THALITA MARTINS FERRAZ

**AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO “MOUSE ANTI-MOUSE-
UNK CLONE 1” E A LOCALIZAÇÃO DA MOLÉCULA ANTIGÊNICA
CORRESPONDENTE NAS CÉLULAS UNK DE CAMUNDONGOS**

THALITA MARTINS FERRAZ

Avaliação da especificidade do anticorpo “mouse anti-mouse-uNK clone 1” e a localização da molécula antigênica correspondente nas células uNK de camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos

Orientador:

Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada

São Paulo
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgílio Boff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1 829
FNVZ

Fernaz, Thalita Marlins

Avaliação da especificidade do anticorpo mouse anti-mouse-UNK done 1^o e a localização da molécula antigênica correspondente nas células UNK de camundongos / Thalita Marlins Fernaz. – São Paulo: Fernaz, T. M. Fernaz, 2006.

73 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Auro Takumi Yamada.

1. UNK. 2. Anticorpo monoclonal. 3. Gestação. 4. Citoesqueleto.
I. Título.

ERRATA

FERRAZ, T. M. **Avaliação da especificidade do anticorpo “mouse anti-mouse-uNK clone 1” e a localização da molécula antigênica correspondente nas células uNK de camundongos.** [Evaluation of the antibody “mouse anti-mouse-uNK clone 1”, specificity and localization of the correspondent epitopes in mice uNK cells]. 2006. 73 f. Dissertação de Mestrado em Ciências – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Folhas	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3	1	73 f.: il.	58 f.: il.
Resumo	1	5	73 f. Dissertação de Mestrado em Ciências -	58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) -
Abstract	1	5	73 f. Dissertação de Mestrado em Ciências -	58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) -

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERRAZ, Thalita Martins

Título: Avaliação da especificidade do anticorpo “mouse anti-mouse-uNK clone 1” e a localização da molécula antigênica correspondente nas células uNK de camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Porf. Dr.:	Instituição:
Assinatura:	Julgamento:
<hr/>	
Porf. Dr.:	Instituição:
Assinatura:	Julgamento:
<hr/>	
Porf. Dr.:	Instituição:
Assinatura:	Julgamento:
<hr/>

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1177-1, sobre "Avaliação da especialidade do anticorpo "mouse anti-mouse-uNK clone 1" e a localização da molécula antigênica correspondente nas células uNK de camundongos" sob a responsabilidade de Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamanada / Thalita Martins Ferraz está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em 11 de dezembro de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1177-1, entitled "Evaluation of specificity of antibody "mouse anti-mouse-uNK clone 1" and localization of antigenic epitopes for anti-uNK antibody of mice", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 11, 2006.

Campinas, 11 de dezembro de 2006.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Dedico este trabalho

A minha mãe, Marlene, por iluminar minha vida, minha alma e ser a responsável pelo que sou.

A minha irmã, Sarah, eterna parceira, confidente e meu braço direito em todas as horas.

Ao meu pai de coração, Odair, pelo inestimável carinho e por me mostrar que alguns anjos que aparecem em nossa vida não tem asas.

Obrigada por fazerem parte desta história, amo muito vocês!

Uma noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e através do céu, passavam cenas da minha vida.

Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era meu e o outro era do Senhor.

Quando a última cena passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso me aborreceu deveras e perguntei então ao Senhor:

- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o caminho. Contudo, notei que durante as maiores atribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu:

- Meu querido filho. Jamais eu te deixaria nas horas de provas e de sofrimento. Quando viste, na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas. Foi exatamente aí que eu te carreguei nos braços.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me ajudar a trilhar meu caminho superando os obstáculos sem perder a esperança.

A minha família, Mamãe, Neném e Di pelo constante incentivo, força, amor, além das visitas à Campinas para sanar minhas carências.

Ao meu orientador Prof. Dr. Áureo Tatsumi Yamada, por me guiar com pulso de ferro e coração de ouro, como somente os grandes mestres podem fazer.

Ao curso de Pós Graduação de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ por ter me recebido como aluna.

Aos docentes do Departamento de Anatomia - FMVZ/USP pelo suporte em todas as atividades didáticas desenvolvidas durante o curso.

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

Ao laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica do Departamento de Histologia e Embriologia - IB/UNICAMP, onde recebi toda assistência para realizar meus experimentos.

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica - IB/UNICAMP, principalmente a Antonia, Adriane, Loló e Cidinha, pelo apoio essencial em diversos momentos e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Aos amigos que mostraram que mais forte do que o laço de sangue é o laço feito entre corações e por isso se tornaram parte da minha família:

Juares, obrigada pela ajuda no laboratório, caronas, passeios e por todos os paparicos que somente um melhor amigo é capaz de oferecer;

Patrick, meu fiel escudeiro, nunca pensei que pudesse encontrar alguém tão parecido comigo, grata por escutar meus desabafos e por estar ao meu lado em todos os momentos bons e ruins;

Renata, obrigada pelo carinho, companheirismo, por me levar à academia e por sempre me enriquecer com seus conselhos;

Petra, meu ombro amigo de todas as horas, agradeço pelos puxões de orelha, colo e por estar junto a mim durante esse caminho de novas descobertas;

Aline, uma das pessoas mais meigas que já conheci, obrigada por toda a ajuda e por nunca me deixar perder a fé.

A família Castelhana Cezar, especialmente a amiga Carina, que me acompanha desde a pré-escola me apoiando em todas as etapas da minha vida.

A Eduardo e Thais, colegas de monitoria em anatomia, foram imprescindíveis me ajudando a entender o universo da anatomia animal.

Aos amigos Adriano, Eduardo, Eliana, Fabíola, Gabriela, Juliana, Juvani, Karina, Luciana, Márcia, Marlúcia, Patrícia, Suzana, Viviane, pela agradável convivência durante todo esse tempo.

Ao secretário do programa de Pós Graduação Maicon pela disponibilidade, paciência e por sempre estar disposto a ajudar.

Aos funcionários do DHE Marta, Baltazar, Rita, Beatriz, Neuza, Raquel pela convivência e colaboração diária.

Ao Kim, amor da minha vida e meu fiel companheiro.

Aos camundongos cujas vidas foram dadas para a realização deste trabalho.

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

*"Quanto mais íngreme o caminho da vida, mais nivelado
precisa estar sua mente"*
(Horacio)

RESUMO

FERRAZ, T. M. Avaliação da especificidade do anticorpo “mouse anti-mouse-uNK clone 1” e a localização da molécula antigênica correspondente nas células uNK de camundongos. [Evaluation of the antibody “mouse anti-mouse-uNK clone 1”, specificity and localization of the correspondent epitopes in mice uNK cells]. 2006. 73 f. Dissertação de Mestrado em Ciências – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

No útero gestante dos animais com placentação do tipo hemocorial, ocorre uma migração e acúmulo transitório de linfócitos *natural killer* (NK), cuja atuação na gestação não está totalmente elucidada. Estas células NK do ambiente uterino (uNK) apresentam comportamento distinto daquelas encontradas no sangue circulante (cNK), constituindo uma sub-população das células NK com expressão gênica específica ditada pelo ambiente uterino gestante. De fato, se estas células isoladas do útero de camundongos prenhes forem inoculadas em machos da mesma espécie eram capazes de induzir a resposta imunológica com produção de anticorpos que reagem especificamente com as células uNK. No presente trabalho foi utilizado um destes anticorpos monoclonais denominados de “*mouse anti-mouse uterine natural killer cell clone 1 (mam-uNK1)*” obtidos anteriormente em nosso laboratório para avaliar a especificidade deste anticorpo e a localização da molécula antigênica correspondente. Para tanto, foram utilizados cortes histológicos do útero no 9º dia de gestação, dos órgãos linfóides (baço, timo e linfonodo), do cérebro, do fígado e do coração submetidos à reações imunocitoquímicas com o anticorpo *mam-uNK1* em nível da microscopia de luz e, pela imunomicroscopia eletrônica nas células uNK do útero gestante e células estriadas cardíacas do miocárdio. Foram obtidos homogenados teciduais dos mesmos órgãos avaliados pela imunocitoquímica para realização do *SDS-PAGE* e *Western-blot* com o intuito de identificar as frações protéicas reativas e homologia entre os diversos órgãos. Os padrões de imunomarcagem com o *mam-uNK1* foram comparadas com o padrão de reatividade da lectina DBA (*Dolichos biflorus*) tanto nos cortes histológicos quanto nos homogenados submetidos ao *Western-blot*. Os resultados demonstraram reação positiva distribuída difusamente no citoplasma, com maior intensidade no perímetro das células uNK, e marcação difusa no citoplasma das células decíduais e das células musculares lisas do miométrio. Reações positivas foram encontradas

também no citoplasma das células musculares cardíacas, no citoplasma das células reticulares dos órgãos linfóides, nos feixes de nervos do sistema nervoso central e no citoplasma dos hepatócitos. Pela imunomicroscopia eletrônica foram observadas partículas de ouro coloidal em maior número no citoplasma que preenchem os prolongamentos citoplasmáticos tipo microvilosidades e no citoplasma marginal abaixo da membrana plasmática nas células uNK. Nas células musculares cardíacas as marcações mais intensas foram constatadas no citoplasma da extremidade destas células onde as miofibrilas eram menos organizadas e se ancoravam à membrana plasmática. Pelo *Western-blot*, foram identificadas duas bandas reativas ao *mam-uNK1* com peso molecular de 52 e 54 kDa comuns a todos os órgãos analisados. Estes dados demonstram que a molécula reconhecida pelo anticorpo *mam-uNK1* tem ampla distribuição em diversos tipos celulares não sendo específica para as células uNK, porém apresentam uma localização peculiar nestas células e nas células musculares cardíacas. Pelo padrão de localização identificado em imunomicroscopia eletrônica, presume-se que estas moléculas estejam associadas com a modulação do citoesqueleto nas diversas atividades que estes componentes estruturais desempenham nas células, sendo particularmente interessante a relação com a motilidade celular.

Palavras-chave: uNK, anticorpo monoclonal, gestação, citoesqueleto

ABSTRACT

FERRAZ, T. M. Evaluation of the antibody “mouse anti-mouse-uNK clone 1”, specificity and localization of the correspondent epitopes in mice uNK cells.[Avaliação da especificidade do anticorpo “mouse anti-mouse-uNK clone 1” e a localização da molécula antigênica correspondente nas células uNK de camundongos]. 2006. 73 f. Dissertação de Mestrado em Ciências – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

In the pregnant uterus of animals developing hemochorial type placentation occurs a transient migration and accumulation of natural killer lymphocytes (NK) which activity in the pregnancy has not been fully elucidated. These NK cells from uterine environment (uNK) present a distinct behavior from those found in the peripheral circulating blood (cNK), composing a subset of NK cells with specific gene expression that is regulated by pregnant uterus. Actually, these cells isolated from pregnant mice uteri were inoculated in the male mice of same strains, they induced immune response with production of antibodies reactivity specifically to uNK cells. In the present work it was used one of these *mouse anti-mouse uterine natural killer cells* clone 1 (*mam-uNK1*) monoclonal antibody that was obtained previously in our laboratory, in the aim to evaluate the specificity of this antibody and localization of corresponding antigenic molecule. It was used histological sections of uteri on 9^o gestational day, lymphoid organs (spleen, thymus and lymph node), brain, liver and heart processed for immunocytochemistry with mam-uNK antibody at light microscopy and immunoelectron microscopy for uNK cells in pregnant uterus and cardiac muscle cells. Tissue homogenates from the same organs that were evaluated by immunocytochemistry were obtained to perform SDS-PAGE and Western-blot primary to identify the proteins fractions reactive with mam-uNK antibody and possible homology among the tissues. The immunolabeling pattern using mam-uNK both, in histological sections and Western-blot were compared with pattern of *Dolichos biflorus* (DBA) lectin reactions. The results showed diffuse positive reaction distributed in the cytoplasm with higher intensity on perimeter of uNK cells and diffuse labeling in the cytoplasm of decidual cells and, in smooth muscle cells of miometrium. Positive reaction was also found in the cytoplasm of cardiac muscle cells, reticular cells of lymphoid organs, hepatocytes and in the axon bundles of the brain. By immunelectron microscopy, were observed higher number of gold particles in the cytoplasm of microvillous-like cell processes and in the marginal cytoplasm

near the plasma membrane of uNK cells. In the cardiac muscle cells the most conspicuous labeling was seen in the cytoplasm of muscle cells at the end portions, that is, where the myofibrills were less organized and anchoring to plasma membrane. The Western-blot identified two bands with 52 and 54 kDa reactive do mam-uNK constantly found in all organs analyzed. These data show that the molecule that is recognized by *mam-uNK1* antibody is widely distributed in several cell types, not specific for mouse uNK cells, but has a very peculiar localization in these cells and in the cardiac muscle cells. To the localization pattern that was identified by immunoelectron microscopy it was suggested that, these molecules were associated to the modulation of the cytoskeleton in many activities that these structural component potentially could carry out in the cells, being particularly attractive those related to cell motility.

