

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Priscila Meirelles Fonseca

EFEITO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PRIMÁRIO
SOBRE AS CÉLULAS NK UTERINAS (NKU) E
AVALIAÇÃO DA SUA VIABILIDADE
IN VITRO

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Priscila Meirelles Fonseca
e aprovada pela Comissão Julgadora.
31/03/2000

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

Orientador: Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada

Co-Orientadora: Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

2020/04/17



CHAMADA:	T/UNICAMP
	F733e
Ex.	
NUMERO BC/	41409
REC.	278/00
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
RECIBO R.B.	11.00
DATA	07-07-00
L. CPD	

CM-00142335-3

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Fonseca, Priscila Meirelles

F733e Efeito das condições de cultivo primário sobre as células *NK* uterinas (NKu) e avaliação da sua viabilidade in vitro/Priscila Meirelles Fonseca. - - Campinas, SP.[s.n.], 2000
116f. ilus.

Orientador: Áureo Tatsumi Yamada

Co-Orientador: Leonilda Maria Barbosa dos Santos

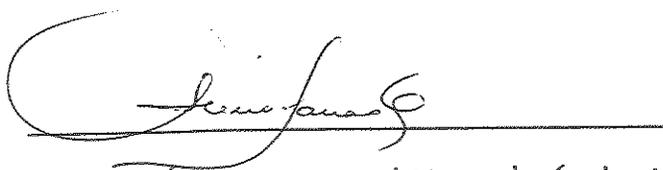
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Células *NK* uterinas. 2. Cultivo primário. 3. Imunologia da reprodução. I. Yamada, Áureo Tatsumi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

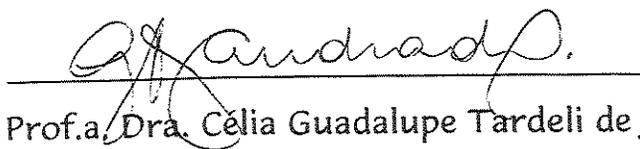
Data da Defesa: 31/03/2000

Banca Examinadora

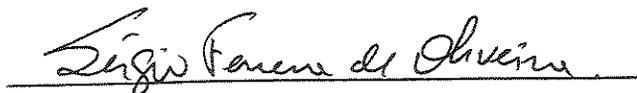
Titulares



Prof. Dr. Aureo Tatsumi Yamada (orientador)



Prof.a Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade



Prof. Dr. Sérgio Ferreira de Oliveira

Suplente



Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro

*“O prazer me traz a sensação da vida.
Enquanto esta sensação existir, vou usá-la
como quem usa os olhos para enxergar.”*

R. Silva

AGRADECIMENTOS

À Sylvia, Lineu, Gisele, Márcio, Camila, Mariane, André e Gabriel, minha família, por todo carinho e inestimável compreensão.

Ao Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada pela orientação e imensa contribuição para minha formação profissional.

Aos Cursos de Pós Graduação em Morfologia e em Biologia Celular e Estrutural do IB/UNICAMP, por tornar possível a realização deste trabalho.

Aos membros da Pré-banca, Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, Profa. Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade e Prof. Dr. Sérgio Ferreira de Oliveira pela leitura da versão inicial da tese e sugestões para aprimoramento da mesma.

Aos docentes do Departamento da Histologia e Embriologia do IB/UNICAMP, por contribuírem na minha formação.

Ao Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica e ao Laboratório de Criométodos e Embriologia Experimental do IB/UNICAMP, onde foi realizada a maior parte dos experimentos.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/UNICAMP, pelo apoio técnico e uso de seus equipamentos.

Ao Departamento de Biologia Celular do IB/UNICAMP, pelo uso do microscópio de luz invertido e auxílio prestado.

Ao Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, meu primeiro orientador, pela pessoa admirável que é.

À Prof. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos, pela co-orientação e uso de seu laboratório.

À Patrícia Aline pela sua presença constante e valiosa ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos colegas Silvane, Suzana, Eliane, Márcia, Patrícia Dourado, Gláucia, Júnior e Celina pelos bons momentos compartilhados.

À Célia Aparecida Almeida Chaves Garcia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB/UNICAMP, pela inestimável colaboração, determinante no sucesso deste trabalho.

À Claudenete Vieira Leal, pela amizade, convivência e colaboração diária.

Aos funcionários Baltazar Pereira de Paula, Antônia Maria Ferreira Lima e Adriane Cristina Sarti Sprogis, pelo auxílio técnico.

Às secretárias Helena e Rita, do Departamento de Histologia e Embriologia/UNICAMP, e Lilian, do Departamento de Biologia Celular, pelo apoio em diversos momentos.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Ao Djavan, pela beleza de suas músicas, companheiras na redação desta tese.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

ÍNDICE

ÍTENS	PÁGINA
Apêndice I - Abreviaturas utilizadas	vii
Apêndice II - Procedência dos reagentes utilizados	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Características gerais das células <i>natural killer</i> uterinas (NKu)	2
1.2. Funções das células NKu	5
1.3. Aspectos gerais da diferenciação das células NKu	8
1.4. Obtenção e manutenção das células NKu <i>in vitro</i>	12
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Animais	20
3.2. Estabelecimento do cultivo primário de explantes da glândula metrial	20
3.3. Meios de cultivo e variação de suplementos testados	20
3.3.1. Obtenção do meio condicionado esplênico (MCE)	21
3.4. Processamento das células obtidas em cultivo	22
3.4.1. Coleta e processamento dos explantes	22
3.4.1.1. Explantes residuais após 24 e 48 horas de cultivo	22
3.4.1.2. Explantes controles no tempo zero (0)	22
3.4.2. Células em suspensão	23
3.4.2.1. Análises em microscopia de luz (ML)	23
3.4.2.2. Análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET)	23
3.4.3. Células aderidas	23

3.4.3.1 Análises em microscopia de luz (ML)	23
3.4.3.2. Análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET)	24
3.5. Procedimentos histoquímicos	25
3.5.1. Histoquímica de PAS	25
3.5.2. Histoquímica de lectina DBA	26
3.6. Procedimentos para microscopia eletrônica de transmissão (MET)	27
3.7. Estimativa do rendimento na obtenção de células NKu aderidas, a partir do cultivo da glândula metrial	28
3.8. Ensaio <i>in vitro</i>	29
3.8.1. Exposição de células aderidas à lectina DBA	29
3.8.2. Localização da lectina DBA biotinada pela microscopia de fluorescência	29
3.8.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	30
4. RESULTADOS	31
4.1. Glândula metrial	32
4.1.1. Explantes controles (tempo 0)	32
4.1.2. Explantes residuais (24 e 48 horas)	33
4.2. Células aderidas	36
4.3. Células em suspensão	38
4.4. Índice de rendimento relativo de células NKu aderidas	40
4.5. Efeito da exposição da lectina DBA sobre as células NKu aderidas	41
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	62
7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

Apêndice I - Abreviaturas utilizadas

- BSA: albumina bovina
- Con-A: concanavalina-A
- DBA: *Dolichos biflorus* agglutinin
- ddg: dias de gestação
- MCE: meio condicionado esplênico
- MET: microscopia eletrônica de transmissão
- MEV: microscopia eletrônica de varredura
- ML: microscopia de luz
- NK: *natural killer*
- NKu: *natural killer* uterinas
- PAS: *periodic acid Schiff*
- PBS: tampão fosfato-salina
- SFB: soro fetal bovino

Apêndice II - Procedência dos reagentes utilizados

- No cultivo celular
 - Azul de tripan (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA);
 - Concanavalina-A (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA);
 - Gentamicina (ESM);
 - Glutamina (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA);
 - Hank's (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA);
 - MEM (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA);
 - Methyl α - D - Mannopyranoside (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA);
 - RPMI (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA);
 - Soro fetal bovino (Nutricell/SP).

- No processamento das amostras
 - Acetato de uranila (Merck, Darmstadt/Germany);
 - Agarose (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA);
 - Amilase (Fungamyl Ultra S, AFVU012/Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil Ltda);
 - Bálsamo sintético Entellan (Merck, Darmstadt/Germany);
 - BSA (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA);
 - Citrato de chumbo (Merck, Darmstadt/Germany);
 - Glutaraldeído (Ladd Research Industries, Burlington/USA);
 - Tetróxido de ósmio (OsO₄) (Ladd Research Industries, Burlington/USA);
 - Óxido propileno (Aldrich Chemical Co/USA);
 - Parafina (Histosec - Merck/RJ);
 - Paraformaldeído (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA);
 - Poli-L-lisina (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA);
 - Resina epoxi (Epon - Polysciences, Warrington, PA/USA);

- Nos procedimentos histoquímicos
 - Ácido periódico (Merck/Darmstadt);
 - Bissulfito de sódio (Reagen/RJ);
 - Complexo streptoavidina-fluoresceína (Amershau, UK);
 - Complexo streptoavidina-peroxidase (DAKO);
 - Diaminobenzidina (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA);
 - Lectina DBA conjugada com Biotina (Wako Chemical Co/Japão);
 - Meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Inc);
 - Peróxido de hidrogênio (Merck/Darmstadt).

RESUMO

As células *natural killer* uterinas (NKu) estão presentes no útero de roedores durante a gestação, período em que surgem e se diferenciam, desaparecendo por completo ao final deste. Os fatores envolvidos nos mecanismos de diferenciação e ativação destas células, bem como as funções por estas desempenhadas são pouco conhecidas. A dificuldade na compreensão plena das funções das NK do ambiente uterino é atribuída à complexidade e dinamismo do ambiente uterino durante a gestação. Os estudos realizados *in vitro* são igualmente inconclusivos devido à falta do estabelecimento de uma condição padrão nos ensaios realizados.

O presente trabalho teve o intuito de padronizar uma condição de obtenção e manutenção de células NKu viáveis para ensaios *in vitro*, a partir do cultivo primário da glândula metrial.

Foram utilizados fragmentos (explantes) da glândula metrial obtidos de camundongos prenhes no 8º dia de gestação (ddg). Estes explantes foram cultivados por 24 e 48 horas, em meios de cultivo MEM e RPMI, com ou sem a adição de MCE (meio condicionado esplênico). Os explantes em 0 hora (controle) e após 24 ou 48 horas de cultivo, assim como as células derivadas destes explantes (aderidas e em suspensão) no cultivo, foram processados para as análises histoquímicas de PAS e lectina DBA (*Dolichos biflorus* agglutinin) e para análises ultra-estruturais em MET.

Os resultados demonstraram que tanto as formas aderidas quanto em suspensão apresentaram positividade à reação histoquímica de PAS e lectina DBA, sendo identificadas como sendo células NKu. O explante residual mostrou sinais de degeneração acentuada após 24 horas, independentemente das condições de cultivo empregadas. Pela MET, o maior índice de células NKu com boa preservação ultra-estrutural foi observada nas células NKu aderidas obtidas

após 24 horas de cultivo em meio RPMI padrão, sem suplementação do meio condicionado esplênico (MCE).

Estas condições de cultivo foram estabelecidas como padrão para a obtenção de células NKu morfologicamente bem preservadas, sendo utilizadas nos ensaios *in vitro*, para avaliar a viabilidade destas células. Sob o efeito da lectina DBA, as células NKu demonstraram variações nos padrões morfológicos e de marcação pela lectina DBA, dependentes da concentração e tempo de ação, constatadas pelas microscopias de fluorescência e eletrônica de varredura (MEV).

Pelos resultados obtidos, estabeleceram-se as condições de cultivo para obtenção de células NKu preservadas a partir do cultivo de explantes da glândula metrial, sendo estas células passíveis de serem utilizadas em ensaios *in vitro*. Pelo padrão de resposta das células NKu em consequência da ação da lectina DBA utilizada para avaliar a viabilidade destas células *in vitro*, sugere-se que o substrato presente na superfície das células NKu poderia ser um potencial receptor de membrana envolvido no mecanismo de resposta celular.

ABSTRACT

During the pregnancy, uterine natural killer (uNK) cells appear in the rodent uterus, differentiate and disappear at the end of this period. However, which factors are involved in the differentiation/activation mechanisms of uNK cells, as well as in their functions, remain to be solved. The advancing on knowledge about these cells has been due to the complexity and dynamism of the uterine environment during pregnancy. Even the *in vitro* studies are inconclusive since no standard condition has been established.

The present work proposed to establish a standard condition of culture to obtain and maintain uNK cells and further evaluate their viability for *in vitro* assays.

Metrial gland fragments (explants) were obtained from the uterus of mice on 8th days of pregnancy and used as explants of culture. The explants were cultured during 24 and 48 hours, in MEM and RPMI media, added or not with spleen-conditioned medium (SCM). The 0 hour explants and after 24 or 48 hours of incubation, as well as explants derived cells (adherents and not-adherents), were processed for PAS and DBA (*Dolichos biflorus* agglutinin) histochemistry analyses and for ultrastructural analyses in TEM.

The results showed positive reaction to PAS and DBA histochemistries both for adherent and not-adherent cell forms in the culture. The residual explant showed degenerative signals after 24 hours, in despite of the culture conditions. The highest index of well-preserved uNK cells evaluated at ultrastructural level was found to adherent uNK form, after 24 hours in standard RPMI, without the supplementation with SCM.

This procedure was established as standard culture conditions to obtain morphologically well preserved uNK cell that was used to *in vitro* assays for evaluation of cellular viability. Under the effect of DBA lectin, uNK cells showed changes in morphology and labelling patterns, upon dependence of

concentration and time lapsed effect, as noticed by fluorescence and scanning electron microscopes (SEM).

Altogether, our findings allowed to establish the conditions to obtain well-preserved uNK cells from the explants of metrial gland in culture, which are useful for *in vitro* assays. Based on *in vitro* assay with DBA lectin, it is proposed that the DBA lectin reactive substrate localised on uNK cell surface could be a potential membrane receptor related in the mechanism of cellular responsiveness.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características gerais das células *natural killer* uterinas (NKu)

A formação da decidua na gestação ou na pseudogestação induzida em roedores é acompanhada pelo aparecimento de uma estrutura transitória (ZHENG *et al.*, 1991c; ZHENG *et al.*, 1993; LINNEMEYER & POLLACK, 1994) denominada glândula metrial (WISLOCKI *et al.*, 1957; PEEL, 1989). Esta glândula, localizada na base do mesométrio de cada sítio de implantação, limitada externamente pela camada interna de músculo liso, é constituída de duas populações celulares principais: os fibroblastos-símile e as células granulosas da glândula metrial (CGMs) (STEWART & PEEL, 1977; LIU *et al.*, 1994). Estudos desenvolvidos durante os últimos anos, especialmente de fenotipagem *in situ* e com emprego de camundongos mutantes ou transgênicos, constataram similaridades entre as CGMs e as NK, caracterizando as primeiras como sendo pertencentes à linhagem específica de células NK, daí sua denominação mais recente de células *natural killer* uterinas (NKu) (CROY, 1990; ZHENG *et al.*, 1991b). Na literatura são também encontradas outras denominações tais como “NK deciduais”, “NK-like” e “NK endometriais”, referindo-se à mesma população celular.

A glândula metrial, bem como as células NKu são também encontradas em uma diversidade de mamíferos, incluindo primatas (DALLENBACH-HELLWEG *et al.*, 1966; CARDELL *et al.*, 1969) e humanos (DALLENBACH-HELLWEG & NETTE, 1964; BULMER *et al.*, 1987). Devido a sua distribuição em mamíferos e sua função desconhecida, a glândula metrial, em especial as células NKu, tornaram-se um foco de atenção importante nestas últimas décadas.

As células NKu são células freqüentemente binucleadas, caracterizadas pela presença de inúmeros grânulos citoplasmáticos e acúmulos de glicogênio, ambos positivos à reação do PAS (WISLOCKI *et al.*, 1957; STEWART & PEEL, 1977; DELGADO *et al.*, 1996). Pela ultra-estrutura, estes grânulos constituem-se de uma matriz amorfa, de eletrondensidade variada, envolvida por uma membrana. Muitos destes grânulos possuem, na sua região periférica, um *cap*

eletrondenso constituído de acúmulos de microvesículas membranosas (STEWART & PEEL, 1977).

Estudos imunocitoquímicos e imunoquímicos (PARR *et al.*, 1987, 1990b; ZHENG *et al.*, 1991a,c) demonstraram a presença de perforina nos grânulos citoplasmáticos das células NKu (PARR *et al.*, 1987; PARR *et al.*, 1990a), uma proteína associada com a atividade lítica de células NK e T citotóxica. Também no interior dos grânulos demonstrou-se, por meio da imunomicroscopia eletrônica, a presença de serina esterase (PARR *et al.*, 1990b) e catepsina D (CORREA DA SILVA, 1997), enzimas proteolíticas lisossômicas. A dupla marcação por imunomicroscopia eletrônica mostrou que a perforina está presente em todos os grânulos citoplasmáticos, enquanto a serina esterase colocaliza-se na maioria destes. No entanto, uma evidência indireta a partir de um gradiente de separação em Percoll sugere que a perforina e a serina esterase possam não residir no mesmo compartimento (PERSECHINI *et al.*, 1989). A catepsina D é encontrada exclusivamente na região do *cap* membranoso (CORREA DA SILVA *et al.*, 1996)

Outras enzimas como hidrolases (BULMER, 1968), granzima A e B (KING *et al.*, 1993) e enzimas degradativas (DELGADO *et al.*, 1996) também foram encontradas no interior dos grânulos das células NKu. A expressão destes mediadores citolíticos pelas células NKu implica numa ativa função lítica (KING *et al.*, 1993). No entanto, os mecanismos relacionados à liberação destes mediadores, se é que são liberados, permanecem não comprovados.

Além da presença dos grânulos citoplasmáticos de conteúdo citolítico, comum aos linfócitos citotóxicos, a expressão de asialo-GM1, CD45, Thy-1, NK1.1, LGL-1 e 4H12 e ausência de CD3 (MUKHTAR *et al.*, 1989; PARR *et al.*, 1990b; LINNEMEYER & HAMILTON, 1990; CROY & KISO, 1993; VAN DEN HEUVEL *et al.*, 1996) caracterizam estas células como sendo da linhagem linfocitária NK.

A utilização de animais transgênicos imunodeficientes tem sido decisivo no estabelecimento da origem das NKu. Com o uso de camundongos *nu/nu*, deficientes em células T, demonstrou-se que as células NKu mantinham-se no útero prenhe e apresentavam frequência, morfologia e localização semelhantes aos camundongos normais, indicando que as mesmas não eram células T (STEWART & PEEL, 1980; CROY *et al.*, 1991a). Da mesma forma, utilizando-se animais *scid/scid*, deficientes em células T e B, as células NK foram igualmente encontrados no útero de animais prenhes (CROY *et al.*, 1991a).

Os animais da linhagem Tgε26, caracterizados pela imunodeficiência em células T e NK, apresentavam entre outras alterações, um número muito reduzido de células NKu nos sítios de implantação, quando comparados aos de animais imunocompetentes (GUIMOND *et al.* 1997). Nestes animais, o útero pode ser repovoado com células NKu através do transplante de medula óssea proveniente de animais SCID, deficientes em células T e B (GUIMOND *et al.* (1998).

O conjunto destes resultados obtidos a partir de animais imunodeficientes foi conclusivo em estabelecer as células NKu como pertencentes à linhagem de células NK.

Porém, existem características não-compartilhadas entre as células NK uterinas e as demais NK. Enquanto as células NK produzem INF- γ espontaneamente e podem ser estimuladas por este, as células NKu só o produzem com prévia estimulação pela IL-2 (WHITELAW & CROY, 1996; CROY *et al.*, 1996-97). Além disso, enquanto as células NK de ratos e camundongos são capazes de lisar *in vitro* células de linfoma YAC-1 (TRINCHIERI, 1989; STEWART, 1991), as células NKu não apresentam tal atividade (PARR *et al.*, 1990a; CROY & KASSOUF, 1989; CROY *et al.*, 1991c; HEAD, 1996-1997), ao menos que sejam estimuladas pela IL-2 (CROY *et al.*, 1991c).

Portanto, apesar da identificação de inúmeros marcadores que caracterizam a semelhança entre as células NKu e as demais NK, outras

evidências sugerem que as células NKu sejam uma subpopulação de linhagem linfocitária NK, única do ambiente uterino gravídico. Desta forma, as tentativas de extrapolar os conhecimentos baseados em experimentos com as células NK em geral, para as NKU não permitem estabelecer com clareza o mecanismo de atuação destas últimas. Desta forma, desconhece-se até o momento um marcador de superfície ou componente de expressão específico das células NKu.

Na falta de um marcador específico, as lectinas tem sido bastante utilizadas no reconhecimento e identificação iniciais destas células. Estudos desenvolvidos por PEEL & BULMER (1996), com o emprego da histoquímica de lectinas, demonstraram que as células NKu de úteros de ratas prenhes apresentavam intensa reação com as lectinas WGA (*Triticum vulgaris*), MPA (*Maclura pomifera*), PHA-L (*Phaseolus vulgaris leucoaglutinin*), fraca reação com Con-A (*Canavalia ensiformis*), LCH (*Lens culinaris*), PSA (*Pisum sativum*), PHA-E (*Phaseolus vulgaris*), e negativa para DBA (*Dolichos biflorus*). Por outro lado, DAMJANOV & DAMJANOV (1992) e CORREA DA SILVA (1997), relataram que as células NKu eram as únicas células presentes no estroma do endométrio gravídico respectivamente de ratas e camundongos, que reagiam com a lectina DBA.

Os resultados do nosso laboratório (PAFFARO, JR, *et al.*, 1999) demonstraram que a lectina DBA não reagem com outras populações linfocitárias, o que sugere alta especificidade na identificação das células NKu. Esta lectina apresenta ainda a potencialidade de marcar as diferentes fases de maturação das NKu em camundongos (PAFFARO, JR. *et al.*, 1999).

1.2. Funções das células NKu

Dentre as atividades metabólicas comprovadas a respeito das células NKu, estão a produção de proteínas líticas (PARR *et al.*, 1987, 1990b; ZHENG *et al.*, 1991a,c; CORREA DA SILVA, 1997), de óxido nítrico sintase induzível

(SLADECK *et al.*, 1998), a secreção de componentes da matriz extracelular e a interação com os mesmos (SANTONI *et al.*, 1989; GINSBURG *et al.*, 1989; BRAGA & GENDLER, 1993; KISO *et al.*, 1994; CROY, 1994; DYUGOSKAYA *et al.*, 1995) e, a participação na produção e resposta às citocinas (NOMURA *et al.*, 1988; CROY *et al.*, 1991b; CROY *et al.*, 1991c; CROY & KISO, 1993; SAITO *et al.*, 1993; HUNT, 1994; CROY, 1994, CHEN *et al.*, 1994).

Dentre as citocinas produzidas pelas células Nku estão a interleucina 1 (IL-1), o fator inibidor da leucemia (LIF), CSF-1 e TNF- α (CROY *et al.*, 1991b; CHEN *et al.*, 1993; CROY *et al.*, 1996-97).

Por analogia com as NK propriamente ditas, pressupõem-se que as células NKu estariam envolvidas na imunologia da gestação (ZHENG *et al.*, 1991b; ZHENG *et al.*, 1993).

A presença de perforina (PARR *et al.*, 1987, 1990b; ZHENG *et al.*, 1991a,c), serina esterase (PARR *et al.*, 1990b), hidrolases (BULMER, 1968), granzima A e B (KING *et al.*, 1993), catepsina D (CORREA DA SILVA, 1996) e outras enzimas degradativas (DELGADO *et al.*, 1996) nos grânulos das células NKu sugere que as mesmas, em semelhança às demais células NK, possam desempenhar uma ativa função lítica (KING *et al.*, 1993). ZHENG *et al.* (1991c) propõem que nas funções das células NKu incluam a lise de células infectadas por vírus presentes na placenta e no útero.

Na tentativa de se estabelecer o papel da perforina durante a gestação, STALLMACH *et al.* (1995) utilizaram animais perforina-deficientes. No entanto, os mesmos apresentavam gestação, desenvolvimento da glândula metrial e diferenciação das células NKu normais. Estes resultados sugerem que a perforina não é essencial para o sucesso da gestação.

WELSH & ENDERS (1987 e 1993) sugerem que durante os estágios iniciais da implantação, as células Nku presentes na região subepitelial do sítio de implantação poderiam contribuir na degradação das células epiteliais e do estroma adjacente, permitindo a adesão e a invasão das células trofoblásticas.

Assim, as células NKu encontradas na região mesometrial, durante o período que antecede a placentação, poderiam estar atuando sobre as células endometriais, auxiliando, deste modo, na remodelação desta região.

Em virtude do seu potencial lítico, é postulada para as células NKu a função de remover as células trofoblásticas aberrantes, impedindo sua invasão (PEEL, 1989; HUNT, 1989; CROY, 1990; HUNT, 1990; KING & LOKE, 1990a; STEWART, 1990; HUNT & POLLARD, 1992), e aquelas senescentes (STEWART, 1990; CROY & KISO, 1993). As indicações para esta função basearam-se nos estudos desenvolvidos por STEWART & MUKHTAR (1988) e PEEL & ADAM (1991), os quais demonstraram que as células NKu são capazes de lisar aproximadamente 1% das células trofoblásticas de camundongos *in vitro*, possivelmente aquelas reconhecidas como aberrantes ou senescentes.

Similarmente, a morte de trofoblastos por células NKu foi descrita em humanos (KING & LOKE, 1990b). Corroborando esta idéia, HUNT (1994) enfatiza em seus estudos *in situ* que as células NKu se encontram posicionadas estrategicamente para esta atividade crítica. Ainda, com emprego da MEV, STEWART & MUKHTAR (1994) relatam observações das células NKu em íntimo contato com células trofoblásticas, *in vitro*. As células trofoblásticas de humanos expressam HLA-G, HLA-C e HLA-E na superfície celular, podendo estes serem utilizadas pelas células NKu no reconhecimento celular (KING, 1999).

Portanto, é plausível presumir que as células NKu possam reconhecer e responder diferentemente a antígenos expressos na placenta, dependendo do genótipo das células trofoblásticas (GUIMOND *et al.*, 1999).

CROY (1994), DELGADO *et al.* (1996) e CROY *et al.* (1996-97) sugerem que as células NKu possam estar envolvidas na degradação da matriz extracelular ao final da gestação, na preparação para a separação da placenta no parto.

Por outro lado, estudos realizados utilizando-se animais *tg_ε26*, camundongos transgênicos deficientes em células T e NK, sugerem um papel

crítico das células NKu no sucesso da gestação (GUIMOND *et al.*, 1996 e 1997). Estes animais apresentam uma série de alterações quando comparados aos controles, incluindo a redução no número de células NKu, diminuição no tamanho da placenta, aumento na taxa de reabsorção fetal e mortalidade perinatal. A reconstituição de células NK/NKu nesses animais por meio do transplante de medula óssea proveniente de animais SCID restaurou o tamanho da placenta e a performance reprodutiva dos primeiros. Portanto, presume-se que as células NKu desempenhem, também, importante papel no período de pós-implantação associado à diferenciação e crescimento da placenta e estabelecimento da circulação na mesma (GUIMOND *et al.*, 1998 e GUIMOND *et al.*, 1999).

