As quantificações foram realizadas a partir de imagens digitalizadas de cortes submetidos à dupla marcação com lectina DBA e anti-HSP72/73 e o núcleo

marcado com DAPI (fig 8g). Foram inicialmente contabilizados o número total de núcleos no campo de 5,5mm² e em seguida quantificadas as células lectina DBA positivas e destas as anti-HSP72/73 positivas. Foram contabilizadas como células uNK somente aquelas que apresentavam reação DBA positiva e com o núcleo evidente. Nos casos em que não houve a perda total da imunomarcação para anti-HSP72/73, ou seja, apenas aconteceu a redução da intensidade de reação, a célula foi considerada como positiva. Da mesma maneira, foram incluídas na quantificação as células uNK enquanto possíveis de serem identificadas naquelas que apresentaram redução da marcação com lectina DBA na presentes nas amostras de lesão embrionária.

As médias dos números absolutos de 45 campos e os valores relativos desta quantificação estão apresentadas na tabela 1 e no histograma representando os valores relativos. Os valores encontrados demonstram que no útero gestante normal 14,5% das células são uNK-DBA positivas, das quais 20% apresentam reação positiva para HSP72/73. Após 1 hora da lesão embrionária, verificou-se a redução tanto na proporção de células uNK-DBA positivas, quanto uNK-HSP 72/73 positivas. Esta tendência de redução acentuou-se significativamente após 6 e 12 h em relação ao controle.

Tabela 1 – Densidade das células uNK DBA positivas e HSP72/73 positivas presentes na região mesometrial do útero de camundongos no dg 9 normal e pós-lesão embrionária

	Células totais	uNK DBA positivas		uNK-DBA-HSP positivas	
dg 9	Nºabsoluto*	Nºabsoluto*	Relativo**	Nºabsoluto*	Relativo***
Normal	470,5±59,8	65,86±22,6	13,9	15,2±4,8	23,1
1h pós-lesão	501,2±72,6	49,2± 11,7	9,8	12,7±2,5	25,9
6h pós-lesão	603 ±63,2	48,4±17,4	8,0	4,2± 2,31	8,6
12h pós-lesão	506,4±12,3	14,9±1	2,9	2,1 ±1,2	14,29

(*) - média do número de células com núcleos DAPI positivas, células uNK-DBA e HSP72/73 positivas obtidas da quantificação de 45 campos de cortes histológicos de três sítios embrionários de três animais.

(**) - valores relativos da média das células uNK lectina DBA positivas em relação ao número total de núcleos do endométrio

(***) - valores relativos das células HSP72/73 positivas em relação às células uNK DBA positivas.



Gráfico 1: Histograma mostrando a proporção relativa em percentagem de células uNK lectina DBA positivas e anti-HSP72/73 positivas. (N) animais normais no dg 9, (1h, 6h e 12h) 1 hora, 6 h e 12 h pós-lesão cirúrgica do embrião, respectivamente. (x: número relativo das células marcadas; y período de lesão embrionária- 1-normal; 2-1 hora pós-lesão; 3- 6 h; 4-12 h.

4.2.3 - Imunomicroscopia eletrônica para anti-HSP72/73

A imunomicroscopia eletrônica com anti-HSP72/73 demonstrou maior concentração de marcação nas mitocôndrias das células uNK (fig 9a) e esparsas distribuições de partículas de ouro no citoplasma. Nos diferentes períodos de póslesão embrionária verificaram-se menor incidência de marcações nas mitocôndrias (fig 9b), assim como no citoplasma das células uNK íntegras.

4.2.4 Western Blotting

O "Western-blot" realizado nos homogeneizados teciduais obtidos do MLAP de sítios uterinos do dg 9 normal e pós-lesão embrionária nos períodos de 1, 6 e 12 h com anticorpo anti-HSP72/73, revelaram uma banda conspícua correspondente a 72 KDa e uma tênue de 73 KDa (fig 10). Embora não quantificado, a banda correspondente a 72 kDa apresentou padrão semelhante entre o homogeneizado obtido do animal de gestação normal e pós-lesão. Porém a banda correspondente a 73KDa tende a diminuir de intensidade nos períodos de 6 e 12hs pós-lesão embrionária. Este dado foi possível de ser demonstrado devido a padronização dos parâmetros de corrida eletroforética, estendendo o tempo de corrida eletroforética no SDS-PAGE para 78 min.

4.2.5- Expressão dos transcritos das isoformas HSP72 e HSP73.

Os teste para estabelecer as temperaturas de anelamento ideal de cada um dos *primers* demonstraram que as temperaturas de 56°C e 58°C eram adequados para a amplificação, não demonstrando formações de bandas inespecíficas e/ou dímeros a 56°C, padronizou-se esta temperatura de anelamento 56°C para os dois primers no ensaio de RT-PCR.

Os testes para otimização do número de ciclos para RT-PCR semiquantitativo com os *primers* de HSP72 e HSP73 foi de 23 e 25 respectivamente. Estas condições adotadas inicialmente para a amplificação do cDNA obtidos de células uNK isoladas demonstraram as expressões dos transcritos de HSP72 (322 pb) e HSP73 (554pb) nestas células (fig 11). Estas condições foram aplicadas para amplificação dos cDNA obtidos de amostras das glândulas metriais dos animais controle no 9º dg e dos grupos experimentais de 1, 6 e 12 hora pós-lesão mecânica do embrião. O controle interno utilizado foi a ciclofilina. A quantificação por densitometria óptica dos cDNAs amplificados nos cDNA obtidos das glândulas metriais normais e submetidas ao tratamento de lesão (fig 12 e 13) não apresentaram diferenças significativas entre as amostras.

4.3- Proliferação e Morte Celular das células uNK em gestação normal e submetida à lesão cirúrgica do embrião

As análises das reações de TUNEL e imunocitoquímicas com anti-PCNA (figs 14 a-h) demonstraram que a grande maioria das células uNK-lectina DBA positivas presentes na região mesometrial no útero do 9º dg apresentam núcleo marcadas positivamente para o PCNA (figs a, c) e TUNEL negativas (figs b,d). Nos períodos pós-lesão embrionária as células uNK com núcleo PCNA positivas era notadamente menor nos períodos de 6 e 12 horas, enquanto acentuava as células com núcleo TUNEL positivas. A marcação positiva com o anti-PCNA permanecia em algumas células uNK menos diferenciadas (subtipos I e II) mesmo nos períodos pós-lesão de 6 e 12 horas (figs e-h). No período de 1 hora pós-lesão não foram detectadas diferenças na intensidade ou proporção de células uNK TUNEL ou PCNA positivas (dados não ilustrados) em relação ao dos animais de gestação normal.

5- DISCUSSÃO

As reações imunocitoquímicas realizadas nos sítios de implantação e desenvolvimento embrionário no útero de camundongos do dg 6 ao 17 revelaram reatividade positiva pelo anti-HSP70 nas células uNK de camundongos nos períodos gestacionais analisados, demonstrando a expressão da HSP70 de forma constante nestas células ao longo da gestação. A constatação da expressão tanto dos transcritos pelo RT-PCR quanto da imunolocalização das isoformas HSP72 e 73 nas células uNK é um dado inédito, não tendo sido descrita ainda para as células NK, assim como para outros leucócitos efetores presentes nos tecidos durante as suas atuações na resposta imune inata. As exceções são limitadas para linhagens de macrófagos (U937) e de linfócitos (JURKAT) mantidas em cultivo, nas quais foi detectada a expressão da HSP 70 (Li *et al.*, 2000;Saleh *et al.*, 2000).

De acordo com as descrições do fabricante quanto à especificidade do anticorpo anti-HSP70 utilizado nestas reações imunocitoquímicas, este anticorpo reconhece isoformas HSP73 e HSP72, formas constitutivas e induzidas, respectivamente, as quais atuam como chaperonas. O RT-PCR destas isoformas de HSP70 realizadas a partir do RNA mensageiro obtidos das células uNK isoladas comprovam a expressão dos genes das isoformas HSP 72 e 73 da família de proteínas de choque térmico (HSP-70).

As proteínas de choque térmico, também conhecidas como chaperonas, são altamente conservadas evolutivamente, já que podem ser rapidamente produzidas pelas células em resposta a uma adversidade ou condições de estresse (Lindquist *et al.*, 1980; Itoh *et al.*, 1991), exercendo papel essencial nas funções de sobrevivência celular (Morimoto *et al.*, 1994; Mosser *et al.*, 2000). São, portanto, fortes candidatas a participarem dos mecanismos de sobrevivência celular, podendo também ser expressas constitutivamente em determinados tecidos susceptíveis a injúrias, como o rim (Boujelben *et al.*, 2006), desempenhando assim um papel citoprotetor mais eficiente. O papel protetor de HSP70 tem sido atribuído nas células intestinais contra oxidantes e outros agentes estressantes (Musch *et al.*, 1996; Wischmeyer *et al.*, 1997, Whittall *et al.*, 2006).

Tais mecanismos podem ser igualmente atuantes na dinâmica do ambiente uterino gestante. Este ambiente é um local em contínua remodelação e transformação, que exige das células ali presentes a capacidade de responder rapidamente aos estímulos locais, seja através da mobilização dos seus componentes intracelulares pré-existentes, ou através da ativação da biosíntese de novos, levando a uma mudança morfológica e funcional do órgão (Lead *et al.,* 2007). Se de um lado estas modificações são necessárias e ainda mais intensas para manutenção da prenhez, por outro lado, é também uma condição crítica. Isto porque a produção local de variadas citocinas e metabólitos pode culminar em uma resposta imunológica anormal (Lead *et al.,* 2007), considerando o afluxo e acúmulo transitório em grandes proporções das células uNK, um linfócito efetor da resposta imune inata.