Key words: uNK, monoclonal antibody, pregnancy, cytoskeleton.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Biologia das Células Natural Killer uterinas	3
1.2	Marcadores específicos para as células uNK de camundongos.....	7
2	OBJETIVOS	9
2.1	Objetivo geral.....	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1	Animais	12
3.2	Coleta e processamento das amostras.....	12
3.2.1	Material para Microscopia de Luz	12
3.2.2	Material para Microscopia Eletrônica	12
3.2.3	Obtenção de homogenados teciduais.....	13
3.3	Reações Imunocitoquímicas com o anticorpo mouse anti-mouse- uNK1 (<i>mam-uNK1</i>)	13
3.3.1	Microscopia de luz	13
3.3.2	Microscopia eletrônica	14
3.4	Reação Citoquímica com lectina <i>Dolichos biflorus</i> (DBA).....	15
3.5	Reações Imunoquímicas com o anticorpo mouse anti-mouse-uNK1 (<i>mam-uNK1</i>) e lectina	16
3.5.1	SDS-PAGE e Westen-blot	16
3.5.1.1	<i>Tratamento com periodato</i>	17
4	RESULTADOS	18
4.1	Microscopia de Luz	19
4.1.1	Análise das reações Imunocitoquímicas:	19
4.1.1.1	<i>Útero gestante</i>	19
4.1.1.2	<i>Órgãos diversos</i>	19
4.1.2	Análise das reações citoquímicas com a lectina DBA	20
4.1.2.1	<i>No útero gestante</i>	20
4.1.2.2	<i>Órgãos diversos</i>	20
4.2	SDS-PAGE e Western Blotting	20

4.3	Microscopia Eletrônica	21
4.3.1	Células uNK	21
4.3.2	Órgãos linfóides e Miocárdio.....	21
5	DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	22
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIA	48

1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos pelos quais o feto não é rejeitado pelo sistema imune materno durante a gravidez normal não são completamente elucidados. O endométrio decidualizado é o tecido materno em mais íntimo contato com o trofoblasto na interface materno-fetal onde se presume que as interações imunológicas entre a mãe e o feto acontecem durante a gravidez (BULMER, 1995). As evidências asseguram o envolvimento de um sistema imune especializado na parte materna da placenta (LAIRD et al, 2003), onde se destaca a incidência de linfócitos Natural Killer (NK) especializados, que surgem no útero como leucócitos dominantes no início da gestação de muitos mamíferos, incluindo humanos e roedores, concomitantemente à transformação das células do estroma uterino, dependentes de progesterona, em decídua (ASHKAR et al, 2000; MOFFETT-KING, 2002).

De todas as gestações detectadas clinicamente em humanos, aproximadamente 10 a 15% culminam em aborto durante o primeiro trimestre. Embora em grande parte sejam esporádicos e não recorrentes, existe um grupo envolvendo 2 a 5% dos casais que sofre aborto recorrente, o qual é definido como a perda de três ou mais gestações consecutivas no primeiro trimestre da gestação (LAIRD et al, 2003). As causas de aborto recorrente são classificadas como sendo de origens genéticas, endocrinológicas, anatômicas, imunológicas, microbiológicas e ambientais (TAKESHITA, 2004). A etiologia em aproximadamente 50% dos casos dos abortos recorrentes é desconhecida, mas tem sido postulado que uma proporção de 80% dessas perdas de gestações repetidas seja devido a causas imunes (LAIRD et al, 2003; KOTLAN et al, 2001).

Em animais experimentais de laboratório, em particular nos camundongos, altas taxas de aborto espontâneo, que ocorrem na combinação de acasalamento CBA/J x DBA/2, têm sido um modelo para definir alguns mecanismos que poderiam ser relacionados com pacientes humanos que sofrem de aborto recorrente (CLARK ET AL 2004). Esta alta incidência de gestações que não chegam a termo ocorre em todos os mamíferos sendo uma das causas apontadas, a resposta imune inadequada do organismo materno.

O fato das células Natural Killer, uma população de linfócitos associados à resposta imune do tipo inata compreender a população leucocitária mais abundante no útero gestante, faz pressupor o seu envolvimento em papéis fisiológicos importantes desde o processo de implantação e no decorrer da gestação normal (ASHKAR et al, 2000; MOFFETT-KING, 2002).

1.1 Biologia das Células Natural Killer uterinas

As células Natural Killer (NK) são linfócitos derivados da medula óssea e dentre as suas características está a atividade citotóxica em resposta imunológica não mediada através da pré-sensibilização por antígenos (TRINCHINERI, 1989; GUMPERZ AND PARHAM, 1995), atuando na via da resposta imune inata.

As células NK expressam diversos receptores de superfície, responsáveis pelo reconhecimento de células alvo e sinalização para produção de citocinas (MORETTA, 2004; YOKOYAMA, 2003; LANIER, 2005). Estes receptores podem ainda cooperar ou antagonizar entre eles (VIVIER, 2004). Apesar das células NK não expressarem receptores de antígenos que são produzidos pela recombinação de segmentos de genes, como ocorre nas células T e B, nestas células, ocorre à combinação dos receptores ativados, que são compostos tanto por moléculas monoméricas quanto por complexos oligoméricos (VÉLY, 2005).

Uma subclasse dos linfócitos NK, denominada Natural Killer uterina (uNK) (GUIMOND et al, 1999; KING et al, 2000; MOFFET-KING, 2002), predominam durante a gestação no útero de diversos animais, tais como camundongos e primatas, inclusive em humanos (CROY ET AL 1997, CROY & KIZO 1993; HEAD 1996; LOKE & KING, 2000).

Estudos de imunofenotipagem das células Natural Killer uterina em humanos, revelaram que estas células se assemelham às células *Natural Killer* do sangue circulante (cNK), porém, apresentam algumas diferenças na expressão de receptores permitindo distinguir estas duas sub-populações. Em humanos 90% das cNK CD56^{dim} CD16^{bright}, enquanto 10% são CD56^{bright} CD16^{dim}. Já as células uNK apresentam fenótipo para estes receptores a semelhança das população minoritária de cNK (CD56^{bright} CD16^{dim}) (COOPER et al, 2001; CARSON E CALIGIURI, 1996).

Em camundongos, as células uNK originam-se da medula óssea (PEEL ET AL 1983) ou de outros órgãos linfóides, migram para o útero e diferenciam-se (CROY, 2002; RAULET & VANCE, 2006) na região MLAp (mesometrial lymphoid aggregate of pregnancy), primariamente denominada de glândula metrial. Estas células raramente são encontradas no útero de camundongos virgens, ou antes da implantação, porém, são identificadas a partir do 5º dia de gestação (dg) (PAFFARO, 2003), atingindo maior concentração entre o 9º e o 12º dg, quando começam a

diminuir progressivamente, não sendo mais encontradas no pós-parto (PEEL, 1989, DELGADO et al, 1996, PAFFARO, ET AL 2003).

Análises sobre a fisiologia das células uNK demonstram que, ao lado de outras células presentes no útero gravídico, estas células têm a capacidade de produzir inúmeras citocinas, que atuam como moduladoras da resposta imune. Durante a gestação esta população celular apresenta um comportamento peculiar, não sendo observado ação citotóxica durante a gestação (SCHAFER-SOMI, 2003). Exemplos de algumas citocinas produzidas pelas células uNK com comprovada atuação na gestação seriam: IL-1, fator inibidor de leucemia (LIF), fator estimulador de colônia (CSF-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) (Croy et al, 2003). A partir de elegantes estudos feitos com camundongos deficientes em células uNK (ASHKAR ET AL 2000, 2003) e IFN- γ (ASHKAR ET AL., 2000), demonstraram que as células uNK são responsáveis pela síntese e secreção de IFN- γ , sendo esta citocina importante na vascularização e na maturação da decídua e da placenta-fetal (PAFFARRO et al, 2003).

Diversos estudos revelaram que as células uNK em humanos e em camundongos produzem VEGF e que uma das maiores funções das células uNK na gestação seja o direcionamento do trofoblasto (LEONARD et al, 2006), juntamente com as células trofoblásticas que também sintetizam VEGF, fortalecendo o gradiente molecular auxiliando no processo da neoangiogênese materna.

Outros modelos sugerem que a expressão de IFN-g e IL-18 pelas células NK é postulado a promover o aumento da produção de VEGF e restringir a proliferação vascular, como por exemplo nas células musculares lisas (RZUCIDLO et al, 1999; TENGGER et al, 2005). Outros produtos do gene potencialmente controlados por IFN-g incluem óxido nítrico sintetase (HUNT et al, 1997) e a-2 macroglobulinas (HE et al, 2005; TAYADE et al, 2005a), os quais são expressos em abundância no sítio de implantação, produzidos por uNK e parecem contribuir com a remodelação vascular e a regulação da invasão do trofoblasto.

Os fatores de transcrição T-bet (*Tbx21*) e eomesodermina (Eomes) regulam a maturação e as funções efetoras das células CD8 T e nas células NK, incluindo a transcrição de *Ifng* (GLIMCHER et al, 2004), mas é observado em maior abundância a transcrição de Eomes do que *Tbx21*. A transcrição de Eomes é menos abundante

nas células uNK agranulares e nas células uNK imaturas granuladas e mais abundante nas células uNK maduras (CROY et al, 2006).

O padrão de transcrição do *Tbx21* começa elevado nas células uNK imaturas e aumenta conforme as células uNK amadurecem e começam a declinar com a senescência. O padrão de transcrição do *Ifng* coincide com o do *Eomes*, e o padrão de transcrição da granzima A coincide com o do *Tbx21*. A transcrição de perforina é maior nas células senescentes (TAYADE et al, 2005b).

A expressão desses receptores não é tão bem caracterizada nas células uNK de camundongos como nas de humano. Em camundongos foram identificados a expressão de *Nkg2d*, seu ligante RAE-1 e adaptadores de sinalização como *Fcgr3*, *Hcst* (DAP10), e *Tyrobp* (DAP 12) na linhagem de camundongo B6 entre o 6º a 10º dia de gestação (XIE et al, 2005).

