GRAZIELA MENCK FERREIRA SANTOS

Avaliação da influência da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase no ciclo celular de células placentárias e embrionárias murinas e de ratas em cultivo celular, frente à ação de hormônios e citocinas

São Paulo
2012

GRAZIELA MENCK FERREIRA SANTOS

Avaliação da influência da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase no ciclo celular de células placentárias e embrionárias murinas e de ratas em cultivo celular, frente à ação de hormônios e citocinas

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Departamento de Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

São Paulo
2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2718
FMVZ

Santos, Graziela Menck Ferreira

Avaliação da influência da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase no ciclo celular de células placentárias e embrionárias murinas e de ratas em cultivo celular, frente à ação de hormônios e citocinas / Graziela Menck Ferreira Santos. -- 2012.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior.

1. Indoleamina 2,3-dioxigenase. 2. Estradiol. 3. Triptofano. 4. Progesterona. 5. Placenta. 6. Embrião.
I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da influência da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase no ciclo celular de células placentárias e embrionárias murina e de ratas em cultivo celular frente à ação de hormônios e citocinas", protocolado sob o nº 2648/2012, utilizando 5 (cinco) ratas e 5 (cinco) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/6/2012.

We certify that the Research "Evaluation of the influence of the expression of Indoleamine 2,3-dioxygenase, in the cell cycle of murine and mice embryonic cells and placenta cells, in cell culture, forward to the action of hormones and cytokines", protocol number 2648/2012, utilizing 5 (five) rats and 5 (five) mice, under the responsibility Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 6/20/2012.

São Paulo, 21 de junho de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Graziela Menck Ferreira

Título: Avaliação da influência da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase no ciclo celular de células placentárias e embrionárias murinas e de ratas em cultivo celular, frente à ação de hormônios e citocinas

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatōrias

Dedico...

À Deus, por Ser meu Respirar.

*Aos meus amados avós, Antonio e Aracy (in memoriam), por
todo amor, carinho e incentivo.*

A minha querida mãe Mônica, que sempre esteve ao meu lado.

*Ao meu grande amor e companheiro Koki, que Deus Colocou como um anjo
em minha vida.*

*Ao amor da minha vida, meu filho Marco Antonio, que a cada dia que passa
ilumina minha vida e me mostra que existe amor maior do que eu imaginava.*

*Às minhas companheiras caninas Glórinha, Greta e Guta, que me recepcionam
sempre com lambidas e muita alegria, tornando meu dia muito mais feliz e com
muito mais razão para ser vivido.*

Agradecimientos

Agradeço...

À Deus por Estar em todos os momentos comigo, através do Espírito Santo, Guiando-me pelos caminhos que devo seguir através da sabedoria e justiça de Sua Palavra.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, me dando todo o apoio e, principalmente meu amor Koki, que me ouvia com toda sua paciência e sabedoria nos momentos difíceis da realização deste trabalho e meu filho Toninho, por existir. Pelo simples fato de seu olhar fazer com eu transbordasse de felicidade, amor e paz!

A minha amada mãe Mônica que sempre me apoiou em tudo e torceu muito por mim. Obrigada por ser minha mãe e por deixar Marco Antonio sob seus cuidados na minha ausência.

As minhas grandes amigas Vanessa e Cici, que me ajudaram muito, com carinho dispensado a mim e, ao cuidar do meu filho nos momentos em que eu não pude estar presente.

À FAPESP pelo apoio e financiamento deste projeto.

À Universidade de São Paulo pelo acolhimento e por todo ensinamento passado.

Ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior pela confiança, orientação, dedicação e por transmitir seus conhecimentos nestes anos de trabalho juntos. Que Deus o abençoe!

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, que dedicou uma parte de seu tempo em me ajudar, e muito. Sempre disposto a dividir seus conhecimentos e experiências, não só a mim, mas a todos que o procuram. Muito obrigada por tudo!