A importância do influxo das células uNK no útero gestante foi demonstrada experimentalmente em camundongos (Croy et al., 2006). Estes autores verificaram que a ausência de tais células está relacionada com o não desenvolvimento do MLAp, com a imaturidade das células deciduais, com a presença de intenso edema entre as células deciduais e com a morfologia anormal das artérias maternas que alimentam a placenta. O afluxo destes linfócitos na gestação é acompanhado da produção de moléculas inflamatórias, tais como IFN γ e TNF- α (Croy *et al.*, 1991). Estas características reunidas em outro local seriam definidas como de reação inflamatória. Porém, não é o que se constata no ambiente uterino considerando que a expressão de IFN-y e IL-18 (citocinas pró-inflamatórias) pelas células uNK está relacionada com a regulação positiva da produção de VEGF e com a limitação da proliferação das células musculares lisas dos vasos (Rzucidlo et al., 1999; Tenger et al., 2005). Igualmente, outros componentes das uNK, como a isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) (Burnett et al., 2000) e a-2-macroglobulinas (He et al., 2005) contribuem para o remodelamento vascular e regulação da invasão do trofoblasto (Croy et al., 2006), eventos estes necessários para o adequado desenvolvimento da gestação e diretamente relacionados ao influxo das células uNK neste ambiente.

Em outros tecidos, as células Natural Killer se comportam como sentinelas do sistema imune, respondendo primariamente à presença de agentes infecciosos. Estas células, sendo linfócitos citotóxicos reconhecem e lisam células tumorais e infectadas por vírus (Trichieri, 1989; Moretta et al., 2002). São células derivadas da medula óssea e circulam no sangue até serem ativadas por citocinas e substâncias quimiotáticas que as recrutam para o tecido injuriado (Moretta, 2002; Zitvogel, 2002; Cooper, 2002), portanto pode-se dizer que são células transitórias. A presença transitória das células uNK durante a gestação, porém sendo residentes compulsórias no ambiente uterino, faz como que estas células desempenhem uma função não relacionada à resposta imune inata, o que constitui um dos paradoxos da imunologia da reprodução.

A hipóxia é condição intrínseca à gestação, enquanto na maioria dos tecidos, a hipóxia é uma conseqüência da reação inflamatória, podendo causar apoptose ou necrose celular, levando a degeneração do tecido em questão. Esta hipóxia na interface materno-fetal do útero é crucial para o adequado desenvolvimento da gestação (Raleigh *et al.*, 1998, Lee *et al.*, 2001; Webster *et al.*, 2006, 2007).

Mudanças de concentrações de oxigênio e a hipóxia do microambiente uterino gestante pode ser um dos fatores que induzem a produção de óxido nítrico (NO) (Fantel *et al.*, 1998, Kiang *et al.*, 2002). O NO é um radical livre que em concentrações adequadas é benéfico, estimulando a angiogênese (Croy *et al.*, 2006) relaxamento de vasos sanguíneos (Ignarro *et al.*, 1987), transdução de neurotransmissores (Knowles *et al.*, 1989) e defesa contra patógenos microbianos (Liew & Cox, 1991). Porém, o NO pode ser deletério quando produzido em excesso (Touyz., 2004) e as células presentes nesta interface necessitam de mecanismos específicos que assegurem a sua sobrevida nestas condições.

O estresse oxidativo infringe uma toxicidade resultante da geração de espécies de oxigênio reativo, e também do NO, que contribui para o estado de imunossupressão, pela inibição das funções das células NK e outros linfócitos, inibindo a secreção de citocinas (Kono *et al.* 1996). As células uNK expressam constitutivamente as três isoformas (iNOS, eNOS e nNOS) de óxido nítrico sintase

(Lippe, 2007) envolvidos na produção do óxido nítrico (NO), que em situação de estresse induzido pela lesão embrionária pode ser exacerbado (Lippe, 2007). Desta forma as células uNK protagonizam diretamente o estresse oxidativo do útero gestante, o que exigiria para sí, um mecanismo de proteção intracelular apropriado para a manutenção da sua sobrevida neste ambiente.

Relatos sobre interações entre NO e produção de HSPs demonstraram que o aumento na produção de NO resultou na elevação da expressão de HSP70 em células musculares (Xu *et al.,* 1997), e que este aumento é mediado pela ativação do fator de choque térmico 1 (HSF1). Uma vez solúvel, o NO pode ter ação citoprotetora (pró-vida) ou citopática (pró-morte) dependendo da interação estabelecida entre HSPs e NOS. Kiang e colaboradores (2002) constataram que a inibição na produção de NO por inibidores de NOS pode reduzir a injúria de intestino de rato causada por isquemia. Porém células tratadas com tais inibidores bloqueiam a produção de HSP70 induzida (HSP70i) e são mais vulneráveis do que células que possuem HSP70i constitutivamente, as quais possuem maior citoproteção contra injúrias (Kiang *et al.,* 2001).

O presente estudo utilizou o modelo de anomalia de gestação induzida pela lesão embrionária para avaliar as possíveis alterações na expressão das isoformas de HSP72 e 73. O ambiente de anomalia na gestação decorrente da lesão cirúrgica do embrião consiste em uma situação de estresse agudo e intenso na interface materno-fetal do útero gestante. Este procedimento foi adotado anteriormente por Roman (2001) e posteriormente pela Copi (2006). Estes autores relataram diversas alterações nos componentes celulares da interface materno-fetal. Dentre as alterações, eram notórias a ocorrência de hiperemia que evoluía para hemorragia com o avanço do período pós-lesão e alterações no padrão de reatividade das células uNK frente à citoquímica com a lectina DBA. Roman (2001) sugeriu que a hiperemia e hemorragia verificada na região mesometrial não seria decorrente do trauma mecânico da própria lesão, mas sim de uma resposta secundária da lesão embrionária, com o possível envolvimento das células uNK que aparentavam perda de conteúdos dos seus grânulos citolíticos.

Os resultados do presente experimento utilizando o modelo de lesão cirúrgica dos embriões detectaram as alterações nos padrões de reatividade e morfologia das células uNK através da citoquímica com a lectina DBA às semelhanças dos relatos da Roman (2001) e nos aspectos ultraestrururais descritos pela Copi (2006). Dentre as nossas observações, as alterações mais evidentes estavam relacionadas com a perda de reatividade à lectina DBA na superfície celular caracterizando marcação descontínua na superfície e no conteúdo dos grânulos citolíticos. A redução ou ausência de marcação nos grânulos lisosomo-secretores decorre da liberação do conteúdo destes pelas células uNK em resposta à alteração da homeostasia do ambiente uterino gestante submetido à lesão embrionária (Copi, 2006). Tais evidências sugerem a resposta das células uNK com possível desencadeamento da ação citotóxica destas células junto aos diversos tecidos da interface materno-fetal, afetando sobremaneira a homeostasia deste microambiente uterino. Cumprem salientar as alterações observadas nas mitocôndrias das células uNK presentes nos sítios pós-lesão que apresentavam as membranas internas distribuídas irregularmente, ou na maioria das vezes, pouco evidentes, sugerindo a sua ruptura e degeneração.

Pela quantificação realizada com os cortes submetidos à dupla marcação com anti-HSP72/73 e a lectina DBA, foram constatadas reduções significativas no número de células uNK-HSP positivas nos sítios submetidos à lesão embrionária após 6 h, assim como, nas intensidades das reações com anti-HSP72/73 no citoplasma das células uNK. Os resultados do "Western-blotting" igualmente evidenciam a expressão de duas bandas reativas correspondentes a 72 e 73 kDa nos homogeneizados teciduais do MLAp na gestação normal. Embora não quantificado, é evidente a redução da intensidade da banda correspondente a 73 kDa nos sítios pós-lesão embrionária de 6 e 12 h, sugerindo ser esta a isoforma afetada.

Por outro lado, a avaliação da expressão dos transcritos das HSP 72 e 73 realizadas nos RNA isolados de homogeneizados teciduais do útero gestante normal confirmou as expressões das isoformas HSP 72 e 73, porém, não foram

constatadas variações significativas nas amostras de pós-lesão avaliadas pelo RT-PCR semi-quantitativo. Estes dados sugerem, em princípio, que não há variações na mobilização desta via celular como mecanismo de proteção ao estresse induzido pela lesão embrionária no ambiente uterino. Por outro lado, cabe lembrar que, a expressão dos transcritos não reflete necessariamente a expressão protéica das referidas isoformas da HSP70, assim como, deve ser ressaltado o fato do RNA ser obtido do homogeneizado total do MLAp como um todo, e não apenas das células uNK.

Vários fatores podem estar envolvidos nesta redução de reatividade com anti-HSP 72/73 nas células uNK encontrado nas reações imunocitoquímicas dos sitos uterino pós-lesão embrionária. De acordo com Roman (2001), após 24 h do período pós-lesão, ocorre uma visível degeneração do tecido endometrial, inclusive a ruptura das células uNK. Em nossas observações, a quantidade tanto de células uNK DBA positivas quanto de uNK HSP72/73 positivas decrescem drasticamente após 12 h da lesão embrionária, sugerindo uma correlação direta entre estas HSPs e a viabilidade das células uNK. É plausível supor que a supressão da HSP nas células uNK possa desencadear um progressivo comprometimento destas células, induzindo a sua degeneração ou acelerando a sua senescência.

As células uNK produzem citocinas que atuam como moduladores da resposta imune, com ações peculiares na gestação (Schafer-Somi *et al.*, 2003). O fator de necrose tumoral α (TNF- α) é uma destas citocinas do tipo pró-inflamatória que pode ser produzida por diferentes tipos celulares, destacando-se macrófagos ativados, linfócitos, além das próprias células uNK (Ashkar *et al.*, 2000), podendo induzir a apoptose via FasL (CD95), um receptor de superfície associado ao receptor de TNF- α (TNFR) que pode induzir a apoptose através da ligação com o sistema Fas presente na célula alvo (Jersak *et al.*, 2002).