As uNK também têm sido atribuídas a habilidade de regular o processo de desenvolvimento da placenta, a invasão do trofoblasto e o crescimento vascular, através de diálogos modulados por receptores de ativação das células uNK e seus ligantes presentes nos diversos tipos celulares (HANNA et al, 2006).

Na ausência das uNK ocorrem alterações importantes no endométrio, como por exemplo, as modificações nas artérias decíduais, a hipo-celularidade ou necrose da decídua e a redução no desenvolvimento da placenta (ASHKAR et al, 2003). Presume-se, portanto, que a presença de células NK competentes são requeridas no compartimento materno-fetal, para o crescimento adequado da placenta (GUIMOND et al, 1999).

Cooper et al (2001) sugerem que as uNK possam atuar na resposta imune inata, de forma análoga as cNK, por estas expressarem a maioria dos genes comuns,. porém, as células uNK expressam vários genes que diferem dos expressos as cNK (KOOPMAN et al., 2003). Este fato sugere que as uNK podem estar relacionadas ou desempenhar (além do papel citotóxico) diferentes papéis no ambiente uterino, sendo importante para a angiogênese da interface materno-fetal (PEEL, 1989; BULMER E LASH, 2005), assim como, para o desenvolvimento da placenta e manutenção da decídua através da secreção citocinas e quimiocinas (ASHKAR et al, 2000).

A presença destas células NK, potencialmente citotóxicas, no ambiente uterino durante a gestação com uma larga gama de genes idênticos as cNK, tem gerado uma série de questionamentos em torno das possíveis funções na interface materno

fetal do útero gestante. Estudos morfológicos e bioquímicos das células uNK demonstraram que o conteúdo dos grânulos parece ser idêntico ao das NK circulantes, sendo identificadas a perforina, granzimas, proteoglicanos e uma gama variada de enzimas hidrolíticas lisossomais (PARR et al 1990, CORREA DA SILVA 1997). Portanto, a presença de grânulos secretores citolíticos nas células uNK, faz presumir que estas células do sistema imune inato possam desenvolver uma ação citolítica (CROY et al 1991, 1997). A ativação das células cNK por IL-2 e IL-12 (LEHMANN et al, 2001) demonstram o aumento da ligação de perforina com a célula alvo e conseqüentemente o aumento da lise pela ação desta molécula citotóxica. Contudo, as células uNK não mediam espontaneamente a lise da célula alvo, comumente utilizado em ensaios de citotoxicidade (PARR et al, 1990), apesar de apresentar todo o arsenal que o habilita a desenvolver uma resposta citotóxica.

Em humanos, esta baixa citotoxicidade espontânea apresentada pelas uNK pode ser devida a ausência da expressão do receptor CD-16, este, um potente indutor da atividade lítica das NK (BIASSONI et al, 1999), e a expressão de receptores conhecidos como KIR (*Killing Inhibitory Receptor*) (LONG et al, 1997) que reconhecem os antígenos HLA-G e HLA-E expressos pelo trofoblasto e, portanto, não induzem a ativação citotóxica das células uNK (KING et al, 2000, CROY et al, 2003). Em camundongos, os receptores da família Ly49 têm função similar aos receptores KIR em humanos, estando envolvidos com reconhecimento das células trofoblásticas e inibição da atividade citotóxica das células uNK (CROY et al, 2003).

Desta forma, pelos conhecimentos acumulados presume-se atualmente que as células uNK pertençam a uma subclasse de células NK, pois apesar da semelhança fenotípica com as NK circulantes (cNK), apresentam características próprias e únicas (PAFFARO et al, 2003). Presume-se ainda que o comportamento diferenciado das células uNK, seja reflexo de um repertório exclusivo de receptores, que reage de modo diferente às das NK circulantes (cNK), sendo esta hipótese recentemente confirmada por Koopman et al (2003), que demonstrou em humanos a expressão gênica diferenciada entre as células uNK e cNK. Estes dados apontam para a importância da identificação de moléculas de expressão específica das células uNK, principalmente de receptores de superfície capazes de reconhecer as variações de sinais do ambiente uterino gestante. Um fato que corrobora com essas perspectivas foi a evidencia de que as células NK derivadas do timo se diferenciam das células NK oriundas da medula óssea expressando GATA-3 e de CD127 (IL-

7R). Estas células do timo são exportadas para os órgãos linfóides periféricos, onde mantêm suas propriedades fenotípicas e funcionais originais que se assemelham ao subtipo de células NK humanas CD56^{hi} e CD16⁻ com propriedades imunomodulatórias específicas. A identificação de um caminho alternativo no desenvolvimento das células NK pode gerar um subtipo distinto das NK de camundongos (VOSSHENRICH et al, 2006), corroborando com a possibilidade da presença de subtipos diferentes de células dentro de uma mesma população celular.

1.2 Marcadores específicos para as células uNK de camundongos

Em camundongos, ainda não há marcadores exclusivos para a identificação e caracterização de moléculas de expressão específica das uNK, exceto pelo trabalho realizado por Paffaro et al (2003) que identificou a expressão de glicoconjugados na superfície celular reativas a lectina *Dolichos biflorus* (DBA) em células uNK de camundongos e que não são expressos nas cNK ou em outros linfócitos.

Porém nenhuma lectina pode ser considerada um marcador específico de qualquer população celular, uma vez que, a especificidade da reação destas moléculas advém do reconhecimento de monômeros de açúcares, que podem estar associados a diferentes glicoconjugados (DAMJANOV, 1987). Neste sentido, a reatividade seletiva da lectina DBA descrita até então para as células uNK pode ser adotada, se limitada ao universo contido no útero de camundongos. Contudo, Paffaro et al (2003) demonstram que a reatividade da lectina DBA na superfície celular é uma característica ímpar das células uNK, não compartilhada por outras populações leucocitárias.

Baseado neste fato Bizinotto (2001) propôs obter imunomarcadores para células uNK de camundongos, adotando uma estratégia peculiar para produção de anticorpos específicos para estas células. Partindo do princípio de que as células uNK seriam uma população celular presente, única e exclusivamente, no útero de animais prenhes, estas células isoladas e purificadas foram utilizadas como inóculos em camundongos machos da mesma espécie, na indução de resposta imune. Nesta estratégia, o pressuposto de que as células uNK seriam populações linfocitárias exclusivas do útero na gestação, teve como evidencia adicional a expressão de glicoconjugados reativos a lectina DBA (*Dolichos biflorus*), que não eram encontrados em outros linfócitos (PAFFARO et al, 2003), ou mesmo, em outras

células do tecido epitelial, conjuntivo ou muscular. Tais glicoconjugados, reativos a lectina DBA, poderiam ser potenciais substratos antigênicos capazes de induzir a ativação do sistema imune do animal inoculado, enquanto que outras moléculas, presentes na superfície celular, seriam reconhecidas como próprias, por serem da mesma espécie.

O sucesso deste protocolo de imunização intra-espécie foi confirmado inicialmente pelas análises realizadas com o soro obtido do animal imunizado (anticorpos policlonais), que apresentaram reação positiva altamente específica para com as células uNK, em reações imunocitoquímicas.

Do baço deste animal foram obtidos clones produtores de anticorpos monoclonais e selecionados aqueles com reação positiva contra células uNK. Dentre estes o *mam-uNK1* (mouse anti-mouse uNK1 monoclonal antibody clone 1) de isotipo IgM, cadeia Kappa, apresentou reatividade positiva na superfície das células uNK de camundongos, assim como, em bandas aparentemente coincidentes em Western-blot realizado com o *mam-uNK1* e lectina DBA, nas frações de homogenado de células uNK (BIZINOTTO, 2001).

Baseado nestes dados, o presente trabalho propôs avaliar a especificidade deste anticorpo “*mouse anti-mouse uterine natural killer cells, clone 1 (mam-uNK1)*” e, localizar o antígeno correspondente nas células uNK de camundongos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a especificidade do anticorpo monoclonal “mouse *anti-mouse uterine natural killer cell (mam-uNK1)*” além da localização e identificação da molécula antigênica reconhecida por este anticorpo através de métodos imunoquímicos e imunocitoquímicos em microscopia de luz e eletrônica.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a distribuição e localização da molécula antigênica reconhecido pelo *mam-uNK1*, no útero prenhe, nos órgãos linfóides (baço, timo e linfonodo), no sistema nervoso central, no fígado e no músculo estriado cardíaco de camundongos, através do método imunocitoquímico em microscopia de luz.

- Avaliar a especificidade do anticorpo *mam-uNK1* e a identificação das frações protéicas reativas através do SDS-PAGE e *Western-blot* em homogenados teciduais obtidos da região mesometrial do útero prenhe, dos órgãos linfóides (baço e timo), do córtex cerebral, do fígado e do miocárdio.

- Avaliar a homologia entre as frações protéicas identificadas pelo anticorpo *mam-uNK1* e da lectina *Dolichos biflorus* em *Western-blot*

- Identificar em nível ultraestrutural a localização da molécula reativa ao *mam-uNK1* nas células uNK e nas células musculares estriadas cardíacas de camundongos através da imunomicroscopia eletrônica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos e fêmeas adultos, da linhagem Swiss, provenientes do CEMIB/UNICAMP. Durante a realização dos experimentos os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia da Universidade de Campinas (Unicamp), em gaiolas individuais forradas com maravalha, recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

A obtenção de camundongos fêmeas prenhes foi feita através de seu acasalamento com machos férteis. O dia em cuja manhã foi constatada a presença do tampão vaginal foi considerado o primeiro dia de gestação (dg).

3.2 - Coleta e processamento das amostras

3.2.1 Material para microscopia de luz

Camundongos fêmeas com 9 dias de gestação foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de Xilazina (Virbaxyl 2%, Virbac, Brasil) e Ketamina (Francotar, Virbac, Brasil) e perfundidas via ventrículo esquerdo com a solução de paraformaldeído (PFA) 4% (Sigma Chemical Co, St Louis/USA) em tampão fosfato 0,1 M. Após a laparotomia dos animais, foram removidos os úteros para coleta dos sítios de implantação embrionária, os órgãos linfóides (baço, timo e linfonodo), além do fígado, cérebro e coração. Estes materiais foram processados de acordo com a técnica rotineira de desidratação em etanol e diafanização xilol para embebição em parafina (Histosec, Merck, Br). Deste material foram obtidos cortes com 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (Leica, UCT), coletados em lâminas silanizadas.

3.2.2 Material para microscopia eletrônica

Fêmeas no 9º dg, foram anestesiadas com injeção intraperitoneal de Xilazina (Virbaxyl 2%, Virbac, Brasil) e Ketamina (Francotar, Virbac, Brasil) e perfundidas com solução de PFA 4% e glutaraldeído (GTA) 0,2% em tampão fosfato 0,1 M contendo 0,01 M de sacarose. Foram coletados os sítios uterinos de implantação embrionária, baço, timo e coração e em seguida, passaram por 3 banhos de 15 minutos cada, com glicina 1% diluída em água ultra pura.

Após fixação, fatias de 300µm de espessura foram obtidas no vibratome (Tissue-slicer, SEM, USA) e em seguida submetidas à desidratação em gradiente crescente (50- 100%) de dimetilformamida (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) e embebidas em resina LR White (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) a -20°C no aparelho de freeze-substitution (FSU 010, Balzers, Liechtenstein). A polimerização da resina foi realizada a -20°C pelo período de 72 horas, sob a ação de luz UV.

