

## Análise da expressão gênica para identificação de subpopulações funcionais de células Natural Killer uterina de camundongos.

**Maria Gabriela F. Mulato\*, Aureo T. Yamada.**

### Resumo

Os linfócitos natural killer (NK) presentes no útero gestante de humanos e alguns roedores como ratos e camundongos desempenham funções críticas para o sucesso da gestação. Em camundongos, a distribuição e morfologia destas células no ambiente uterino variam de acordo com o desenvolvimento da gestação sugerindo a ocorrência de subtipos funcionais. O presente trabalho busca identificar as variações das expressões gênicas destes subtipos morfológicamente distinguíveis distribuídas na região do MLAp (agregado linfóide do mesométrio associado a gestação) por meio da microscopia de dissecação a laser em preparados histológicos de útero gestante de camundongos submetidos à citoquímica de lectina DBA (Dolichos bibrurus). Desta análise busca-se estabelecer a correlação morfofuncional das subpopulações das células natural killer uterinas (uNK) relacionado com a gestação.

### Palavras-chave:

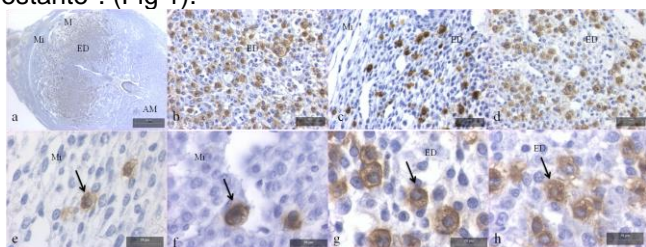
*uNK, gestação, transcriptoma.*

### Introdução

Estudos funcionais realizados com camundongos geneticamente modificados e *in vitro* de uNK isoladas confirmam a secreção de diversos mediadores como IFN- $\gamma$ , VEGF, PlGF, angiopoietina-2, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que auxiliam a homeostase do ambiente uterino relacionado com a gravidez<sup>1,2</sup>. Presume-se que esta diversidade funcional seja relacionado com os subtipos morfológicos de uNKs que apresentam distribuição preferencial na região denominada MLAp (mesometrial lymphoid aggregate associated to pregnancy)<sup>3</sup>. Contudo, se estes subtipos morfológicos localizados em áreas diferentes têm funções diferentes permanece como questão aberta na biologia da reprodução. Assim, este estudo busca inicialmente aprimorar os métodos de preservação do RNA total e identificar a diferenças de expressões gênicas dos subtipos morfológicos das uNK de camundongos obtidos através da técnica de LCM (*Laser capture microdissection*) e avaliar as respectivas expressões gênicas por meio de microarranjo de RNA.

### Resultados e Discussão

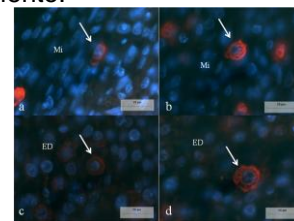
**Identificação dos subtipos morfológicos de células uNK de camundongos.** A lectina DBA marca seletivamente as células uNK de camundongos no útero gestante<sup>3</sup>. (Fig 1).



**Figura 1.** Citoquímica de lectina DBA/peroxidase no útero de 9dg. Localização das células uNKs no MLAp (a) distribuídas no endométrio e miométrio (b-d). Detalhe dos subtipos de células uNK, pequena e agranular do miométrio (e) e endométrio (f); grande com grânulos citoplasmático do endométrio decidualizado (g) e não decidualizado (h) miométrio (Mi); endométrio decidualizado (ED); região anti-mesometrial (AM); região mesometrial (M).

### Adequação do processamento destinado ao isolamento de RNA.

Os procedimentos de preservação tanto da morfológica quanto da integridade do RNA (acetona, etanol, metanol e suas combinações 1:1, 1:2, 2:1) combinados com o RNAlater não resultam na boa histológica, particularmente das células uNK. A melhor preservação foi obtida com PAXGene (PreAnalytiX 2013) que preservou a afinidade da lectina DBA para o reconhecimento das células uNK (Fig 2). A microdissecação destes subtipos morfológicos das células uNK pelo LCM estão em andamento.



**Figura 2.** Citoquímica de lectina DBA/Texas Red de DAPI ao microscópio de fluorescência do útero gestante processado com PAXGene, identifica os subtipos de células uNKs (setas) pequenas, agranulares (a) e granulares (b) do miométrio-MI e; as grandes, agranulares (c) e granulares (d) do endométrio decidualizado-ED.

### Conclusões

Os subtipos morfológicos de células uNK identificáveis pela lectina DBA foram mantidos pelo processamento com PAXgene, em protocolo otimizado para preservação do RNA. Este é um importante avanço para padronizar a microdissecação de subtipos celulares pelo LCM e decifrar a especificidade funcional dessas células por meio da avaliação dos seus transcriptomas.

### Agradecimentos

Instituição de fomento: PIBIC/CNPq.

<sup>1</sup> Lima, P.D.A., Paffaro, V. A. Jr., Yamada, A. T. Part F: Functional duality of mouse uterine Natural Killer cell in pregnancy. *Immunology of pregnancy*; France, 2013, 335-359.

<sup>2</sup> Lippe, E. M. O., Yamada, A. T., Sharma, S. Part G: Human uterine Natural Killer cell: friends or foes of pregnancy outcomes. *Immunology of pregnancy*; France, 2013, 360-376.

<sup>3</sup> Paffaro, V. A., Bizinoto, M. C., Joazeiro, P. P., Yamada, A. T., Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity, *Placenta* 2003; 24, 479-488.