De acordo com (Kusakabe *et al.*, 2005), as células uNK expressam o sistema Fas/ FasL e as células NK circulantes expressam receptores do TNF (Naume *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 2007), sugerindo que estas células podem ser igualmente suscetíveis aos efeitos do FasL e do TNF presentes no ambiente uterino, podendo

induzir ou acelerar a sua morte celular por apoptose. Contudo, na cascata de sinalização que culmina na apoptose, existem mecanismos de bloqueio ou de proteção que evitam a apoptose, ressaltando-se a chaperona HSP70 que pode intervir inibindo pontos chaves da via de ativação da proteína c-Jun N-terminal quinase 1 (*JNK1*) dependente de *Bid* (Park *et al.*, 2001). Os resultados da imunomicroscopia eletrônica realizados no presente trabalho demonstram uma localização conspícua da molécula HSP72/73, distribuída de forma predominante na mitocôndria das células uNK na gestação normal. Esta marcação mitocondrial era reduzida ou totalmente negativa nas células uNK dos sítios uterinos pós-lesão embrionária. Este resultado juntamente com os da quantificação que demonstram a gradual redução de células uNK-HSP72/73 positivos a partir de 1 hora pós-lesão, que se acentuam nos períodos de 6 e 12 horas, sugerem o envolvimento direto das isoformas HSP72 e 73 presentes na mitocôndria com a sobrevida das células uNK frente a situações de estresse induzido pela lesão embrionária

Mitocôndrias são organelas que desempenham um papel central na morte celular por apoptose ou necrose celular. Isto porque, alterações que afetam a respiração mitocondrial, a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), mudanças no potencial de membrana mitocondrial e a liberação de moléculas regulatórias e sinalizadoras derivadas do espaço intermembranas podem desencadear a morte celular (He *et al.*, 2003). Danos na membrana mitocondrial causam a liberação de proteínas apoptóticas, incluindo citocromo c e o Fator Indutor de Apoptose (AIF), que ativam vias caspases dependentes ou independentes que promovem a morte celular por apoptose e a redução precoce da liberação do citocromo c mitocondrial está relacionada com a super expressão de HSP70 (Tsuchiya *et al.*,2003).

A HSP70 inibe a ativação da caspase 3, podendo afetar a via JUN-Kinase e a ativação de p38 quinase (Mosser *et al.*, 1997). HSP70 liga-se e modula a função de *Bag-1*, a proteína *bcl-2* (McLaughlin *et al.*, 2003), controlando a morte celular por apoptose. Em células epiteliais, a HSP72 reduz comprovadamente a injúria da membrana mitocondrial (Li *et al.*, 2002), ligando-se ao citocromo c que é

translocado para o citosol em casos de injúria (Li *et al.*, 2002) e interage com Bcl-2, uma proteína pró-apoptótica (Wang *et al.*, 1999). Nos casos de algumas injúrias celulares, como a depleção de ATP, o AIF (fator indutor de apoptose) pode escapar para o compartimento extra-mitocôndrial, mas a HSP72 pode ligar-se com AIF mitocondrial e prevenir o acúmulo de AIF nuclear, impedindo assim a condensação da cromatina periférica e a degradação do DNA (Ravagnan *et al.*, 2001). A *Bax* é uma outra proteína que forma canais específicos para a passagem do citocromo c, desencadeando as cascatas de caspases, caso haja danos mitocondriais (Jurgensmeir *et al.*, 1998). Na mitocôndria, HSP70 poderia bloquear a apoptose induzida por temperatura por dificultar a translocação e a inserção de *Bax* na membrana externa da mitocôndria, prevenindo sua permeabilização e assim a liberação do citocromo c e de AIF (Stankiewicz *et al.*, 2005).

Por conseguinte, a localização mitocondrial das HSP72/73 nas células uNK sugere que estas células possam adotar mecanismos semelhantes associadas à ação anti-apoptótica, e a redução na sua expressão estaria relacionada com a redução na função citoprotetora da HSP nas células uNK presentes no útero gestante, induzindo a morte destas células por apoptose.

Dentre os possíveis mecanismos envolvidos nesta resposta das células uNK, os relatos de Polla e colaboradores (1996) que apontam a mitocôndria como um alvo seletivo protegido contra injúrias oxidativas decorrente da presença, das proteínas da família HSP70, corroboram com a hipótese desta função da HSP72/73 presente na mitocôndria das células uNK. O excesso de radicais livres produzidos pelo estresse oxidativo induz muitas alterações nas células, a mitocôndria pode ser a primeira organela a sofrer com as ROS (Richter & Kass, 1991), envolvendo vias de ação citotóxica como pelo de TNF- α . A proteção contra a citotoxicidade de citocinas como TNF α que estimula a geração de ROS nas mitocôndrias (Hennet *et al.*, 1993), é claramente atribuída a HSP (Jaattela *et al.*, 1993) e, a redução desta chaperona nas células uNK deve afetar a sua resistência ou sobrevida ao estresse gerado no ambiente uterino gestante induzido pela lesão embrionária

Pelas análises dos resultados da reação imunocitoquímica com anti-PCNA observou-se uma alta atividade proliferativa das células uNK presentes no útero de 9º dg normal, confirmando os dados relatados anteriormente por Paffaro Jr e colaboradores (2003). Contudo, esta atividade proliferativa é drasticamente comprometida com a lesão embrionária, onde após 12 h, raras são as células uNK com núcleo PCNA positiva, demonstrando que ciclo celular destas células foi inibido. Esta supressão do ciclo celular não parece ser uma simples regulação negativa do processo de proliferação celular, mas sim do comprometimento da integridade destas células decorrente da alteração da homeostasia do ambiente frente à anomalia provocada pela lesão embrionária. De fato, a reação de TUNEL, revelou que a lesão cirúrgica do embrião provoca um progressivo aumento, dependente do período transcorrido da lesão embrionária, de células uNK que apresentam o seu núcleo marcado pela reação com TdT. A incorporação do TdT indica a presença de fragmentos de DNA, característicos de células em processo de morte celular. O aumento de células uNK TUNEL positivos no ambiente uterino pós-lesão embrionária confirma o comprometimento da integridade destas células, induzindo a sua morte decorrente da fragmentação do seu DNA. Embora não tenham sido realizadas reações concomitantes com TUNEL e anti-HSP72/73, cumpre salientar que a incidência de células uNK TUNEL positivas, coincide com a localização daquelas células uNK com redução de marcação para o anti-HSP72/73 nos períodos de pós-lesão embrionária de 6 horas.

Pelas análises qualitativas e quantitativas, a redução maior nas células uNK-HSP72/73 positivas ocorreram nas áreas do endométrio próximo ao embrião, correspondendo aos subtipos III e IV. Aquelas células imaturas do subtipo I e II presentes na área próxima ao miométrio conservavam maior proporção de células com reação positiva com o anti-HSP. Estas observações apontam as formas maduras e senescentes das células uNK como sendo mais suscetíveis, ou responsivas ao estresse induzido pela lesão embrionária, enquanto que as formas imaturas seriam mais resistentes, ou menos responsivas, ao estímulo do estresse induzido pela lesão cirúrgica do embrião.

.Por conseguinte, a expressão das moléculas de HSP70 seria um mecanismo desenvolvido pelas células uNK recrutadas para o ambiente uterino gestante, com a qual asseguram a sua sobrevida para desempenharem o seu papel crucial no decorrer da gestação normal. Neste mecanismo, o papel exercido pelas HSP70 como chaperona, envolve ainda várias outras vias na sobrevivência de diversas células tanto em estado fisiológico quanto em situações de injúrias de origem endógena ou exógena. HSP70 possui sítios de ligação que permitem participar nos processos de dobramento de proteínas recém sintetizadas, reconformação de proteínas mal conformadas ou agregadas, além de atuarem na translocação de organelas membranosas, na secreção de proteínas e controle da atividade regulatória de proteínas (BuKau et al., 2000). HSP70 pode interagir com moléculas reguladoras chaves de muitas vias de transdução de sinais que controlam a homeostase da célula, tais como, proliferação, diferenciação e morte celular (Pratt et al., 2003). Todas estas atividades parecem estar baseadas na propriedade que a HSP70 possui em interagir com segmentos de peptídeos hidrofóbicos controlados pela sua porção ATPase (Mayer et al., 2005).

Por outro lado, a HSP 70 presente no citosol das células podem estar sob formas distintas, como produto de genes diferentes. São distinguidas como: (i) a forma estresse-induzido, HSP72 (HSP70), e (ii) a forma expressa constitutivamente, HSP73 (também conhecida como *heat shock cognata*-HSC-70) (Lindquist *et al.*,1980). Além destes dois membros, na família HSP70 ressalta-se a HSP 75 (Grp75) que está presente exclusivamente nas mitocôndrias de algumas células (Craig *et al.*, 1994). Tanto a forma constitutiva como a estresse-induzido interagem com proteínas recém sintetizadas e desnaturadas e assim previnem a agregação e o dobramento errôneo de outras proteínas. Essa capacidade de estabelecer a conformação de novas proteínas (Gething, *et al.*, 1992; Nollen, *et al.*, 1999). Além disso, a HSP 70 citosólico parece facilitar a translocação de proteínas do citosol para o retículo endoplasmático, mitocôndrias e lisossomos (Sheffiel *et al.*, 1990).

Desta forma a redução de marcação das HSP72/73 nas células uNK maduras, após lesão embrionária, permite aventar também a possibilidade desta HSP ser secretada pelas células uNK, desempenhando uma função de sinalização intercelular. A forma da HSP extracelular (eHSP) é correlacionada com funções imunológicas, sendo o seu envolvimento no sistema imune inato o mais notório (Chen *et al.*, 1999; Asea *et al.*, 2000; Basu *et al.*, 2000; Campise *et al.*, 2003). Esta forma pode estar relacionada com a indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e ativação do sistema de complemento (Prohaszka *et al.*, 1999, 2002). Além disso, a eHSP é capaz de aumentar a atividade fagocitária de macrófagos (Kakimura *et al.*, 2002). Na resposta imune adaptativa, a eHSP age como molécula adjuvante estimulada por várias substâncias microbianas (Srivastava *et al.*, 2002; Binder *et al.*, 2004). Neste contexto, não se descarta a possibilidade de secreção da proteína HSP70 e a sua relação com a redução na expressão após os tratamentos com a lesão embrionária. Estas possibilidades merecem ser investigadas futuramente.

A grande variedade funcional desempenhada pelas HSPs nos diferentes tipos celulares deixa dúvidas sobre o papel destas proteínas, principalmente em se tratando das células uNK (uma célula efetora da resposta imune). Contudo, a expressão de forma constitutiva, particularmente nas mitocôndrias das células uNK, sugere fortemente o seu envolvimento como chaperona citoprotetora. Tal localização asseguraria a sobrevida e atividade das células uNK no ambiente de estresse determinado pelo útero gestante, particularmente decorrente do estresse oxidativo e das vias de sinalização afetadas pelos formas de oxigênio reativo, incluindo o NO. A HSP presente nas células uNK deve atuar de forma eficiente na proteção intracelular nestas situações, porém, a geração exacerbada de NO, como no desequilíbrio da homeostasia da interface materno-fetal decorrente da lesão embrionária, pode afetar a expressão destas moléculas citoprotetoras, conduzindo à degeneração ou senescência das células uNK.