Dos blocos polimerizados foram obtidos cortes semi-finos de 1µm de espessura e corados pelo azul de toluidina 0,5% (Vetec, Brasil) para análise prévia em microscopia de luz e definição das áreas de interesse para estudos ultraestruturais. Das regiões selecionadas foram obtidos cortes ultrafinos no ultramicrotomo (Leica Ultracut, UCT) coletados em telas de níquel.

3.2.3 Obtenção de homogenados teciduais

Fêmeas no 9º dg foram sacrificadas por deslocamento cervical e após laparotomia o útero foi removido para dissecação e coleta da região mesometrial dos sítios de implantação embrionários e dos seguintes órgãos: baço, timo, fígado, cérebro e coração. Os órgãos foram fragmentados, pesados e suspensos, na proporção de 30g/100ml, na solução de extração constituída de EDTA 0,1M pH7,4, pirofosfato de sódio (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) 0,1M, fluoreto de sódio (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) 1M, ortovanadato de sódio 0,1M, PMSF (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) 0,02M, aprotinina (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) 0,1mg/ml em Tris-HCl 1M pH7,4. A homogeneização foi feita em um homogeneizador-mecânico (Glas-Col, USA), em tubos de vidro, com pistilo de teflon, em banho de gelo.

Os homogenados foram centrifugados a 3000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi aliquoteado após a dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), através de kit comercial da Bio Rad.

3.3 Reações imunocitoquímicas com o anticorpo *mouse anti-mouse-uNK1* (*mam-uNK1*)

3.3.1- Microscopia de luz

Os cortes histológicos de sítio de implantação embrionários, baço, timo, linfonodo, coração, fígado, cérebro e coração, foram desparafinizados e hidratados. Em seguida, os cortes, imersos em tampão citrato 0,1 M pH 6,0, foram submetidas à irradiação de microondas em forno comercial a 800MHz, em 3 ciclos de 3 minutos (TORNEHAVE et al, 2000). Na seqüência os cortes foram lavados com PBS 0,01M pH 7,4 e tratados com peróxido de hidrogênio 0.3% (Merck/Brasil) em PBS 100 mM pH 7,4 durante 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Após uma nova lavagem com PBS 0,01M pH 7,4 os cortes foram bloqueados com albumina sérica bovina 1% (BSA type V, Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) em PBS 0,01M pH 7,4 durante 1 hora e incubados com anticorpo *mam-uNK1* por 12 horas a 4°C. Em seguida foi realizada a incubação com o anticorpo secundário anti IgM de camundongo obtido em coelho conjugado com biotina (Cedarlane, CN), durante 1 hora a temperatura ambiente, seguida pelo tratamento com complexo avidina-peroxidase (Dako Corporation, EUA) pelo período de 45 minutos a temperatura ambiente. A revelação foi feita com diaminobenzidina (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA), em tampão TBS 0,05M pH7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3% (Merck/Brasil). Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, e foram procedidas a desidratação e montagem permanente, em bálsamo sintético (Entellan, Merck).

As reações foram sempre acompanhadas do controle negativo onde era omitida a incubação com o anticorpo *mam-uNK1*.

As observações foram realizadas no microscópio Eclipse 800 (Nikon, Japan) e as imagens documentadas através de câmera digital Cool Snap com o programa Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA)

3.3.2 Microscopia eletrônica

Os cortes ultrafinos de 80 a 100 nm de espessura dos materiais embebidos em resina LR-White coletados em telas de níquel foram submetidos à reação de imunocitoquímica com o anticorpo *mam-uNK1*.

Primeiramente as telas contendo os cortes foram reidratadas em água ultra pura, seguida do bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos com TBS 0,01M pH 7,4 contendo 1% de BSA (BSA type V, Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) 1% de Tween 20 (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA), durante 30 minutos, seguido da

incubação como anticorpo primário *mam-uNK1* durante 12 horas a 4°C em câmara úmida. Após a lavagem com TBS 0,01M pH 7,4 os cortes foram incubados com o anticorpo secundário de cabra anti IgM de camundongo biotinado (Cedarlane, CN), durante 1 hora a temperatura ambiente. As telas foram lavadas TBS 0,01M pH 7,4, em seguida da incubação com o complexo estrepto-avidina conjugada com ouro coloidal de 10 nm (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) por 2 horas. Depois de lavadas com TBS 0,01M pH 7,4, as telas foram secas. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila 2% (Riedel-de Haenm, Alemanha) durante 5 minutos e citrato de chumbo 0,5%, durante 30 segundos. Após cobertura com película de carbono (Carbon Coater, Liechtenstein), as observações foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão, EM908 (LEO-SchrohZeiss, Germany) a 60kVA.

3.4 Reação citoquímica com lectina *Dolichos biflorus* (DBA):

Os cortes histológicos de sítio de implantação embrionário, os órgãos linfóides (baço e timo), além do fígado, cérebro e coração, foram desparafinizados e hidratados. Após a lavagem com PBS 0,05M os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio 0.3% (Merck/Brasil) em PBS, durante 30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente, seguidos do bloqueio com PBS/BSA 1% (Albumina Sérica Bovina) (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA), pH 7,4 0,05M, por 30 minutos em camara úmida a temperatura ambiente. Em seguida, foram incubados com lectina DBA biotinada (*Dolichos biflorus agglutin*) (Honen Chemical Co, Japão) em PBS/BSA 1% pH 7,4 0,05M, por 12 horas a 4°C, em câmara úmida. Após a incubação com o complexo estreptoavidina-peroxidase (Dako Corporation, EUA), pelo período de 45 minutos a temperatura ambiente, foi feita a revelação com diaminobenzidina (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA), em tampão Tris salina (TBS) 0,05M pH7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3% (Merck/Brasil). Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, seguido da desidratação em gradiente crescente de etanol e montagem permanente, em bálsamo sintético (Entellan, Merck).

As reações foram sempre acompanhadas do controle negativo onde era omitido a incubação com a lectina.

3.5 Reações imunoquímicas com o anticorpo *mam-uNK1* e reação com a lectina DBA

3.5.1 SDS-PAGE e *Westen-blot*

As amostras do homogenado obtidas no item 3.2.3 foram misturadas v/v com tampão amostra, acrescido de β -mercaptoeanol 10% (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) e levadas ao banho maria fervente por 3 minutos.

A corrida eletroforética das amostras do homogenado foi realizada em géis de poliacrilamida a 10%, preparadas segundo Laemmli (1970) em mini-placas verticais (8 x 7,3 cm) do sistema Mini Protean III (Bio-Rad), com a amperagem constante em 25mA, por aproximadamente 2 horas. As corridas foram sempre acompanhadas por um padrão de peso molecular – Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (Bio-Rad). Os géis foram corados com comassie Brilliant blue R 250 (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) a 0,25% para conferir o padrão de separação eletroforética das proteínas, após a transferência para membrana de PVDF.

A transferência para membranas de PVDF (Millipore, Bedford, MA) foi realizada com o sistema de transferência (Bio-Rad), com corrente ajustada para 2mA/cm² durante 2 horas. As membranas foram lavadas em tampão TBS 0,02M pH 7,4 contendo 1% de Tween 20 (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA), bloqueadas com TBS-T 0,02M contendo 5% de leite desnatado Molico, durante 1 hora em temperatura ambiente. O anticorpo *mam-uNK1* foi incubado na concentração 1:2000 em TBS-T 0,02M *overnight* à 4°C. As membranas foram lavadas em tampão de lavagem e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgM de camundongo obtido em coelho, conjugado com peroxidase (gentilmente cedidos pelo laboratório da Prof. Dra. Wirla Tamashiro) por 2 horas à temperatura ambiente. A reação foi revelada com diaminobenzidina – DAB (Sigma Chemical Co, St Louis/ USA) em tampão Tris salina (TBS) 0,02M pH7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3% (Merck/Brasil).

Para a reação com a lectina DBA biotinada (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA), as membranas foram incubadas com a lectina na concentração 1:600 em TBS-T 0,02M *overnight* a 4°C e em seguida lavadas em tampão de lavagem TBS 0,02M e incubadas com o complexo estreptoavidina-peroxidase (Armasham, U.K.) na concentração 1:500 TBS-T 0,02M. A reação foi revelada com

diaminobenzidina em tampão Tris salina (TBS) 0,05M pH7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3% (Merck/Brasil).

3.5.2 Tratamento com periodato

Para avaliar se o epítopo antigênico reconhecido pelo *mam-uNK1* localiza-se nas cadeias oligossacarídeos, foi realizado o tratamento com periodato na membrana de *western blotting* de acordo com o método descrito por Woodward et al (1985).

Após a transferência as membranas foram lavadas em TBS 0,02M pH 7,4 contendo 1% de Tween 20 (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA), bloqueadas com TBS-T contendo 1% de BSA (BSA type V, (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA), durante o período de 2 horas, a temperatura ambiente. Após nova lavagem com TBS-T as membranas permaneceram por 5 minutos em tampão acetato de sódio 0,5M, pH 4,5 (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA). Em seguida elas foram incubadas com meta-periodato de sódio (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) nas concentrações de 0,001M e 0,2M diluídos em, tampão acetato de sódio 0,5M, pH 4,5 por 1 hora em temperatura ambiente, no escuro. Como controle negativo da reação, as membranas foram incubadas apenas com tampão citrato. Após a lavagem com tampão citrato as membranas foram incubadas com boroidrato de sódio 0,5M (Sigma Chemical Co, St. Louis/USA) diluído em TBS-T por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram lavadas com TBS-T e submetidas à incubação com o anticorpo *mam-uNK1* e com a lectina DBA, de acordo com o descrito no item 3.5.1.

4 RESULTADO

4.1 Microscopia de Luz

4.1.1 Análise das reações Imunocitoquímicas:

4.1.1.1 Útero gestante

A reação imunocitoquímica realizada com o anticorpo monoclonal *mam-uNK1* no útero de camundongos gestantes no 9ºdg, demonstrou a afinidade deste anticorpo com as células uNK (Fig. 1-4), células decíduais e células musculares lisas do miométrio. Nas células uNK a marcação era mais intensa no perímetro celular (Fig. 2) e o padrão difuso no citoplasma evidenciava o contorno dos grânulos (Fig. 3). Nas células decíduais (Fig. 3) e células do miométrio o padrão de marcação era difuso, porém não delineava o contorno celular. Não foram encontradas marcações positivas nos controles negativos (Fig. 4)

4.1.1.2 Órgãos diversos

A reação imunocitoquímica realizada no diferentes órgãos de camundongo revelou a presença de várias células reativas com o anticorpo *mam-uNK1*.

Os linfócitos presentes nos órgãos linfóides, baço, timo e linfonodo não apresentaram marcação positiva. No baço, foram constatadas reações positivas mas de forma difusa no citoplasma das células reticulares localizadas tanto na polpa branca quanto vermelha (Figs. 5 e 6). Da mesma forma, no linfonodo, foram constatadas reações positivas nas células reticulares presentes na região cortical e medular (Figs. 7 e 8). No timo, também foram encontradas marcações positivas no citoplasma das células com extensos prolongamentos citoplasmáticos pertencentes, provavelmente às populações de células reticulares (Figs. 9 e 10).

As células musculares cardíacas apresentaram as marcações distribuídas aleatoriamente no citoplasma com algumas áreas apresentando reações mais intensas irregularmente distribuídas ao longo do miocárdio (Figs 11 e 12).

No sistema nervoso central, não foram encontrados reações positivas no corpo celular dos neurônios, porém marcações positivas foram detectadas nos feixes de axônios, presentes na substância cinzenta (Figs. 13 e 14).