YELIAN *et al.* (1993) relatam ainda a produção de proteínas da matriz extracelular pelas células NKu para o crescimento/migração das células trofoblásticas. Segundo WEGMANN & GUILBERT (1992), as células NKu poderiam ainda estar envolvidas na produção de citocinas que promovam o crescimento, diferenciação e ativação das células trofoblásticas.

Embora muitas funções postuladas para as células NKu presumam sua participação na manutenção da gestação, outros estudos sugerem que estas células possam desempenhar efeitos deletérios no desenvolvimento fetal, resultando em aborto espontâneo em camundongos (GENDRON & BAINES, 1988; CLARK, 1991; CLARK, 1994; BAINES & GENDRON, 1990) ou humanos (YOKOYAMA *et al.*, 1994; COULAM *et al.*, 1995; MAKIDA *et al.*, 1991; AOKI *et al.*, 1995). ZHENG *et al.* (1993) propõem que o duplo papel das células NK em relação ao conceito na promoção ou inibição de seu crescimento pode estar atribuída a duas supostas subpopulações de células NK.

1.3. Aspectos gerais da diferenciação das células NKu

As células NKu se originam a partir de células precursoras procedentes da medula óssea (PEEL & STEWART, 1984). Estudos ultra-estruturais

mostraram que as células NKu parecem diferenciar-se *in situ* no endométrio, a partir de um precursor tipo linfócito pequeno (PEEL & BULMER, 1977; STEWART & PEEL, 1977).

Em camundongos, o aparecimento das células NKu inicia-se no momento da implantação (4,1/2 dias de gestação), tem seu pico por volta dos 12^o-14^o dia de gestação e declina progressivamente (PARR *et al.*, 1990b).

Na sua forma não diferenciada, as células NKu são pequenas e podem ou não apresentar pequenos grânulos citoplasmáticos e acúmulo de glicogênio (STEWART & Peel, 1977; CORREA DA SILVA, 1997). Estas células são LGL-1 positivas, não expressam o marcador de superfície asialo-GM1 (MASON *et al.*, 1988; PARR *et al.*; 1991), porém são lectina DBA positivas (CORREA DA SILVA, 1997).

O processo de diferenciação destas células é caracterizado morfológicamente pelo aumento em número e tamanho dos grânulos citoplasmáticos, bem como pelo acúmulo de glicogênio. Estas características morfológicas são acompanhadas da alta expressão da perforina (ZHENG *et al.*, 1991a, c; PARR *et al.*, 1990b) e caracterizam células NKu maduras. O pico de aparecimento destes grânulos citoplasmáticos ocorre ao redor do 12^o dia de gestação (KISO *et al.*, 1992a), a partir do qual, muitas destas células NKu iniciam um processo de degeneração contínuo. No período peri-parto poucas células NKu são observadas e as remanescentes são liberadas junto com a placenta por meio da luz uterina, desaparecendo completamente do útero 48 horas após o parto (JACOBUCCI, comunicação pessoal). DELGADO *et al.* (1996) atribuem o desaparecimento das células NKu do período peri-parto a um processo de morte celular programada que não a apoptose.

Apesar das células NKu provavelmente se diferenciarem e se proliferarem *in situ* no útero grávido, os fatores iniciadores ou reguladores de seu desenvolvimento ainda não foram conclusivamente identificados (YE *et al.*, 1996). No entanto, como o aparecimento das células NKu no útero prenhe é

simultâneo à decidualização, é possível que citocinas e outros fatores humorais presentes localmente no endométrio decidualizado estejam envolvidos na iniciação ou regulação da diferenciação das células NKu (YE *et al.*, 1996). STEWART (1983; 1987) tem proposto que, em função da íntima relação entre células do estroma e células NKu, fatores ainda não conhecidos, derivados de células do estroma ativadas por hormônios, possam desempenhar papel importante na diferenciação das células NKu. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que as células NKu não se diferenciam sem a decidualização do estroma (PEEL, 1989).

A formação e a diferenciação da glândula metrial em animais pseudográvidos sugerem que fatores maternos, mais do que fetais, sejam responsáveis pela indução da diferenciação das células NKu (YE *et al.*, 1996). Segundo STEWART (1987) a progesterona parece facilitar a diferenciação de células Nku, embora não tenha ação direta nestas células. Porém, estudos mais recentes utilizando PCR-RTA, imunocitoquímica e hibridização *in situ* constataram a expressão de receptores para progesterona em 63% das células NKu em camundongos (VAN DEL HEUVEL *et al.*, 1996), sugerindo que estas células possam sofrer a ação deste hormônio. O estrógeno parece também desempenhar um papel importante na atração de células precursoras de células NKu para o útero durante o ciclo estral em camundongos (PEEL & STEWART, 1986). VAN DEL HEUVEL *et al.* (1996) demonstraram que a expressão de receptores para estrógeno abrange 90% da população de células NKu em camundongos. No entanto, é difícil estabelecer se estes hormônios são importantes na fisiologia das células NKu, dado que em ratos estas células não expressam receptores nem para a progesterona e nem para o estrógeno (OGLE *et al.*, 1997).

Sendo as células NKu pertencentes à linhagem de células NK, pressupõe-se que as mesmas citocinas capazes de estimular as últimas e/ou induzir a expressão de mediadores citolíticos estejam também envolvidos no controle do

desenvolvimento das células NKu (YE *et al.*, 1996). Esta hipótese é corroborada pelo fato destas células compartilharem a expressão de alguns receptores de citocinas, ou de cadeias destes, tais como IL-2R α , β , γ , TNF- α R e IFN γ R (CROY *et al.*, 1996-97). Curiosamente, a cadeia IL-2R γ é comum aos receptores das citocinas IL-4, IL-7 e IL-15, um novo fator de crescimento de células NK (GIRI *et al.*, 1994).

Muitas citocinas têm se mostrado capazes de induzir a diferenciação e ativação de células NK e linfócitos T citotóxicos, e induzir ou reprimir a expressão de perforina e granzimas nestas células. Dentre estas citocinas tem-se as IL-2, IL-6, IL-7, IL-12 (HERBERMAN, 1982; LIU *et al.*, 1989; HUNT, 1989; SMYTH *et al.*, 1990; SALCEDO *et al.*, 1993).

A IL-2, normalmente produzida por linfócitos T (PARR. *et al.*, 1991), é mediadora da ativação de células NK (ORTALDO & HERBERMANN, 1984). No entanto, poucos linfócitos T são encontrados no útero no período em que se dá a diferenciação das células NKu (PARR. *et al.*, 1991). Além disso, CROY *et al.*, (1997b) demonstraram que a diferenciação da glândula metrial e das células NKu ocorre normalmente em camundongos IL-2 $-/-$. Portanto, a IL-2 não seria necessária para a viabilidade das células NKu precursoras, nem para a iniciação da diferenciação das células NKu.

Mais recentemente, YE *et al.* (1996) descreveram a ação da interleucina IL-15 em células NKu, que exhibe algumas atividades semelhantes da IL-2 em outras células NK. A IL-15 parece ser produzida por uma variedade de tipos celulares, mas não por linfócitos T, como acontece com a IL-2. Os resultados obtidos por estes autores sugerem que a IL-15 e não a IL-2 estaria correlacionada com a diferenciação das células NKu.

O aparecimento, localização e diferenciação normais das células NKu em camundongos transgênicos SCID, deficientes em células T e B, indicam que estas últimas não apresentam papel regulatório durante o estabelecimento da linhagem das células NKu (CROY *et al.*, 1994). Alguns autores (LI *et al.*, 1991;

LOHMANN-MATTHES, 1991) sugerem que precursores de macrófagos, sob influências combinadas de CSF-1 e IL-2, tornariam-se células “NK-like”. No entanto, a análise de sítios de implantação de camundongos que expressam osteopetroses (op/op), caracterizados pela incapacidade em produzir a citocina CSF-1, mostrou que a diferenciação das células NKu progride normalmente. Sendo assim, deduz-se que a citocina CSF-1 não é requerida na diferenciação de células NKu e estas não se diferenciam a partir de precursores de macrófagos (KISO *et al.*, 1992b).

GUIMOND *et al.* (1996) constataram que a diferenciação das células NKu ocorre normalmente em animais W/W^y, caracterizados pela deficiência em mastócitos devido a uma mutação no gene que codifica para o receptor do fator de crescimento para este tipo celular (YOKOI *et al.*, 1994; ANDERSON *et al.*, 1990).

1.4. Obtenção e manutenção de células NKu *in vitro*

O cultivo celular proporciona o estabelecimento de um sistema de estudo *in vitro*, desde que a viabilidade e atividades funcionais das células estejam preservadas e controladas. A grande vantagem deste sistema é, sobretudo, a possibilidade de se controlar as variáveis no experimento, o que não é possível de ser realizado completamente *in situ*. Desta forma, tanto o cultivo celular, quanto o ensaio *in vitro* com células isoladas constituem importantes ferramentas para aquisição de informações precisas acerca do comportamento celular.

A compreensão acerca da diferenciação e ativação das células NKu, bem como a de determinar as funções desempenhadas por estas no útero, depara-se com a dificuldade de ser este um ambiente extremamente complexo e dinâmico. Diante destas dificuldades, foram realizadas inúmeras tentativas de se isolar e desenvolver experimentos *in vitro* com as células NKu.

PARR *et al.* (1990a) utilizaram métodos mecânico e enzimático com o intuito de se obter células NKu isoladas para o cultivo celular. No entanto, as células assim obtidas mostraram-se muito frágeis aos processos de manipulação utilizados, não preservando as características morfológicas observadas para as células NKu *in situ*. Funcionalmente, estas células, quando tratadas com meio condicionado obtido do cultivo (por 48 horas) de células esplênicas estimuladas pela concanavalina-A, não induziram a lise de células-alvo YAC (PARR *et al.*, 1990a).

STEWART *et al.* (1996), obtiveram células NKu em suspensão, preparadas a partir da dissociação enzimática de glândulas metriais de ratos, para avaliar a sua atividade citotóxica natural. Este ensaio, comumente utilizado para medir a habilidade das células NK em geral em lisar células-alvo Wehi 164, demonstrou que as células NKu exibiam altos níveis de citotoxicidade, desde que os ensaios tivessem duração prolongada, acima de 20 horas.

Recentemente, KISO *et al.* (1998) empregaram o método imunomagnético como alternativa para o isolamento das células NKu. Os autores reportavam o sucesso neste procedimento, por meio do uso do anticorpo anti-asialo-GM-1 conjugado às esferas magnéticas, para obtenção de células NKu íntegras quando avaliadas na ultra-estrutura. Porém, não há qualquer menção neste trabalho sobre a manutenção da sua funcionalidade. A asialo-GM-1 é conhecida como sendo uma molécula presente na superfície dos linfócitos citotóxicos relacionada com a citotoxicidade, uma vez que a sua inibição pelo anti-asialo-GM-1 reduz a atividade citolítica destas células (HARGROVE & TING, 1988; PARR *et al.*, 1991). Isto sugere que as células NKu obtidas pelo método preconizado por KISO *et al.* (1998) teriam sua funcionalidade afetada para posteriores ensaios *in vitro*.

MUKHTAR & STEWART (1988, 1993a) padronizaram a técnica para isolamento e cultivo das células NKu a partir de cultivo de explantes da

glândula metrial. Estes autores constataram que as mesmas apresentavam alta motilidade e migravam para fora do explante. O pico de migração destas células ocorria durante os primeiros dois dias de cultura e reduzia progressivamente nos explantes obtidos de animais em estágios mais avançados de gestação. LINNEMEYER & POLLACK (1991) sugeriam que a migração das células NKu do explante seria dependente do nível de IL-2 adicionada ao meio e limitada a um curto período de tempo, por volta do 8º ddc.

Embora a técnica de cultivo de explantes da glândula metrial represente uma metodologia alternativa para obtenção das células NKu, tal técnica apresenta alguns obstáculos. Segundo CROY *et al.* (1997c), as células NKu não proliferam ou se diferenciam em cultura, porém, a sua viabilidade pode ser prolongada por até 14 dias na presença de alguns componentes da matriz, a laminina e a fibronectina. Outra limitação seria o pequeno número (não quantificado) de células NKu que poderiam ser isoladas do explante (CROY *et al.*, 1997c).

Não obstante, as células NKu isoladas do explante uterino têm sido utilizadas em vários ensaios *in vitro*, particularmente para correlacionar o seu comportamento com as demais células NK.

CROY *et al.* (1991c) avaliaram, por meio de ensaios de citotoxicidade medida pela liberação de Cr, o potencial das células NKu de lisar células YAC e células-alvo de células killer ativadas por linfocinas (LAK), as células P815. Estes autores demonstraram que as células NKu obtidas a partir do cultivo de explantes da glândula metrial foram incapazes de lisar células-alvo YAC. Porém, a lise mediada por células NKu pôde ser alcançada, quando as mesmas foram cultivadas em meio contendo IL-2. Em contrapartida, estas células foram incapazes de causar a lise de células-alvo P815, mesmo quando cultivadas sob estímulo desta interleucina.

STEWART & MUKHTAR (1988) e PEEL & ADAM (1991) mostraram por meio da observação direta utilizando videomicroscopia que as células Nku de

camundongos e de ratos, obtidas do cultivo de explantes, eram capazes de matar trofoblastos do labirinto, quando co-cultivadas. Dados semelhantes foram descritos em estudos utilizando-se células NK esplênicas ativadas com IL-2 (DRAKE & HEAD, 1989). Em contrapartida, células NKu de porcos não requeriam tratamento com IL-2 para desenvolverem atividade lítica contra células trofoblásticas *in vitro* (CROY *et al.*, 1994).

Os resultados acima descritos demonstram a importância dos estudos *in vitro* como uma ferramenta fundamental para a elucidação das funções e dos mecanismos que envolvem a diferenciação celular. No entanto, segundo CROY *et al.* (1997c), pequenas modificações introduzidas às estratégias de cultivo podem tornar as preparações de células NKu bastante distintas entre os laboratórios, resultando em dados muito diversos e pouco conclusivos.

Dentre os vários procedimentos descritos na literatura, destaca-se as células NKu obtidas do explante da glândula metrial, que aparentam maior viabilidade. Contudo, mesmo com os vários estudos empregando o cultivo de explantes da glândula metrial, como metodologia para isolamento de células NKu, não se conhece o efeito deste procedimento sobre as NKu. Além disso, nenhum dos estudos relatados apresenta uma análise morfológica em nível ultra-estrutural das células NKu, de modo que não se pode aferir o grau de integridade das células utilizadas nos ensaios. Na ausência de um outro método suficientemente adequado para avaliar a viabilidade das células NKu isoladas e mantidas *in vitro*, a avaliação da integridade morfológica torna-se imprescindível como parâmetro de referência para aferir a viabilidade destas células antes, durante e após os ensaios *in vitro*.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

Objetivo Geral:

- Estabelecer as condições de cultivo primário do explante da glândula metrial de camundongos para obtenção de células NKu viáveis e os parâmetros referenciais da integridade destas células para fins de ensaios *in vitro*.

Objetivos Parciais:

- Estabelecer as condições de cultivo primário da glândula metrial para a obtenção de células NKu.
- Avaliar a integridade celular por meio de métodos citoquímicos e morfológicos ultra-estruturais das células NKu obtidas em diferentes condições de cultivo.
- Estabelecer os parâmetros referenciais da integridade das células NKu destinadas aos ensaios *in vitro*.
- Avaliar a viabilidade das células NKu obtidas *in vitro* por meio da análise do seu comportamento sob exposição à lectina *Dolichos biflorus* (DBA).

3. MATERIAL E MÉTODOS

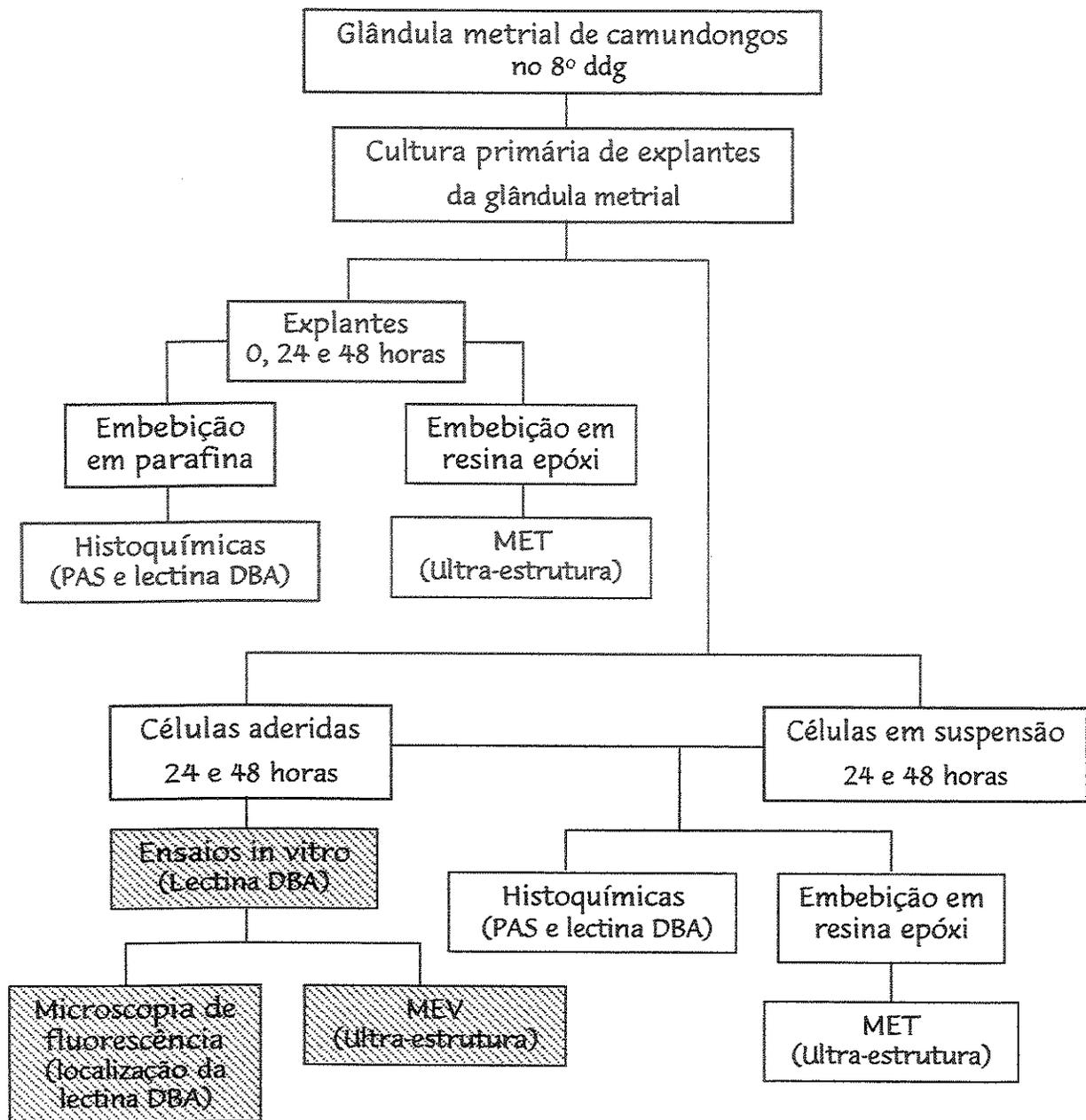


Figura 1 - O fluxograma esquematiza a seqüência dos experimentos realizados em duas etapas. A primeira etapa (delimitadas por áreas retangulares, brancas) demonstra a seqüência para o estabelecimento das condições de cultivo para obtenção de células NKu e os seus métodos de análise. A segunda etapa (delimitadas por áreas retangulares achuriadas) demonstra a seqüência dos ensaios *in vitro* realizados com as células NKu e suas formas de análise.

O presente experimento foi conduzido em duas etapas, conforme apresentado no fluxograma da figura 1.

3.1. Animais

Camundongos fêmeas *Mus musculus* da linhagem Swiss, com idade de 12 a 16 semanas, procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP, foram acasalados com machos da mesma linhagem e o dia em que, pela manhã, se constatou o tampão vaginal, foi considerado o 1º dia de gestação (ddg).

As fêmeas prenhes no 8º ddg foram sacrificadas por deslocamento cervical. Sob condições assépticas, realizou-se a laparotomia dos animais e constatada a presença de sítios de implantação embrionários, os cornos uterinos foram dissecados e imediatamente imersos em meio Hank's, para obtenção das glândulas metriais.

3.2. Estabelecimento do cultivo primário de explantes da glândula metrial

Esta etapa foi baseada na técnica descrita por MUKHTAR & STEWART (1988) para a obtenção dos explantes de glândula metrial. Na câmara de fluxo laminar, cada sítio de implantação foi individualmente dissecado e a região da glândula metrial foi recortada em quatro fragmentos de aproximadamente 1mm³. Estes fragmentos (explantes) foram distribuídos em placas de cultura de 35x10mm (Corning Costar Corporation, Cambridge/USA), ou em placas de cultivo de 24 wells contendo lamínulas de vidro (diâmetro 13mm) ou plásticas (Nunc/USA). Os explantes foram mantidos em diferentes meios de cultivo, conforme descrito no item 3.3, a 37°C, em estufa (modelo 2123TC, Shell Lab) de atmosfera úmida com nível de 5% de CO₂, por um período de 24 ou 48 horas.

3.3. Meios de cultivo e variação de suplementos testados

- Meio essencial mínimo (MEM) acrescido de 1% de glutamina e 0,125% de

gentamicina (padrão) e 5% de soro fetal bovino (SFB);

- MEM padrão, acrescido de 20% de SFB;
- MEM padrão, acrescido de 5% de SFB e 20% de meio condicionado esplênico (MCE, vide 3.3.1.);
- MEM padrão, acrescido de 20% de SFB e 20% de MCE;
- RPMI acrescido de 1% de glutamina e 0,125% de gentamicina (padrão) e 5% de SFB;
- RPMI padrão, acrescido de 20% de SFB;
- RPMI padrão, acrescido de 5% de SFB e 20% de MCE;
- RPMI padrão, acrescido de 20% de SFB e 20% de MCE.

3.3.1. Obtenção do meio condicionado esplênico (MCE)

Foram utilizados baços dos próprios animais doadores dos explantes de glândula metrial. Quando da remoção dos sítios de implantação, o baço foi retirado, imediatamente imerso em meio de lavagem Hank's e processado de acordo com GULLBERT *et al.* (1981), modificado como segue.

Sob condições assépticas, o baço foi macerado e a suspensão celular obtida foi centrifugada a 213g, durante 10 minutos. Após hemólise em tampão de lise (solução aquosa de NH_4Cl 0,83%, KHCO_3 0,1%, EDTA 0,0037%) a suspensão celular foi lavada e ressuspensa em meio RPMI padrão, acrescido de 5% de SFB.

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o Azul de tripan e a concentração ajustada para 2×10^6 células/ml. Alíquotas de 10ml desta suspensão celular foram distribuídas em frascos de cultura (Corning Inc./USA), estimuladas com Con-A (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e incubadas em estufa de atmosfera úmida, com nível de 5% de CO_2 a 37°C.

Após 24 horas de cultivo, a suspensão celular foi centrifugada e o sobrenadante recolhido. Este foi tratado com Methyl α - D - Mannopyranoside (20mg/ml), filtrado em membrana 0,2 μm (Millipore), aliqotado e

mantido no freezer, a -20°C , até o momento do uso.

3.4. Processamento das células obtidas em cultura

Os cultivo dos explantes da glândula metrial foram monitorados em tempos regulares por meio da observação em microscópio de luz invertido com contraste de fase (Axiovert, Zeiss). Nestas observações foi constatada a presença de células aderidas à superfície e em suspensão no meio, além do próprio explante. Estas amostras foram processadas de acordo com as estratégias empregadas em cada uma das etapas que se segue:

3.4.1. Coleta e processamento dos explantes

3.4.1.1. Explantes residuais após o período de 24 e 48 horas de cultivo

Os explantes mantidos em cultivo nas diversas condições de meio e tempo foram coletados e imediatamente fixados em solução de paraformaldeído a 4% em tampão-fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4, por 2 horas, e processados para a embebição em parafina, conforme técnica histológica rotineira, ou fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão-fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4, por 2 horas, e processados para a embebição em resina epóxi, conforme descrito no item 3.6.

Cortes de parafina de $5\mu\text{m}$ de espessura foram coletados em lâminas histológicas pré-tratadas com poli-L-lisina e, então, destinados às análises histoquímicas em microscopia de luz.

3.4.1.2. Explantes controles no tempo zero (0)

Explantes de glândula metrial, imediatamente após a dissecação, foram fixados e processados conforme descrito em 3.4.3.1, para os explantes residuais.

3.4.2. Células em suspensão

Foram coletadas as células em suspensão no meio, após 24 e 48 horas de cultivo para:

3.4.2.1. Análises em microscopia de luz (ML):

As células em suspensão foram concentradas por centrifugação (Centrífuga Micro Centaur/SANYO) e os *pellets* obtidos foram ressuspensos em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão-fosfato-salina 0,1M, pH 7,4, na qual as células permaneceram durante 15 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas em tampão fosfato-salina 0,05M, pH 7,4 e, em seguida, citocentrifugadas (Citocentrífuga Incibrás, a 200g, durante 7 minutos) para aderência em lâminas histológicas, previamente recobertas com poli-L-lisina.

3.4.2.2. Análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET):

As células foram concentradas por centrifugação e os *pellets* obtidos foram ressuspensos em solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% em tampão-fosfato-salina 0,1M, pH 7,4, na qual as células permaneceram por 30 minutos. Após a fixação, as células foram centrifugadas (855g, por 10 minutos) e os *pellets* obtidos foram incluídos em agarose 1% (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) ou em solução tampão-fosfato-salina/BSA 10% e, então processados para embebição em resina epóxi (conforme item 3.6)

3.4.3. Células aderidas

Realizada a análise a fresco em microscopia de fase ou de interferência (Eclipse 800, Nikon), as células aderidas às placas de cultivo ou às lamínulas, após 24 e 48 horas de cultivo foram coletadas para:

3.4.3.1. Análises histoquímicas em microscopia de luz:

As células aderidas foram coletadas e processadas de duas maneiras distintas:

1 - Raspagem mecânica das células, com o uso de *cell scraper* (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA), após fixação química em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão-fosfato 0,1M, pH 7,4, por 15 minutos. Após lavagem em tampão-fosfato-salina 0,05M, pH 7,4, as células aderidas foram centrifugadas em *pellets*, os quais foram ressuspensos em 100µl de tampão-fosfato-salina 0,05M, pH 7,4. A suspensão celular resultante foi citocentrifugada para aderência em lâminas histológicas previamente tratadas com poli-L-lisina e, após secagem à temperatura ambiente, as células foram submetidas às reações histoquímicas, conforme descrito no item 3.5.