6- CONCLUSÕES

Nossos resultados mostram que:

- As células uNK são reativas ao anticorpo anti-HSP70 ao longo da gestação;
- As células uNK expressam os genes das isoformas HSP72 e HSP73;
- A expressão protéica das isoformas HSP 72 /73 é constatada nos homogenados teciduais do MLAp de úteros em gestação normal, porém, ocorre uma redução da isoforma HSP73 nos animais submetidos à lesão embrionária;
- A imunomarcação detectada na mitocôndria das células uNK, sugere que a HSP72/73 esteja associada com um provável mecanismo de citoproteção destas células frente ao estresse intrínsico da gestação;.
- O estresse induzido pela lesão embrionária altera a homeostasia da interface materno-fetal e afeta diretamente as células uNK, levando à redução da expressão intracelular da HSP70, particularmente, da isoforma HSP73, uma chaperona com função citoprotetora;
- A lesão embrionária altera o ciclo biológico das células uNK, provocando redução ou inibição da atividade proliferativa destas células;
- A redução das expressões das isoformas de HSP 73 presentes nas células uNK nos períodos pós-lesão embrionária pode estar relacionada com o desencadeamento ou aceleração da morte das células uNK frente ao estresse agudo induzido pela lesão embrionária.
7-ILUSTRAÇÕES



Figuras 6a-h : Fotomicrografias de imunoperoxidade (a-f) com anti-HSP70 e dupla marcação lectina DBA-fluoresceína com anti-HSP70-Cy3 (g,h) da região mesometrial de sítios de desenvolvimento embrionário de camundongos, contra-corados com hematoxilina. (a) - 6ºdg mostrando a região mesometrial, com ausência de células uNK ou de células HSP72/73 positivas; (b)- 9º dg com presença de células uNK HSP72/73 positivas (setas) distribuídas no MLAp; (c) - 12º dg mostrando células reativas ao anti- HSP72/73 predominantemente nas células uNK dos subtipos III (seta) e IV (cabeça de seta) e em algumas células do estroma endometrial (*); (d) - 15º dg com as marcações positivas nos citoplasmas das células uNK dos IV (cabeça de seta) e, algumas células do estroma HSP72/73 positivas (*); (e-f) - detalhe do padrão de reatividade no citoplasma da célula uNK do subtipo IV (12ºdg) e III (17ºdg), respectivamentes. Notar as marcacões fracamente positivas também no citoplasma de algumas células do estroma endometrial (*); (g-h) – notar a distribuição predominante (setas) das células unk-DBA positivas (verde) com presença de HSP70 no citoplasma (vermelho) e raras células HSP 70 positivas no estroma endometrial (*) do útero gestante normal no 9º dg. Em detalhe, a reação com HSP70 positiva em padrão puntiforme e granular distribuída no citoplasma das células uNK.

Barras:(a,b) = 30um, (c,d)=20um, (e,f)=5um, (g,h)= 20 e 5 µm, respectivamente



Figuras 7 (a-d) : Fotomicrografias de imunoperoxidade com anti-HSP72/73 nos sítio de desenvolvimento embrionário no 9º dg submetidos à lesão embrionária e contracoradas com hematoxilina. (a,b) - 1 hora pós-lesão evidenciando a distribuição de células uNK com a redução na intensidade dos subtipos III e IV (setas) presentes no endométrio mais próximo do embrião, enquanto as dos subtipos I e II (cabeças de setas) mantêm a reação mais intensa no seu citoplasma. VS – vaso sanguíneo; (c) - 6 h pós- lesão com a grande maioria das células uNK dos subtipos II e III (setas) negativas ou marcadas fracamente; (d) - 12 h pós-lesão cirúrgica mostrando detalhe de células uNK do subtipo III (seta) apresentando citoplasma vacuolizado e fraca marcação para anti-HSP72/73. Notar uma reação fraca e difusa também nas células do estroma adjacente (*). Barras: (a,c) = 30 μ m, (b) = 20 μ m, (d) = 5 μ m.



Figuras 8 (a-f): Microscopia de fluorescência com reação citoquímica de lectina DBAbiotinada revelado com estreptoavidina-FITC (verde) e imunocitoquímica com anti-HSP72/73 revelado com anticorpo secundário conjugado com Cy2 (vermelho). (a) - 9º dg 1 h pós-lesão cirúrgica do embrião mostrando a maioria das células uNK fracamente marcadas com lectina DBA e ausência ou fraca (seta) marcação para o HSP72/73; (b) - 6 h após-lesão mostrando perda de reatividade pela lectina DBA, assim como para HSP72/73 na maioria das células uNK (setas); (c)- detalhes da célula uNK 1 h pós-lesão embrionária com fraca marcação de lectina DBA e com reação positiva para HSP72/73. (d, e) - - Detalhes da célula uNK 6h pós-lesão mostrando marcação positiva (vermelho) no subtipo II e negativa para HSP no subtipo III com grânulos DBA positivas (verde) e (e) – Detalhe da célula uNKapós12 h da lesão marcação para HSP nas células do subtipo I sem grânulos DBA positivas. Notar o padrão granular puntiforme da marcação para o HSP no citoplasma; (g) – Aspecto da região mesometrial do útero no 9ºdg, com tripla marcação: lectina DBA-FITC (verde), anti HSP72/73 (vermelho) e DAPI (azul), que evidencia os núcleos, utilizada para quantificação das células uNK-DBA e -HSP positivas Barras: $(a;b)=20\mu m, (c-f)=5\mu m$



Figuras 9 (a-b): Imunomicroscopia eletrônica com anti-HSP72/73 mostrando marcações positivas com partículas de outro coloidal (7nm) sobre as mitocôndrias (setas) das células uNK presentes no MLAp do útero de camundongos no 9º dg normal e 6 h pós-lesão, respectivamente. Notar algumas partículas de outro distribuídas também no citoplasma, porém, esta incidência, assim como na mitocôndria é menor nas células uNK presentes nos sítios de embrião lesionados. Barras= 1 μ m









CICLOFILINA/HSP72 12a



13a









Figura 10: *Western blotting* com anticorpo anti-HSP72/73 realizados nos SDS-PAGE de homogenados teciduais do MLAp obtidos de animais no 9º dg normal (1) e póslesão embrionária nos períodos de 1, 6 e 12 h. Notar a presença de duas bandas, uma correspondente a isoforma HSP72, com intensidade de reação mais forte e uniforme entre as amostras e, a da isoforma HSP73 com uma marcação mais tênue na amostra normal, que tende reduzir de intensidade nas amostras de pós-lesão.

Figura 11 : RT-PCR dos genes (1) HSP72 (322pb) e (2) HSP73 (554pb) utilizando cDNA obtido de células uNK isoladas do MLAp de camundongos no 8ºdg (A). marcador Trackl 100bp DNA Ladder

Figuras 12a,b : (a) Eletroforese em gel de agarose 2% do RT-PCR do gene da Ciclofilina (660pb banda superior) e HSP72 (322pb – banda inferior) utilizando cDNA obtido do MLAp de camundongos no 9º dg normal (1 a 4) e nos períodos de 1h (5 a 7), 6h (8 a 10) e 12 h (11 e 13) pós-lesão. (A) marcador Trackl 100bp DNA Ladder (b)-Análise semi-quantitativa de HSP72 normatizado com ciclofilina como controle interno em unidades arbitrárias obtidas pela densidade óptica (IOD) das bandas amplificadas de RT-PCR em (a).

Figuras 13a,b : (a) Eletroforese em gel de agarose 2% do RT-PCR do gene HSP73 (554pb), utilizando cDNA obtidos do MLAp de camundongos no 9º dg normal (1 a 4) e nos períodos de 1 (5 a 8) , 6 (9 a 11) e 12 h (12 a 15)) pós-lesão. (A) marcador Track I 100bp DNA Ladder, (b)- Gráfico da análise semi-quantitativa de HSP73 em unidades arbitrárias obtidas pela densidade óptica (IOD) das bandas amplificadas de RT-PCR em gel de agarose em (a), normatizado com RT-PCR de ciclofilina como controle interno.



Figuras 14 (a-f): Fotomicrografias da tripla marcação com anti-PCNA revelado com Cy3 (vermelho), lectina DBA-Alexa fluor 488 (verde) observado com microscopia de fluorescência (a, c, e, q) e, reações de TÚNEL revelada com peroxidase-DAB observadas em microscopia de campo claro (b,d,f,h). (a) Sítio de desenvolvimento embrionário de 9ºdg normal demonstrando grande quantidade de células PCNA positivas, e em (b) a mesma área com ausência de células com reação TUNEL positiva. (c) detalhe das células uNK com núcleo PCNA positivas (cabeças de seta) presentes na região mesometrial do útero de 9º dg normal e em (d) detalhe da reação de TÚNEL mostrando ausência de marcação para as células uNK, porém, uma célula endotelial (seta) com marcação positiva. (e-h) Região do MLAp de sítio uterino após 6 e 12 h da lesão cirúrgica do embrião mostrando o predomínio de células uNK com núcleo PCNA negativo (e, g) e a mesma área mostrando o predomínio de núcleos com reação de TUNEL positivos (f,h) nas células uNK (setas), assim como, nas demais células do estroma endometrial. Notar que em 6 horas pós-lesão são encontradas algumas células PCNA positivas (e) e TUNEL (f) negativa (cabeça de seta), porém totalmente negativas após 12 horas da lesão embrionária. Barras: $(a,b,e,f,g,h)=40\mu m, (c,d)=20\mu m$

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLAN D.J., A. H., B.V. - The morphologic categorization of cell death induced by mild hyperthemia and comparison with death induced by ionizing radiation and cytotoxic drugs. , **Scan Electron Microsc** v.3 p.1121-1133. 1986.