No fígado foi constatada a marcação positiva de forma difusa no citoplasma dos hepatócitos (Figs. 15 e 16)

4.1.2 - Análise das reações citoquímicas com a lectina DBA

4.1.2.1 No útero gestante

A reação citoquímica de lectina DBA realizada nos cortes de sítios de implantação embrionária de camundongos identificou seletivamente as células uNK distribuídas na região mesometrial (Fig. 17). As marcações encontradas foram semelhantes àquelas descritas por Paffaro e colaboradores (2003), isto é, as reações positivas foram verificadas constantemente na superfície destas células e nos grânulos citoplasmáticos quando presentes (Fig. 18). Nas demais regiões do útero foram verificadas reações positivas nas células endoteliais de vênulas pós-capilares e veias de pequeno e médio calibre.

4.1.2.2. Órgãos diversos

Nos órgãos linfóides analisados não houve marcação com a lectina DBA nos linfócitos ou outras células do parênquima destes órgãos, sendo as reações positivas restritas às células endoteliais (Figs 19-22). Não foram detectadas reações positivas nos neurônios ou células gliais do córtex cerebral (Figs.23 e 24), ou nos hepatócitos (Fig.25 e 26), ou nas células musculares cardíacas (Figs.27 e 28) .

4.2 SDS-PAGE e Western Blotting

Os homogenados teciduais obtidos da região mesometrial do útero prenhe, do baço, timo, cérebro, fígado e do coração, apresentaram padrão de bandeamento eletroforético de proteínas variado no SDS-PAGE. Pelo *Western-blot* realizado com o anticorpo monoclonal *mam-uNK1*, constataram-se duas bandas reativas comuns aos órgãos avaliados com o peso molecular estimado em 52 KDa e 54 KDa (Fig. 29).

O *Western blot* realizado com a lectina DBA apresentou reação positiva em uma espessa banda de peso molecular estimada em 52 KDa (Fig 30).

No teste realizado com o pré-tratamento pelo metaperiodato, as marcações com a lectina DBA foram completamente inibidas enquanto com o anticorpo *mam-uNK1* foram mantidas nas bandas com peso molecular de 52 e 54 kDa (Fig. 31).

4.3 Microscopia Eletrônica

4.3.1 Células uNK

Na análise feita através da técnica de imunomicroscopia eletrônica com o *mam-uNK1* pode-se observar a presença das esferas de ouro predominantemente no interior das projeções citoplasmáticas e no citoplasma adjacente à membrana plasmática e, com alguma freqüência na membrana plasmática das células uNK (Figs. 32; 33). Não foram constatadas marcações no interior dos grânulos citoplasmáticos (Fig. 32) ou nas demais organelas membranosas, assim como no meio extra-celular. No controle negativo não foram encontradas esferas de ouro (Fig. 34).

4.3.2 Órgãos linfóides e Miocárdio

A imunomicroscopia eletrônica não detectou marcação significativa em células linfocitárias dos órgãos linfóides analisados, porém foram detectas uma fraca incidência de partículas de ouro distribuídas no citoplasma das células reticulares (Figs. 35 e 36). As células reticulares foram identificadas pelos seu contorno irregular devido aos seus prolongamentos citoplasmáticos e núcleos com cromatina pouco condensada .

No miocárdio observou-se a presença de partículas de ouro distribuídas difusamente sobre os sarcômero das células musculares cardíacas, com ligeira predominância sobre a área correspondente à banda I e, maior acúmulo no citoplasma das áreas de extremidades das fibras cardíacas em continuidade com a matrix-extracelular, onde os sarcômeros eram menos organizados (Figs. 37, 38 e 39). Não foram encontradas marcações significativas nas áreas citoplasmáticas das regiões das miofibras que apresentavam junções com outras miofibras ou, nas áreas laterais das miofibras. . No controle negativo não foram encontradas esferas de ouro (Fig.40).

5 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Figuras 1 a 4: Fotomicrografias das reações imunocitoquímicas com o anticorpo *mam-uNK1* em cortes de parafina do útero de camundongos no 9º dg, revelados com peroxidase-diaminobenzidina. Contra coloração hematoxilina de Harris. Figura 1: Vista panorâmica da região mesometrial do endométrio mostrando a distribuição de células uNK (setas) com marcação positiva. Barra: 30 µm. Figuras 2 e 3 : Detalhe do padrão de marcação evidenciando o perímetro celular (setas) e no citoplasma evidenciando o contorno dos grânulos (+). Notar a fraca marcação também no citoplasma das células decíduais (cabeça de seta) Barras: 10 µm. Figura 4: Controle negativo da reação imunocitoquímica com o anticorpo *mam-uNK1* no endométrio da região mesometrial. Barra: 30 µm

Figuras 5 a 10: Fotomicrografias das reações imunocitoquímica anticorpo *mam-uNK1* no baço, linfonodo e timo, revelados com peroxidase-diaminobenzidina. Contra coloração com hematoxilina de Harris. Figuras 5 e 6: Vista panorâmica do padrão de reação no baço nas polpas vermelhas e branca e detalhe mostrando a reação no citoplasma das células reticulares (setas), respectivamente. Barras: 30 e 10µm. Figuras 7 e 8: Vista panorâmica do padrão de reação na região medular do linfonodo e detalhe mostrando marcação no citoplasma das células reticulares (setas), respectivamente. Barras: 30 e 10µm. Figuras 9 e 10: Vista panorâmica do padrão de reação no parênquima do timo e detalhe mostrando marcação no citoplasma das células reticulares epiteliais da zona medular. Barras: 30 e 10µm

Figuras 11 a 16: Fotomicrografias das reações imunocitoquímicas com o anticorpo *mam-uNK1*, no miocárdio, córtex cerebral e fígado, revelados com peroxidase-diaminobenzidina. Contra coloração com hematoxilina de Harris. Figuras 11 e 12 -: Vista panorâmica do padrão de reação no miocárdio e detalhe da marcação nas células musculares estriadas cardíacas (setas), respectivamente. Barras: 30 e 10 μm . Figuras 13 e 14: Vista panorâmica do padrão de reação no córtex cerebral e detalhe de marcações nos feixes de axônios em corte transversal (setas), respectivamente. Barras: 30 e 10 μm . Figuras 15 e 16: Vista panorâmica do padrão de reação no parênquima hepático e detalhe da marcação no citoplasma dos hepatócitos (setas), respectivamente. Barras: 30 e 10 μm .

Figuras 17 a 22: Fotomicrografias do padrão de marcação da citoquímica com lectina *Dolichos biflorus* (DBA) reveladas com SAV-pexosidase-diaminobenzidina, no útero de camundongos no 9º dg, timo e baço. Contra coloração hematoxilina de Harris. Figuras 17 e 18. Vista panorâmica do padrão de reação no endométrio da região mesometrial mostrando a distribuição das células uNK lectina DBA positivas (pontos castanhos) no revestimento endotelial de alguns vasos e, detalhe de marcação na superfície e citoplasma das células uNK (seta), respectivamente. Barras: 30 µm e 10 µm, respectivamente. Figuras 19 e 20: Vista panorâmica do padrão de reação no timo e detalhe de marcação em células endoteliais e no citoplasma de algumas células reticulares (setas), respectivamente. Barras: 30 µm e 10 µm, respectivamente. Figuras 21 e 22: Vista panorâmica do padrão de reação no baço e detalhe das marcações somente nas células endoteliais (setas), Barras: 30 µm e 10 µm, respectivamente.

Figuras 23 a 28: Fotomicrografias do padrão de marcação da citoquímica com lectina *Dolichos biflorus* (DBA) reveladas com SAV-peroxidase-diaminobenzidina, no córtex cerebral, fígado e miocárdio. Contra coloração hematoxilina de Harris. Figuras 23 e 24: Vista panorâmica e detalhe do padrão de reação negativa no córtex cerebral Barras: 30 μ m e 10 μ m, respectivamente. Figuras 25 e 26: Vista panorâmica e detalhe do padrão de reação negativa no parênquima hepático. Barras: 30 μ m e 10 μ m, respectivamente. Figuras 27 e 28: : Vista panorâmica e detalhe do padrão de reação negativa no miocárdio. Barras: 30 μ m e 10 μ m, respectivamente.

Figura 29: Padrão do Western blott obtido com o anticorpo *mam-uNK1* em homogenados da glândula metrial (MLAP) (1), baço (2), timo (3), fígado (4) e coração (5). Notar as duas bandas positivas com peso molecular de 52 e 54 kDa comuns a todos os órgãos.

Figura 30: Padrão do Western blott obtido com a lectina DBA em homogenados da glândula metrial (MLAP) (1), baço (2), timo (3), fígado (4) e coração (5). Notar a banda de 52 KDa positiva na MLAP em comum, mas de menor intensidade nos demais órgãos.

Figura 31: Western blott da glândula metrial com *mam-UNK1* após tratamento pelo periodato 0,1mM (1) e periodato 20mM (2) , o controle sem tratamento (3). Notar que não houve alteração na reatividade das duas bandas de 52 e 54 KDa após o tratamento com o periodato. Western blott da glândula metrial com lectina DBA após o tratamento com periodato 0,1mM (4). Notar que a marcação com a lectina DBA foi completamente inibida.

Fig 29

Fig 30

Fig 31

Figuras 32 a 34: Imunomicroscopia eletrônica com o anticorpo *mam-uNK1* revelados com estreptoavidina conjugado com ouro coloidal (10nm). Figura 32: Vista panorâmica de uma área do citoplasma da célula uNK apresentando os seus grânulos lisosomo-secretor (*) mictocôndrias (M) e cisternas de retículo endoplasmático granular (setas). Notar as partículas de ouro distribuídas no citoplasma com maior concentração na região próxima à membrana plasmática (cabeças de setas). Barra: 3 μ m Figura 33: Detalhe do perímetro de uma células uNK com as partículas de ouro nas projeções citoplasmáticas (seta). Barra: 2 μ m Figura 34: Controle negativo da reação imunocitoquímica mostrando em detalhe os grânulos lisosomo-secretorios (*) da célula uNK. Barra: 0,4 μ m

Figuras 35 e 36: Imunomicroscopia eletrônica com *mam-uNK1* de uma célula reticular do timo e detalhe mostrando marcação positiva no seu citoplasma (setas). Barras 2 μm e 0,2 μm , respectivamente.

Figuras 37 a 40: Imunomicroscopia eletrônica mostrando padrão de marcação com *mam-uNK1* nos sarcômeros. Figura 37 e 38 notar a pequena freqüência de partículas de ouro nas regiões correspondente à banda A (A), mas com maior acúmulo na área próxima à linha Z (seta), da banda I (I). Notar na figura 39 a grande concentração de partículas de ouro no citoplasma localizado nas extremidades das fibras musculares, onde os sarcômeros estão menos organizados e há um acúmulo de material amorfo eletrondenso (*) que se interpõe entre os filamentos contráteis dos sarcômeros e a membrana plasmática (cabeça de seta). A matriz extra-celular (MEC) não apresenta marcação positiva pelo *mam-uNK1*. Na figura 40, o controle negativo da reação imunocitoquímica com o *mam-uNK*. Barras: 0,5 μm , 0,2 μm , 0,5 μm e 0,5 μm , respectivamente.