2 - Fixação das células aderidas em lamínulas de vidro ou plásticas em solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão-fosfato-salina 0,1M, pH 7,4, por 15 minutos.

Após fixação, as células foram lavadas e submetidas às reações histoquímicas.

3.4.3.2. Análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET):

As células aderidas foram coletadas e processadas de duas maneiras distintas:

1 - Raspagem mecânica das células, com o uso de *cell scraper*, após fixação química em solução fixadora de glutaraldeído a 2,5% em tampão-fosfato 0,1M, pH 7,4, por 30 minutos. As células foram centrifugadas em *pellets*, os quais foram incluídos em agarose 1% ou em solução tampão-fosfato-salina/BSA 10% e então processados para inclusão em resina epóxi (conforme item 3.6).

2 - Fixação das células aderidas em lamínulas de vidro em solução fixadora de glutaraldeído 2,5% em tampão-fosfato 0,1M, pH 7,4, por 30 minutos. Após fixação, as células foram processadas para embebição em resina epóxi (conforme item 3.6.).

3.5. Procedimentos histoquímicos

3.5.1. Histoquímica de *periodic acid Schiff* (PAS)

A histoquímica de PAS foi realizada nos seguintes materiais:

a) cortes de parafina dos explantes de glândula metrial (controle, 24 e 48h pós-cultivo) obtidos em 3.4.3.;

b) células em suspensão no meio de cultivo, após 24 e 48 horas de cultivo, obtidas em 3.4.1.1.;

c) células aderidas a lamínulas de vidro ou plásticas, após 24 e 48 horas em cultivo, obtidas em 3.4.2.1.

A reação de PAS foi precedida pelo tratamento com amilase, diluída a 1% em água destilada, à 37°C, durante 45min a 1 hora.

As etapas da reação constituíram-se em:

1. lavagem em água destilada;
2. oxidação com ácido periódico 0,5% durante 10min;
3. lavagem em água destilada durante 5min;
4. reagente de Schiff durante 9min no escuro;
5. lavagem rápida em água destilada;
6. lavagem em bissulfito de sódio 0,5% durante 9min;
7. lavagem em água destilada;
8. coloração com hematoxilina de Harris, durante 15 segundos;
9. tratamento com solução saturada de carbonato de lítio, durante 15 segundos;
10. desidratação em gradiente crescente de etanol (70, 80, 95 e 100%), 5min cada;
11. montagem em bálsamo sintético - Entellan.

3.5.2. Histoquímica de lectina DBA

A histoquímica de lectinas foi realizada nos mesmos materiais submetidos à histoquímica de PAS.

A seqüência para esta reação constituiu-se em:

1. lavagem em tampão-fosfato-salina 0,05M, pH 7,4, durante 15min;
2. tratamento com tampão fosfato-salina 0,01M, pH 7,4, contendo peróxido de hidrogênio a 0,3%, durante 30 min, em câmara úmida, à temperatura ambiente.
3. lavagem em tampão-fosfato-salina 0,05M, pH 7,4, durante 15min;
4. tratamento com tampão-fosfato-salina/BSA 1%, durante 30min, em câmara úmida, à temperatura ambiente;
5. incubação com lectina DBA conjugada com biotina diluída na proporção de 1:300 em tampão-fosfato-salina/BSA 1%, pH 6,8, durante 3 a 12 horas, em câmara úmida, a 4°C;
6. lavagem com tampão fosfato-salina 0,05M, pH 7.4, durante 15min;
7. incubação com complexo estreptoavidina-peroxidase, durante 1 hora, em câmara úmida, à temperatura ambiente;
8. lavagem com tampão-fosfato-salina 0,05M, pH 7,4;
9. lavagem com tampão-tris-salina 0,05M, pH 7,4;
10. revelação com diaminobenzidina (0,5mg/ml) em tampão-tris-salina 0,05M, pH 7,4 e peróxido de hidrogênio a 0,3%, durante 5min;
11. coloração com hematoxilina de Harris, durante 15 segundos;
12. tratamento com solução saturada de carbonato de lítio, durante 15 segundos;
13. desidratação em gradiente crescente de etanol (70, 80, 95 e 100%), 5min cada;
14. montagem em bálsamo sintético - Entellan.

Cada reação foi acompanhada de um controle negativo, no qual se omitiu

a incubação do preparado com a lectina DBA.

3.6. Procedimentos para microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Foram utilizados os materiais procedentes de:

- a) explantes controle e residuais obtidos após 24 e 48h de cultivo, obtidos em 3.4.3.;
- b) *pellets* de células em suspensão, após 24 e 48 de cultivo, obtidos em 3.4.1.2.;
- c) células aderidas a lamínulas de vidro, após 24 e 48 horas em cultivo, ou seus respectivos *pellets* de raspado, obtidos em 3.4.2.2.

Estes materiais, previamente fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, foram processados de acordo com as seguintes etapas:

1. lavagem em tampão-fosfato-salina 0,05M, pH 7,4, durante 15min;
2. pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio 1%, em tampão-fosfato de sódio 0,1M, pH 7.4, durante 1 hora, a 4°C;
3. lavagem em tampão-fosfato-salina 0,05M, pH 7,4, durante 15min;
4. desidratação em gradiente crescente de etanol (50, 70, 80, 95 e 100%) durante 30min cada;
5. embebição em mistura de etanol e óxido propileno na proporção 1:1 durante 20 minutos, óxido propileno puro durante 20 minutos e mistura de óxido propileno e resina epóxi na proporção 1:1 durante 1 hora;
6. embebição em resina pura durante 12 horas;
7. polimerização a 60° C durante 72 horas.

Foram obtidas secções semifinas, de 500nm de espessura, no ultramicrotomo (Leica, modelo Ultracut UCT). Estes cortes foram corados com Azul de Toluidina a 0,5% para análise prévia em microscópio de luz.

Os cortes ultrafinos de 70nm obtidos no ultramicrotomo foram coletados em telas de cobre e contrastados em acetato de uranila a 2%, por 15 minutos, e em citrato de chumbo a 0,5%, por 5 minutos. Os cortes foram

analisados em microscópio eletrônico de transmissão LEO Schott Zeiss EM 906.

Em se tratando das células aderidas às lamínulas de vidro, após a polimerização completa da resina, as lamínulas foram removidas após fratura em nitrogênio líquido e, então, realizada a microtomia.

3.7. Estimativa do rendimento de células NKu aderidas, obtidas a partir dos explantes da glândula metrial

A estimativa do rendimento de células NKu, obtidas a partir de explantes da glândula metrial, foi realizada nas populações de células aderidas em lamínulas, submetidas à histoquímica de lectina DBA.

Para esta estimativa foram empregadas as condições de cultivo que se seguem, mantidas por 24 e 48 horas.

- MEM padrão, acrescido de 5% de SFB;
- MEM padrão, acrescido de 5% de SFB e 20% de MCE;
- RPMI padrão, acrescido de 5% de SFB;
- RPMI padrão acrescido de 5% de SFB e 20% de MCE.

As populações de células aderidas foram computadas em sua totalidade, com as contagens tendo sido realizadas em duplicatas. Para esta estimativa, foram consideradas apenas as células em que se conseguia distinguir o núcleo. Foram estabelecidos dois grupos:

a) Grupo 1: de células NKu aderidas

Foram computadas aquelas células nucleadas, com reação positiva à lectina DBA localizada na superfície celular e nos grânulos citoplasmáticos.

b) Grupo 2: das demais células, excluindo-se as hemácias.

Foram consideradas todas aquelas células nucleadas, que se apresentavam negativas à lectina DBA.

3.8. Ensaio *in vitro*

Para fins de ensaio, as células NKu foram obtidas a partir de explantes posicionados, dois a dois, sobre lamínulas de vidro ou plásticas, dispostas nos *wells* de placas de cultivo, contendo 2ml de meio. O meio utilizado foi o RPMI padrão acrescido de 5% SFB. Após 24 horas de cultivo, os explantes residuais e o meio de cultivo foram removidos, e as células aderidas às lamínulas foram lavadas com meio de lavagem Hank's.

3.8.1. Exposição de células aderidas à lectina DBA

O meio de lavagem Hank's foi substituído pelo meio RPMI padrão, com 5% de SFB, e acrescido de 1,25 ou 2,5µg/ml de lectina DBA biotinada. As células foram mantidas neste meio por 30 minutos, 1 e 2 horas em estufa de atmosfera úmida com nível de 5% de CO₂.

Realizados os ensaios, as células aderidas foram lavadas e imediatamente fixadas em acetona por 10 minutos, a -20° C, para a localização da lectina DBA em microscopia de fluorescência, ou, fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão-fosfato 0,1M, pH 7,4, por 30 minutos para processamento em MEV.

Como controle dos ensaios, as células foram lavadas em Hank's e mantidas em cultivo no meio RPMI padrão com 5% de SFB, sem adição da lectina.

3.8.2. Localização da lectina DBA biotinada pela microscopia de fluorescência

Os preparados fixados em acetona foram lavados em PBS 0,1 M, pH 7,4 e incubados com estreptoavidina conjugado à fluoresceína, diluída a 1:1000 em tampão-fosfato 0,1M, pH 7,4, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem e montagem em meio Vectashield, as observações foram realizadas no microscópio de fluorescência (Eclipse 800, Nikon).

Células aderidas controles (não expostas à lectina DBA) foram fixadas em acetona por 10 minutos, lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4 e tratadas com

tampão-fosfato-salina/BSA 1%, durante 30min, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Em seguida, estas células foram incubadas com lectina DBA conjugada a biotina diluída na proporção de 1:300 em tampão-fosfato-salina/BSA 1%, pH 6,8, durante 3 horas, em câmara úmida, a 4°C. Para a revelação foi utilizada a estreptoavidina conjugada com fluoresceína, para observação em microscopia de fluorescência.

3.8.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Células NKu aderidas, submetidas à ação da lectina DBA em diferentes tempos e concentrações, foram processadas para avaliação em MEV.

Os preparados fixados foram submetidos à:

1. lavagem em tampão-fosfato-salina 0,05M, pH 7,4, 3 x 5min;
2. pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em tampão-fosfato-salina 0,1M, pH 7,4, durante 30min;
3. desidratação em gradiente crescente de etanol 50, 70, 80, 95 e 100% durante 10 min cada.

Após a desidratação, realizou-se o ponto crítico destas amostras e as lamínulas foram montadas em suportes de alumínio (1,3cm de diâmetro). Em seguida, foi realizada cobertura do material com ouro/paladium, empregando-se um "Sputter Coater", modelo SCD 050 (BAL-TEC).

As observações foram realizadas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM - 5800 LV.

4. RESULTADOS

Os explantes da glândula metrial mantidos em cultivo aderiam-se na superfície das lamínulas ou das placas de cultivo, embora não chegassem a se fixar fortemente à mesma, sendo facilmente destacados. Independentemente das condições ou dos tempos de cultivo avaliados, macroscopicamente os explantes mantinham-se como uma massa tecidual. Nas proximidades destes, pela microscopia de contraste de fase (fig. 2), foram constatadas invariavelmente formas celulares aderidas à superfície da placa e formas celulares em suspensão no meio de cultivo.

As análises morfológicas e histoquímicas foram focalizadas nos explantes mantidos em diferentes condições e tempos de cultivo, assim como das células originadas destes, encontradas tanto em suspensão no meio de cultivo, quanto aderidas na superfície das lamínulas e placas.

4.1. Glândula metrial

4.1.1. Explantes controles (tempo 0 hora)

Os cortes histológicos dos explantes-controles de glândula metrial submetidos à reação histoquímica de PAS apresentavam numerosas células grandes, de aspecto globoso, núcleo ovóide com cromatina descompactada, nucléolo evidente e citoplasma contendo grânulos PAS positivos, amilase-resistentes. Tais células foram reconhecidas como sendo células NKu (fig. 3).

Junto com as células decíduais negativas à reação de PAS, as células NKu formavam traves celulares, delimitando vasos sanguíneos (fig. 3).

Pela histoquímica de lectina DBA foram encontradas, em toda a extensão do explante (fig. 4), células de aspecto globoso, núcleo ovóide com cromatina pouco condensada, nucléolo evidente e citoplasma contendo grânulos DBA positivos bem delineados, além de intensa marcação na superfície celular (fig. 5). Esta descrição e padrão de marcação caracterizam células NKu submetidas à histoquímica de lectina DBA.

Na análise pela MET foi constatada a presença de células com citoplasma amplo, contendo grânulos esferoidais de contornos regulares, com dimensões e eletrondensidades variadas (fig. 6). Estes grânulos apresentavam uma área central, maior e homogênea e uma região periférica, constituindo um capuz eletrondenso formado por inúmeras vesículas membranosas pequenas (fig. 7). Constatou-se, ainda, a presença de outras organelas, tais como mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático. No núcleo predominava a cromatina descompactada. Estas características ultra-estruturais correspondem às das células NKu. Tais células foram observadas em meio às células decíduais, caracterizadas pelo formato poligonal, núcleo esférico com cromatina descompactada e nucléolos evidentes. O citoplasma contendo organelas, tais como retículo endoplasmático, complexo de Golgi e mitocôndrias, apresentava-se mais eletrondenso do que o das células NKu. Foram constatadas algumas junções do tipo *adherens* e *nexus* entre estas células.

4.1.2. Explantes residuais (24 e 48 horas)

Nos cortes histológicos de explantes residuais da glândula metrial, cultivados por períodos de 24 e 48 horas em diferentes meios de cultivo, pôde ser constatada a existência de duas regiões distintas, sendo uma periférica e outra central.

Pelo emprego da histoquímica de PAS, foi constatada na região periférica a presença das células grandes, com núcleo ovóide, cromatina pouco condensada, e grânulos citoplasmáticos PAS positivos (figs. 8 e 9). Tais células, identificadas como células NKu, foram também observadas com freqüência projetando-se na superfície do explante (fig. 8). As células do estroma uterino apresentavam-se aparentemente íntegras e negativas à histoquímica de PAS. Estas células caracterizavam-se como sendo grandes, com núcleo esférico e cromatina frouxa, nucléolo evidente, citoplasma amplo e levemente basófilo.

Foram observadas também células menores, com núcleo esférico, cromatina condensada e citoplasma levemente basófilo (figs. 8 e 9).

Na região central do explante, foram observadas raras células integras positivas à reação PAS após 24 horas de cultivo. As células de dimensões diversas apresentavam na sua grande maioria sinais de degeneração (figs. 8 e 10). A organização das células em traves delimitando os vasos sanguíneos, não mais foi observada em quaisquer dos explantes residuais obtidos após cultivo nas condições empregadas.

Por meio da histoquímica de lectina DBA constatou-se reação positiva nos grânulos citoplasmáticos e na superfície das células NKu concentradas na região periférica do explante mantidas em cultivo por 24 e 48 horas, independentemente do meio de cultivo utilizado (figs. 11 e 12). Nesta região foram também encontradas células do estroma endometrial lectina DBA negativas, predominando aquelas que apresentavam núcleo ovóide, com cromatina descompactada, nucléolo evidente e citoplasma bastante amplo, porém claro (figs. 11 e 12).

Na região central de explantes residuais mantidos 24 horas em cultivo, foram encontradas raras células lectina DBA positivas íntegras à semelhança do que foi observado com a técnica de PAS. Foi comum observar reações DBA positivas nas células em flagrante estado de degeneração e em fragmentos celulares. Após 48 horas, foram observadas reações lectina DBA positivas apenas em fragmentos celulares (fig. 13).

As regiões periférica e central observadas na microscopia de luz, também foram analisadas no estudo ultra-estrutural dos explantes residuais

Os explantes residuais cultivados por 24 ou 48 horas em meios MEM e RPMI padrões, sem a adição do MCE, demonstraram a presença de células NKu íntegras na região periférica (fig. 14), embora também estivessem presentes células NKu rompidas e em estágios avançados de degeneração. Nesta região, as

células do estroma endometrial também apresentavam características ultra-estruturais bem preservadas na sua grande maioria. Após 48 horas de cultivo nestas condições, foi constatada frequência maior de células NKu degeneradas, especialmente na superfície dos explantes, restando apenas fragmentos celulares e, eventualmente, grânulos citoplasmáticos característicos (fig. 15).

Com a suplementação pelo MCE tanto em meio RPMI quanto em MEM contatou-se, já em 24 horas de cultivo, maior incidência de células NKu rompidas ou demonstrando sinais de degeneração, à semelhança do que se observou em cultivo de 48 horas sem suplementação do MCE. Em 48 horas, com a suplementação pelo MCE, predominavam células rompidas e degeneradas.

Independentemente das condições de cultivo e tempos empregados, a região central dos explantes residuais apresentava uma degeneração celular generalizada. A identificação de resquícios de células NKu, nesta região, foi possível apenas quando da presença de seus grânulos citoplasmáticos ainda preservados. Estas células exibiam nucléolo com extensas áreas de cromatina condensada e formações vesiculares no citoplasma, além da membrana plasmática apresentar-se descontínua (fig. 16). As células do estroma uterino apresentavam-se igualmente degeneradas (fig. 17). Em meio aos fragmentos celulares era comum a presença de grânulos citoplasmáticos de células Nku totalmente livres.

Após 48 horas de cultivo, especialmente nos explantes cultivados em meios suplementados com o MCE, constatou-se na região central um predomínio de fragmentos celulares de origem irreconhecível (fig. 18).

Os explantes mantidos em meios de cultivo MEM ou RPMI, com a adição do SFB a 5 ou 10% , não apresentaram células NKu com padrões histoquímicos e morfológicos diferentes entre sí.

4.2. Células aderidas

Independentemente das condições de cultivo adotadas, formas celulares com morfologias diversas, bem como hemácias, foram observadas aderidas na superfície das placas de cultivo ou das lamínulas. Estas células rareavam a medida que elas se afastavam do ponto de aderência do explante, formando um gradiente de concentração celular (fig. 2).

Com 24 horas de cultivo, quando observadas ao microscópio de interferência, destacavam-se células globosas grandes, contendo granulações citoplasmáticas e pequenas gotículas lipídicas (fig. 19). Freqüentemente estas células apresentavam finos prolongamentos citoplasmáticos na sua superfície, uniformemente distribuídos, ou concentrados em regiões específicas. Pela histoquímica de PAS, estas células foram caracterizadas como sendo células NKu pelo seu núcleo geralmente excêntrico, contendo nucléolo evidente e pelo amplo citoplasma, repleto de conteúdo PAS positivo amilase resistente (fig. 20).

Por meio da histoquímica de lectina DBA, grande quantidade de células obtidas de cultivos por 24 horas, sem o MCE, foram igualmente identificadas como sendo células NKu dada a positividade na superfície celular (figs. 21 e 22).

Tanto na histoquímica de PAS como na histoquímica de lectina DBA, ainda foram observadas células pequenas PAS e DBA negativas. Estas apresentavam núcleo esférico, cromatina condensada, citoplasma pouco corado e reduzido. Foi também constatada a presença de células maiores PAS e lectina DBA negativas, de formato alongado e contorno irregular, contendo núcleo geralmente elíptico, com cromatina descondensada, nucléolo evidente e citoplasma amplo e pouco corado. Estas células foram identificadas como fibroblastos (fig. 21).

Na análise pela MET, dentre as células aderidas obtidas em 24 horas de cultivo sem a adição do MCE, as células NKu foram facilmente reconhecidas,

uma vez que conservavam os seus grânulos citoplasmáticos característicos observados para as células NKu dos explantes-controles da glândula metrial (Fig. 23). Estas células NKu aderidas apresentavam-se menos globosas e exibiam também prolongamentos celulares. Raras células apresentavam indícios de degeneração.

Nos cultivos de 24 horas suplementados com o MCE, a maioria das células NKu apresentava, além da granulação típica e gotículas lipídicas, áreas circulares de grandes dimensões, distribuídas no citoplasma, quando observadas em microscopia de interferência (fig. 24). Quando observadas ao MET, estas células apresentavam-se íntegras, porém exibiam maior acúmulo de gotículas lipídicas, grânulos citoplasmáticos de contorno irregular, bem como vesículas citoplasmáticas eletrólúcidas, aparentemente extraídas, e de limites membranosos descontínuos (fig. 25).

Com 48 horas de cultivo sem a adição do MCE foi constatada pela microscopia de interferência, a presença de células aderidas globosas mais volumosas, mais espaiadas e com granulação citoplasmática mais evidente, ao lado de células semelhantes às descritas em 24 horas (sem a adição do MCE). Nos cultivos de 48 horas suplementados com o MCE, muitas destas células apresentavam estruturas circulares de grandes dimensões, distribuídas no citoplasma, tal qual observado para os cultivos de 24 horas, suplementados com MCE. Constatou-se ainda maior incidência de células fragmentadas (fig. 26).

Pela histoquímica de PAS, foram encontradas células NKu com o mesmo padrão de marcação observado em 24 horas. Além destas, constatou-se a presença de células PAS positivas maiores e de formatos irregulares, especialmente em cultivos suplementados com o MCE.

Pela histoquímica de lectina DBA, observaram-se células NKu marcadas positivamente. Porém, em meios suplementados com o MCE foram encontradas

células que exibiam um citoplasma mais amplo, muitas vezes de limites imprecisos ou fragmentado, e apresentavam positividade também nos grânulos citoplasmáticos (fig. 27).

Em análises ultra-estruturais de células obtidas após 48 horas de cultivo sem o MCE, foram encontradas células NKu que apresentavam boa preservação quanto ao conteúdo citoplasmático, porém com áreas acentuadas de condensação cromatínica próximas ao envoltório nuclear (fig. 28). Este mesmo padrão foi observado em meios suplementados pelo extrato de baço, porém era mais freqüente a presença de fragmentos celulares contendo ainda grânulos citoplasmáticos de células NKu.

Não foram observadas diferenças nos padrões histoquímicos e morfológicos entre as células NKu aderidas se obtidas nos meios de cultivo, MEM ou RPMI, bem como com a adição de concentrações distintas de soro fetal bovino nestes meios.

4.3. Células em suspensão

Independentemente das condições de cultivo utilizadas, após 24 horas, foram observadas, pela microscopia com contraste de fase, formas celulares íntegras em suspensão em meio de cultivo. Com a suplementação dos meios de cultivo com o MCE observou-se, além das células íntegras, fragmentos celulares em suspensão. Parte destas formas celulares, coletadas por citocentrifugação e submetidas à histoquímica de PAS, apresentaram-se PAS positivas amilase resistentes em todas as condições testadas.

Tais células, reconhecidas como células NKu, a exemplo das aderidas, caracterizavam-se pelo seu núcleo geralmente excêntrico, nucléolo evidente e por um citoplasma amplo, repleto de conteúdo PAS positivo (fig. 29). Em meio a estas células, também foram observadas células PAS negativas, pequenas, que apresentavam núcleo esférico, cromatina condensada e citoplasma pouco corado (fig. 29). Foi também constatada a presença de células volumosas PAS

negativas, que apresentavam núcleo geralmente elíptico, com cromatina descondensada, nucléolo evidente e citoplasma amplo e pouco corado que acompanhava o formato do núcleo. Estas células foram identificadas como fibroblastos.

A histoquímica de lectina DBA revelou, dentre as células em suspensão, a presença de populações celulares em suspensão cuja superfície celular e grânulos citoplasmáticos mostravam-se positivos a esta reação, independentemente das condições de cultivo utilizadas. Tais células foram reconhecidas como células NKu, porém de aspecto mais globoso (fig. 30) quando comparadas às células aderidas obtidas nas mesmas condições.

Pela MET das células em suspensão obtidas após 24 horas de cultivo, as células NKu foram facilmente reconhecidas por meio de seus grânulos citoplasmáticos. Estas células apresentavam características ultra-estruturais semelhantes àquelas observadas nas células NKu dos explantes controles e nas células aderidas, exceto pelo maior acúmulo de glicogênio e gotículas lipídicas (Fig. 31). Ao lado destas formas características foram observadas também células cujo núcleo apresentava acentuada condensação cromatínica e freqüentemente, células cujos limites da membrana plasmática eram (indefinidos) imprecisos. Algumas destas células exibiam numerosas formações vesiculares no citoplasma e foram reconhecidas como sendo células NKu apenas pela presença dos grânulos citoplasmáticos característicos (Fig. 32). Nos cultivos suplementados com o MCE, foram observadas células NKu com padrão morfológico semelhante, sendo mais freqüente a presença de células fragmentadas. Outras células provavelmente pertencentes ao estroma endometrial também apresentavam-se rompidas ou com aspecto ultra-estrutural indicativo de degeneração.

Após 48 horas de cultivo, sem a adição do MCE, foi observada pela microscopia de contraste de fase a presença de células globosas em suspensão,

aparentemente íntegras, ao lado de fragmentos celulares. Nos cultivos suplementados com o MCE, predominavam fragmentos celulares.

Pelas histoquímicas de PAS e lectina DBA destas formas celulares obtidas por citocentrifugação foram encontradas células que apresentavam padrões de marcação semelhantes aos observados em 24 horas. No entanto, em 48 horas, ressaltou-se a presença de células PAS e lectina DBA positivas maiores e células rompidas, especialmente em cultivos suplementados com o MCE. Pela MET, não foram encontradas células NKu íntegras nestas condições. As poucas células identificadas como sendo células NKu apresentavam-se com limites celulares imprecisos, citoplasma contendo inúmeras vesículas membranosas, além dos grânulos característicos destas células e o núcleo com grumos de condensação cromatínica (Fig. 33). Em meios suplementados com o MCE, foram observadas células NKu com estas mesmas características, sendo ainda freqüente a presença de grânulos citoplasmáticos livres em meio aos fragmentos celulares.

Não foram constatadas outras diferenças nos padrões morfológicos ou mesmo histoquímicos entre as células NKu obtidas de cultivos em meio RPMI ou MEM, bem como pela variação da concentração de soro fetal bovino.

4.4. Índice de rendimento relativo de células NKu aderidas

Foi realizada a quantificação de células lectina DBA positivas dentre as populações celulares aderidas obtidas de explantes da glândula metrial mantidas nas diversas condições de cultivo empregadas. Os valores relativos destas contagens estão sumariados na Tabela I.

O emprego do meio MEM em iguais condições resultou no índice de 59,21%, índice este que, embora inferior ao obtido com o emprego do RPMI em quaisquer condições, foi o maior entre aqueles obtidas com o uso do meio MEM.

O maior índice de células NKu obtidas após 24 horas de cultivo foi com o emprego do meio RPMI sem a adição do MCE, resultando em 72,23% de células, enquanto com o meio padrão resultava em apenas 50,71%.