2. APLIN, J. D. - Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro, **J Cell Sci** v.99, n.4, p.681-692. 1991.

3. ARNOLD-SCHILD, D., HANAU, D., SPEHNER, D., SCHMID, C., RAMMENSEE, H.-G., DE LA SALLE, H.; SCHILD, H. - Cutting Edge: Receptor-Mediated Endocytosis of Heat Shock Proteins by Professional Antigen-Presenting Cells, J Immunol, v.162, n.7, p.3757-3760. 1999.

4. ASEA, A., KRAEFT, S.-K., KURT-JONES, E. A., STEVENSON, M. A., CHEN, L. B., FINBERG, R. W., KOO, G. C.; CALDERWOOD, S. K. - HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine, **Nat Med**, v.6, n.4, p.435-442. 2000.

5. ASEA, A. R., M.; KABINGU,E.; BOCH, J.A., BARE, O.; AURON, P.E.; STEVENSON, M.A.; CALDERWOOD, S.K - Novel Signaltransduction pathway utilized by extracellular HSP70: role toll like recptor (TLR) 2 and TLR4, **J Biol Chem**, v.277, n.17 p.15028-34. 2002.

6. ASHKAR, A. A., DI SANTO, J. P.; CROY, B. A. - Interferon {gamma} Contributes to Initiation of Uterine Vascular Modification, Decidual Integrity, and Uterine Natural Killer Cell Maturation during Normal Murine Pregnancy, **J Exp Med**, v.192, n.2, p.259-270. 1999.

7. ASHKAR AA, D. S. J., CROY BA - Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy., **J Exp Med**, v.192, n.2, p.259-70. 2000.

8. BAGCHI, M. K., TSAI, S. Y., TSAI, M. J.; O'MALLEY, B. W. - Progesterone enhances target gene transcription by receptor free of heat shock proteins hsp90, hsp56, and hsp70, **Mol Cell Bio**I, v.11, n.10, p.4998-5004. 1991.

9. BARRETO, A., GONZALEZ, J. M., KABINGU, E., ASEA, A.; FIORENTINO, S. -Stress-induced release of HSC70 from human tumors, **Cellular Immunology**, v.222, p.97-104. 2003.

10. BASU, S., BINDER R.J., RAMALINGAM T., SRIVASTAVA P.K. - CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp 96, hsp90, hsp70, and calreticulin. , **Immunity** v.14, p.303-313. 2001.

11. BASU, S., BINDER, R. J., SUTO, R., ANDERSON, K. M.; SRIVASTAVA, P. K. -Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-{kappa}B pathway, **Int Immunol**, v.12, n.11, p.1539-1546. 2000.

12. BECKMANN, R. P., MIZZEN, L. E.; WELCH, W. J. - Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly, **Science** v.248, n.4957, p.850-854. 1990.

13.BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN J, MARSHALL PA, FREEMAN BA - Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci U S A** 87:1620–1624, 1990.

14. BEERE, H. M., WOLF, B. B., CAIN, K., MOSSER, D. D., MAHBOUBI, A., KUWANA, T., TAILOR, P., MORIMOTO, R. I., COHEN, G. M. GREEN, D. R. - Heatshock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome, **Nat Cell Biol**, v.2, n.8, p.469-475. 2000.

15. BINDER, R. J., BLACHERE, N. E.; SRIVASTAVA, P. K. - Heat Shock Proteinchaperoned Peptides but Not Free Peptides Introduced into the Cytosol Are Presented Efficiently by Major Histocompatibility Complex I Molecules, **J Biol Chem**, v.276, n.20, p.17163-17171. 2001.

16.BINDER, R. J., HAN, D. K., SRIVASTAVA, P. K. - CD91: a receptor for heat shock protein gp96, **Nat Immunol**, v.1, p.151–155. 2000.

17. BINDER, R. J., VATNER, R.; SRIVASTAVA, P. - The heat-shock protein receptors: some answers and more questions, **Tissue Antigens**, v.64, p.442-451. 2004.

18. BLACK, S. M., BEDOLLI, M. A., MARTINEZ, S., BRISTOW, J. D., FERRIERO, D. M.; SOIFER, S. J. - Expression of neuronal nitric oxide synthase corresponds to regions of selective vulnerability to hypoxia-ischaemia in the developing rat brain, **Neurobiol Dis**, v.2, p.145-155. 1995.

19. BOUJELBEN, M., GHORBEL F., VINCENT C., MAKNI-AYADI F., GUERMAZI F., CROUTE F., FEKI A.E. - Lipid peroxidation and HSP72/73 expression in rat following cadmium chloride administration, **Exp Toxicol Pathol**, v.57, p.437-443. 2006.

20. BROQUET, A. H., THOMAS, G., MASLIAH, J., TRUGNAN, G.; BACHELET, M. Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. **J. Biol. Chem:** M302326200 p. 2003.

21.BUKAU B., D. E. - The Hsp70 and Hsp60 cahperones machine,, **Cel**I, v.92, p.351-366. 1998.

22. BUKAU B., D. E., PFUND C. E CRAIG E. A. - Getting newly synthesized proteins into shape. , **Cell**, v.101, p.119–122. 2000.

23. BURNETT, T. G.; HUNT, J. S. - Nitric Oxide Synthase-2 and Expression of Perforin in Uterine NK Cells, **J Immunol** v.164, n.10, p.5245-5250. 2000.

24. BUZZARD, K. A., GIACCIA, A. J., KILLENDER, M.; ANDERSON, R. L. Heat Shock Protein 72 Modulates Pathways of Stress-induced Apoptosis. **J Biol Chem**. 273: 17147-17153 p. 1998.

25. CAMPISI, J. - Cancer and ageing: rival demons?, Nat Rev Cancer, v.3, n.5, p.339-349. 2003.

26. CANIGGIA I.,, WINTER, J., LYES S., POST, M. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of preeclampsia. **Placenta** 14:S25–S30, 2000

27. CARRETERO M., C. C., BELLÓN T., BOTTINO C., BIASSONI R., RODRÍGUEZ A., PÉREZ-VILLAR J.J., MORETTA L., MORETTA A., LÓPEZ-BOTET M. 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**. 27: 563-567 p. 1997.

28. CHANTAKRU, S., MILLER, C., ROACH, L. E., KUZIEL, W. A., MAEDA, N., WANG, W.-C., EVANS, S. S.; CROY, B. A. Contributions from Self-Renewal and Trafficking to the Uterine NK Cell Population of Early Pregnancy. **J Immunol**. 168: 22-28 p. 2002.

29. CHEN, W., SYLDATH, U., BELLMANN, K., BURKART, V.; KOLB, H. Human 60kDa Heat-Shock Protein: A Danger Signal to the Innate Immune System. **J** Immunol. 162: 3212-3219 p. 1999.

30. CHO, K. B., PALLISER D., GUILLEN E., WISNIEWSKI J., YOUNG R.A., CHEN J.Z., ELISEN H.N. - A proposed mechanism for the induction of cytotoxic T lymphocyte production by heat shock fusion proteins. , **Immunity**, v.12, p.263-272. 2000.

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

32. CRAIG, E., J. WEISSMANN, A. HORWICH. - Heat shock proteins and molecular chaperones: Mediators of protein conformation and turnover in the cell. , **Cell** v.78, p.365. 1994

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

34. CROY B.A.; KASSOUF, S. - Evolution of the murine metrial gland for immunological function., **JReprodImmunol**, v.14 p.51-70. 1989.

35. CROY, B. A., ALI, A. A., ROBERT, A. F., JAMES, P. D., JEANNE, M., DANIEL, C., SANDRA, J. G., MICHAEL, J. G., NORBERT, W., WERNER, M.; MARIE-JOSÉE, G. - Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy, **JReprodImmunol**, v.35, n.2, p.111-133. 1997.

36. CROY, B. A., HE, H., ESADEG, S., WEI, Q., MCCARTNEY, D., ZHANG, J., BORZYCHOWSKI, A., ASHKAR, A. A., BLACK, G. P., EVANS, S. S., CHANTAKRU, S., VAN DEN HEUVEL, M., PAFFARO VA, JR.; YAMADA, A. T. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction** 126: 149-160 p. 2003.

37. CROY B.A., VAN DEN HEUVEL M.J., BORZYCHOWSKI A.M., TAYADE, C. Uterine natural killer cells a specialized differentiation regulated by ovarian hormones, **Immunol Rev**; 214: 161-185, 2006

38. CROY, B. A. G., L.J., BROWN, M.A., GOUGH, N.M., STINCHOMB, D.T., REED, N.; WEGMENN, T.G. - Characterization of cytokine production by the metrial gland granulated metrial gland cells., **JReprod Immunol** v.19, p.149-166. 1991.

39.COOPER DJ. Albumin use declining in UK intensive care.**Crit Care Resusc**. ;3(1):7.2001

40. COPI, C., Efeito da lesão embrionária nos grânulos lisossomos-secretores das células Natual Killer uterinas de camundongos, UNICAMP, 2006.

41.DELNESTE, Y. Scavenger receptors and heat-shock protein-mediated antigen cross-presentation. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 633-635 p. 2004.

42. DITTMAR, K. D., BANACH, M., GALIGNIANA, M. D.; PRATT, W. B. The Role of DnaJ-like Proteins in Glucocorticoid Receptor·hsp90 Heterocomplex Assembly by the Reconstituted hsp90·p60·hsp70 Foldosome Complex. **J. Biol. Chem**. 273: 7358-7366 p. 1998.

43. FANTEL A.G., M. B., STAMPS L.D., TRAN T.T., PERSON R.E., - Reactive oxygen species and DNA oxidation in fetal rats tissues, **Free Radic Biol Med** 26: 419-430, 1999, v.25, p.95-103. 1998.

44. FARRUGIA, W., HO, P. W., RICE, G. E., MOSELEY, J. M., PERMEZEL, M.; WLODEK, M. E. - Parathyroid hormone-related protein(1-34) in gestational fluids and release from human gestational tissues, **J Endocrinol** v.165, n.3, p.657-662. 2000.

45. GABAI, V. L., MERIIN, A. B., MOSSER, D. D., CARON, A. W., RITS, S., SHIFRIN, V. I.; SHERMAN, M. Y. - Hsp70 Prevents Activation of Stress Kinases. A NOVEL PATHWAY OF CELLULAR THERMOTOLERANCE, **J Biol Chem**, v.272, n.29, p.18033-18037. 1997.