6 DISCUSSÃO

O anticorpo monoclonal “*mouse anti-mouse uterine natural killer*” (*mam-uNK*), foi desenvolvido a partir da inoculação de células Natural Killer isolados do útero de camundongos prenhes em camundongos machos da mesma linhagem (BIZINOTTO, 2001). Dentre os vários clones obtidos, o *mam-uNK1* em particular apresentou nos testes preliminares uma reatividade difusa no citoplasma evidenciando o contorno dos grânulos e com intensa reação no perímetro celular. Este padrão de marcação no perímetro celular de forma bastante específica para esta população celular no ambiente uterino, sugeria a identificação de um antígeno de expressão específica para as células uNK de camundongos (BIZINOTTO, 2001). A identificação de moléculas de expressão específica das células uNK constitui um dos grandes desafios na área da imunologia da reprodução, uma vez que, estas células apresentam um comportamento incomum para uma célula relacionada com a resposta imune inata no ambiente uterino gestante.

Pelas análises das reações imunocitoquímicas em microscopia de luz realizadas neste trabalho com o anticorpo *mam-uNK1* no ambiente uterino gestante, comprovou-se a reatividade difusa no citoplasma com maior intensidade no perímetro celular das uNK, sugerindo possível localização do antígeno na superfície celular, semelhança ao relatado através do método citoquímico utilizando lectina DBA (PAFFARO, 2003). As reações citoquímicas realizadas com a mesma lectina no presente no trabalho, confirmaram o mesmo padrão de marcação nas células uNK de camundongos.

Contudo, a reatividade do anticorpo *mam-uNK1* observado também no citoplasma de células pré-decíduais e nas células musculares lisas do miométrio sugeriam que o antígeno reconhecido pelo *mam-uNK1* fossem expressos também em outras populações celulares, embora o padrão de marcação na superfície celular fosse exclusivo para as células uNK. De fato, o estudo prospectivo realizado através da reação imunocitoquímica em outros órgãos revelou positividade também no citoplasma das células reticulares dos órgãos linfóides (baço, timo e linfonodo), assim como nas células musculares estriadas cardíacas, nos hepatócitos e nos feixes de axônios do sistema nervoso central.

A expressão de antígenos comuns em diversos órgãos reconhecidos pelo *mam-uNK1* foi confirmada também nos homogenados teciduais destes órgãos submetidos ao SDS-PAGE e *Western-blot*, pelo qual foram identificadas duas bandas com peso molecular correspondente a 52 e 54KDa. Estes mesmos

homogenizados teciduais quando submetidos à reação com a lectina DBA, demonstraram várias frações positivas, dentre as quais algumas com pesos moleculares próximas aos das bandas reconhecidas pelo *mam-uNK1*. Ressalte-se porém que, com a lectina DBA não foram identificadas bandas positivas comuns a todos os órgãos como aquela reconhecida pelo anticorpo, sugerindo a não correspondência entre as frações reativas à lectina DBA com a do *mam-uNK1*.

Corroboram com esta pressuposição, os resultados da citoquímica com a lectina DBA realizados nestes mesmos órgãos que não apresentaram reatividades positivas coincidentes com as marcações obtidas com o *mam-uNK1*.

Cumprе salientar que o fato do epítopo antigênico da molécula reativa ao anticorpo *mam-uNK1* ser mantida após o tratamento com o metaperiodato, confirma que este epítopo não está localizado nas frações glicídicas, caso esta molécula seja uma glicoproteína, enquanto as frações reativas à lectina DBA desaparecem após este tratamento de remoção das cadeias oligossacarídicas (WOODWARD et al, 1985).

A imunomicroscopia eletrônica realizada em células uNK confirmaram a distribuição do antígeno reativo ao *mam-uNK1* no citoplasma destas células sem qualquer predomínio sobre organelas, sendo observada apenas uma constância maior no compartimento do citoplasma próximo à membrana citoplasmática e particularmente no interior das microvilosidades e dos filopódios. Foram constatadas também marcações na membrana plasmática, porém, estas eram mais esporádicas e irregulares ao longo da extensão da superfície celular. Tal padrão de marcação observado ao microscópio eletrônico confirma a maior intensidade de reatividade junto ao perímetro celular, porém excluindo a expectativa da ocorrência do antígeno junto à membrana plasmática. Tal expectativa foi aventada inicialmente pelo fato do anticorpo obtido ter sido induzido através da inoculação de células uNK íntegras como antígeno e por conseguinte, a resposta imunológica esperada do animal inoculado fosse para antígenos presentes na superfície das células uNK (BIZINOTTO, 2001).

O padrão de marcação no compartimento citoplasmático abaixo da membrana plasmáticas e nas projeções tipo microvilosidades e filopódios onde as células uNK, de acordo com Paffaro e colaboradores (2003), não apresentam organelas membranosas, sugere que o antígeno esteja relacionado com moléculas associadas ao citoesqueleto ou com moléculas associadas à movimentação celular.

Corroborando com esta possibilidade de ligação do anticorpo em moléculas presentes na organização do citoesqueleto, vale ressaltar que as células decíduais, cuja marcação pelo *mam-uNK1* foi observada, também demonstram alta atividade de reorganização do seu citoesqueleto durante o processo de decidualização onde se torna evidente a presença da desmina e de outros componentes do citoesqueleto (ABRAHAMSOHN & ZORN, 1993; FOULADI-NASHTA et al, 2005). Da mesma forma, as células musculares lisas, que constituem o miométrio, apresentam citoesqueleto e filamentos contráteis bem desenvolvido e organizado, que sofrem constantes mudanças promovidas pelo processo de contração (DOGAN et al, 2006; SALOMONIS et al, 2005).

Nos órgãos linfóides apenas as células reticulares foram evidenciadas pelo anticorpo *mam-uNK1*. Estas células, por sua vez, apresentam a função de fagocitar e degradar antígenos em potencial, através da formação de grânulos e da reorganização do seu citoesqueleto com emissão de prolongamentos citoplasmáticos (RUNG-RUANGKIJKRAI et al, 2004; WAKE et al, 2001). Já no fígado, os hepatócitos apresentaram reação para o anticorpo *mam-uNK1* no citoplasma e de acordo com Shinohara et al (2006) estas células apresentavam citoesqueleto em constante remodelação.

Por outro lado, em todos estes órgãos as marcações evidenciadas nos diferentes tipos celulares foram mais tênues e sempre de padrão difusa no citoplasma, diferente da marcação encontrada nas células uNK que apresentou se constante e com acentuada reatividade no perímetro celular. Intriga a fraca marcação encontrada nos órgãos linfóides que a princípio possuem células migratórias como células Natural Killer (NK), Linfócitos T e B entre outras (COLLINS, 1995; GOMPERTZ, 2000). Esta diferença de reatividade destaca a peculiaridade das células uNK no endométrio gestante apontado por Koppman et al (2003) que, sugerem que as células uNK são diferentes das células NK circulantes, além da possibilidade da ocorrência de outros subtipos funcionais de células NK (VOSSHENRICH et al, 2006).

Um padrão de reatividade que chamou a atenção foi aquele encontrado nos feixes de axônios do sistema nervoso central, onde notadamente são formados por neurofilamentos, uma das categorias de filamentos intermediários que constituem o citoesqueleto (KARASEK et al, 2004) e não de proteínas filamentosas contráteis como a actina. Por outro lado, as células musculares cardíacas apresentam os

filamentos de actina altamente organizados nos sarcômeros e que poderiam ser as potenciais moléculas antigênicas reconhecidas pelo *mam-uNK1*.

Com o intuito de distinguir se os possíveis antígenos reativos ao *mam-uNK1* estariam relacionados com moléculas contráteis tipo actina ou com moléculas estruturais do citoesqueleto, foram avaliados a localização destes através da imunomicroscopia eletrônica no tecido muscular estriado cardíaco, uma vez que este órgão é constituído basicamente por um único tipo celular, que apresentam uma bem estruturada associação de filamentos contráteis nos seus sarcômeros, ao lado de proteínas estruturais do citoesqueleto (COOPER, 2006; HALAYKO & SOLWAY, 2001).

De acordo com o padrão de marcação verificado nas células musculares cardíacas, não houve reação significativa nos sarcômeros que lembrasse a disposição dos filamentos de actina e/ou miosina. Ao contrário, foram constatadas maior reatividade onde os filamentos de actina se ancoram na linha I dos sarcômeros e uma marcação significativamente maior no citoplasma das extremidades das células musculares cardíacas em contigüidade com a matriz extracelular. Nestas áreas do citoplasma os sarcômeros das miofibrilas eram menos organizadas, apresentando um material amorfo e eletrondenso sem organização que lembrasse qualquer organela ou estrutura celular definida.

Estes dados de imunomicroscopia eletrônica das células cardíacas, junto com os das células uNK, sugerem que o antígeno reconhecido pelo *mam-uNK1* esteja relacionado com componentes associados ao citoesqueleto e/ou aos filamentos contráteis, porém, sem uma organização que lembre qualquer arranjo estrutural destes filamentos intracelulares.

A literatura referente às diversas moléculas relacionada com os filamentos citoplasmáticos é bastante abrangente, uma vez que, estes são encontrados no citoplasma de todas as células eucarióticas formando uma rede de proteínas filamentosas. Essa rede contém três tipos principais de filamentos: microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários. As diferentes formas e funções das estruturas de filamentos de citoesqueleto nas células dependem ainda de um vasto repertório de proteínas acessórias, sendo que cada um dos filamentos apresentam um leque de proteínas acessórias relacionadas com as suas respectivas funções (QUALMANN & KESSELS, 2002; KODAMA et al, 2004; RUBENSTEIN & WEN, 2005; CAVISTON & HOLZBAUR, 2006).

Dentre as possíveis moléculas candidatas, estão as proteínas tirosino-quinases que são compostas por proteínas com peso molecular entre 52-62 KDa. Estas proteínas possuem seis domínios funcionais distintos: SH4, um domínio único, SH3, SH2, SH1 e uma região regulatória C-terminal (BROWN & COOPER, 1996; SCOTT & MILLER, 2000). No domínio SH4 há sinais que guiam a molécula Src à membrana da célula. Este domínio único é responsável pela interação específica de receptores particulares e proteínas alvo (THOMAS & BRUGGE, 1997; PARSONS & PARSONS, 2004). Além do mais, se liga a proteínas atípicas da quinase C (SEIBENHENER et al, 1999). As regiões moduladoras, SH3 e SH2, controlam as interações intra e intermoleculares com substratos de proteínas e afetam a atividade catalítica, localização e associação com proteínas alvo (PAWSON, 1995). Estas proteínas também estão localizadas próximas a regiões com grande concentração de filamentos de actina (BROWN & COOPER, 1996, PARSONS & PARSONS, 2004), como no caso do compartimento citoplasmático pericelular das células uNK.

Assim por estas características, esta molécula pode estar sendo marcada pelo anticorpo *mam-uNK1*, lembrando que tanto o resultado apresentado pelo SDS-PAGE e Western Blot apresentou para homogenado dos diversos órgãos bandas com peso molecular de 52 KDa e 54 KDa, compatível com o peso molecular estabelecido para a tirosina-quinase (BROWN & COOPER, 1996).

Para as células uNK a localização destas moléculas estariam diretamente relacionadas com a motilidade das mesmas no ambiente uterino, deste o momento da sua migração dos vasos para e no interior do estroma endometrial, cujo processo é coordenado através da polarização da superfície e produção de moléculas citoplasmáticas para remodelação (INNGJERDINGEN et al, 2003; MALORNI et al, 2003). Esta remodelação é supervisionada pelos componentes do citoesqueleto, que seriam capazes de influir em sua migração e locomoção, sua capacidade de se ligar a componentes da matriz-extracelular via integrinas e ainda de participar nos mecanismos de destruição das células alvos na sua atividade citotóxica por meio de degranulação, (HESSLEIN et al, 2006; MALORNI et al, 2003; HAMERMAN & LANIER, 2006), sendo a participação das tirosina-quinase importante para este processo (LOWIN-KROPF et al, 2000; BILLADEAU et al, 2003).