Em 24 horas de cultivo, ao contrário do que se verificou em 48 horas, a suplementação com o MCE, tanto no meio RPMI quanto em MEM, não resultou em maior índice relativo de células NKu.

Tabela I - Proporção de células NKu DBA positivas obtidas a partir dos explantes da glândula metrial submetidos às variações na composição dos meios e nos tempos de cultivo.

Tempos de cultivo	Condições de Cultivo			
	MEM padrão	MEM acrescido de 20% de MCE	RPMI padrão	RPMI acrescido de 20% de MCE
24 horas	50.71%	43.74%	72.23%	60.41%
48 horas	43.03%	59.21%	70.90%	84.42%

4.5. Efeito da exposição da lectina DBA sobre as células NKu aderidas

As células submetidas aos ensaios *in vitro*, sob exposição de diferentes concentrações (1,25 e 2,5 µg/ml) e pulsos (30 minutos, 1 hora e 2 horas) de lectina DBA biotinada, foram avaliadas quanto ao padrão morfológico (MEV) e distribuição do conjugado lectina-biotina, revelada pela streptavidina-fluoresceína (microscopia de fluorescência).

Pela microscopia de fluorescência, as células NKu obtidas em condições-controle, apresentaram a lectina DBA distribuída homogeneamente em toda a superfície celular e nos grânulos citoplasmáticos (Fig. 34). Em MEV, estas células eram caracterizadas pelo aspecto globoso e pela presença de filopódios e projeções foliáceas, das quais emergiam projeções semelhantes a microvilos (fig. 35). Estas estruturas eram livres, porém os filopódios também foram observados na base das células, estando totalmente aderidos à superfície da lamínula de vidro. Estas características morfológicas e distribuição da lectina

DBA encontradas nas células NKu controles foram convencionadas como perfil 1.

Após exposição da lectina DBA, em diferentes concentrações e tempo de atuação, as células NKu aderidas apresentaram diferentes padrões de distribuição da lectina, bem como morfológicos, constatadas respectivamente pela microscopia de fluorescência e pela MEV. Pela frequência e constância em que estes padrões foram observados, destacaram-se 3 (três) perfis distintos, além daquele correspondente ao perfil 1.

Perfil 2 -

Caracterizavam-se como células NKu globosas que, em microscopia de fluorescência, mostravam a lectina DBA concentrada em uma região específica da superfície celular (capuz) que coincidia freqüentemente com uma protuberância na superfície celular (fig. 36).

Quando da observação em MEV, estas células apresentavam contorno irregular com uma grande projeção (*bud*) de formato quase sempre globular na sua superfície celular. A superfície desta protuberância apresentava-se rugosa, diferindo do restante da superfície celular que se apresentava relativamente lisa, embora exibissem algumas projeções semelhantes a microvilos (fig. 37). Freqüentemente constatava-se a presença de um conjunto de filopódios em uma das extremidades da célula.

Perfil 3 -

Em microscopia de fluorescência, estas células NKu exibiam uma distribuição homogênea para a lectina DBA na superfície celular. Apresentavam, no entanto, limites celulares imprecisos, aparentando fragmentação citoplasmática, sendo encontrados grânulos citoplasmáticos também marcados pela lectina DBA no interior das células ou fora do limite destas (fig. 38).

Em MEV, estas células exibiam inúmeras protuberâncias na superfície celular, de dimensões menores que aquelas projeções globosas observadas no perfil 2 (fig. 39). Algumas estruturas esféricas que apresentavam a sua superfície com textura semelhante às protuberâncias foram encontradas isoladas, distantes das células NKu.

Perfil 4 -

Em microscopia de fluorescência, as células NKu apresentavam limites imprecisos, freqüentemente fragmentadas e intensamente marcadas pela lectina DBA. Algumas estruturas esferoidais apresentando fluorescência anular foram encontradas em meio às células fragmentadas (fig. 40).

Em MEV foram encontradas raras células íntegras. Junto aos fragmentos celulares ou nos vestígios de onde estavam aderidas as células NKu, foram encontradas estruturas esféricas pequenas (fig. 41).

A exposição da lectina DBA em diferentes concentrações e tempo nas células NKu *in vitro* resultou em diferentes padrões de respostas destas células (perfis 2, 3 e 4), sumariadas na tabela II.

Dentre estes padrões destaca-se a incidência do perfil 2 (formação da projeção globular fluorescente na superfície das células NKu) como sendo o efeito da lectina em 30 minutos, independentemente da sua concentração. Após 1 hora, a localização em forma de capuz da lectina já não está presente, estando distribuídas uniformemente na superfície celular das células NKu (perfil 3). Com 2,5ug/ml de lectina, durante 2 horas, verificou-se predomínio de formas fragmentadas ou degeneradas (perfil 4).

Tabela II- Distribuição dos perfis observados nos ensaios *in vitro* com emprego de diferentes concentrações da lectina DBA e tempos de cultivo.

Concentrações da lectina DBA	Duração dos ensaios		
	30 minutos	1 hora	2 horas
-	1*, 4	1*, 4	1*, 4
1,25µg/ml	1, 2*, 3, 4	2, 3*, 4	2, 3*, 4
2,5µg/ml	2*, 3, 4	2, 3*, 4	2, 3, 4*

(0) - células NKu controle, sem exposição à lectina

(*) perfil observado em maior frequência

5. DISCUSSÃO

Os estudos por meio da fenotipagem (MUKHTAR & STEWART, 1989; PARR *et al.*, 1990b; LINNEMEYER & HAMILTON, 1990; ZHENG *et al.*, 1991a, CROY & KISO, 1993; VAN DEN HEUVEL *et al.*, 1996), avaliação da atividade lítica (CROY *et al.*, 1991c) e comparações em animais imunodeficientes (STEWART & PEEL, 1980; CROY *et al.*, 1991a; GUIMOND *et al.*, 1997; GUIMOND *et al.*, 1998) permitiram caracterizar as células granulosas da glândula metrial como sendo pertencentes à linhagem de linfócitos NK.

Já a elucidação dos mecanismos que envolvem a atuação das células NK do ambiente uterino não tem sido bem sucedida devido, de um lado, às diferenças existentes entre estas e as demais células NK. Do outro lado, o ambiente uterino em toda a sua complexidade parece ser o fator determinante nos mecanismos da migração, proliferação e diferenciação das células NKu durante a gestação.

Com o intuito de se estabelecer um modelo de estudo *in vitro* em que se possa controlar as variáveis que influenciariam na proliferação, diferenciação e comportamento funcional das células NKu, em nosso estudo, preconizamos o isolamento destas células a partir do cultivo de explantes da glândula metrial.

O procedimento empregado em nosso estudo para a obtenção de células NKu a partir de explantes da glândula metrial foi inicialmente descrito por MUKHTAR & STEWART (1988). Tal procedimento fundamenta-se no fato da glândula metrial ser considerada uma estrutura transitória do útero prenhe constituída pelas células NKu (ZHENG *et al.*, 1991c, ZHENG *et al.*, 1993; LINNEMEYER & POLLACK, 1994) e, portanto, potencialmente uma fonte para obtenção e isolamento destas células.

No presente trabalho, utilizaram-se explantes das glândulas metriais obtidas de camundongos no 8º ddg para fins de cultivo, ao contrário de outros autores que utilizaram doadoras em estágios mais avançados de gestação (MUKHTAR & STEWART, 1993a; CROY *et al.*, 1997c). Embora a maioria das células NKu encontradas a partir do 10º ddg estejam plenamente diferenciadas

e ricas em grânulos citoplasmáticos grandes, verificam-se já algumas células com sinais indicativos de degeneração nesse dia (PAFFARO JR *et al.*, 1999). Além disso, DELGADO *et al.* (1996) relataram que a partir do 12º ddg, as células NKu iniciam um processo de morte celular programada, culminando com o seu desaparecimento do ambiente uterino ao final da gestação. Recentemente, CROY *et al.* (1997c), demonstraram ainda que, a partir deste período, aproximadamente a metade das células Nku presentes nos sítios de implantação apresentam fragmentação nuclear, indicando um processo de morte celular.

Supõe-se, portanto, que estando presentes entre a população de células NKu totalmente diferenciadas, aquelas que já tenham iniciado um processo degenerativo progressivo, não sejam as ideais para a realização de estudos *in vitro*, que procurem avaliar a resposta celular.

De acordo com PAFFARO JR *et al.* (1999), no 8º ddg, são encontradas células plenamente diferenciadas, ao lado de células menos diferenciadas, porém são pouco freqüentes aquelas com sinais de degeneração. Deste modo, em nosso estudo, optou-se por utilizar explantes de glândula metrial de 8º ddg pressupondo a obtenção de células NKu mais promissoras para manutenção *in vitro*.

As nossas observações das secções histológicas de explantes controles de glândulas metriais de 8º ddg, submetidas às reações histoquímicas de PAS e lectina DBA, confirmam a presença de grande quantidade de células NKu, PAS e lectina DBA positivas, em meio às células deciduais, negativas a estas reações. A histoquímica de PAS tem sido amplamente utilizada para identificação das células NKu (WISLOCKI *et al.*, 1957; BULMER & DICKSON, 1960; STEWART & PEEL, 1977; PEEL, 1989), embora não apresente grande seletividade. A lectina DBA em métodos histoquímicos tem sido relatado como um marcador de alta seletividade para as células NKu de camundongos (CORREA DA SILVA *et al.*, 1996; CORREA DA SILVA, 1997; PAFFARO Jr. *et al.*, 1999). Pela microscopia

eletrônica foram identificadas igualmente as células NKu, cujas características ultra-estruturais eram em tudo semelhantes àquelas descritas na literatura (STEWART & PEEL, 1977; CORREA DA SILVA, 1997).

O uso da glândula metrial como explante de cultivo primário para obtenção de células NKu fundamenta-se no princípio de que estas células tenham capacidade de migrar para o meio de cultivo (MUKHTAR & STEWART 1988). De fato, foi constatada desde o início a presença de células NKu fora dos limites do explante independentemente das condições de cultivo, atestando a eficiência do explante como fonte de células NKu. Por outro lado, houve a preocupação em avaliar o comprometimento do explante residual mantido *in vitro* quanto à sua manutenção como fonte de células NKu.

Chamou a atenção em nossos resultados o fato de, após o período de 24 e 48 horas de cultivo, os explantes residuais exibirem no seu interior um gradiente de alterações degenerativas tanto da histo-arquitetura do estroma endometrial, quanto das células que a constituíam. Isto é, mesmo após 24 horas de cultivo, enquanto a região periférica apresentava células NKu com melhor preservação ultra-estrutural, constatava-se na região central dos explantes, a completa degeneração da histo-arquitetura, acompanhada da degeneração das células NKu. Após 48 horas, o comprometimento da região central se acentua, quando independentemente das condições de cultivos adotadas, não foram verificadas quaisquer formas celulares íntegras.

Estes resultados corroboram com os relatos de LINNEMEYER & POLLACK (1991) que descrevem as alterações degenerativas que têm lugar na região central dos explantes residuais paralelamente à ausência de células NKu nesta.

A acentuada degeneração da região central do explante pode ter sido desencadeada por diversos fatores. Uma das possíveis causas pode estar relacionada ao fato dos explantes cultivados, de quaisquer tecidos, tenderem a apresentar necrose em sua região central. Este fenômeno seria desencadeado pelo trauma inicial da explantação e, posteriormente, pela deficiência na

oxigenação desta região, especialmente em explantes grandes (LASNITZKI, 1986). Fundamenta-se esta hipótese baseado na degeneração observada tanto em 24 quanto em 48 horas, acometendo igualmente as células do estroma uterino e as células NKu. Pelas condições empregadas no presente experimento não se pode contudo, estabelecer quais tipos celulares são primariamente comprometidas na sua manutenção *in vitro*.

Há de se ressaltar, porém, a dependência do crescimento e diferenciação de determinados tipos celulares pelos componentes do estroma (matriz extracelular e células). LINNEMEYER & POLLACK (1991) atentam para esta possibilidade, sugerindo uma importante interação *justácrina* entre as células do estroma do explantes e as células NKu para a manutenção da viabilidade destas células mesmo em cultivo. É provável ainda que fatores solúveis produzidos por células do estroma possam influenciar as células NKu presentes no interior do explante ou mesmo condicionando o meio de cultivo. O fato das células NKu estarem sempre confinadas na região da glândula metrial do útero prenhe é uma evidência indireta de que o estroma uterino desta região possa apresentar características próprias inexistentes em outras regiões do útero. Em vista disso, é possível que um desequilíbrio funcional das células do estroma ou nas interações *justácrina* e *parácrina* entre estas e as células NKu, decorrido das condições de cultivo, possa comprometer diretamente a viabilidade ou comportamento das células NKu presentes na região central dos explantes.

Considerando que as células NKu exibem potencial para causar a lise celular, pode-se propor que o desequilíbrio do seu microambiente possa desencadear a degeneração destas células, com a liberação do conteúdo citolítico de seus grânulos. Uma vez liberados, os mediadores citolíticos, tais como perforina e serinas esterases, poderiam atuar indistintamente nas células do estroma decidual, acelerando a lise não apenas destas células, mas também das próprias células NKu deste local. A acentuada degeneração observada na área central do explante, logo em 24 horas de cultivo, restando apenas grande

quantidade de fragmentos celulares, poderia ser resultante deste processo lítico acelerado. A presença de grânulos citoplasmáticos livres em meio a fragmentos celulares no interior dos explantes residuais, conforme constatada em nosso experimento, é uma evidência sugestiva de que a degeneração das células NKu possa ter contribuído para a degeneração de outros tipos celulares ali presentes.

Em nosso experimento, o meio condicionado esplênico (MCE) foi utilizado como suplemento para induzir a migração de células NKu para fora dos explantes de glândula metrial. O MCE obtido a partir de culturas de células esplênicas estimuladas pela Con-A, é considerado rico em IL-2 (GULLBERT *et al.*, 1981), a qual estimula a migração de células NKu (LINNEMEYER & POLLACK, 1991). De fato, a suplementação dos meios de cultivo com MCE resultou em maior número de células NKu. Porém, os explantes residuais mantidos nestas condições apresentaram acentuada degeneração celular, principalmente na região central, se comparados aos explantes mantidos em meios não suplementados. Em vista disso, o MCE poderia estar envolvido no desequilíbrio das interações justácrina e/ou parácrina entre as células que compõem a glândula metrial.

Como resultante do cultivo de explantes da glândula metrial foi constatada a presença de formas celulares aderidas e em suspensão no meio de cultivo. Independentemente das condições de cultivo utilizadas, o emprego das técnicas histoquímicas de PAS e lectina DBA identificaram células positivas a estas reações dentre estas populações de células. A positividade a estas duas técnicas histoquímicas são peculiares às células NKu, conforme constatado *in situ* por CORREA DA SILVA (1997). Resultados semelhantes foram encontrados nas análises dos explantes residuais, demonstrando a presença de células NKu PAS e DBA positivas, cujas características morfológicas eram semelhantes àquelas encontradas *in situ* no endométrio.

A facilidade na obtenção de células NKu a partir de culturas de explantes da glândula metrial tem sido atribuída à capacidade que estas células teriam de migrarem para fora dos mesmos (MUKHTAR & STEWART, 1988). De fato, as células NKu não são células residentes permanentes do ambiente uterino, estando presentes apenas na gestação (DELGADO *et al.*, 1996). Sendo as células NKu, células de origem medular (PEEL *et al.*, 1984), as formas precursoras necessitam transpor a parede endotelial dos vasos para se estabelecerem no ambiente uterino.

À esta mobilidade celular se somam as evidências de que as células NKu que se diferenciam em meio às células do estroma da glândula metrial são freqüentemente encontradas na luz de vasos sangüíneos, sugerindo a migração para este compartimento (STEWART & PEEL, 1978; STEWART, 1991), e para o interior da placenta fetal (STEWART & PEEL, 1978).

A localização de células NKu distantes do ponto de adesão dos explantes, reflete a capacidade migratória inerente deste tipo celular também *in vitro*. LINNEMEYER & POLLACK (1991) atribuem a atividade migratória das células NKu do explante em cultivo à tentativa de escapar da região central em degeneração para uma região periférica e desta para o meio de cultivo, onde deve existir nutrientes acessíveis.

A migração celular requer a expressão de receptores da superfície celular e a interação destes aos componentes da matriz extracelular (KISO *et al.*, 1992a). As células NKu, tal como as demais NK, expressam tais receptores (KISO *et al.*, 1994, CROY *et al.*, 1997a). No entanto, estes podem ter sua distribuição e especificidade alterada em função do grau de diferenciação (SOMERSALO *et al.*, 1992; BURROWS *et al.*, 1993; KISO *et al.*, 1994; SLUVKIN *et al.*, 1994). Acredita-se que, *in vivo*, a atividade migratória seja uma característica de células NKu em estágio final de diferenciação, uma vez que células plenamente diferenciadas são observadas no interior de vasos sangüíneos (STEWART & PEEL, 1980).

Frente a estas considerações, é plausível supor que as células NKu degeneradas encontradas na região central dos explantes após 24 e 48 horas de cultivo correspondam às células NKu não totalmente diferenciadas, presentes no explante O hora e que não tiveram a capacidade de migrar para fora dos mesmos. Por outro lado, pode se supor também que mesmo as células NKu com capacidade migratória, presentes no centro dos explantes, tenham iniciado um processo degenerativo, em decorrência das condições de cultivo. A brusca alteração do microambiente poderia estar afetando a interação e resposta entre as células presentes na glândula metrial.

Desta forma, as células NKu encontradas (aderidas e em suspensão) no meio de cultivo certamente não correspondem à totalidade das células NKu presentes no explante. Aquelas encontradas fora dos explantes da glândula metrial cultivados provavelmente correspondam às células NKu que estavam próximas ou junto à região periférica dos mesmos e que apresentavam capacidade migratória, ou se diferenciaram a tempo para serem capazes de migrar para fora dos mesmos.

Embora tanto a forma aderida quanto a forma em suspensão de células NKu obtidas no cultivo tenham apresentado reatividade semelhantes às histoquímicas de PAS e lectina DBA, a análise ultra-estrutural revelou que as amostras de células em suspensão apresentavam maior proporção de células NKu com indícios de degeneração. A degeneração pode ser artefactual, decorrente do processamento empregado para a concentração desta população celular. No entanto, mesmo as células NKu em suspensão que apresentavam aparente integridade ultra-estrutural, distinguiam-se daquelas observadas *in situ* por apresentarem maior acúmulo de glicogênio e gotículas lipídicas.

Em nosso experimento, as células NKu com melhor preservação ultra-estrutural foram encontradas para as formas aderidas provenientes dos cultivos de 24 horas em meio padrões, RPMI e MEM, sem a adição do MCE. Nestas condições, além da preservação dos padrões histoquímicos (PAS e lectina

DBA), as células NKu exibiam as características morfológicas ultra-estruturais semelhantes às observadas para as células NKu encontradas *in situ*.

Segundo HELANDER & TIMONEN (1998), as células NK são as células mais adesivas dentre os linfócitos isolados *in vitro*. Considerando-se que a aderência celular das células NK seja um indicativo de sua viabilidade e tendo em vista as similaridades existentes entre as células NKu e as demais NK, presume-se que as células NKu aderidas observadas nos cultivos correspondam àquelas mais sadias e viáveis. Além disso, a forma aderida das células NKu apresentavam, em MEV, a morfologia característica deste tipo celular em cultivo descrito por MUKHTAR & STEWART (1993b).

Ainda que células NKu aderidas com características ultra-estruturais bem preservadas pudessem ser obtidas, tanto a partir de cultivos em meio MEM, quanto em meio RPMI, a estimativa do rendimento destas células revelou que a sua proporção era sempre maior quando os explantes eram cultivados em meio RPMI, independentemente do tempo de cultivo e da adição, ou não de MCE.

Em nosso trabalho, o maior rendimento de células NKu aderidas obtidas de explantes da glândula metrial foi alcançado com o cultivo destes, por 48 horas, em meio RPMI suplementado com o MCE. Considerando que a migração de células NKu para fora dos explantes de glândula metrial é dependente da quantidade de IL-2 adicionada ao meio de cultivo (LINNEMEYER & POLLACK, 1991), é possível que o rendimento superior dos cultivos de glândula metrial em meio RPMI suplementado com o MCE seja decorrente da atividade da IL-2, presente em elevadas concentrações neste último.

De acordo com GULLBERG *et al.* (1981), o MCE obtido a partir do sobrenadante de culturas de células esplênicas estimuladas pela Con-A é uma excelente fonte de IL-2. Esta interleucina é, por sua vez, capaz de estimular uma série de respostas celulares, tais como proliferação, diferenciação, incluindo até mesmo a geração de células citotóxicas (BAKER *et al.*, 1978; INOUE & SENDO, 1983).

Em nosso estudo, se de um lado, a suplementação dos meios de cultivo com o MCE resultou em maior proporção de células NKu, do outro lado, a análise ultra-estrutural revelou que a integridade destas estava mais afetada. Isto é, especialmente em cultivos perdurados por 48 horas com o MCE, as células NKu apresentavam-se rompidas, com formações de fragmentos citoplasmáticos vesiculares e núcleo, cuja cromatina exibia aspecto apoptótico. Constatou-se ainda que as células NKu, assim obtidas, apresentavam marcação com a lectina DBA também nos grânulos citoplasmáticos, indicando que a lectina teve acesso ao substrato presente nos grânulos. Tal marcação deve ser decorrente da solução de continuidade da membrana plasmática, atestando o comprometimento da integridade celular.

Além disso, nos cultivos suplementados com o MCE, muitas células aparentemente íntegras apresentavam estruturas circulares no citoplasma, distintas da granulação ou de gotículas lipídicas, quando observadas em microscopia de interferência. Em MET, estas imagens foram correlacionadas às vesículas eletronlúcidas do citoplasma, aparentemente extraídas, e com limites membranosos descontínuos.

Baseado nestas observações, conclui-se que a suplementação do cultivo de explantes da glândula metrial com o MCE, bem como o cultivo perdurado por mais de 24 horas, resultam em células NKu cujas características ultra-estruturais denotam comprometimento da sua integridade e conseqüentemente, da sua viabilidade.

As condições estabelecidas em nosso trabalho não nos permite determinar quais fatores presentes no MCE são responsáveis pelo acentuado processo de degeneração observado nas células NKu. Dada a elevada concentração e atividade de IL-2 neste extrato (GULLBERG *et al.*, 1981; DRAKE & HEAD, 1989), é possível que esta citocina contribua também para as alterações morfológicas observadas. Embora LINNEMEYER & POLLACK (1991) tivessem empregado a IL-2 nos cultivos de explantes da glândula metrial,

constatando seu efeito indutor na migração de células NKu para fora destes, não descreveram o efeito em bases ultra-estruturais.

Deste modo, se de um lado o MCE resulta em maior proporção de células NKu a partir do explante de glândula metrial, de outro lado, é inegável o efeito deletério constatado nas características ultra-estruturais dos compartimentos celulares das células NKu. Se a causa da degeneração acentuada das células NKu decorre da ação distinta e específica da IL-2, ou se da ação indireta de outros fatores presentes neste meio condicionado, ou até mesmo da ação combinada dos mesmos em um mecanismo sinérgico, merece estudos mais pormenorizados no futuro.

De acordo com as nossas análises, os meios de cultivo contendo soro fetal bovino em concentrações de 5% ou 20% em combinação com outras suplementações, não resultaram em alterações detectáveis nos padrões histoquímicos ou morfológicos das células NKu. Portanto, estabeleceu-se a adição de 5% deste componente ao meio de cultivo como sendo suficiente para a manutenção do meio necessário às NKu.

Assim sendo, pela análise do conjunto de resultados, pode-se estabelecer que as células NKu aderidas, obtidas em 24 horas de cultivo do explantes da glândula metrial mantidos em meio RPMI, acrescido de (5% ou 20%) SFB, sem a adição do MCE, foram dentre todas, as que apresentaram melhor preservação. O meio de cultivo RPMI é amplamente utilizado na manutenção de células da linhagem linfocitária *in vitro*. As células obtidas nestas condições foram avaliadas quanto a sua viabilidade, baseado na manutenção do seu potencial de resposta frente a estímulos extrínsecos.

Ressalta-se, porém, a falta de dados comprovados em literatura que atestem quais citocinas ou mediadores químicos possam atuar de forma efetiva no comportamento das células NKu. É incontestável que há diferenças entre as NKu e as demais NK, uma vez que as últimas não respondem aos estímulos de ativação comprovadamente eficientes para as células NK (CROY & KASSOUF,

1989; PARR *et al.*, 1990a; CROY *et al.*, 1991c; CROY & KISO, 1993; HEAD, 1996; WHITELOW & CROY, 1996; CROY *et al.*, 1996-97).

O insucesso no estabelecimento dos mecanismos relacionados com a atividade citolíticas das NKu, baseado no conhecimento das NK em geral, faz pressupor que as primeiras devam expressar receptores de membrana próprios e específicos. Até o presente momento não há um único relato que demonstre qual seria este constituinte de expressão específica das células NKu e que seria determinante nos mecanismos de ativação e/ou inibição destas células. Frente a esta situação, não há ainda qualquer método que possa ser utilizado, para avaliação da viabilidade funcional das NKu *in vitro* ou *in vivo*.

A escolha da lectina DBA como possível agente indutor da resposta celular para as células NKu *in vitro* baseou-se em evidências indiretas pelas quais se pressupôs uma possível ação sobre as células NKu. A principal evidência de que a lectina DBA possa interagir com as células NKu está nos resultados obtidos em nosso laboratório que constatou o fato destas células serem as únicas da linhagem linfocitária (HARAGUCHI *et al.*, 1999) ou mesmo dentre os leucócitos sangüíneos (LIMA *et al.*, 1999) que apresentam reatividade na superfície. Tal seletividade de reação deve estar relacionada com a expressão de glicoconjugados altamente específicos pelas células NKu, que por sua vez poderia estar relacionada com o comportamento ímpar destas células no ambiente uterino. O fato ainda destes glicoconjugados afins à lectina DBA serem expressos em células NKu mantidas *in vitro* reforça o indício da importância destes no comportamento das mesmas.

Em células NKu controles não expostas aos pulsos de lectina DBA, a análise em microscopia de fluorescência revelou a marcação homogênea ao longo de toda a superfície celular. Este padrão de marcação sugere que os glicoconjugados DBA reativos estão distribuídos uniformemente em toda a superfície das NKu, à semelhança do que se observa com as NKu encontradas *in situ* no útero prenhe.

Em MEV, estas células NKu controles caracterizavam-se pelo aspecto globoso e pela riqueza em filopódios, projeções semelhantes a microvilos e projeções foliáceas, projetadas em sua superfície celular. A presença de filopódios, em quaisquer tipos celulares, está relacionada com o movimento celular, caracterizando assim, células móveis (ALBERTS *et al.*, 1994). Deduz-se, portanto, que as células NKu obtidas nas condições de cultivo estabelecidas neste experimento apresentam capacidade migratória. Tais observações corroboram o fato das células NKu exibirem alta motilidade, tanto *in situ* (STEWART & PEEL, 1978; STEWART, 1991) quanto *in vitro* (STEWART & MUKHTAR, 1988).