46. GARRIDO C., BRUNE M., DIDELO C., ZERMATI Y., SCHIMITT, E., KROEMER G., HEAT SHOCK Protein 27 and 7, **Revi Cell Cycle**, 5:22, 2592-2601. 2006

47. GAYLE D.A., L. Z., TONG C., LANDERS T., LIPTON J.W., CARVEY PM - Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and nitric oxide **Brain Res Dev Brain Res** v.133, n.1, p.27-35. 2002.

48.GERALDINE M.O´C., H., O.M., GARDINER,C.M. - Putting the natural killer cell in its place., **Rev Immunol**, v.117, p.1-10. 2005.

49. GETHING, M.-J.; SAMBROOK, J. - Protein folding in the cell, Nature, v.355, n.6355, p.33-45. 1992.

50. GUZHOVA, I., KISLYAKOVA, K., MOSKALIOVA, O., FRIDLANSKAYA, I., TYTELL, M., CHEETHAM, M.; MARGULIS, B. - In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance, **Brain Res**, v.914, p.66-73. 2001.

51.GUZHOVA I, K. K., MOSKALIOVA O, FRIDLANSKAYA I, TYTELL M, CHEETHAM M, MARGULIS B - In vitro studies show that Hsp70 can be released by glia and that exogenous Hsp70 can enhance neuronal stress tolerance., **Brain Res Dev Brain Res**, v.914, n.(1-2), p.66-73. 2001.

52. HARTL, F. U. - Molecular chaperones in cellular protein folding, **Nature**, v.381, n.6583, p.571-580. 1996.

53.HE GX, YANG WL, PEI G, ZHU YH, DU FL.- Studies on the effect of dihydromyricetin on antilipid-peroxidation., **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.** v(12):1188-90, 2003

54. HE, H., MCCARTNEY, D. J., WEI, Q., ESADEG, S., ZHANG, J., FOSTER, R. A., HAYES, M. A., TAYADE, C., VAN LEUVEN, F.; CROY, B. A. - Characterization of a Murine Alpha 2 Macroglobulin Gene Expressed in Reproductive and Cardiovascular Tissue, **Biol Reprod** v.72, n.2, p.266-275. 2005.

55. HENNET T, R. C., PETERHANS E - Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells, **Biochem J**, v.289, n.Pt 2, p.587-92. 1993.

56. HILKENS, C. M. U., SCHLAAK, J. F.; KERR, I. M. - Differential Responses to IFN-{alpha} Subtypes in Human T Cells and Dendritic Cells, **J Immunol** v.171, n.10, p.5255-5263. 2003.

57. HO-CHEN, J. K., BUSTAMANTE, J. J. e SOARES, M. J. Prolactin-Like Protein-F Subfamily of Placental Hormones/Cytokines: Responsiveness to Maternal Hypoxia. **Endocrinology** 148: 559-565 p. 2007.

58. HOFFMAN A., LEE.M.S.; BURKET M., Cessation of cell proliferation by adjustment of cell redox potencial., **J. Theor. Biol**., 211. 403-407., 2001

59. HOUCHINS, J. P., LANIER, L. L., NIEMI, E. C., PHILLIPS, J. H.; RYAN, J. C. Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C. **J Immunol**. 158: 3603-3609 p. 1997.

60. HUPPERTZ, B., KINGDOM, J., CANIGGIA, I., DESOYE, G., BLACK, S., KORR, H.; KAUFMANN, P. - Hypoxia Favours Necrotic Versus Apoptotic Shedding of Placental Syncytiotrophoblast into the Maternal Circulation, **Placenta**, v.24, n.2, p.181-190. 2003.

61. IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G.-Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.**Proc Natl Acad Sci U S A**.;84(24):9265-9.1987

62.ITOH H., T. Y. - The stress (heat shock) proteins, **J Biochem**, v. 23, p.1185–1191. 1991.

63. JÄÄTTELÄ M.- Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2., **J Immunol.** 15;151(8):4286-94, 1993

64. JAATTELA, M. - Heat shock proteins as cellular lifeguards, **Ann Med**, v.31, p.261 -271. 1999.

65. JÄÄTTELÄ M, W. D., KOKHOLM K., KALLUNKI T. EGEBLAD M. - Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases., **EMBOJ**, v.17, p.6124-6134. 1998.

66. JACOBS WB, P. R. - Evaluation and treatment of spinal metastases: anoverview, **Neurosurg Focus**, v.15, p.11(6) e 10. 2001.

67.JACQUIER-SARLIN, M. R., FULLER, K., DINH-XUAN, A. T., RICHARD, M. J.; POLLA, B. S. - Protective effects of hsp70 in inflammation, **Cell Mol Life Sci**, v.50, n.11, p.1031-1038. 1994.

68. JAUNIAUX, E., WATSON, A. L., HEMPSTOCK, J., BAO, Y.-P., SKEPPER, J. N.; BURTON, G. J. - Onset of Maternal Arterial Blood Flow and Placental Oxidative Stress : A Possible Factor in Human Early Pregnancy Failure, **Am J Pathol**, v.157, n.6, p.2111-2122. 2000.

69. JERSAK M., B. P. - Apoptosis in the trimester human placental: the role in maintain immune privilege at the maternal-fetal interface and in trophoblast remodeling, **Eur J Obst e Ginecol Reprod Biol**, v.100, p.138-142. 2002.

70. JOZA, N., SUSIN, S. A., DAUGAS, E., STANFORD, W. L., CHO, S. K., LI, C. Y. J., SASAKI, T., ELIA, A. J., CHENG, H. Y. M., RAVAGNAN, L., FERRI, K. F., ZAMZAMI, N., WAKEHAM, A., HAKEM, R., YOSHIDA, H., KONG, Y.-Y., MAK, T. W., ZUNIGA-PFLUCKER, J. C., KROEMER, G.; PENNINGER, J. M. - Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death, **Nature**, v.410, n.6828, p.549-554. 2001.

71.JÜRGENSMEIER JM, X. Z., DEVERAUX Q, ELLERBY L, BREDESEN D, REED JC - Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria, **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.9, p.4997-5002. 1998.

72. KAKIMURA, J.-I., KITAMURA, Y., TAKATA, K., UMEKI, M., SUZUKI, S., SHIBAGAKI, K., TANIGUCHI, T., NOMURA, Y., GEBICKE-HAERTER, P. J., SMITH, M. A., PERRY, G.; SHIMOHAMA, S. Microglial activation and amyloid-b clearance induced by exogenous heat-shock proteins. **FJ Express** 01-0530fje p. 2002.

73.KIANG, J. G., KIANG, S. C., JUANG, Y.-T.; TSOKOS, G. C. Nomega -nitro-Larginine inhibits inducible HSP-70 via Ca2+, PKC, and PKA in human intestinal epithelial T84 cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 282: G415-423 p. 2002

74. KING RW, Z., JEFFERIES MW - Inhibition of the replication of a hepatitis C virus-like RNA template by interferon and 3'-deoxycytidine, **Antivir Chem Chemother**, v.13, n.6, p.363-70. 2002.

75. KNOWLES RG, PALACIOS M, PALMER RM, MONCADA S.-Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci U S A**.;86(13):5159-62.1989

76.KOMAROVA E.Y., A., E.A., BULATOVA, M.M, CHEETHAM, M.E., MARGULIS, B.A., GUZHOVA, I.V - Dowstream caspases are novel targets for the antiapoptotic activity of the molecular chaperone HSP70, **Cell Stress Chaper**, v.9, n.3, p.265-275. 2004.

77. KONO K, S.-O. F., PETERSSON M, HANSSON J, MASUCCI G, WASSERMAN K, NAKAZAWA T, ANDERSON P, KIESSLING R - Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell-and natural killer cell-mediated cytotoxicity, **Eur J Immunol**, v.26, n.6, p.1308-13. 1996.

78.KOOPMAN, P. - Developmental biology: Gender benders, **Nature**, v.426, n.6964, p.241-241. 2003.

79. KUPPNER M. C., G. R., GELWER S., NÖSSNER E, OCHMANN, O., SCHARNER A., D ISSELS R. The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: Hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. **Eur J Immunol.** 31: 1602-1609 p. 2001.

80. KUSAKABE K, OTSUKI Y, KISO Y. Involvement of the fas ligand and fas system in apoptosis induction of mouse uterine natural killer cells. **J Reprod Dev.** 2005 Jun;51(3):333-40. Epub 2005

81.LAPPAS, M., PERMEZEL, M., GEORGIOU, H. M.; RICE, G. E. - Regulation of Phospholipase Isozymes by Nuclear Factor-{kappa}B in Human Gestational Tissues in Vitro, **J Clin Endocrinol Metab** v.89, n.5, p.2365-2372. 2004.

82. LEAD, R. G. e SANDRA, O. - Immunoendocrine aspects of endometrial function and implantation, **Reproduction** v.134, n.3, p.389-404. 2007.

83.LEE, X., KEITH, J. C., STUMM, N., MOUTSATSOS, I., MCCOY, J. M., CRUM, C. P., GENEST, D., CHIN, D., EHRENFELS, C., PIJNENBORG, R., ASSCHE, F. A. V.; MI, S. - Downregulation of Placental Syncytin Expression and Abnormal Protein Localization in Pre-eclampsia, **Placenta**, v.22, n.10, p.808-812. 2001.

84. LEHNER, T., WANG, Y., WHITTALL, T., MCGOWAN, E., KELLY, C. G.; SINGH, M. - Functional domains of HSP70 stimulate generation of cytokines and

chemokines, maturation of dendritic cells and adjuvanticity, **Biochem Soc Trans**, v.32, n.Pt 4, p.629-632. 2004.

85. LENNON S.V., M. S. J. A. C. T. G. - Dose-dependent induction of apoptose in human tumour cell lines by widely diverging stimuli, **Cell Prolif**, v.24, p.203-214. 1991.

86.LI P, NIJHAWAN D, BUDIHARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES, WANG X.- Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell.** 14;91(4):479-89, 1997.