A tirosina-quinase também atua nas células musculares, sejam elas lisas, estriadas esquelética ou cardíacas. Nestas células a tirosina-quinase atua sobre o processo de contração muscular e nos processos envolvendo caderina

(CAROTHERS et al, 2006), assim como na movimentação associada a mudanças no citoesqueleto dos prolongamentos celulares dos neurônios (HUANG et al, 2006; LEE, 2006). Sem dúvida, os componentes do citoesqueleto sofrem modificações dinâmicas com constante remodelação a fim de atender as necessidades fisiológicas das células como, por exemplo, o transporte de vesículas tanto para secreção quanto absorção de compostos e proteínas, bem como na migração celular auxiliando e sustentando a formação dos prolongamentos celulares (FRIEDL & BROCKER, 2000; DE LOOF et al, 1996).

No caso do citoesqueleto de actina, os rearranjos estruturais globais em resposta a sinais externos são provocados por uma série de diferentes receptores de superfície celular (GERTHOFFER, 2005). Muitos receptores celulares dependem da fosforilação para se oligomerizar e começar a funcionar, a maior família responsável por esta fosforilação das tirosino-quinase no citoplasma dos mamíferos é a família Src (Steroid Receptor Coactivator) (BROMANN et al, 2004; BRUNTON et al, 2004). Os substratos Src na maioria das vezes são encontrados com componentes de integrina mediando sinais de transdução, ligados a actina e integrina, vinculina, cortactina, talina e paxilina, FAK (focal adhesion kinase), tensina, e p130cas. Além disso, proteínas de junção, como catenina, ZO-1, ocludina, p120ctn, conexina 43, nectina-2 delta são identificadas como os maiores sítios de fosforilação da família Src (ABRAM & COURTNEIDGE, 2000). Tais vias metabólicas estão diretamente relacionadas com as diversas atividades conhecidas das células uNK na gestação (LOWIN-KROPF et al, 2000; MALORNI et al, 2003; HAMERMAN & LANIER, 2006).

Desta forma, de acordo com os resultados obtidos no presente experimento, embora o anticorpo monoclonal *mam-uNK1* tenha sido obtido através da inoculação das células uNK de camundongos, não reconhece uma molécula de expressão específica destas células, uma vez que, são reconhecidas também em outras células de diversos órgãos. Contudo, o padrão de marcação sugere ser uma molécula associadas ao citoesqueleto com distribuição peculiar nas células uNK e por conseguinte, desempenhar uma importante atividade regulatória na atividade destas células. Investigações futuras visando à identificação desta molécula deverão prosseguir, buscando contribuir para elucidações do comportamento destas células no útero gestante.

7 CONCLUSÃO

- A molécula antigênica reativo ao anticorpo *mam-uNK1* está localizada no citoplasma das células uNK e em outras populações de diversos órgãos. E portanto, não podem ser utilizadas como marcadores específicos das células uNK. O anticorpo *mam-uNK1* reconhece duas frações protéicas com pesos moleculares de 52 e KDa que são expressos em todos os órgãos analisados, porém, estas não devem ter correspondência com a fração reativa a lectina DBA.
- O fato das frações de 52 e 54 KDa manterem a reatividade com o anticorpo *mam-uNK1* após o tratamento com o metaperiodato, comprova que o epítipo antigênico não está localizada em cadeiais oligossacarídicas.
- A imunomicroscopia eletrônica demonstra uma marcação predominante no interior dos prolongamentos citoplasmáticos e nos compartimentos citoplasmático junto à membrana plasmática das células uNK, sugerindo que a molécula antigênica esteja associada a elementos do citoesqueleto ou aos filamentos contráteis tipo actina.
- A suposta associação da molécula antigênica reconhecida pelo anticorpo *mam-uNK1* com elementos do citoesqueleto e não com filamentos contráteis é evidenciado pelo padrão de imunomarcação nas células musculares cardíacas.
- O presente trabalho não identificou bioquimicamente a natureza da molécula reativa ao anticorpo *mam-uNK1*, porém o padrão único de marcação no citoplasma localizado no perímetro celular das células uNK, ressalta o comportamento peculiar destas células no útero gestante, modulado também pela expressão desta molécula reativa ao *mam-uNK1*.

REFERÊNCIA

ABRAHAMSOHN P. A.; ZORN T. M. Implantation and decidualization in rodents. **J Exp Zool.**, v. 266, n. 6, p. 603-628, 1993.

ABRAM, C. L.; COURTENEIDGE, S. A. Src Family tyrosine kinases and growth factor signaling. **Exp Cell Res**, v. 254, n. 1, p. 1-13, 2000.

ASHKAR, A. A.; DI SANTO, J. P.; CROY, B. A. Interferon contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J. Exp. Med**, v. 192, p. 259–270, 2000.

ASHKAR, A.A.; BLACK, G.P.; WEI, Q.; HE, H.; LIANG, L.; HEAD, J.R.; CROY, B.A. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. **J. Immunol**, v. 171, n. 6, p.: 2937- 44,2003.

BIASSONI, R.; BOTTINO, C.; MILLO, R.; MORRETA, L.; MORRETA, A. Natural killer cell- mediated recognition of human trophoblast. **Sem. Cancer Bio**, v.. 9, p. 13-18, 1999

BILLADEAU, D. D.; UPSHAW, J. L.; SCHOON, R. A.; DICK, C. J.; LEIBSON, P. J. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. **Nat Immunol.**, v. 4, n. 6, p. 557-64, 2003.

BIZINOTTO, M. C.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; YAMADA, A. T. Monoclonal antibodies against mouse unk cells. **Biocell**, v. 25, p. 57, 2001.

BIZZINOTTO, M. C. Obtenção de anticorpos para moléculas de expressão específica em células natural killer uterinas (NKu) de camundongos, 2001. 66p. Tese de Mestrado – Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROMANN, P. A.; KORKAYA, H.; COURTNEIDGE, S. A. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. **Oncogene**, v. 23, n. 48, p. 7957-68, 2004.

BROWN, M. T.; COOPER, J. A. Regulation, substrates and functions of src. **Biochim Biophys Acta**, v. 1287, n. 2-3, p. 121-49, 1996.

BRUNTON, V. G.; MACPHERSON, I. R.; FRAME, M. C. Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. **Biochim Biophys Acta**, v. 1692, n. 2-3, p. 121-44, 2004.

BULMER J. N. Immune cells in decidua. In: Kurpisz M, Fernandez N (eds.), Immunology of Human Reproduction. **Oxford: Bios Scientific Publishers Ltd.** 313–334, 1995.

BULMER, J.N., LASH, G.E. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. **Mol Immunol.** v.42, n. 4, p.511-21, 2005

CAROTHERS, A. M.; JAVID, S. H.; MORAN, A. E.; HUNT, D. H.; REDSTON, M.; BERTAGNOLLI, M. M. Deficient E-cadherin adhesion in C57BL/6J-Min/+ mice is associated with increased tyrosine kinase activity and RhoA-dependent actomyosin contractility. **Exp Cell Res**, v. 312, n. 4, p. 387-400, 2006.

CARSON, W. E.; CALIGIURI, M. A. Interleukin 15: a potential player during the innate immune response to infection. **Exp. Parasitol.**, v. 84, n. 2, p. 291-294, 1996.

CAVISTON, J. P.; HOLZBAUR, E. L. Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. **Trends Cell Biol**, v. 16, n. 10, p. 530-7, 2006.

CLARK, D. A.; MANUEL, J.; LEE, L.; CHAOUAT, G.; GORCZYNSKI, R. M.; LEVY, G. A. Ecology of danger-dependent cytokine-boosted spontaneous abortion in the CBA x DBA/2 mouse model. I. Synergistic effect of LPS and (TNF- α + IFN- γ) on pregnancy loss. **Am J Reprod Immunol.**, v. 52, n. 6, p. 370-8, 2004.

COLLINS, M. Potential roles of apoptosis in viral pathogenesis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 152, n.4, p. S20-4, 1995

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

COOPER, G. 4TH. Cytoskeletal networks and the regulation of cardiac contractility: microtubules, hypertrophy, and cardiac dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, n. 3, p. 1003-14, 2006

CORRÊA DA SILVA, C. R. Estudo citoquímico e imunocitoquímico das células granulosas metriais em útero de camundongos (*Mus musculus*) prenhes, 1997 Campinas: UNICAMP. 71p. Tese de Mestrado em Morfologia- Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

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

CROY B.A.; 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. Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy. **J Reprod Immunol**, v. 35, n. 2, p. 111-33, 1997.

CROY, B A.; GUILBERT, L.J.; BROWNE, M. A.; GOUGH, N. M.; STINCHCOMB, D. T.; REED, N.; WEGMANN, T. G. Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells. **J Reprod Immunol**, v. 19, n. 2, p. 149-66, 1991.

CROY, B. A.; KISO, Y. Granulated metrial gland cells: a natural killer cell subset of the pregnant murine uterus. **Microsc Res Tech**, v. 25, n. 3, p.189-200, 1993.

CROY, B. A.; REED, N.; MALASHENKO, B. A.; KWON, B. S. Demonstration of YAC target cell lysis by murine granulated metrial gland. **Cell Immunol**, v. 133, p. 116-126, 1991.

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

DAMJANOV, I. Lectin cytochemistry and histochemistry. **Lab Invest**, v. 57, n. 1, p. 5-20, 1987

DE LOOF, A.; VANDEN, J.; JANSSEN, I. Hormones and the cytoskeleton of animals and plants. **Int Rev Cytol**, v. 166, p. 1-58, 1996.

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

DOGAN, S.; DESHPANDE, D. A.; WHITE, T. A.; WALSETH, T. F.; KANNAN, M. S. Regulation of CD 38 expression and function by steroid hormones in myometrium. **Mol Cell Endocrinol**, v. 26, n. 246(1-2), p.101-6, 2006

FOULADI-NASHTA, A. A.; JONES, C. J.; NIJJAR, N.; MOHAMET, L.; SMITH, A.; CHAMBERS, I.; KIMBER, S.J. Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. **Dev Biol**, v. 281, n.1, p. 1-21, 2005

FRIEDL, P.; BROCKER, E. B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, n.1, p. 41-64, 2000.

GERTHOFFER, W. T. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle contraction. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 83, n. 10, p. 851-6, 2005.

GLIMCHER, L. H.; TOWNSEND, M. J.; SULLIVAN, B. M.; LORD, G. M. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. **Nat Rev Immunol**, v. 4, p. 900-911, 2004.

GOMPERTZ S.; STOCKLEY, R. A. Inflammation- role of the neutrophil and the eosinophil. **Semin Respir Infect**, v. 15, n.1, p. 14-23.

GUIMOND, M. J.; WANG, B.; CROY, B. A. Immune competence involving the natural killer cell lineage promotes placental growth. **Placenta**, v. 20, p. 441-450, 1999.

GUMPERTZ, J. E.; PARHAM, P. The enigma of the Natural killer cell. **Nature**, v. 378, n. 6554, p. 245-248, 1995.

HALAYKO, A. J.; SOLWAY, J. Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth muscle cells. **J Appl Physiol**, v. 90, n. 1, p. 358-68, 2001.