As células NKu submetidas aos ensaios com diferentes concentrações e tempo de exposição à lectina DBA apresentaram alterações nos padrões morfológicos e da fluorescência localizada na superfície celular. À microscopia de fluorescência foram observadas com frequência células NKu, que exibiam uma área ou mesmo uma projeção globular da superfície celular, em forma de *bud* (perfil 2), intensamente marcada para a lectina DBA, 30 minutos após a sua incubação tanto com 1,25µg/ml, quanto com 2,5µg/ml de lectina DBA.

Este padrão de marcação na microscopia de fluorescência, simultâneo ou não à existência do *bud*, demonstra a ocorrência da formação de domínios específicos na superfície celular, onde estaria concentrada grande quantidade do glicoconjugado substrato da lectina DBA. Conforme a literatura, este fenômeno é referido como *capping* e se estende a outros tipos celulares (GORMUS *et al.*, 1980; ALBERTS, 1994).

Considerando que as células NKu controles sem o estímulo pela lectina apresentam marcação homogênea na superfície celular, a o perfil 2, com o capuz fluorescente, sugere que esta lectina seja capaz de induzir o agrupamento de glicoconjugados em pontos específicos da superfície celular. Este resultado é semelhante aos relatos de NIETO *et al.* (1998) que, ao estudarem o papel de quimocinas e da polarização celular nas interações entre

células NK humanas e células-alvo (K562), constataram a redistribuição de receptores para determinada citocina em *clusters* na superfície de células NK, quando da indução pela própria citocina.

Em MEV, foi observada, em uma grande quantidade de células, a formação de uma projeção na superfície celular que se caracterizava pelo aspecto rugoso e quase sempre globular.

Esta formação da projeção da superfície celular em forma de *bud* nas NKu foi provavelmente induzida pelo efeito da lectina DBA adicionada ao meio de cultivo. Tal fenômeno tem sido relatado em células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, que adquirem a forma de *shmoo*, o qual está comprovadamente relacionado à ligação de hormônios a seus receptores, como resposta celular a estímulos externos (ALBERTS, 1994).

Sob efeito prolongado da lectina DBA, observou-se um maior número de células que exibiam aparente fragmentação citoplasmática e perda do conteúdo granular, quando observada na microscopia de fluorescência (perfil 3). Da mesma forma, a análise ultra-estrutural em MEV constatou células NKu, em cuja superfície celular estavam presentes pequenas protuberâncias regulares (perfil 3). Em conjunto, estes perfis indicam o desencadeamento de um processo celular progressivo, no qual fragmentos celulares, revestidos com membrana estariam sendo liberados (ou perdidos) pelas células NKu. Estas imagens não foram observadas em células NKu mantidas em meio de cultivo padrão, comprovando que as mesmas tenham sido induzidas sob o efeito da exposição à lectina DBA.

Fragmentos celulares intensamente marcados pela lectina DBA (perfil 4) nas proximidades de células NKu de limites imprecisos, com aparente fragmentação citoplasmática e perda do conteúdo granular foram observados em todas as preparações realizadas, inclusive nos controles. Células claramente rompidas, junto aos fragmentos celulares, foram igualmente constatadas em microscopia de eletrônica de varredura (perfil 4). Estas imagens são sugestivas

de um processo de degeneração e/ou ruptura sofrido pelas células NKu. A intensa marcação observada para estas células e fragmentos celulares pode ser atribuída ao fácil acesso da lectina a substratos intracelulares.

Tendo em vista a observação destes fragmentos em todas as preparações empregadas, inclusive nos controles, sugere-se que as mesmas correspondam a células e fragmentos celulares presentes no cultivo, antes mesmo da realização dos ensaios. Portanto, não seriam resultantes da adição de lectina DBA aos meios de cultivo, mas sim de um processo degenerativo de algumas células em decorrência das condições de cultivo empregadas na obtenção de células NKu.

Por outro lado, nos ensaios mais prolongados (2h), com o uso de uma concentração mais elevada de lectina DBA-biotina (2,5µg/ml), houve um aumento pronunciado na frequência destas imagens. Deste modo, a exposição à lectina DBA-biotina em tal concentração parece induzir maior labilidade das células NKu, contribuindo na ruptura ou fragmentação destas células.

Ainda que não fosse objetivo do nosso trabalho estabelecer o mecanismo de ação da lectina DBA nas células NKu, algumas considerações relevantes podem ser feitas. As evidências são bastantes sugestivas de que a lectina DBA tenha participação na indução de respostas por parte das células NKu. Além disso, embora desconheça-se a natureza do sítio reativo à lectina DBA, presente na membrana plasmática, a interação entre estes desencadeia um conjunto de fenômenos morfológicamente detectáveis. O rearranjo de glicoconjugados da membrana acompanhada de alterações na forma celular, sugere um efeito intracelular provocando a reorganização provavelmente dos filamentos do citoesqueleto. Deste modo, é plausível supor que estes glicoconjugados reativos à lectina, presentes na superfície de células NKu, correspondam a receptores de superfície, passíveis de ativação pela própria lectina DBA-biotina.

Desta forma, os ensaios com a lectina DBA demonstraram, não apenas a viabilidade das células NKu obtidas a partir das condições de cultivo de explantes da glândula metrial estabelecidas em nosso estudo, mas também, que

o sítio reativo presente na membrana plasmática, tem uma importante função no comportamento destas células. Comprova-se assim as premissas com as quais foi justificada a utilização da lectina DBA nos ensaios *in vitro*.

CROY *et al.* (1997c) apontavam para a limitação desta metodologia de isolamento de células NKu, no que diz respeito ao número de células que se pode obter de um útero. Aparentemente, estas células não proliferam em cultura, de modo que o número de células obtidas do cultivo de explantes da glândula metrial seria insuficiente para alguns ensaios imunológicos ou para replicar a cultura (CROY *et al.*, 1997c). De fato, em nosso estudo, constatou-se que a quantidade de células NKu que se consegue obter a partir de cada cultivo de explantes da glândula metrial é limitada. Porém, os ensaios baseados em células NKu aderidas, conforme preconizados em nossos experimentos, requerem um número de células apenas suficientes para serem acompanhadas pelas diferentes técnicas de microscopia. Desta forma, a resolução da resposta celular avaliada foi limitada à própria resolução da técnica de microscopia adotada.

A avaliação ultra-estrutural pela microscopia eletrônica de transmissão mostrou ser um importante instrumento na avaliação da integridade celular. Se por um lado, as análises realizadas no nível da microscopia de luz identificaram a presença de células NKu em diferentes condições de cultivo, por outro lado, somente a análise ultra-estrutural permitiu estabelecer de forma inequívoca a viabilidade destas células baseada na preservação morfológica.

Em nossos resultados, demonstramos a presença de células com a sua ultra-estrutura bem preservada, particularmente entre as populações de células NKu aderidas, obtidas após 24 horas em meio RPMI padrão. As células obtidas nestas condições demonstraram manter o potencial de resposta frente a estímulos extrínsecos, tal como constatado nos ensaios realizados com a lectina DBA. Estes resultados atestam a viabilidade das células NKu, possibilitando a

utilização deste modelo em estudos posteriores, para elucidação dos mecanismos de diferenciação e ativação destas células.

6. CONCLUSÕES

Com os procedimentos adotados e resultados obtidos no presente trabalho pode se concluir que:

- A partir de explantes da glândula metrial (no 8º ddg) podem ser obtidas células NKu na forma aderida e em suspensão.
- Nas várias condições de cultivo testadas, as células NKu obtidas mantêm a reatividade positiva tanto para a reação PAS quanto para a lectina DBA, dois parâmetros de referência adotados para a identificação das células Nku *in situ*.
- A análise ultra-estrutural por meio da MET permitiu estabelecer de forma precisa os parâmetros relativos ao grau de preservação das células NKu obtidas em diferentes condições de cultivo.
- As formas aderidas de células NKu obtidas do explante da glândula metrial, mantida por 24 horas no meio RPMI padrão, adicionado de 5% de SFB, apresentaram o maior índice de células NKu íntegras e preservadas.
- Os perfis encontrados para as células NKu frente à exposição à lectina DBA-biotina demonstram a manutenção do potencial de resposta das NKu frente a estímulos extrínsecos e, por conseguinte, atestam a manutenção de sua viabilidade.
- A lectina DBA-biotina mostrou-se como potente indutor de resposta celular *in vitro*, capaz de atuar de forma efetiva no comportamento das células NKu
- Presume-se que o glicoconjugado reativo à lectina DBA expresso na superfície das células NKu, além de marcador destas células, seja também um receptor de membrana envolvido na resposta celular.

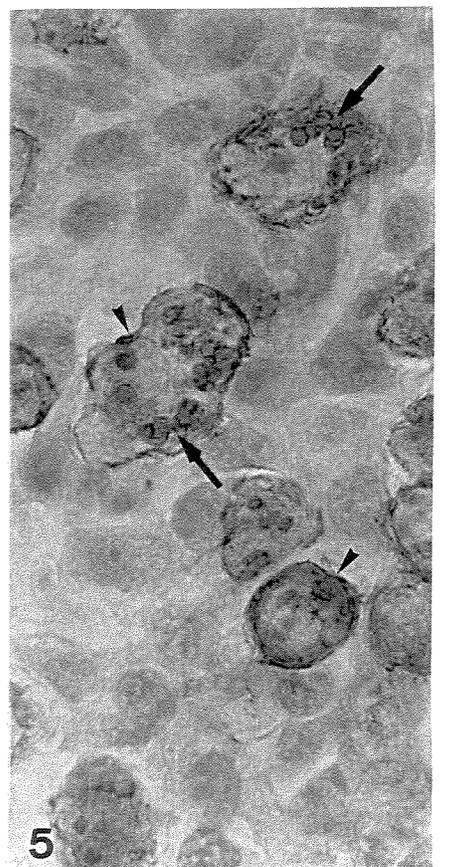
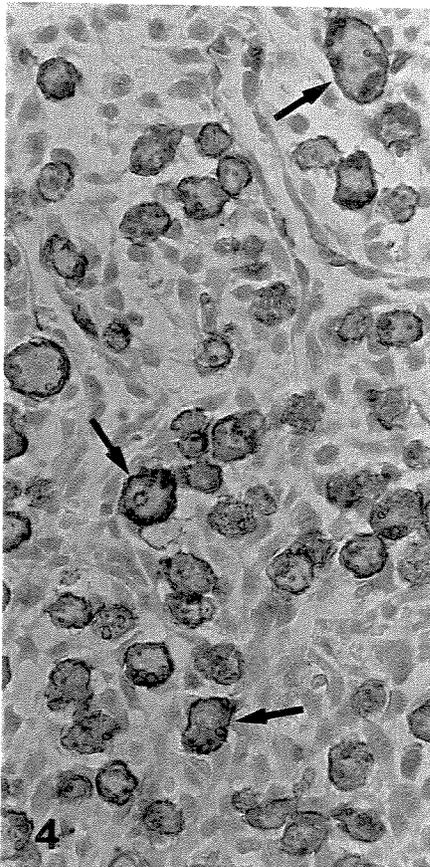
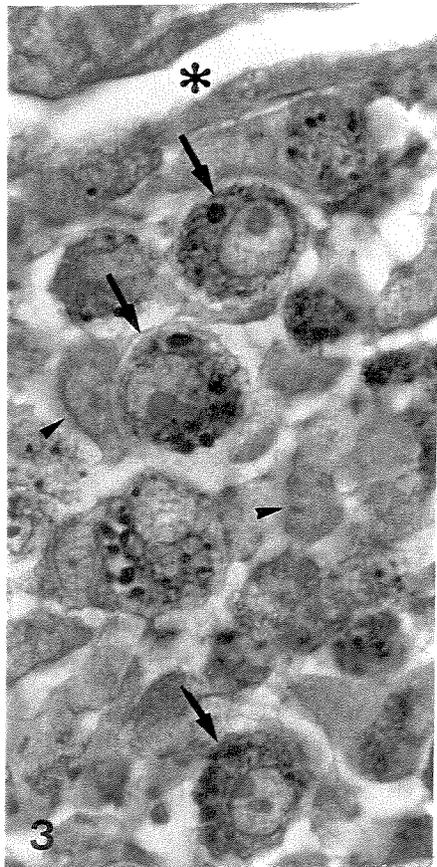
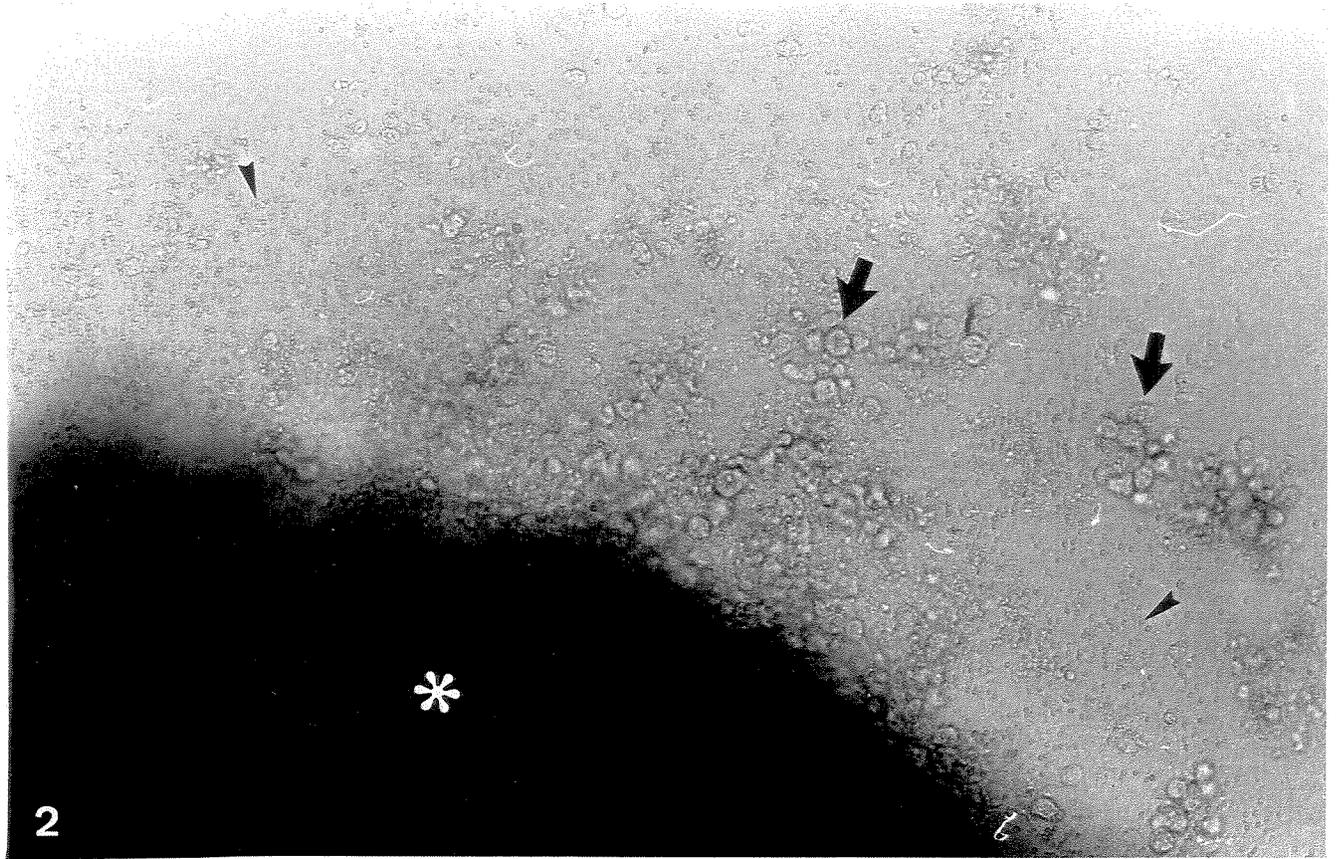
7. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

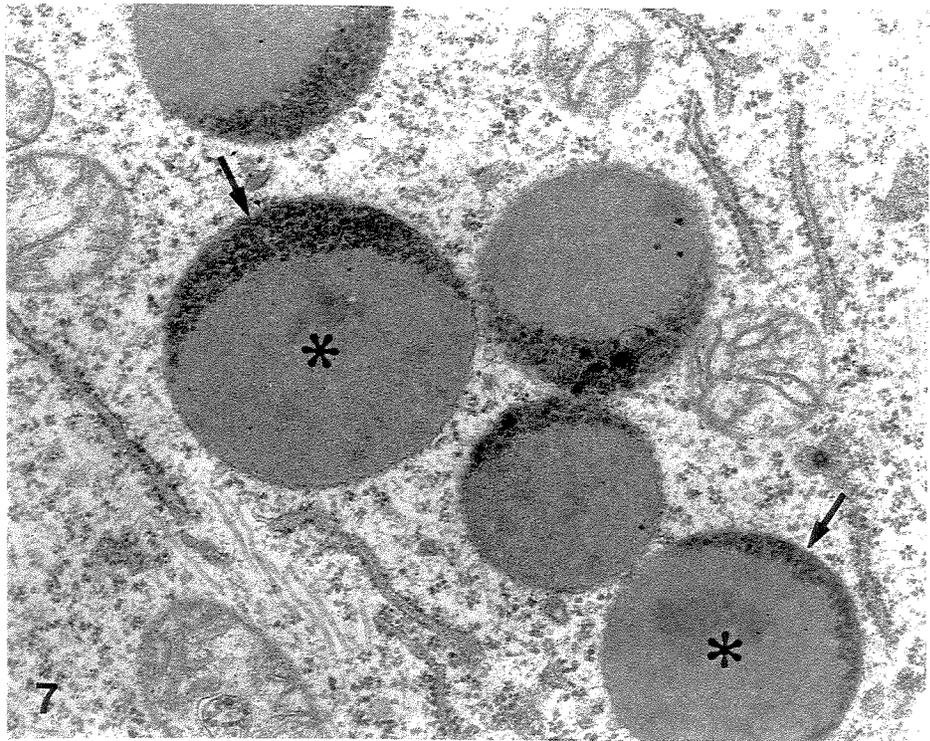
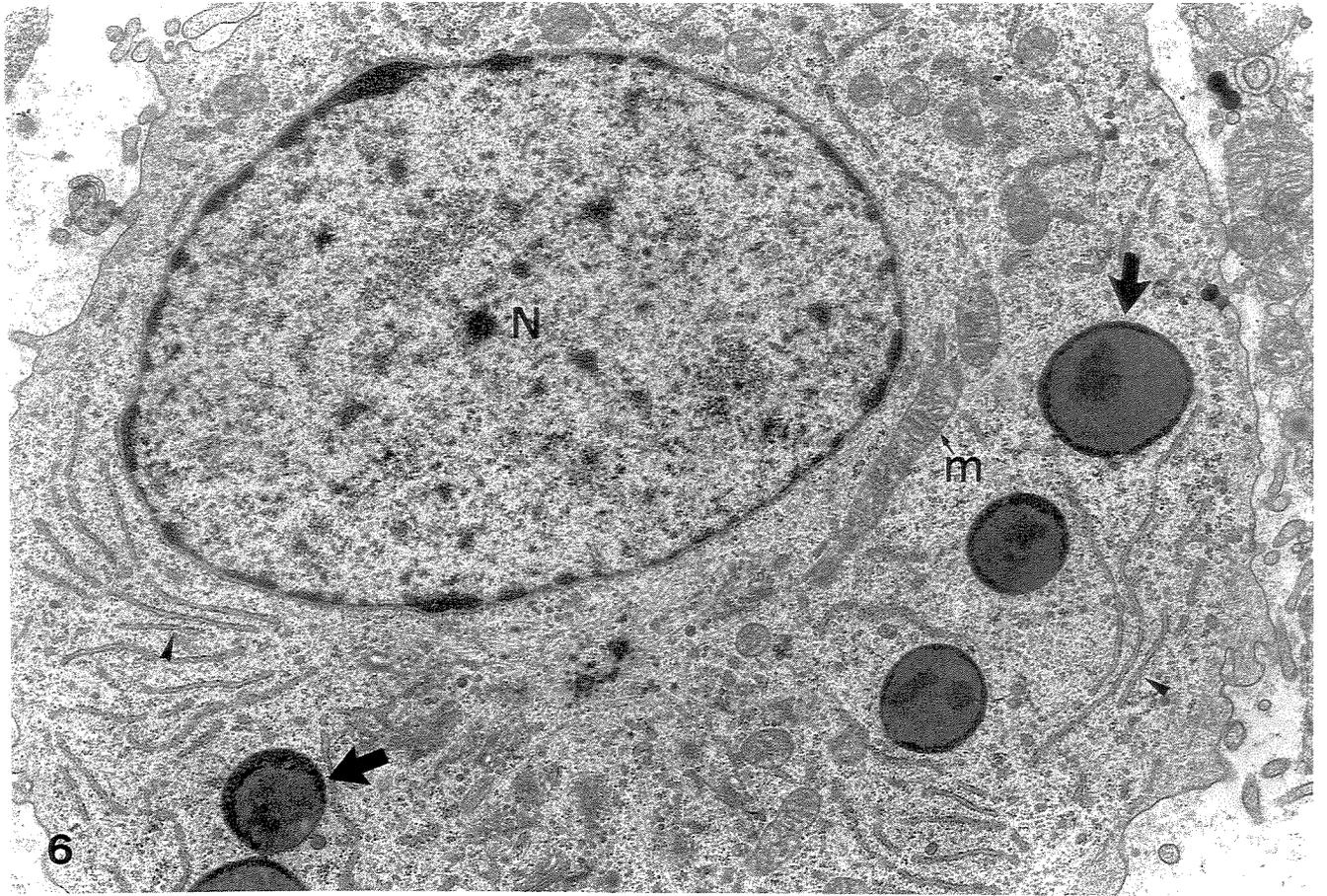
Figura 2 - Explante da glândula metrial em cultivo, por 24 horas em RPMI padrão. Observar as formas celulares (setas) e hemácias (cabeça de seta) aderidas à placa de cultivo nas proximidades do explante residual (*). Contraste de fase. 1100x.

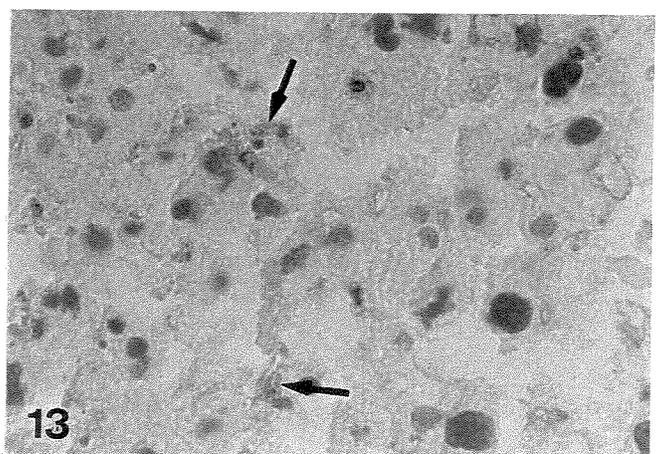
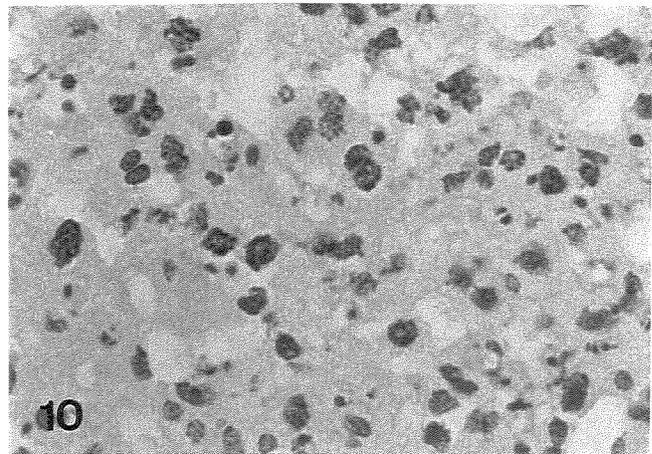
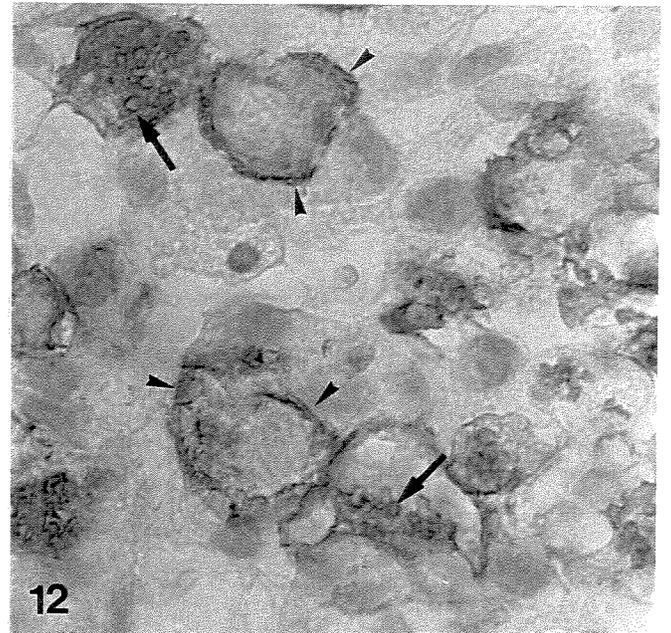
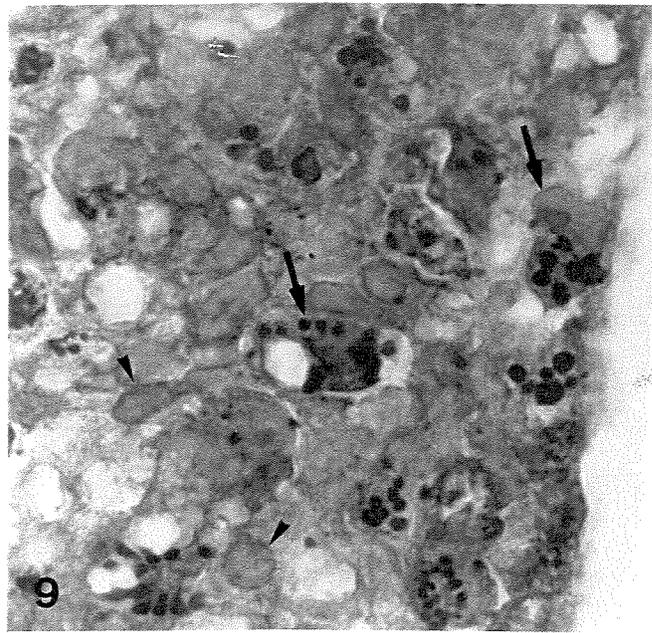
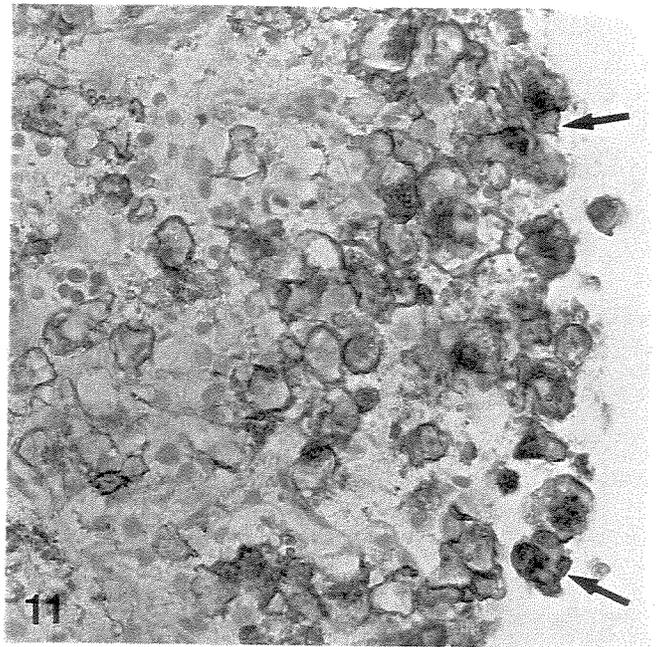
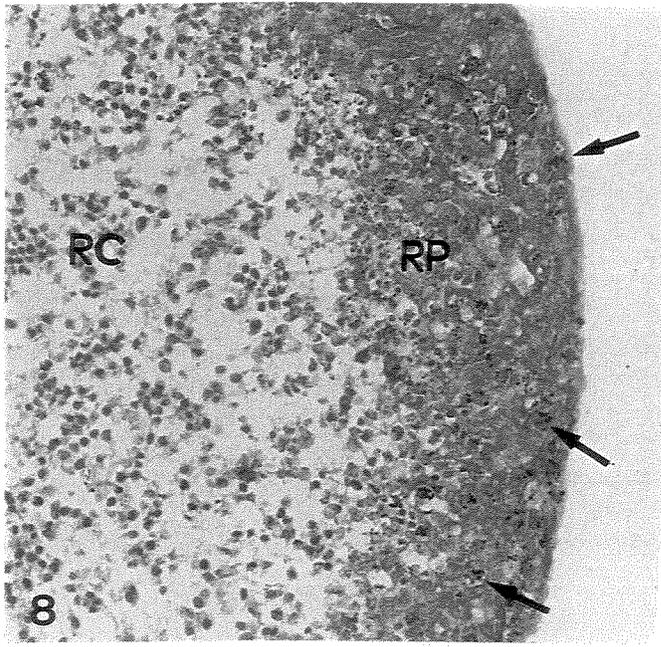
Figura 3 - Corte histológico da glândula metrial (explante-controle) submetida à reação de PAS. Observar células NKu PAS positivas (setas) junto às células do estroma uterino (cabeça de setas). Vaso sanguíneo (*). ML. 1000x