87.LI, C.-Y., LEE, J.-S., KO, Y.-G., KIM, J.-I. e SEO, J.-S. - Heat Shock Protein 70 Inhibits Apoptosis Downstream of Cytochrome c Release and Upstream of Caspase-3 Activation, **J Biol Chem**, v.275, n.33, p.25665-25671. 2000.

88.LIEW FY, COX FE.- Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. **Immunol Today**;12(3):A17-21. Review. 1991.

89.LINDQUIST S., Varying patterns of protein synthesis in Drosophila during heat shock: implications for regulation, **Dev. Biol. 77: 463–479. 1980**

90.LIPPE E., M.,, Avaliação da expressão das isoformas da óxido nítrico sintase nas células da interface materno fetal na gestação normal e com lesão embrionária., Dissertação mestrado- Universidade Estadual de Capinas - UNICAMP., 2007.

91.MAYER, M.; BUKAU, B. - Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism, **Cell Mol Life Sci**, v.62, n.6, p.670-684. 2005.

92. MAYHAN, W. G. - VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway, **Am J Physiol Cell Physiol** v.276, n.5, p.C1148-1153. 1999.

93. MCLAUGHLIN, B., HARTNETT, K. A., ERHARDT, J. A., LEGOS, J. J., WHITE, R. F., BARONE, F. C.; AIZENMAN, E. - Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning, **PNAS**, v.100, n.2, p.715-720. 2003.

94. MELILLO, G., MUSSO, T., SICA, A., TAYLOR, L. S., COX, G. W.; VARESIO, L. - A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter, **J Exp Med**, v.182, n.6, p.1683-1693. 1995.

95.MENORET, A., CHANDAWARKAR, R. Y.; SRIVASTAVA, P. K. - Natural autoantibodies against heat-shock proteins hsp70 and gp96: implications for immunotherapy using heat-shock proteins, **Immunology**, v.101, n.3, p.364-370. 2000.

96. MIZZEN LA, K. A., WELCH WJ. - The two mammalian mitochondrial stress proteins, grp 75 and hsp 58, transiently interact with newly synthesized mitochondrial proteins., **Cell Regul** v.2, n.2, p.165-79. 1991.

97. MORETTA A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. **Nat Rev Immunol**; 2: 957–964, 2002

98. MORETTA A, BOTTINO C, MINGARI MC, BIASSONI R, MORETTA L. What is a natural killer cell? **Nat Immunol**; 3: 6–8, 2002.

99. MORIMOTO, R. I. - Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators, **Genes Dev**, v.12, n.24, p.3788-3796. 1998.

100.MOSSER, D. D., A. W. CARON, L. BOURGET, C. DENIS-LAROSE,; B. MASSIE - Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis, **Mol Cell Biol**, v.17, p.5317–5327. 1997.

101.MOSSER, D. D., CARON, A.W., BOURGET, C., MERIIN, A.B., SHERMAN, M.Y., MORIMOTO, R.I., MASSIE, B - The Chaperone Function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis, **MolCell Biol**, v.20, p. 7146-7159. 2000.

102.MUSCH, M. W., CIANCIO, M. J., SARGE, K.; CHANG, E. B. - Induction of heat shock protein 70 protects intestinal epithelial IEC-18 cells from oxidant and thermal injury, **Am J Physiol Cell Physiol** v.270, n.2, p.C429-436. 1996.

103.MYATT, L., ROSENFIELD, R. B., EIS, A. L. W., BROCKMAN, D. E., GREER, I.; LYALL, F. - Nitrotyrosine Residues in Placenta: Evidence of Peroxynitrite Formation and Action, **Hypertension**, v.28, n.3, p.488-493. 1996.

104.NAUME B, SHALABY R, LESSLAUER W, ESPEVIK T.Involvement of the 55and 75-kDa tumor necrosis factor receptors in the generation of lymphokineactivated killer cell activity and proliferation of natural killer cells.**J Immunol.** 1;146(9):3045-8. 1991 105.

106.NEUER, A., LAM,K-N., TILLER, F.-W. - Human heat shock protein in the first trimester human deciduas, **Infect Dis Obstet Gynecol**, v.3, p.188-189. 1996.

107.NGUYEN, H. T., RICE, G. E., FARRUGIA, W., WONG, M.; BRENNECKE, S. P. - Bacterial endotoxin increases type II phospholipase A2 immunoreactive content and phospholipase A2 enzymatic activity in human choriodecidua, **Biol Reprod** v.50, n.3, p.526-534. 1994.

108.NOLLEN EA, BRUNSTING JF, ROELOFSEN H, WEBER LA, KAMPINGA HH.-In vivo chaperone activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. **Mol Cell Biol**.;19(3):2069-79, 1999

109.NOLLEN, E. A. A.; MORIMOTO, R. I. - Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing `heat shock' proteins, J **Cell Sci** v.115, n.14, p.2809-2816. 2002.

110.OGANDO, D. G., PAZ, D., CELLA, M.; FRANCHI, A. M. - The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice, **Reproduction** v.125, n.1, p.95-110. 2003.

111.OHYAMA H., Y. Y., OHKAWA A.; WATANABE I. - Radiation-induced formation os apoptotic bodies in rats thymus, **Radiat Res**, v.101, p.123-130. 1985.

112.PAFFARO JR, V. A., BIZINOTTO,M.C., JOAZEIRO,P.P., YAMADA,A.T - Subsets classification of mouse metrial gland cells isolated by DBA lectin reactivity, **Placenta**, v.24, p.479-488. 2003.

113.PANDEY, M., MATHEW, A.; NAIR, M. K. - Cancer vaccines: a step towards prevention and treatment of cancer, **Eur J Surg Oncol**, v.25, n.2, p.209-214. 1999.

114.PARK, H.-S., LEE, J.-S., HUH, S.-H., SEO, J.-S.; CHOI, E.-J. - Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase, **EMBO J** v.20, n.3, p.446-456. 2001.

115.PARR, E. L., YOUNG, L. H., PARR, M. B.; YOUNG, J. D. - Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perform and serine esterases, **J Immunol** v.145, n.7, p.2365-2372. 1990.

116.PEEL, S. - Granulated metrial gland cells, **AdvAnat EmbryolCell Biol**, v.115, p.1-112. 1989.

117.PEREZ-VILLAR, J. J., CARRETERO, M., NAVARRO, F., MELERO, I., RODRIGUEZ, A., BOTTINO, C., MORETTA, A.; LOPEZ-BOTET, M. - Biochemical and serologic evidence for the existence of functionally distinct forms of the CD94 NK cell receptor, **J Immunol** v.157, n.12, p.5367-5374. 1996.

118.PICCINIM.P., R., S. - Regulation of fetal allograft survival by a hormone-controlled Th1 and Th2 type cytokines, **Immunol Res**, v.15, p.141-150. 1996.

119.POLLA, B. S., KANTENGWA, S., FRANCOIS, D., SALVIOLI, S., FRANCESCHI, C., MARSAC, C.; COSSARIZZA, A. Mitochondria are selective

targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. **Proc Natl Acad Sci U S A** 93: 6458-6463 p. 1996.

120.PRATT, W. B.; TOFT, D. O. - Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70-Based Chaperone Machinery, **Exp Biol Med** v.228, n.2, p.111-133. 2003.

121.PROHASZKA, Z., DUBA, J., LAKOS, G., KISS, E., VARGA, L., JANOSKUTI, L., CSASZAR, A., KARADI, I., NAGY, K., SINGH, M., ROMICS, L.; FUST, G. -Antibodies against human heat-shock protein (hsp) 60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement-activating ability, **Int Immunol**, v.11, n.9, p.1363-1370. 1999.

122.PROHASZKA Z, S. M., NAGY K, KISS E, LAKOS G, DUBA J,; FUST G. - Heat shock protein 70 is a potent activator of the human complement system., **Cell Stress Chaperones**, v.7, p.17–22. 2002.

123.RADI R, RODRIGUEZ M, CASTRO L, TELLERI R.- Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. **Arch BiochemBiophys** 308:89–95, 1994.

124.RALEIGH, J. A., CALKINS-ADAMS, D. P., RINKER, L. H., BALLENGER, C. A., WEISSLER, M. C., FOWLER, W. C., JR., NOVOTNY, D. B.; VARIA, M. A. - Hypoxia and Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Human Squamous Cell Carcinomas Using Pimonidazole as a Hypoxia Marker, **Cancer Res** v.58, n.17, p.3765-3768. 1998.

125.RANDALL S.K, Shore. C.G. - Import of a mutant mitochondrial precursor fails to respond to stimulation by a cytosolic factor **FEBS Lett.** 3;250(2):561-4. 1989.

126.RAVAGNAN L, GURBUXANI S, SUSIN SA, MAISSE C, DAUGAS E, ZAMZAMI N, MAK T, JÄÄTTELÄ M, PENNINGER JM, GARRIDO C, KROEMER G.- Heatshock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. **Nat Cell Biol** ;3(9):839-43.2001

127.RENOIR, J. M., RADANYI, C., FABER, L. E. e BAULIEU, E. E. - The non-DNAbinding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59-kilodalton protein, **J Biol Chem**, v.265, n.18, p.10740-10745. 1990.

128.RETI NG, L. M., HUPPERTZ B, RILEY C, WLODEK ME, HENSCHKE P, PERMEZEL M, RICE GE - Effect of high oxygen on placental function in short-term explant cultures, **Cell Tissue Res**, v.328, n.3, p.607-16. 2007.

129.RICHTER C, KASS GE.- Oxidative stress in mitochondria: its relationship to cellular Ca2+ homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. **Chem Biol Interact.**1;77(1):1-23. Review.1991.

130.ROMAN, S. S. Caracterização morfológica e comportamento das células uNK em camundongos após lesão embrionária em diferentes períodos gestacionais. UNICAMP 2001.

131.RUCHALSKI, K. L., MAO, H., LI, Z., WANG, Z., GILLERS, S., WANG, Y., MOSSER, D. D., GABAI, V., SCHWARTZ, J. H. e BORKAN, S. C. - Distinct Hsp70 domains mediate apoptosis inducing factor release and nuclear accumulation, **J Biol Chem**, p.M513728200. 2006.