HAMERMAN, J. A.; LANIER, L. L. Inhibition of immune responses by ITAM-bearing receptors. **Sci STKE**, v.320, p. re1, 2006

HANNA, J.; GOLDMAN-WOHL, D.; HAMANI, Y.; AVRAHAM, I.; GREENFIELD, C.; NATANSON-YARON, S.; PRUS, D.; COHEN-DANIEL, L.; ARNON, T. I.; MANASTER, I.; GAZIT, R.; YUTKIN, V.; BENHARROCH, D.; PORGADOR, A.; KESHET, E.; YAGEL, S.; MANDELBOIM, O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. **Nature medicine**, v.12, p.1065-1074, 2006.

HE H.; MCCARTNEY, D. J.; WEI, Q.; ESADEG, S.; ZHANG, J.; FOSTER, R. A.; HAYES, M. A.; TAYADE, C.; VAN LEUVEN, F.; CROY, B. A. Characterization of a murine alpha 2 macroglobulin gene expressed in reproductive and cardiovascular tissue. **Biol Reprod**, v. 72, p. 266-275, 2005.

HEAD, JR. Uterine natural killer cells during pregnancy in rodents. **Nat. Immun**, v. 15, p.7-21, 1996.

HESSLEIN, D. G.; TAKAKI, R.; HERMISTON, M. L.; WEISS, A.; LANIER, L. L. Dysregulation of signaling pathways in CD45-deficient NK cells leads to differentially regulated cytotoxicity and cytokine production. **PROC NATL ACAD SCI U S A**, v. 103, n.18, p. 7012-7, 2006.

HUANG J.; SAKAI R.; FURUICHI, T. The docking protein Cas links tyrosine phosphorylation signaling to elongation of cerebellar granule cell axons. **Mol Biol Cell.**, v. 17, n. 7, p. 3187-96, 2006.

HUNT, J. S.; MILLER, L.; VASSMER, D.; CROY, B. A. expression of the inducible nitric oxide synthase gene in mouse uterine leukocytes and potential relationships with uterine function during pregnancy. **Biol Reprod**, v. 57, p. 827-836, 1997.

INNGJERDINGEN, M.; ROLSTAD, B.; RYAN, J. C. Activating and inhibitory Ly49 receptors modulate NK cell chemotaxis to CXC chemokine ligand (CXCL) 10 and CXCL12. **J Immunol**, v. 171, n. 6, p. 2889-95, 2003.

KARASEK, M.; SWILTOSLAWSKI, J.; ZIELINISKA, A. Ultrastructure of the central nervous system: the basics. **Folia Neuropathol**, v. 42, p. 1-9, 2004

KING, A.; HIBY, S.E.; GARDNER, L.; JOSEPH, S.; BOWEN, J. M.; VERMA, S.; BURROWS, T. D.; LOKE, Y. W. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors. **Placenta**, v. 21, p. 81-85, 2000.

KODAMA, A.; LECHLER, T.; FUCHS, E. Coordinating cytoskeletal tracks to polarize cellular movements. **J Cell Biol**, v. 167, n. 2, p.:203-7, 2004

KOOPMAN, L.A.; KOPCOW, H.D.; RYBALOV, B.; BOYSON, J.E.; ORANGE, J.S.; SCHATZ F.; MASCH, R.; LOCKWOOD, C.J.; SCHACHTER, A.D.; PARK, P.J.; STROMINGER, J. L. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. **J Exp Med**. v.198, n. 8, p. 1201-12, 2003

KOTLAN, B.; FULOP, V.; PADANYI, A.; SZIGETVÁRI, I.; RÉTI, M.; GYÓDI, É.; FEHÉR, É.; PETRÁNYI, G. High Anti-paternal Cytotoxic T-lymphocyte Precursor Frequencies in Women with Unexplained Recurrent Spontaneous Abortions. **Human reproduction**, v. 16, n. 6, p. 1278-1285, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage. **Nature**, v. 227, n 680-685, 1970

LAIRD, S. M.; TUCKERMAN, E. M.; CORK, B. A.; LINJAWI, S.; BLAKEMORE, A. I. F.; LI, T. C. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 2, p. 163-174, 2003.

LANIER, L. L. NK cell recognition. **Annu Rev. Immunol**, v. 25, p. 225-274, 2005.

LEE, S. H. Interaction of nonreceptor tyrosine-kinase Fer and p120 catenin is involved in neuronal polarization. **Mol Cells**, v. 20, n. 2, p. 256-62, 2005.

LEHMANN, C; ZEIS, M; UHAREK L. Activation of natural killer cells with interleukin 2 (IL-2) and IL-12 increases perforin binding and subsequent lysis of tumour cells. **Br J Haematol.**, v.114, n.3, p. 660-5, 2001.

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

LOKE YW, KING A. Immunology of implantation. **Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v.14, n.5, p.827-37, 2000.

LONG, E.O.; BURSHTYN, D.N.; CLARK, W.P.; PERUZZI, M., RAJAGOPALAN, S., ROJO, S., WAGTMANN, N., WINTER, C.C. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. **Immunol Rev**. v.155, p.135-44, 1997.

LOWIN-KROPF, B.; KUNZ, B.; BEERMANN, F.; HELD, W. Impaired natural killing of MHC class I-deficient targets by NK cells expressing a catalytically inactive form of SHP-1. **J Immunol**. v.165, n.3, p.1314-21, 2000.

MALORNI, W., QUARANTA, M. G., STRAFACE, E., FALZANO, L., FABBRI, A., VIORA, M., FIORENTINI, C. The Rac-activating toxin cytotoxic necrotizing factor 1 oversees NK cell-mediated activity by regulating the actin/microtubule interplay. **J Immunol**. v.171,n.8, p.4195-202, 2003

MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nat. Rev. Immunol**. v.2, p.656–663, 2002.

MORETTA, L.; MORETTA, A. Unravelling natural killer cell function: Triggering and inhibitory human NK receptors. **J. EMBO**. v.23, p.255-259, 2004.

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

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

PARSONS, S. T.; PARSONS, J. T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. **Oncogene**. v.23, n.48, p.7906-9, 2004.

PAWSON, T. Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. **Nature**. v.373, n.6514, p.477-8, 1995.

PEEL, S . Granulated metrial gland cells. **Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.** v.115, p.1-12, 1989.

PEEL, S.; STEWART, I.J.; BULMER, D. Experimental evidence for the bone marrow origin of granulated metrial gland cells of the mouse uterus. **Cell Tissues Res.** v.233, p.647-656, 1983.

QUALMANN, B.; KESSELS, M. M. Endocytosis and the cytoskeleton. **Int Rev Cytol.** v.220, p.93-144, 2002

RAULET D. H.;VANCE R. E. Self-tolerance of natural killer cells. **Nat Rev Immunol.** v.6, p.520-31, 2006.

RUBENSTEIN, P. A.; WEN, K. K. Lights, camera, actin. **IUBMB Life**. v.57, n.10, p.683-687, 2005

RUNG-RUANGKIJKRAI, T.; FUJIKURA, D.; KITAMURA, H.; SAITO, M., IWANAGA, T. The expression of src-suppressed C kinase substrate (SSeCKS) and uptake of exogenous particles in endothelial and reticular cells.**Arch Histol Cytol.** v.67, n.2, p.135-47, 2004.

RZUCIDLO, E. M.; QUIST, W. C.; HAMDAN, A. D.; LOGERFO, F. W. Interferon gamma up-regulates a novel protein in vascular smooth muscle cells. **J Vasc Surg**. v.29, p.317-323, 1999.

SALOMONIS, N.; COTTE, N.; ZAMBON, A. C.; POLLARD, K. S.; VRANIZAN, K., DONIGER, S. W.; DOLGANOV, G.; COKLIN, B. R. Identifying genetic networks underlying transition to labor. **Genome Biol.** v.6, n.2:R12, 2005

SCHAFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: **Animal Reprod. Science.** v.75, p. 73-94, 2003.

SCOTT, M. P.; MILLER, W. T. A peptide model system for processive phosphorylation by Src family kinases. **Biochemistry.** V.39, n.47, p.14531-7, 2000.

SEIBENHENER, M. L.; ROEHM, J.; WHITE, W. O.; NEIDIGH, K. B.; VANDENPLAS, M. L.; WOOTEN, M. W. Identification of Src as a novel atypical protein kinase C-interacting protein. **Mol Cell Biol Res Commun.** v.2, n.1, p.28-31, 1999.

SHINOHARA, M.; OHYAMA, N.; MURATA, Y.; OKAZAWA, H.; OHNISHI, H.; ISHIKAWA, O.; Matozaki, T. CD47 regulation of epithelial cell spreading and migration, and its signal transduction. **Cancer Sci.** v. 97, n. 9, p.889-95, 2006

TAKESHITA, T. Diagnosis and Treatment of Recurrent Miscarriage Associated with Immunologic Disorders: Is Paternal Lymphocyte Immunization a Relic of the Past? **J Nippon Med Sch.** v.71, n.5, p. 308-13, 2004.

TAYADE, C.; ESADEG, S.; FANG, Y.; CROY, B. A. Functions of alpha 2 macroglobulins in pregnancy. **Mol Cell Endocrinol**, v.245, p.60-66, 2005a.

TAYADE, C.; FANG, Y.; BLACK, G.; PAFFARO, V. A. JR.; CROY, B. A. Transcription of Eomes and t-bet during differentiation and development of effector function in mouse uterine natural killer cells. **J Leuko Biol**, v.78, p.1347-1355, 2005b.

TENGER, C.; SUNDBORGER, A.; JAWIEN, J.; ZHOU, X. H. IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells. **Arterioscler thromb Vasc Biol**, v 25, p.791-796, 2005.

THOMAS, S. M.; BRUGGE, J. S. Cellular functions regulated by Src family kinases. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v.13, p. 513-609, 1997

TORNEHAVE, D.; HOUGAARD, D. M.; LARSSON, L. I. Microwaving for double indirect immunofluorescence with primary antibodies from the same species and for staining of mouse tissues with mouse monoclonal antibodies. **Histochem. Cell. Biol.**v.113, p.19-23, 2000.

TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. **Adv. Immunol.** v.47, p. 187-376, 1989.

VÉLY, F.; VIVIER, E. Natural killer cell receptor signaling pathway. *Science STKE*. cm6, 2005.

VIVIER, E.; NUNES, J. A.;VELY, F; Natural killer cell signaling pathways. **Science**. V. 306, p. 1517-1519, 2004.

VOSSHENRICH, C. A. J.; GARCÍA-OJEDA, M. E.; SAMSON-VILLÉGER, S. I.; PASQUALETTO, V.; ENAULT, L.; GOFF, O. R.; CORCUFF, E.; GUY-GRAND, D.; ROCHA, B.; CUMANO, A.; ROGGE, L.; EZINE, S.; DI SANTO, J. P. A thymic pathway os mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. **Nature immunology**.v.7, p. 1217-1224, 2006.

WAKE, K.; KAWAI, Y.; SMEDSRD, B.; Re-evaluation of the reticulo-endothelial system.**Ital J Anat Embryol**. v.106, p.261-9, 2001

WOODWARD, M. P; YOUNG, W. W. JR; BLOODGOOD, R. A. Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation.**J Immunol Methods**, v. 78, n.1, p.:143-53, 1985

XIE, X.; HE, H.; COLONNA, M.; SEYA, T.; TAKAI, T.; CROY, B. Pathways participating in activation of mouse uterine natural killer cells during pregnancy. **Biol Reprod.**, v.73, p. 510-518, 2005.

YOKOYAMA, W. M.; PLOUGASTEL. Immne functions encoded by the natural killer gene complex. **Nat. Rev. Immunol.**,v. 3, p. 304-316, 2003.