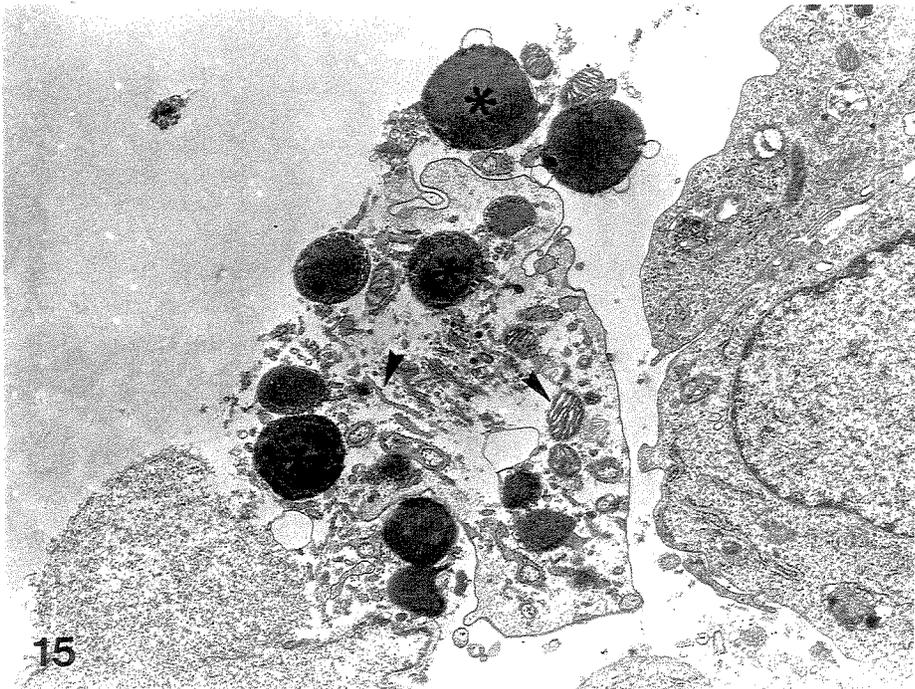
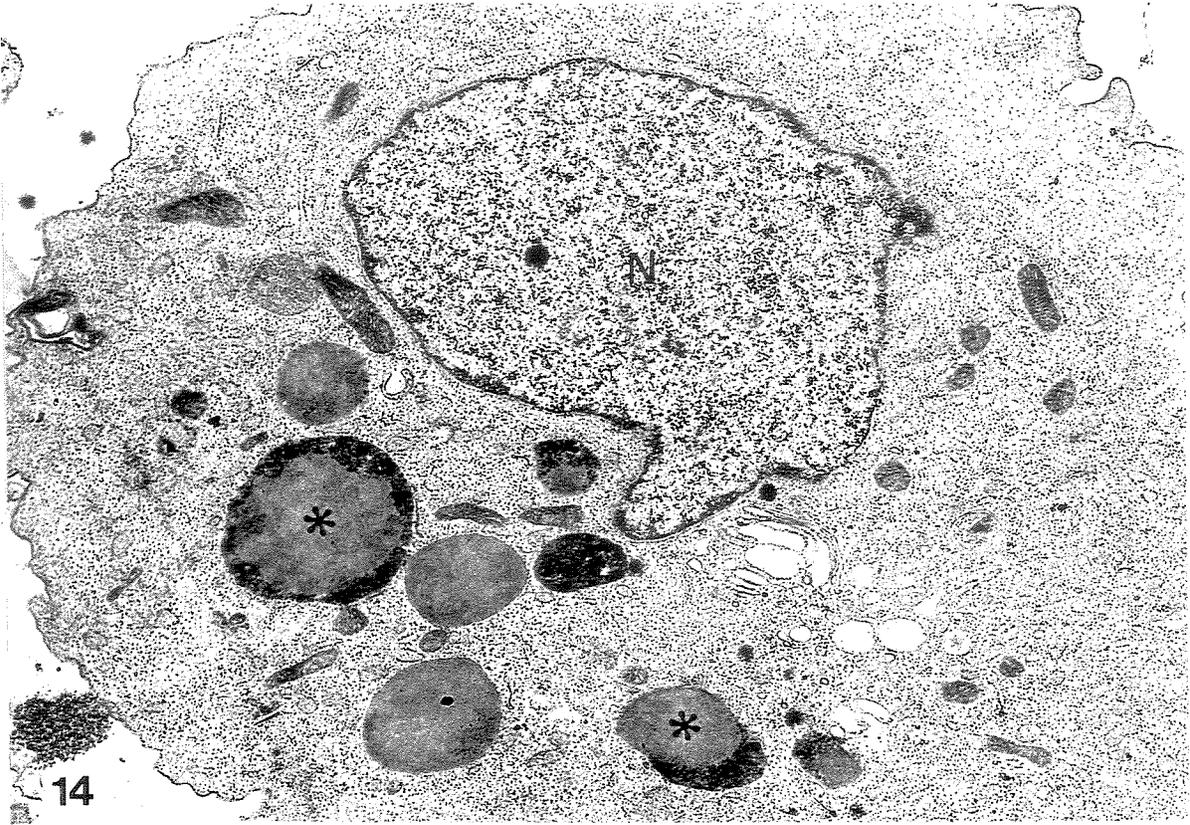
Figura 4 - Corte histológico da glândula metrial (explante-controle) submetida à histoquímica de DBA. Notar as inúmeras células NKu DBA positivas (setas) presentes em meio a células do estroma uterino. ML. 400x.

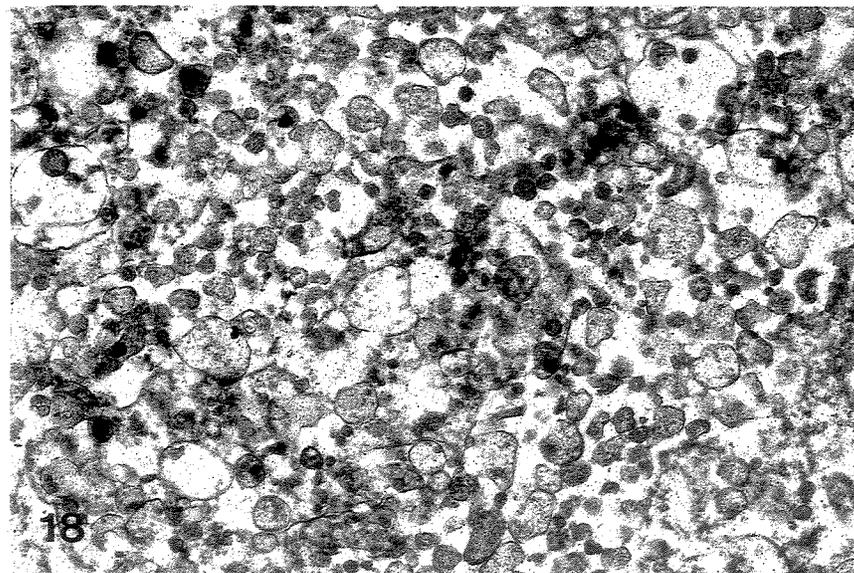
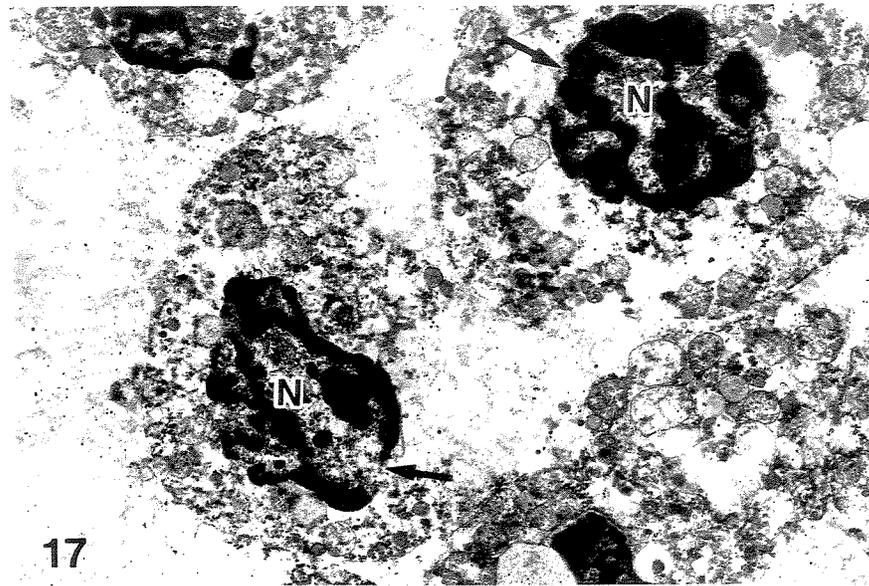
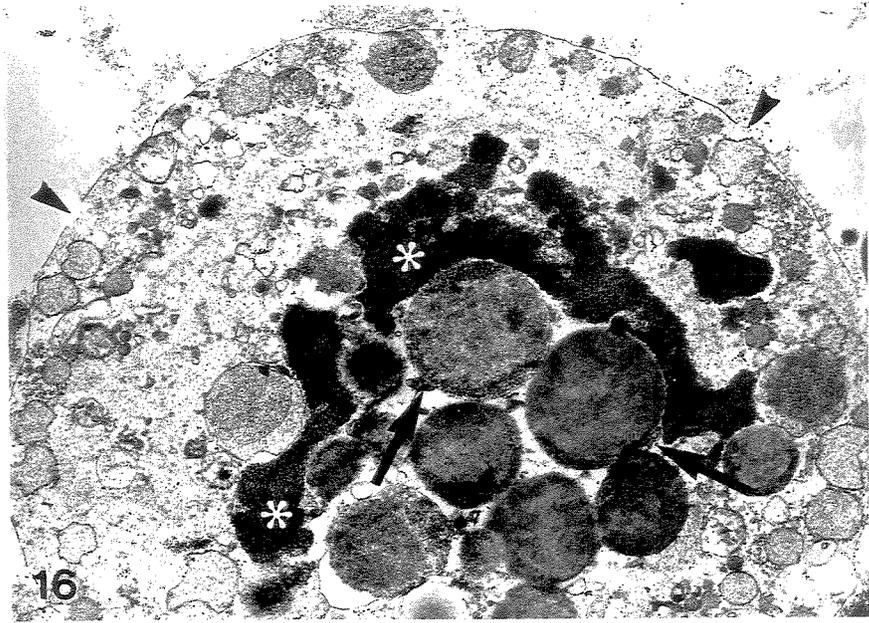
Figura 5 - Detalhe do anterior. Observar a positividade à lectina DBA localizada na superfície celular (cabeças de seta) e nos grânulos citoplasmáticos (setas) das células NKu. Note os grânulos citoplasmáticos de células NKu bem delineados. Histoquímica de lectina DBA ML 1000x

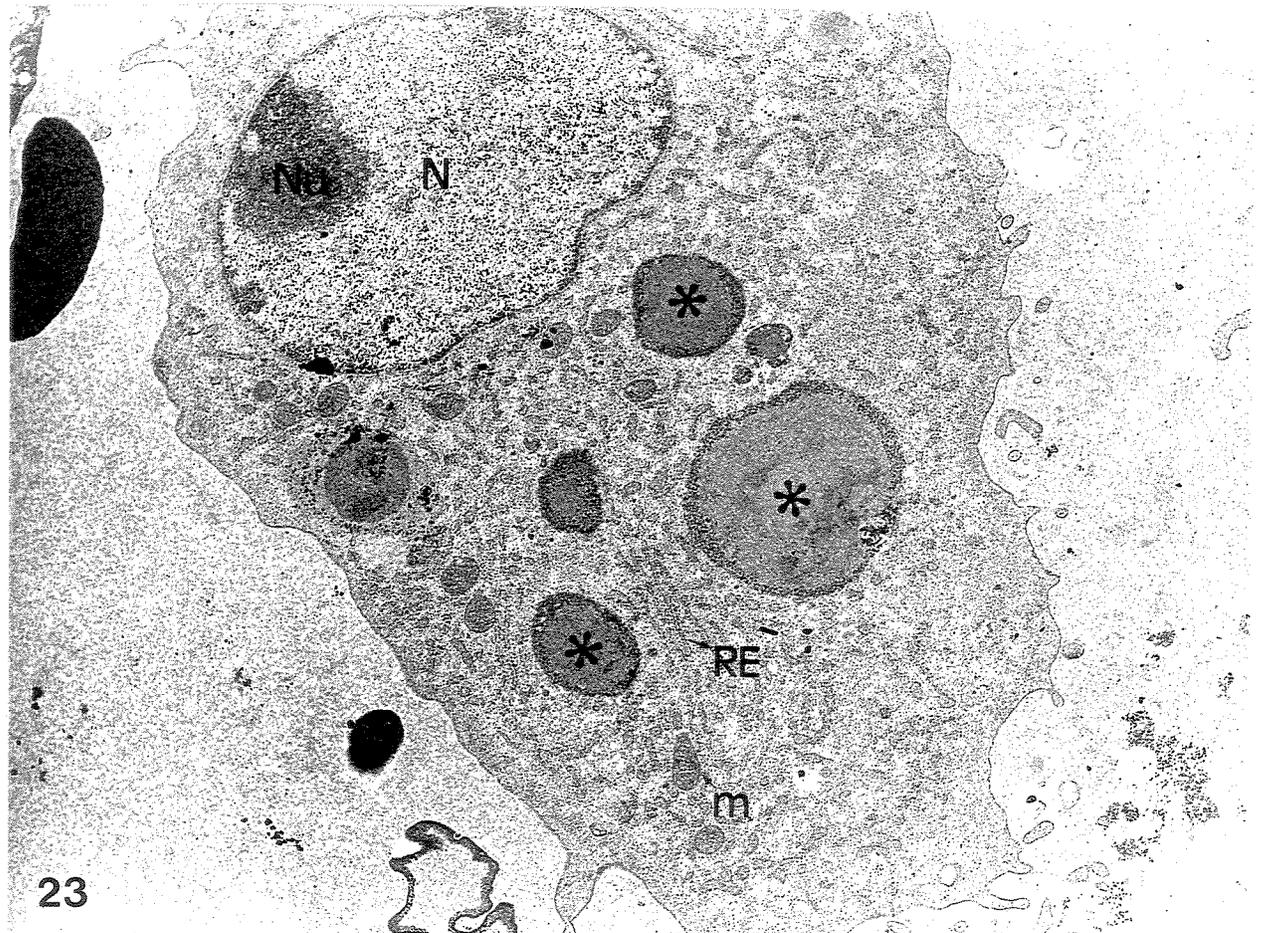
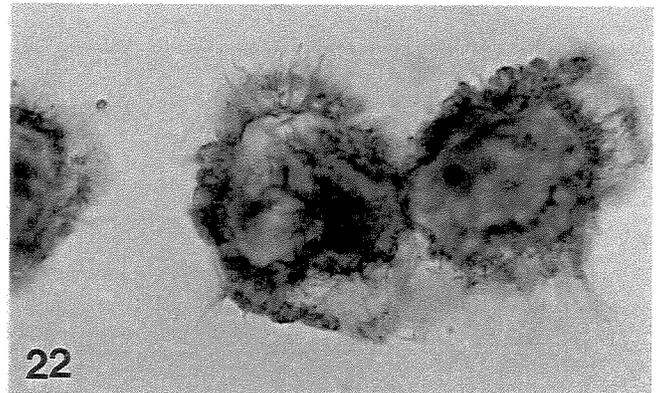
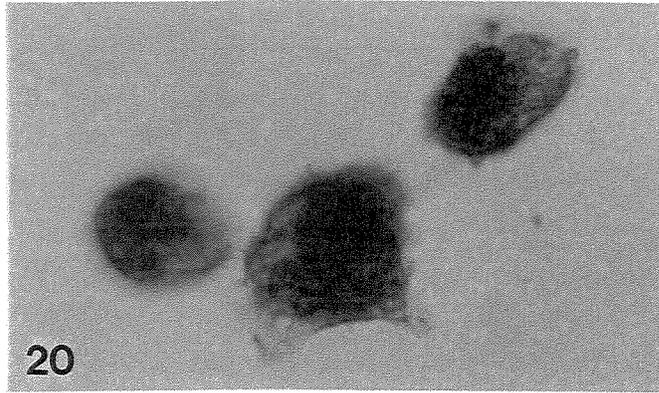
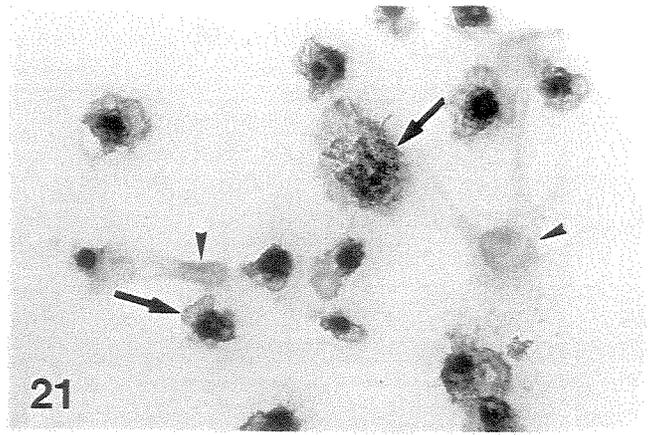
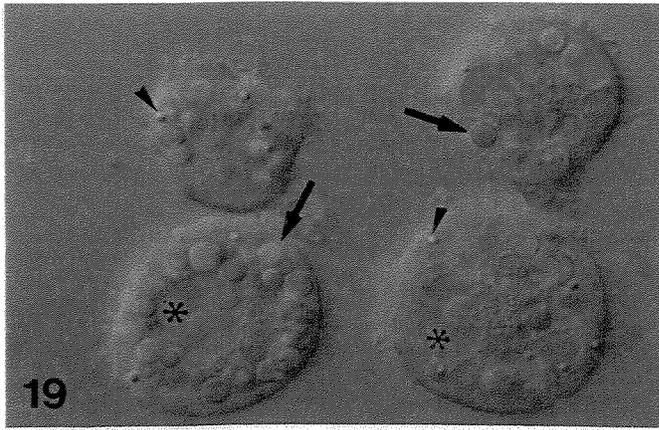


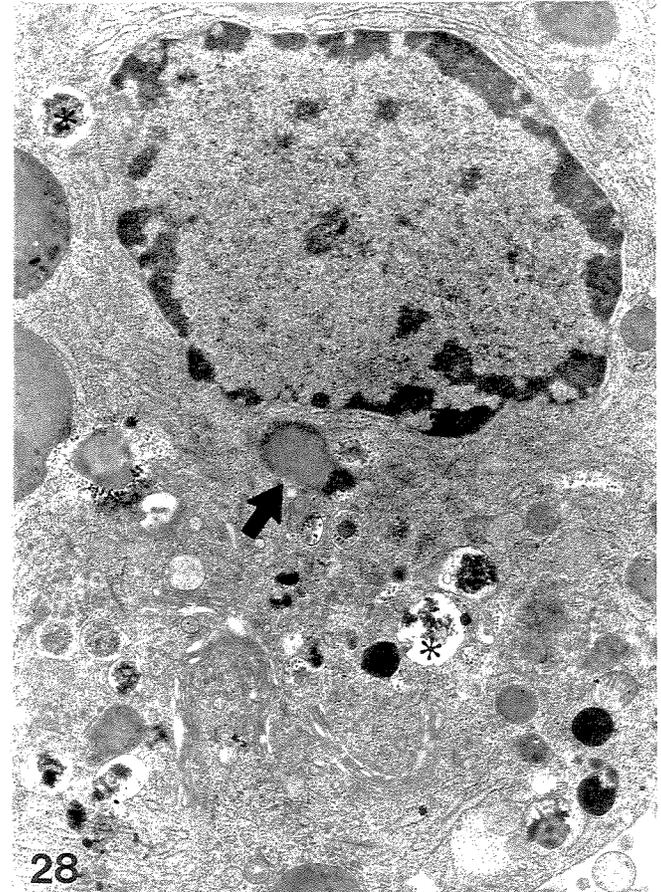
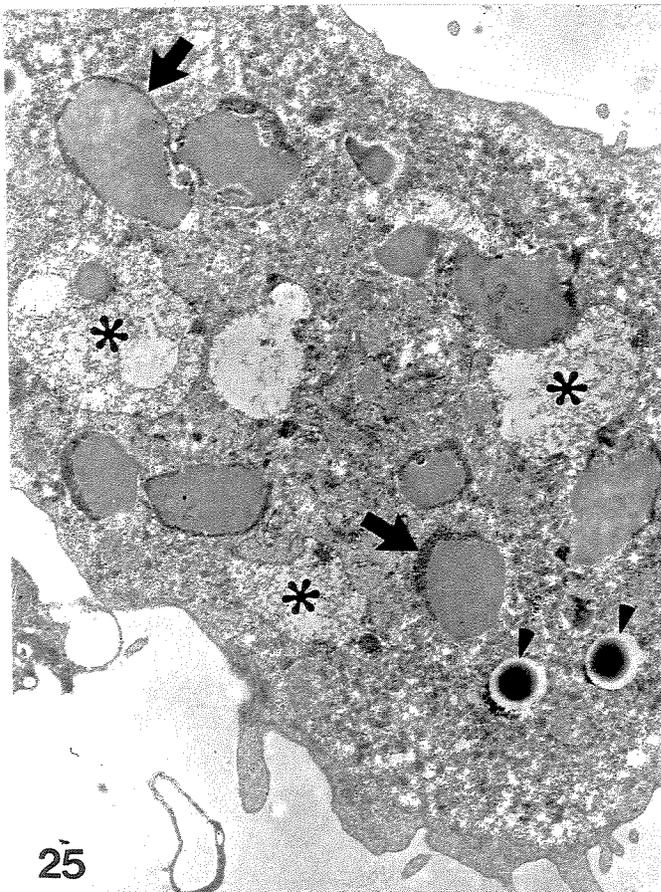
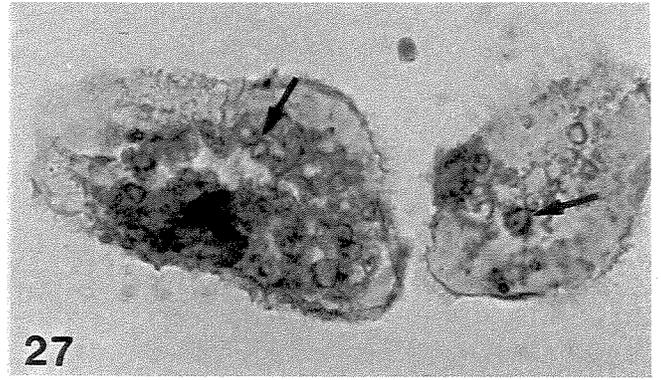
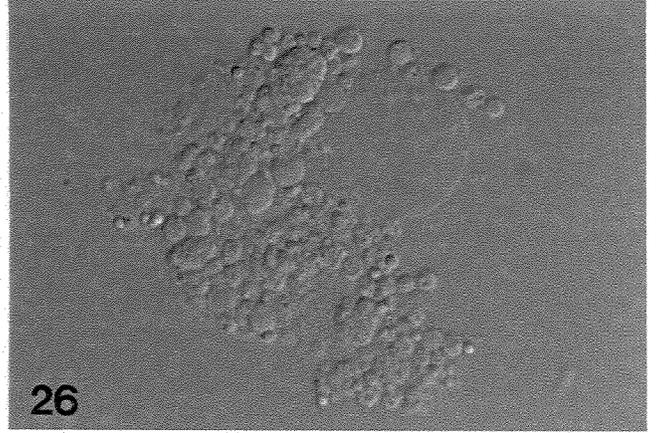
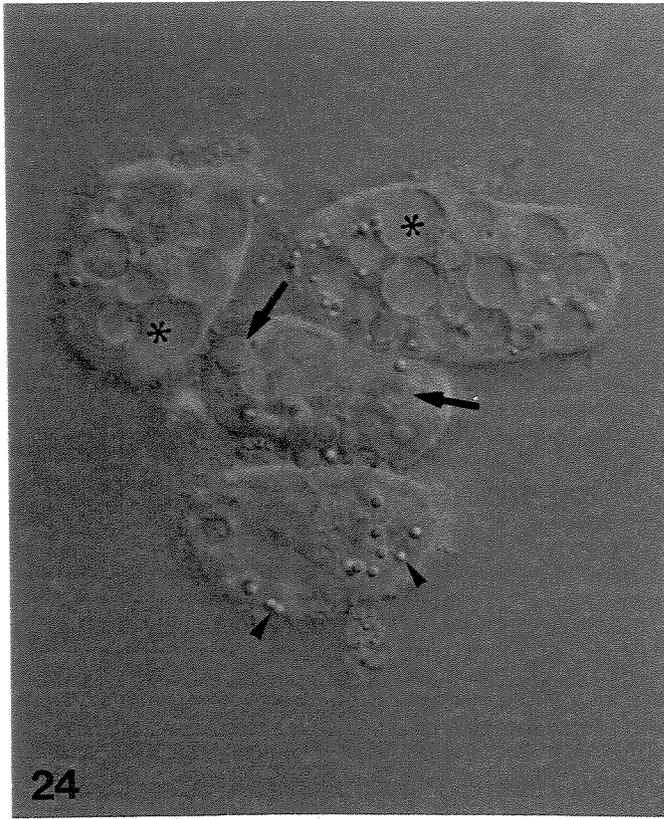