132.RZUCIDLO EM, QUIST WC, HAMDAN AD, LOGERFO FW.- Interferon gamma up-regulates a novel protein in vascular smooth muscle cells. **J Vasc Surg**.;29(2):317-23; discussion 324-5.1999

133.SALEH A., S. S., BALKIRT L., ROBBINS PD., ALNEMRI ES - Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by HSP70, **Nat Cell Biol.**, v.2, n.8, p.476-83. 2000.

134.SATO, S., FUJITA, N. e TSURUO, T. - Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90, **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.97, n.20, p.10832-10837. 2000.

135.SCHÄFER-SOMI, S. - Cytokines during early pregnancy of mammals: a review., **Anim Reprod Sc**i, v.75, n.1-2, p.73-94. 2003.

136.SCHNEIDER H.- Placental oxygen consumption. Part II: in vitro studies--a review. **Placenta.** Suppl A:S38-44, 2000

137.SCHILD, H., ARNOLD-SCHILD, D., LAMMERT, E., RAMMENSEE, H. G. -Stress proteins and immunity-mediated by cytotoxic T lymphocytes., **Curr Opin Immunol** v. 11, p.109–113. 1999.

138.SCHIMITT E., GERMANN M., BRUNET, G., MULTHOFF G., GARRIDO C.-Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy., **J. Leuc. Biol.** v 81. p1189., 2006

139.SCHOCH, H. J., FISCHER, S.; MARTI, H. H. - Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain, **Brain Res**, v.125, n.11, p.2549-2557. 2002.

140.SEMENZA, G. L. - Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis, **Curr Opin Genet Dev**, v.8, p.588-594. 1998.

141.SEMENZA,G.L - HIF-1: Using Two Hands to Flip the Angiogenic Switch, **Cancer and Metastasis Reviews**, v.19, p.59-65. 2000.

142.SHAH, M., STANEK, J.; HANDWERGER, S. - Differential Localization of Heat Shock Proteins 90, 70, 60 and 27 in Human Decidua and Placenta During Pregnancy, **The Histochemical Journal**, v.30, n.7, p.509-518. 1998.

143.SHEFFIELD, W. P., SHORE, G. C.; RANDALL, S. K. - Mitochondrial precursor protein. Effects of 70-kilodalton heat shock protein on polypeptide folding, aggregation, and import competence, **J Biol Chem**, v.265, n.19, p.11069-11076. 1990.

144.SIES H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew Chem Int Ed Engl**;25:1058-71, 1986

145.SINGH-JASUJA, H., TOES, R. E. M., SPEE, P., MUNZ, C., HILF, N., SCHOENBERGER, S. P., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., NEEFJES, J., RAMMENSEE, H.-G., ARNOLD-SCHILD, D.; SCHILD, H. - Cross-Presentation of Glycoprotein 96-associated Antigens on Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Requires Receptor-mediated Endocytosis, **J Exp Med**, v.191, n.11, p.1965-1974. 1999.

146.<u>SONDERMANN H, BECKER T, MAYHEW M, WIELAND F, HARTL FU.</u>-Characterization of a receptor for heat shock protein 70 on macrophages and monocytes.**Biol Chem**. ;381(12):1165-74.2000

147.SRIVASTAVA, P. - Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity, **Nat Rev Immunol**, v.2, n.3, p.185-194. 2002.

148.STANKIEWICZ, A. R., LACHAPELLE, G., FOO, C. P. Z., RADICIONI, S. M.; MOSSER, D. D. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. **J. Biol. Chem**.: M509497200 p. 2005.

149.STEWART-AKERS A.M., K., J.S., BREKOSKY, J. DELOIA J.A. - Endometrial leukocytes are altered numerically and functionally in women with implantation defects, **Am J Reprod Immunol**, v.39, p.1-11. 1998.

150.STEWART, I., PEEL, S. - Granulet metrial gland cells at implantation sites of the mouse uterus, **Anat Embryol**, v.160, p.227-238. 1980.

151.SUBUDHI A W, D. S. L., KIPP R W , ASKEW E W \cdot Antioxidant status and oxidative stress in elite alpine ski racers, **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v.11, n.1, p.32-41. 2001.

152.TABIBZADEH, S. A. B., J. - Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle, *Infect Dis Obstet, Gynecol,* v.7, p.5-9. 1999.

153.TAYADE C, ESADEG S, FANG Y, CROY BA. Functions of alpha 2 macroglobulins in pregnancy. **Mol Cell Endocrino**l ;245: 60–66. 2005

154.TENGER, C., SUNDBORGER, A., JAWIEN, J.; ZHOU, X. - IL-18 Accelerates Atherosclerosis Accompanied by Elevation of IFN-{gamma} and CXCL16 Expression Independently of T Cells, **Arterioscler Thromb Vasc Bio**<u>1</u>, v.25, n.4, p.791-796. 2005.

155. TOUYZ RM.- Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? **Hypertension.** 2004 Sep;44(3):248-52. Epub 19. Review.2004.

156.TRINCHIERI G. Biology of natural killer cells. **Adv Immunol**; 47: 187–376, 1989.

157.TSUCHIYA D, H. S., MATSUMORI Y, KAYAMA T, SWANSON RA, DILLMAN WH, LIU J, PANTER SS, WEINSTEIN PR - Overexpression of rat heat shock protein 70 reduces neuronal injury after transient focal ischemia, transient global ischemia, or kainic acid-induced seizures, **Neurosurgery**, v.53, n.5, p.1179-87. 2003.

158.VAN DER MEER, A., LUKASSEN, H. G. M., VAN LIEROP, M. J. C., WIJNANDS, F., MOSSELMAN, S., BRAAT, D. D. M.; JOOSTEN, I. - Membranebound HLA-G activates proliferation and interferon-{gamma} production by uterine natural killer cells, **Mol Hum Reprod_**v.10, n.3, p.189-195. 2004.

159. VERES, A., FUST, G., SMIEJA, M., MCQUEEN, M., HORVATH, A., YI, Q., BIRO, A., POGUE, J., ROMICS, L., KARADI, I., SINGH, M., GNARPE, J., PROHASZKA, Z., YUSUF, S.- Relationship of Anti-60 kDa Heat Shock Protein and Anti-Cholesterol Antibodies to Cardiovascular Events, Circulation, p.01. 2002.

160.WANG, X., QIN Y., HU MH., XIE, Y. - Dendritic cells pulsed with hsp70-peptide complexes derived from human hepatocellular carcinoma induce specific anti-tumor immune responses., **World J Gastroenterol**, v.11, n.36, p.5614-5620. 2005.

161.WANG, Y., KELLY, C. G., SINGH, M., MCGOWAN, E. G., CARRARA, A.-S., BERGMEIER, L. A. LEHNER, T. - Stimulation of Th1-Polarizing Cytokines, C-C Chemokines, Maturation of Dendritic Cells, and Adjuvant Function by the Peptide Binding Fragment of Heat Shock Protein 70, **J Immunol**_v.169, n.5, p.2422-2429. 2002.

162.WANG, Y., KNOWLTON, A. A., CHRISTENSEN, T. G., SHIH, T. e BORKAN, S. C. - Prior heat stress inhibits apoptosis in adenosine triphosphate-depleted renal tubular cells, **Kidney Int**, v.55, n.6, p.2224-2235. 1999.

163.WEBSTER, W. S., HOWE, A. M., ABELA, D.; OAKES, D. J. - The Relationship Between Cleft Lip, Maxillary Hypoplasia, Hypoxia and Phenytoin, **Curr Pharm Des**, v.12, p.1431-1448. 2006.

164.WEBSTER WS, ABELA D.- The effect of hypoxia in development.Birth Defects **Res C Embryo Today**.;81(3):215-28. Review. 2007

165.WELLS, A. D., MALKOVSKY, M - Heat shock proteins, tumor immunogenicity, and antigen presentation: an integrated view, **Immunol Today**, v. 21, p. 129–132. 2000.

166.WHITALL, T., WANG, Y., KELLY,C.G., THOMPSON, R., SANDERSON, J. LOMER, M., SOON, S.Y., BERGMEIER, L.A., SINGH, M., LEHNER, T. - Tumour necrosis factor alfa and its inhibition in circulating dendritic cells and eluted from mucosal tissues in Crohn's disese, **Clin Exp Immunol**, v.143, p.550-559. 2006.

167.WISCHMEYER, P. E., MUSCH, M. W., MADONNA, M. B., THISTED, R. e CHANG, E. B. - Glutamine protects intestinal epithelial cells: role of inducible HSP70, **J Gastroenterol Hepatol**, v.272, n.4, p.G879-884. 1997.

168.WILCZYNSKI, J.R. Th1/Th2 cytokines balance-yin and yang of reproductive immunology., **J Obstet Gynaecol**, 10. 1016. 2005

169.WU, X. W., H; ZHANG, J; TIAN, Z, - IIncreased uterine NK-derived IFN- γ and TNF- α in C57BL/6J mice during early pregnacy, **Cell Mol Immunol**, v. 3, n.2, p.131-137. 2006.

170.XIE J. Hedgehog signaling in prostate cancer **Future Oncol.** ;1(3):331-8.2005

171.XU, Y. A. LINDQUIST., S - Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp60v-src kinase., **Proc Natl Acad Sci USA**, v.90, p.7074 -7078. 1993.

172. XU Q, HU Y, KLEINDIENST R, WICK G.- Nitric oxide induces heat-shock protein 70 expression in vascular smooth muscle cells via activation of heat shock factor 1. **J Clin Invest**. 1;100(5):1089-97.1997.

173.XU J, CHAKRABARTI AK, TAN JL, GE L, GAMBOTTO A, VUJANOVIC NL.Essential role of the TNF-TNFR2 cognate interaction in mouse dendritic cellnatural killer cell crosstalk.**Blood.**15;109(8):3333-41. 2007

170- ZITVOGEL L. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innateimmunity. J Exp Med. 195:9–14.2002.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/tese de mestrado/doutorado intitulada "Expressão das proteínas de choque térmico (70) (HSP70) nas células uNK de camundongos na gestação normal e sob estresse induzida pela lesão embrionária"

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

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

(x) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1303-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo n°_____).

atiaal Patrícia Daniele Azevedo Lima Aureo Tatsumi Yamada

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(1) Deferido () Indeferido

Nome: Função:

Profa. Dra. ANA MARIA A. GUARALDO Presidente Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/IB - UNICAMP