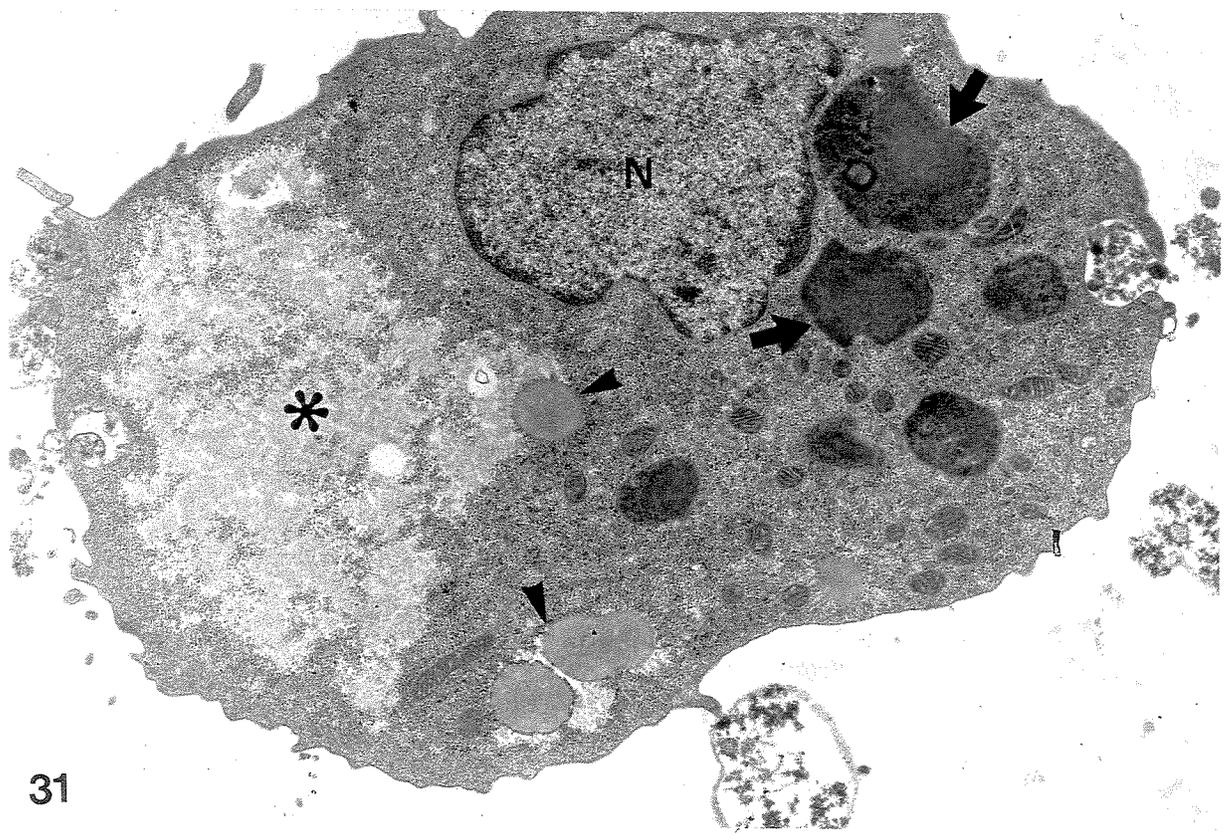
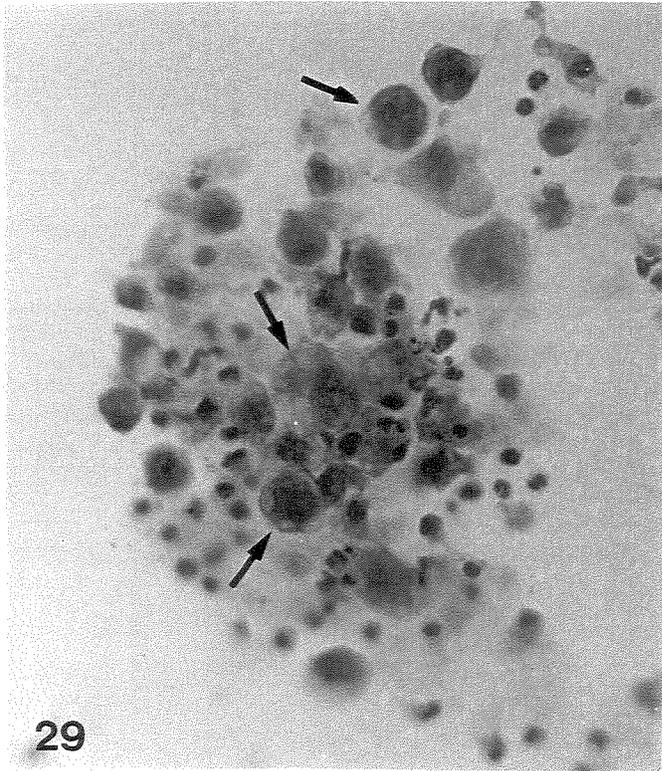


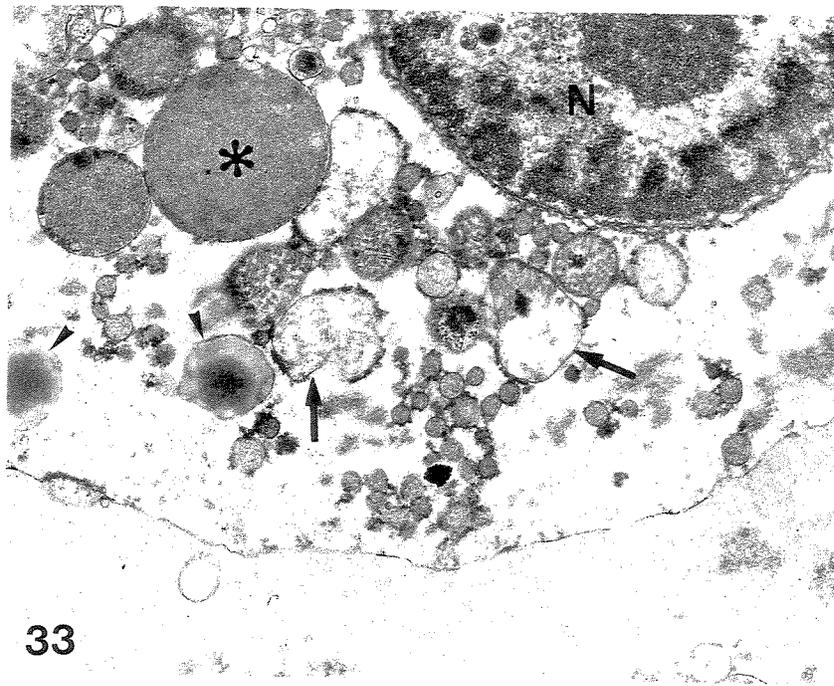
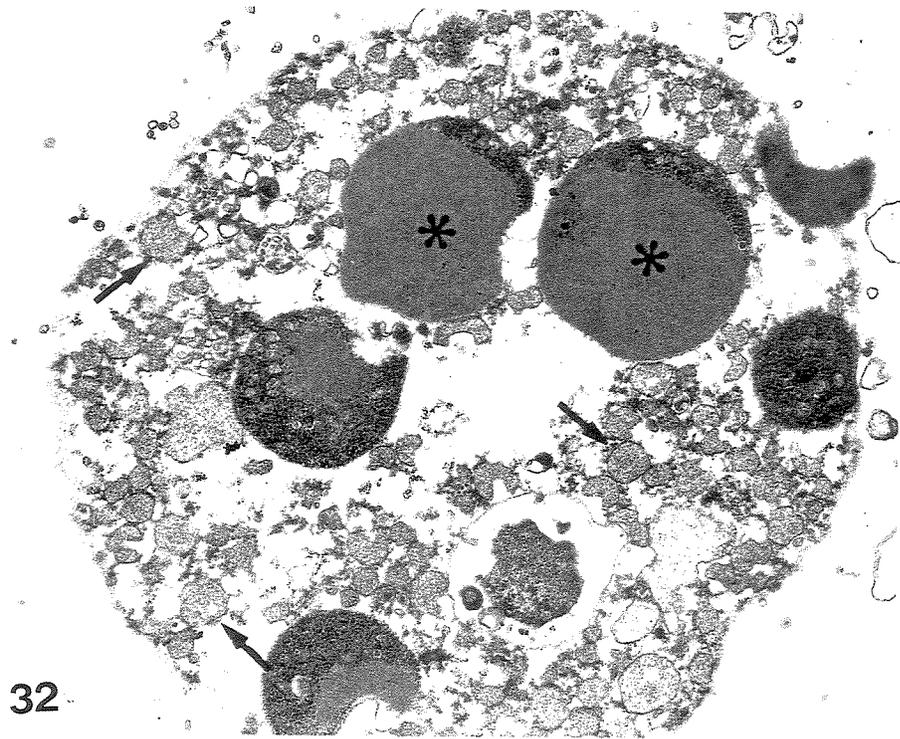


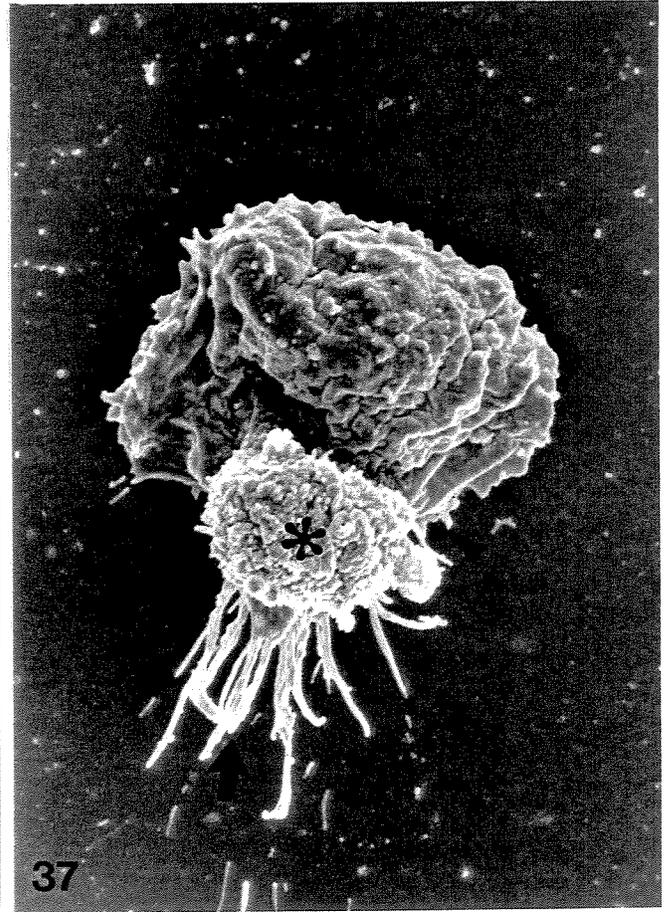
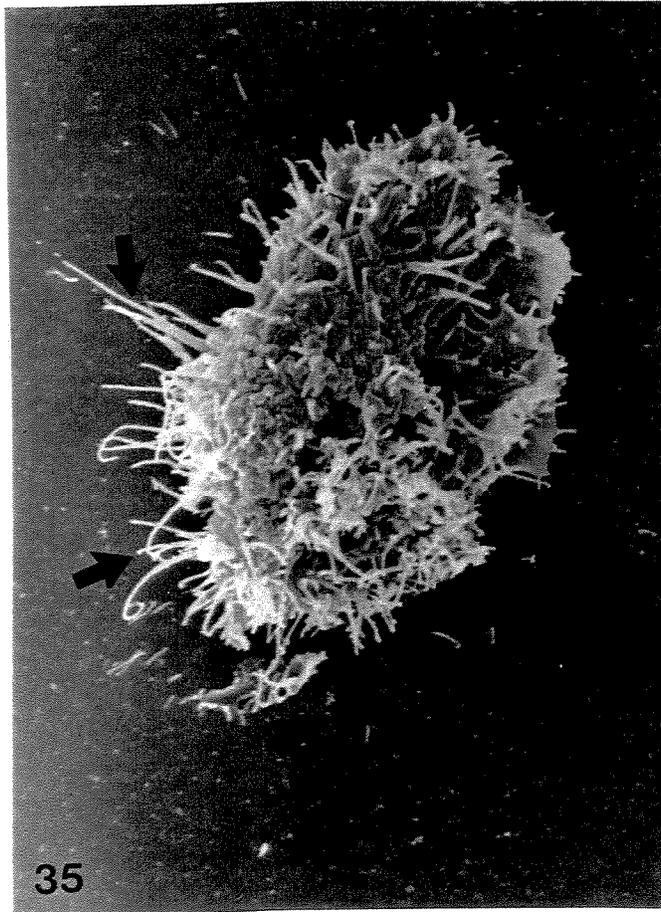
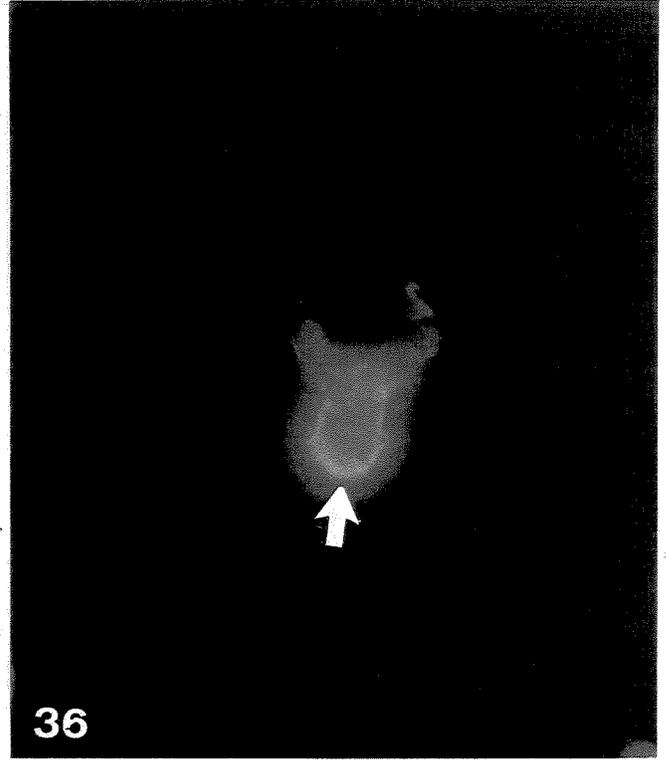
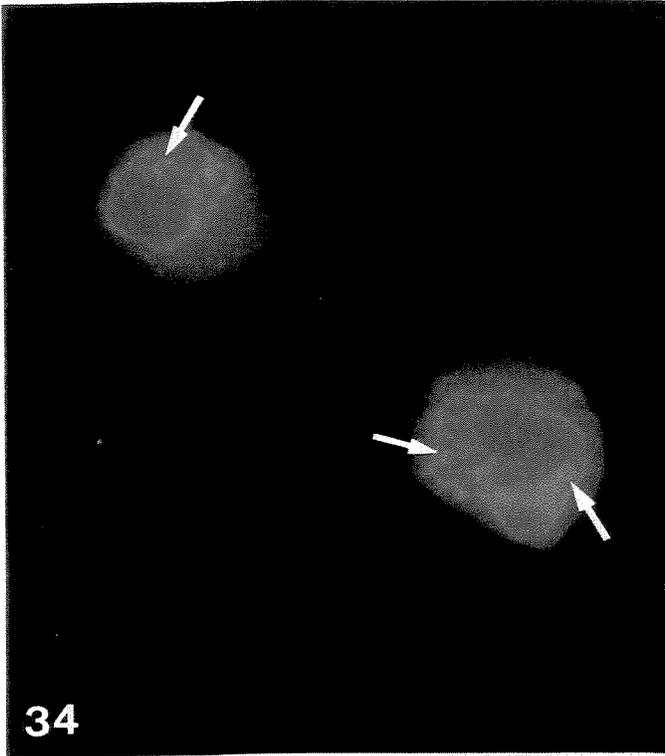


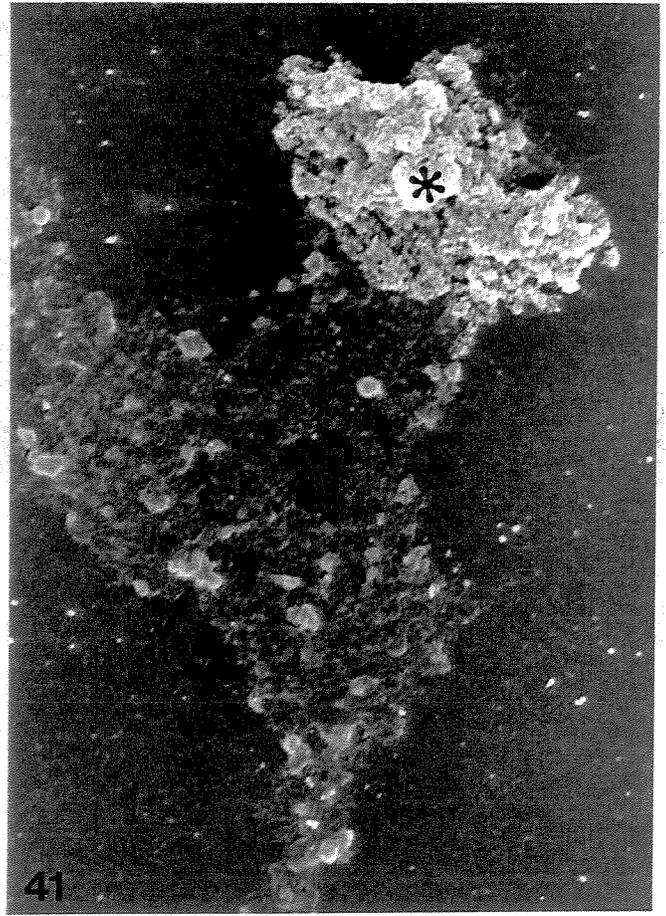
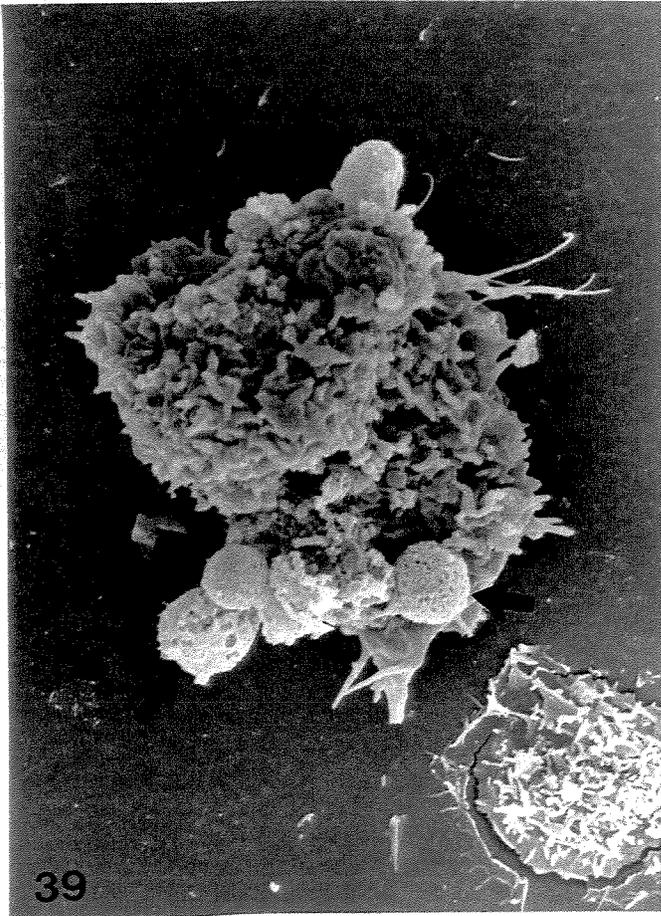
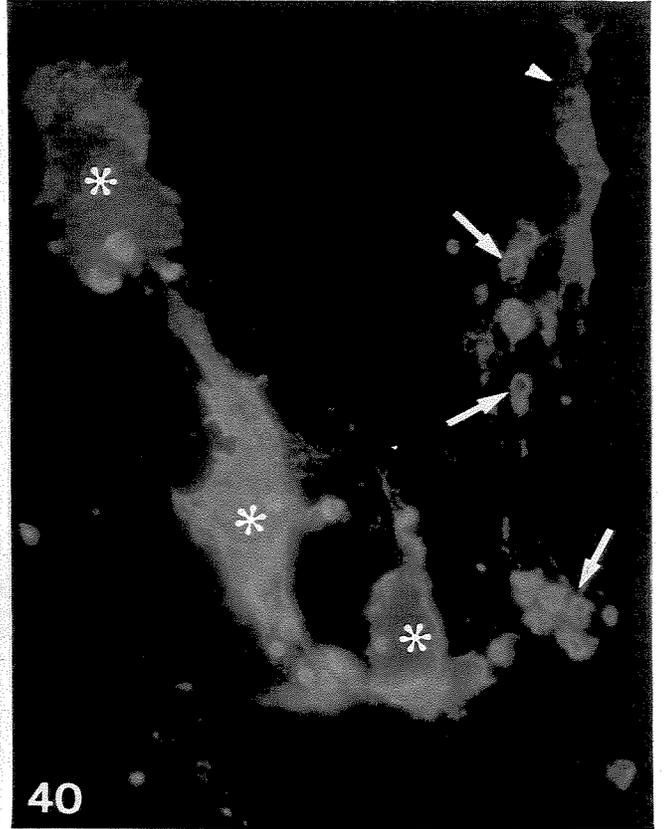
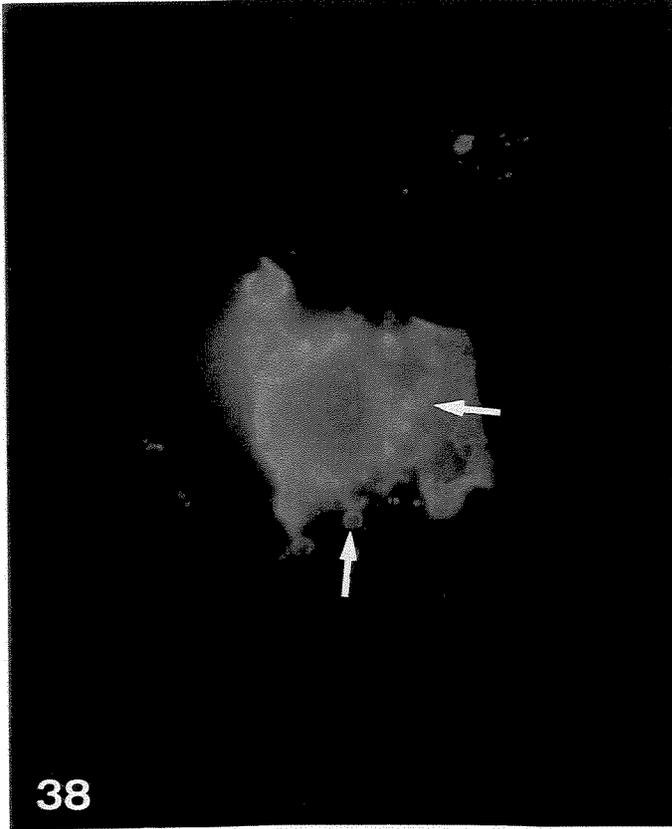












8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J. D. (1994) The cytoskeleton. In: *Molecular biology of the cell*. 3th ed. New York, Garland Publishing, 787-860.
- ANDERSON, D. M.; LYMAN, S. D.; BAIRD, A.; WIGNALL, J. M.; EISENMAN, J.; RAUCH, C.; MARCH, C. J., BOSWELL, H. S.; GIMPEL, S. D.; COSMAN, D. & WILLIAMS, D. E. (1990) Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell*, 63: 235-243.
- AOKI, K.; KAJIURA, S.; MATSUMOTO, Y.; OGASAWARA, M.; OKADA, S. YAGAMI, Y. & GLEICHER, N. (1995) Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet*, 345: 1340-1342.
- BAINES, M. G. & GENDRON, R. L. (1990) Are both endogenous and exogenous factors involved in spontaneous foetal abortion? *Res. Immunol.* 141: 154-158.
- BAKER, P. E.; GILLIS, S.; FERM, M. M. & SMITH, K. A. (1978) The effect of T cell Growth Factor on the generation of cytolytic T cells. *J. Immunol.*, 121: 2168-2173.
- BRAGA, V. M. M. & GENDLER, S. J. (1993) Modulation of Muc-1 mucin expression in the mouse uterus during the estrus cycle, early pregnancy and placentation. *J. Cell Sci.* 195: 397-405.
- BULMER, D. (1968) Further studies on the granulated metrial gland cells of the pregnant rat. *J. Anat.*, 103: 479-489.
- BULMER, D. & DICKSON, A. D. (1960) Observations on carbohydrate materials in the rat placenta. *J. Anat.*, 94: 46-58.
- BULMER, J. N.; JOHNSON, P. M., & BULMER, D. (1987) Leukocyte populations in human decidua and endometrium. In: *Immunoregulation and Fetal Survival*, GILL, T. J. II, & WEGMANN, T. G. (eds.) Oxford University Press, New York, 111.

- BURROWS, T. D.; KING, A & LOKE, Y. W. (1993) Expression of adhesion molecules by human decidual large granular lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 147: 81-94.
- CARDELL, R. R.; HISAW, F. L. & DAWSON, A. B. (1969) The fine structure of granular cells in the uterine endometrium of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) with a discussion of the possible function of these cells in relaxin secreton. *Am. J. Anat.*, 124: 307-340.
- CHEN, H. L., KAMATH, R.; PACE, J. L.; RUSSEL, S. W. & HUNT, J. S. (1994) Gestation-related expression of the interferon-gamma receptor gene in mouse uterine and embryonic hematopoietic cells. *J. Leukoc. Biol.*, 55: 617-625.
- CHEN, H. L.; YELAVARTHI, K. K. & HUNT, J. S. (1993) Identification of transforming growth factor-beta 1 mRNA in virgin and pregnant rat uteri by in situ hybridization. *J. Reprod. Immunol.*, 25: 221-233.
- CLARK, D. A. (1991) Controversies in reproductive immunology. *Crit. Rev. Immunol.*, 11: 215-247.
- CLARK, D. A. (1994) Maternal aggression against placenta? *Am. J. Reprod. Immunol.* 31: 205-207.
- CORREA DA SILVA, C. R. Estudo citoquímico e imunocitoquímico das células granulosas metriais em útero de camundongos (*Mus musculus*) prenhes. Campinas. 1997. 71p. Tese (mestrado). Instituto de Biologia. UNICAMP.
- CORREA DA SILVA, C. R.; JOAZEIRO, P. P.; YOKOTA, S. & YAMADA, A. T. (1996) Granules of endometrial NK-like cells show a specific lysosomal compartment. *Acta Histochem. Cytochem.*, 29: 487-488.
- COULAM, C. B., GOODMAN, C.; ROUSSEV, R. G.; THOMASON, E. J. & BEAMAN, K. (1995) D. Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. *Am. J. Reprod. Immunol.* 33: 40-46.
- CROY, B. A. (1990) Granulated metrial gland cells- interesting cells found in the pregnant uterus. *Am. J. Reprod Immunol.*, 23: 19-21.

- CROY, B. A. (1994) Granulated metrial gland cells: hypotheses concerning possible functions during murine gestation. *J. Reprod. Immunol.*, 27: 85-94.
- CROY, B. A. & KASSOUF, S. A. (1989) Evaluation of the murine metrial gland for immunological function. *J. Reprod. Immunol.*, 15: 51-69.
- CROY, B. A. & KISO, Y. (1993) Granulated metrial gland cells: a natural killer cell subset of the pregnant murine uterus. *Microsc. Res. Tech.*, 25: 189-200.
- CROY, B. A.; ALI, E.; ASHKAR, A. A.; FOSTER, R. A.; DISANTO, J. P.; MAGRAM, J.; CARSON, D.; GENDLER, S. J.; GRUSBY, M. J.; WAGNER, N.; MULLER, W. & GUIMOND, M. -J. (1997a). Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 35: 111-133.
- CROY, B. A.; CHAPEAU, C.; REED, N.; STEWART, I. & PEEL, S. (1991a) Is there an essential requirement for bone marrow-derived cells at the fetomaternal interface during successful pregnancy? A study of pregnancies in immunodeficient mice. In: *Molecular and cellular immunobiology of the maternal fetal interface*, WEGMANN, T.G.; GILL, T.J. III, NISBET-BROWN, E. (eds). New York, Oxford University Press, 168-188.
- CROY, B. A.; GUILBERT, L. J.; BROWNE, M. A.; GOUGH, N. M.; STINCHCOMB, D. T.; REED, N. & WEGMANN, T. G. (1991b). Characterisation of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. *J. Reprod. Immunol.*, 19: 149-166.
- CROY, B. A.; GUIMOND; M. -J.; LUROSS, J.; HAHNEL, A.; WANG, B. & VAN DEN HEUVEL, M. (1997b) Uterine natural killer cells (uNK) do not require Interleukin-2 for their differentiation or maturation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 33: 463-470.
- CROY, B. A.; LUROSS, J. A.; GUIMOND, M. J. & HUNT, J.S. (1996-97) Uterine natural killer cells: insights into lineage relationships and functions from

- studies of pregnancies in mutant and transgenic mice. *Nat. Immun.*, 15: 22-33.
- CROY, B. A.; MCBEY, B. -A.; VILLENEUVE, L. A.; KASAKABE, K.; KISO, Y. & VAN DEN HEUVEL, M. (1997c) Characterisation of cells that migrate from metrial glands of the pregnant mouse uterus during explant culture. *J. Reprod. Immunol.*, 32: 241-263.
- CROY, B. A.; REED, N.; MALASHENKO, B. A.; KIM, K. & KWON, B. S. (1991c) Demonstration of YAC target cell lysis by murine granulated metrial gland cells. *Cell Immunol.*, 133: 116-126.
- CROY, B. A.; YU, Z. -M. & KING, G. J. (1994) A review of the natural killer cell lineage in the uterus of the mouse and the pig. *J. Anim. Sci.*, 72: 9-15.
- DALLENBACH-HELLWEG, G. & NETTE, G. (1964) Morphological and histochemical observations on trophoblast and decidua of the basal plate of human placenta at term. *Am. J. Anat.*, 115: 309-326.
- DALLENBACH-HELLWEG, G.; DAWSON, A. B. & HISAW, F. L. (1966) The effect of relaxin on the endometrium of monkeys. Histological and histochemical studies. *Am. J. Anat.*, 119: 61-78.
- DAMJANOV, A. & DAMJANOV, I. (1992) Isolation of serine protease from granulated metrial gland cells of mice and rats with lectin from *Dolichos biflorus*. *J. Reprod. Fert.*, 95: 679-684.
- DRAKE, B. L. & HEAD, J. R. (1989) Murine trophoblast can be killed by lymphokine-activated killer cells. *J. Immunol.*, 143: 9-14.
- DELGADO, S. R.; MCBEY, B. -A.; YAMASHIRO, S.; FUJITA, J.; KISO, Y. & CROY, B. A. (1996) Accounting for the peripartum loss of granulated metrial gland cells, a natural killer cell population, from the pregnant mouse uterus. *J. Leuk. Biol.*, 59: 262 - 269.
- DYUGOVSKAYA, I.; BERKUTSKI, T. & GINSBURG, H. (1995) Characterisation of the morphogenetic course and secretion of two different types of mucoid

- material by granulated metrial gland/lymphokine-activated killer cells. *J. Anat.* 187: 693-708.
- GENDRON, R. L. & BAINES, M. G. (1988) Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. *Cell. Immunol.*, 113: 261-267.
- GINSBURG, H.; COLEMAN, R.; DAVIDSON, S.; KHOURY, C. & MOR, R. (1989) Lymphokine activated killer (LAK) cells are identical to the uterine granulated metrial gland (GMG) cells. *Transplant. Proc.*, 21: 186-189.
- GIRI, J. G.; AHDIEH, M.; EISENMAN, J. SHANEBECK, K.; GRABSTEIN, KUMANI, S.; NAMEN, A.; PARK, L. S.; COSMAN, D. & ANDERSON, D. (1994) Utilisation of the beta and gamma chains of IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO Journal*, 13: 2822-2830.
- GORMUS, B. J.; BASARA, M. L.; ARNESON, M. A. & KAPLAN, M. E. (1980) Capping of mouse spleen lymphocyte C3 receptors: effects of pharmacologic agents. *J. Immunol.*, 124: 2747-2753.
- GUIMOND, M. -J.; LUROSS, J. A.; WANG, B.; TERHORST, C.; DANIAL, S. & CROY, B. A. (1997) Absence of natural killer cells during murine pregnancy is associated with reproductive compromise in Tg ϵ 26 mice. *Biol. Reprod.*, 56: 169-179.
- GUIMOND, M. -J.; WANG, B. L. & CROY, B. A. (1998) Engraftment of bone marrow from severe combined immunodeficient (SCID) mice reverses the reproductive deficits in natural killer cell - deficient Tg ϵ 26 mice. *J. Exp. Med.*, 187: 217-233.
- GUIMOND, M. -J.; WANG, B. L. & CROY, B. A. (1999) Immune competence involving the natural killer cell lineage promotes placental growth. *Placenta*, 20: 441-450.
- GUIMOND, M. -J.; WANG, B. L.; FUJITA, J.; TERHORST, C. & CROY, B. A. (1996) Pregnancy-associated uterine granulated metrial gland cells in mutant and transgenic mice. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 35: 501-509.

- GULLBERG, M.; IVARS, F.; COUTINHO, A. & LARSSON, E. -L. (1981) Regulation of T cell growth factor production: arrest of TCGF production after 18 hours in normal lectin-stimulated mouse spleen cell cultures. *J. Immunol.*, 127: 407-411.
- HARGROVE, M. E. e TING, C. -C. (1988) Asialo GM1 as an accessory molecule determining the function and reactivity of cytotoxic T lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 112: 123-134.
- HARAGUCHI, C. M.; BIZINOTTO, M. C. & YAMADA, A. T. (1999) Expression of glycoconjugates containing N-acetyl-galactosamine by uterine natural killer cells. *Acta Mic.*, 8: 277-288.
- HEAD, J. R. (1996-97) Uterine natural killer cells during pregnancy in rodents. *Nat. Immun.*, 15: 7-21.
- HELANDER, T. S. & TIMONEN, T. (1998) Adhesion in NK Cell Function. In: Specificity, Function, and Development of NK Cells, KÄRRE, K. & COLONNA, M. (eds). Berlin-Heidelberg, Springer, 89-99.
- HERBERMAN, R. B. (1982) Natural killer cells and their possible relevance to transplantation biology. *Transplantation*, 34: 1-7.
- HUNT, J. S. (1989) Cytokine networks in the uteroplacental unit: macrophages as pivotal regulatory cells. *J. Reprod. Immunol.*, 16: 1-17.
- HUNT, J. S. (1990) The role of macrophages in the uterus response to pregnancy. *Placenta*; 11: 467-475.
- HUNT, J. S. (1994) Immunologically relevant cells in the uterus. *Biol. Reprod.*, 50: 461-466.
- HUNT, J. S. & POLLARD, J. W. (1992) Macrophages in the uterus and placenta. In: Current Topics in Microbiology and Immunology (Macrophages and Macrophages Activation), GORDON, S. & RUSSELL, S. W. (eds). Berlin-Heidelberg, Springer, 36-63.

- INOUE, T. & SENDO, F. (1983) *In vitro* induction of cytotoxic polymorphonuclear leukocytes by supernatant from a concanavalin A-stimulated spleen cell culture. *J. Immunol.*, 131: 2508-2514.
- KING, A. (1999) Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors. *Placenta*, 20: A. 6.
- KING, A. & LOKE, Y. W. (1990a) Uterine large granular lymphocytes: a possible role in embryonic implantation? *Am J. Obstet Gynecol.*, 162: 308-310.
- KING, A & LOKE, Y.W. (1990b) Human trophoblast and JEG choriocarcinoma cells are sensitive to lysis by IL-2-stimulated decidual NK cells. *Cell. Immunol.* 129: 435-448.
- KING, A; WOODING, P.; GARDNER, L. & LOKE, Y.W. (1993) Expression of perforin, granzyme A and TIA-1 by human uterine CD56+ NK cells implies they are activated and capable of effector functions. *Human Reprod.*, 8: 2061-2067.
- KISO, Y.; MCBEY, B. A. & CROY, B. A. (1992a) Granulated metrial gland cells in the pregnant uterus of mice expressing the collagen mutation tight - skin (Tsk/+). *Cell Tiss. Res.*, 268: 393-396.
- KISO, Y.; POLLARD, J. W. & CROY, B. A. (1992b) A study of granulated metrial gland cell differentiation in pregnant, macrophage - deficient, osteopetrotic (op/op) mice. *Experientia*, 48: 973-975,
- KISO, Y.; TOKUNAGA, Y.; KUSAKABE, K.; OKADA, T.; MORIKAWA, Y. & SASAKI, F. (1998) Isolation of granulated metrial gland cells, a uterine form of natural killer cell, by magnetic immunobeads particles. *J. Reprod. Dev.*, 44: 107-111.
- KISO, Y.; YOSHIZAWA, M.; WILSON, J, A.; MCBEY, B. A & CROY, B. A (1994) Immuno-histochemical analysis of beta-1 integrin receptors displayed by murine uterine natural killer cells over the course of successful pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 27: 213-225.

- LASNITZKI, I. (1986) Organ culture. In: *Animal cell culture - A practical approach*, FRESHNEY, R. I (ed). Oxford, IRL Press, 149-181.
- LI, H.; KNIEP, E.; EMMENDORFFER, A., & LOHMANN-MATTHES, M. L. (1991) Differentiation of macrophage precursors to cells with LAK activity under the influence of CSF-1 and high dose IL-2. *Scand. J. Immunol.*, 33: 511-520.
- LIMA, E. A. A.; JAMUR, M. C.; FONSECA, P. M.; JOAZEIRO, P. P. & YAMADA, A. T. (1999) Uterine natural killer cells isolation by lectin reacted streptavidin coated magnetic beads. *Acta Mic.*, 8: 279-280.
- LINNEMEYER, P. A. & HAMILTON, M. S. (1990) A monoclonal antibody, 4H12, recognizes a surface antigen found on granulated metrial gland cells in the murine decidua. *J. Immunol.* 17: 279-294.
- LINNEMEYER, P. A. & POLLACK, S. B. (1991) Murine granulated metrial gland cells at uterine implantation sites are natural killer lineage cells. *J. Immunol.*, 147: 2530-2535.
- LINNEMEYER, P. A. & POLLACK, S. B. (1994) Stage specific expression of activation antigens on NK cells at uterine implantation sites in mice. *J. Immunol.*, 153: 1478-1485.
- LIU, C. -C.; PARR, E. L. & YOUNG, J. D.-E. (1994) Granulated lymphoid cells of the pregnant uterus: morphological and functional features. *Int. Rev. Cytol.*, 153: 105-136.
- LIU, C. C.; RAFFI, S.; GRANELLI-PIPERNO, A.; TRAPANI, J. A. & YOUNG, J. D. -E. (1989) Perforin and serine esterase gene expression in stimulated human T cells: kinetics, mitogen requirements, and effects of cyclosporin A. *J. Exp. Med.* 170: 2105-2118.
- LOHMANN-MATTHES, M. L.; EMMENDORFFER, A. & HAO, L. (1991) Influence of interleukin-2 on the differentiation of macrophages. *PathoBiol.*, 59: 117-121.

- MAKIDA, R.; MINAMI, M.; TAKAMIZAWA, M.; JUJI, T.; FUJII, T. & MIZUNO, M. (1991) Natural killer cell activity and immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. *Lancet*, 338: 579-580.
- MASON, L. H. GIARDINA, S. L., HECHT, T., ORTALDO, J. & MATHIESON, B. J. (1988) LGL-1: a non-polymorphic antigen expressed on a major population of mouse natural killer cells. *J. Immunol.*, 140: 4403-4412.
- MUKHTAR, D. D. Y. & STEWART, I. J. (1988) Migration of granulated metrial gland cells from cultured explants of mouse metrial gland tissue. *Cell Tiss. Res.*, 253: 413 - 417, 1988.
- MUKHTAR, D. D. Y. & STEWART, I. J. (1993a) Observations of the cellular changes in cultured mouse metrial gland explants and of the maintenance of granulated metrial gland cells *in vitro*. *Tissue and Cell*, 25: 857-864.
- MUKHTAR, D. D. Y. & STEWART, I. J. (1993b) The surface morphology of mouse metrial gland cells. *J. Anat.*, 182: 415-424.
- MUKHTAR, D. D. Y.; STEWART, I. J. & CROY, B. A. (1989) Leucocyte membrane antigens on mouse granulated metrial gland cells. *J. Reprod. Immunol.*, 15: 269-79.
- NIETO, M.; NAVARRO, F.; PEREZ-VILLAR, J. J.; POZO, M. A.; GONZÁLEZ-AMARO, R.; MELLADO, M.; FRADE, J. M. R.; MARTÍNEZ-A, C.; LÓPEZ-BOTET, M. & SÁNCHEZ-MADRID, F. (1998) Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions. *J. Immunol.*, 161: 3330-3339.
- NOMURA, S.; WILLS, A. J.; EDWARDS, D. R.; HEATH, J. K.; HOGAN, B. L. M. (1988) Developmental expression of Zar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *J. Cell. Biol.*, 106: 441-450.
- OGLE, T. F.; DAÍ, D.; GEORGE, P. & MAHESH, V. B. (1997) Stromal cell progesterone and estrogen receptors during proliferation and regression of the decidua basalis in the pregnant rat. *Biol. Reprod.*, 57: 495-506.
- ORTALDO, J. R. & HERBERMANN, R. B. (1984) Heterogeneity of natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2: 359-394.

- PAFFARO, JR. V. A.; HARAGUCHI, C. M.; FONSECA, P. M.; JACOBUCCI, G. B.; JOAZEIRO, P. P. & YAMADA, A. T. (1999) Glycoconjugates containing N-Acetyl-Galactosamine expressed by mouse uterine natural killer used as selective cell marker. *Placenta*, 20: A.51.
- PARR, E. L.; PARR, M. B. & YOUNG, J. D. -E. (1987) Localization of a pore-forming protein (perforin) in granulated metrial gland cells. *Biol. Reprod.*, 37: 1327-1335.
- PARR, E. L.; PARR, M. B.; ZHENG, L. M. & YOUNG, J. D. -E. (1991) Mouse granulated metrial gland cells originate by local activation of uterine natural killer lymphocytes. *Biol. Reprod.*, 44: 834 - 841.
- PARR, E. L.; SZARY, A. & PARR, M. B. (1990a) Measurement of natural killer activity and target cell binding by mouse metrial gland cells isolated by enzymatic or mechanical methods. *J. Reprod. Fert.*, 88: 283 -294.
- PARR, E. L.; YOUNG, L. H. Y.; PARR, M. B. & YOUNG, J. D. -E. (1990b) Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases. *J. Immunol.*, 145: 2365-2372.
- PEEL, S. (1989) Granulated metrial gland cells. *Adv. Anat Embryol. Cell Biol.*, 115:1-112.
- PEEL, S. & ADAM, E. (1991) The killing of the rat placental cells by rat and mouse granulated metrial gland cells in vitro. *Placenta*, 12: 161-171.
- PEEL, S. & BULMER, J. N. (1977) The fine structure of the metrial gland in relation to the origin of the granulated cells. *J. Anat.*, 123: 687-695, 1977.
- PEEL, S. & BULMER, J. N. (1996) Lectin histochemistry of pregnant rat uterine tissues. *J. Anat.*, 188: 197-205.
- PEEL, S. & STEWART, I. (1984) The differentiation of granulated metrial gland cells in chimeric mice and the effect of uterine shielding during irradiation. *J. Anat.*, 139: 593 - 598.
- PEEL, S. & STEWART, I. (1986) Oestrogen and the differentiation of granulated metrial gland cells in chimeric mice. *J. Anat.*, 144: 181-187.

- PERSECHINI, P. M.; LIU, C. C.; DETMERS, P. A. & YOUNG, J. D. E. (1989) Heterogeneity of granules of murine cytolytic T lymphocytes. Isolation of a homogeneous population of dense granules. *J. Immunol. Meth.*, 124: 7-15.
- SAITO, S.; NISHIKAWA, K.; MORII, T.; ENOMOTO, M.; NARITA, N.; MOTOYOSHI, K. & ICHIJO, M. (1993) Cytokine production by CD16-CD56 (bright) natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int. Immunol.*, 5: 559-563.
- SALCEDO, T. W.; AZZONI, L.; WOLF, S. F. & PERUSSIA, B. (1993) Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *J. Immunol.*, 151: 2511-2520.
- SANTONI, A.; GISMONDI, A.; MORRONE, S.; PROCOPIOK, A.; MODESTI, A.; SCARPA, S.; D'ORAZI, G.; PICOLLI, M. & FRATI, L. (1989) Rat natural killer cells synthesise fibronectin: possible involvement in the cytotoxic function. *J. Immunol.*, 143: 2415-2421.
- SLADEK, S. M.; KANBOUR-SHAKIR, A.; WATKINS, S.; BERGHORN, K. A.; HOFFMAN, G. E. & ROBERTS, J. M. (1998) Granulated metrial gland cells contain nitric oxide synthases during pregnancy in the rat. *Placenta*, 19: 55-65.
- SLUVKIN, I. I.; CHERNYSHOV, V. P.; MERKULOVA, A. A.; VODYANIK, M. A. & KALINOVSKY, A. K. (1994) Differential expression of adhesion and homing molecules by human decidual and peripheral blood lymphocytes in early pregnancy. *Cell. Immunol.*, 158: 29-45.
- SMYTH, M. J.; ORTALDO, J. R.; BERE, W.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. & Young, H. A. (1990) IL-2 and IL-6 synergize to augment the pore-forming protein gene expression and cytotoxic potential of human peripheral blood T cells. *J. Immunol.*, 145: 1159-1166.
- SOMERSALO, K.; TARKKANEN, J.; PATARROYO, M. & SAKSELA, E. (1992) Involvement of β -2 integrins in the migration of human natural killer cells. *J. Immunol.*, 149: 590-598.

- STALLMACH, T.; EHRENSTEIN, T.; ISENMANN, S. MULLER, C.; HENGARTNER, H. & KAGI, D. (1995) The role of perforin-expression by granular metrial gland cells in pregnancy. *Eur. J. Immunol.*, 25: 3342-3348.
- STEWART, I. J. (1983) An investigation into the differentiation of granulated metrial gland cells in the early pregnant mouse uterus. *J. Anat.*, 137: 85-93.
- STEWART, I. J. (1987) Differentiation of granulated metrial gland cells in ovariectomized mice given ovarian hormones. *J. Endocr.*, 112: 23-26.
- STEWART, I. J. (1990) Granulated metrial gland cells in the mouse placenta. *Placenta*, 11: 263 - 275.
- STEWART, I. J. (1991) Granulated metrial gland cells: pregnancy specific leukocytes? *J. Leuk. Biol.*, 50: 198-207.
- STEWART, I. J. & MUKHTAR, D. D. Y. (1988) The killing of mouse trofoblast cells by granulated metrial gland cells in vitro. *Placenta*, 9: 417-425.
- STEWART, I. J. & MUKHTAR, D. D. Y. (1994) A scanning electron microscopy study of interactions between mouse granulated metrial gland cells and placental trophoblast cells in vitro. *J. Anat.*, 184:153-6.
- STEWART, I. & PEEL, S. (1977) The structure and differentiation of granulated metrial gland cells in the pregnant mouse uterus. *Cell and Tissue Res.*, 184: 517 - 527.
- STEWART, I. & PEEL, S. (1978) The differentiation of the decidual and the distribution of metrial gland cells in the pregnant mouse uterus. *Cell Tiss. Res.*, 187: 167 - 179.
- STEWART, I. & PEEL, S. (1980) Granulated metrial gland cells at implantation sites of the pregnant mouse uterus. *Anat. Embryol.*, 160: 227-238.
- STEWART, I.; PEEL, S. & WEBSTER, A. J. (1996) A study of natural cytotoxic (NC) activity in the metrial glands of rats and mice. *Scand. J. Immunol.*, 44: 394-400.
- TRINCHIERI, G. (1989) Biology of the natural killer cells. *Adv. Immunol.*, 47: 187-376.

- VAN DEL HEUVEL, M.; MCBEY, B. -A .; HAHNEL, A . C. & CROY, B. A. (1996) An analysis of the uterine lymphocyte-derived hybridomal cell line GWM 1-2 for expression of receptors for estrogen, progesterone and interleukin 2. *J. Reprod. Immunol.*, 31: 37-50.
- WEGMANN, T. G. & GUILBERT, L. J. (1992) Immune signalling at the maternal-fetal interface and trophoblast differentiation. *Dev. Comp. Immunol.*, 16: 425-430.
- WELSH, A .O. & ENDERS, A. C. (1987) Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat. *Anat. Rec.* 217: 203-219.
- WELSH, A .O. & ENDERS, A. C. (1993) Chorioallantoic placenta formation in the rat. III. Granulated cells invade the uterine luminal epithelium at the time of epithelial cell death. *Biol. Reprod.*, 49: 38 - 57.
- WHITELAW, P. F. & CROY, B. A. (1996) Granulated lymphocytes of pregnancy. *Placenta*, 17: 533-543.
- WISLOCKI, G. B., WEISS, L. P., BURGOS, M. H. & ELLIS, R. A. (1957) The cytology, histochemistry and electron microscopy of the granular cells of the metrial gland of the gravid rat. *J. Anat.*, 91: 130-140.
- YE, W.; ZHENG, L. -M.; YOUNG, J. D. -E. & LIU, C. C. (1996) The involvement of interleukin (IL)-15 in regulating the differentiation of granulated metrial gland cells in mouse pregnant uterus. *J. Exp. Med.*, 184: 2405-2410.
- YELAN, F. D.; EDGEWORTH, N. A.; DONG, L. J.; CHUNG, A. E. & ARMANT, D. R. (1993) Recombinant entactin promotes mouse primary trophoblast cell adhesion and migration through the Arg-Gly-Asp (RGD) recognition sequence. *J. Cell Biol.*, 121: 923-929.
- YOKOI, H.; NAKAYAMA, H.; HORIE, K.; FUKUMOTO, M.; FUJITA, K.; KANEKO, Y.; IWAI, M.; NATSUYAMA, S.; KANZAKI, H.; MORI, K. J. & FUJITA, J. (1994) High incidence of uterine inversion in mast cell-deficient osteopetrotic mutant mice of mi/mi genotype. *Biol. Reprod.*, 50:1034-1039.

- YOKOYAMA, M.; SANO, M.; SONODA, K.; NOZAKI, M.; NAKAMURA, G. I. & NAKANO, H. (1994) Cytotoxic cells directed against placental cells detected in human habitual abortions by an in vitro terminal labeling assay. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 31: 197-204.
- ZHENG, L. M.; LIU, C. -C.; OJCIUS, D. M. & YOUNG, J. D. -E. (1991a) Expression of lymphocyte perforin in the mouse uterus during pregnancy. *Cell Sci.*, 99: 317-323.
- ZHENG, L. M.; OJCIUS, D. M. & YOUNG, J. D. -E. (1991b) Role of granulated gland cells in the immunology of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 25: 72-76.
- ZHENG, L. M.; OJCIUS, D. M. & YOUNG, J. D. -E. (1993) Perforin-expressing cells during spontaneous abortion. *Biol. Reprod.*, 48: 1014-1019.
- ZHENG, L. M.; OJCIUS, D. M.; LIU, C. -C.; KRAMER, M. D.; SIMON, M. M.; PARR, E. L. & YOUNG, J. D. -E. (1991c) Immunogold labeling of perforin and serine esterases in granulated metrial gland cells. *FASEB J.*, 5: 79-85.