À Rosemary Viola Bosch, que sempre esteve disposta a me ajudar e se tornou uma amiga querida.

Ao Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto, por ter me recebido tão bem e ter me dado grande apoio na parte estatística, que foi fundamental neste trabalho.

À Lilian Jesus de Oliveira por estar sempre se prontificando em ajudar e me privilegiando em poder contar com seus conhecimentos. Parabéns pela sua dedicação e inteligência. Admiro muito você.

À Janaína Munuera Monteiro por ter me ensinado muito, desde quando ingressei na Pós Graduação, tornando-se também uma pessoa querida em minha vida.

À minha querida amiga Sílvia Amélia Ferreira Lima, minha "irmã de coração". Sustentamo-nos firmemente nestes anos de trabalho, através de nossos ouvidos, corações, abraços, choros e muitas risadas. Silsili você é muito especial! Te amo amiga!

À Fernanda Cardoso, uma pessoa admirável pelo seu jeito verdadeiro de ser e pela sua dedicação e persistência. Uma amiga que dedicou seu tempo me estendendo a mão, quando precisei, me dando seu ombro para eu chorar e rindo quando eu contava minhas piadas sem graça, mas que no fundo tem uma graça. Você é especial e se tornou muito importante na minha vida. Obrigada por toda ajuda e incentivo!

À Fernanda Bastianello Junior, outra pessoa especial que encontrei. Espero que esse seja somente o começo de uma grande amizade que estamos construindo. Amizade para vida inteira Feba. Conte comigo sempre!

À amiga Érika Zolcsak de Souza por toda ajuda e companheirismo desde que nos conhecemos.

À Maria Letícia Baptista Salvadori, por toda ajuda e por transmitir suas experiências com todos do laboratório.

Aos colegas Rafael Magnadelo Leandro e Pedro Kastein Faria da Cunha Bianchi por toda ajuda e pela troca de experiências.

Às queridas amigas Dilaila Kelly de Abreu, Renata Avancini Fernandes, Sônia Will que sempre estiveram ali do meu lado quando precisei. Gosto muito de vocês!

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck, por ser um cientista admirável por sua integridade, ética, docência e inteligência, além de ser um exemplo de humildade. Tenho muito orgulho de ser sua prima e que Deus continue abençoando você, sua família e sua carreira!

Ao IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), na pessoa de Maria Neide Ferreira Mascarenhas, pelo fornecimento dos animais, para a execução deste projeto.

A todos os colegas e funcionários do Programa de Pós Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, por esses anos de convivência e troca de experiências.

Aos irmãos da Igreja Presbiteriana Independente de Vila Yara, pelos conselhos de sabedoria e orações dedicadas a mim.

RESUMO

SANTOS, G. M. F. **Avaliação da influência da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase no ciclo celular de células placentárias e embrionárias murinas e de ratas em cultivo celular, frente à ação de hormônios e citocinas.** [Evaluation of the influence of the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase on the cell cycle of murine and rat embryonic cells and placental cells in culture supplemented with hormones and cytokines]. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) desempenha um papel importante na tolerância materno-fetal devido à sua ação de catabolizar o triptofano e, consequentemente, impedir a proliferação de linfócitos T, que necessitam desse aminoácido para se manter. Hormônios da reprodução também participam do processo de sobrevivência do feto alógeno, como a progesterona que bloqueia o estímulo mitogênico da proliferação de células T, modula a produção de anticorpos, favorece a produção de IL-10, etc. e o estradiol, que pode modular o perfil imune Th1 ou Th2 na gestação, dependendo de sua concentração. Contudo, a existência ou não de correlação da ação da IDO com esses hormônios ou vice-versa ainda encontra-se pouco evidenciada. Desta forma este trabalho verificou a influência da expressão da IDO e às ações de hormônios da reprodução e citocinas no ciclo celular de células oriundas de fetos e placenta de gestação a termo de fêmeas de ratas e camundongos em cultivo. Este estudo foi realizado em complementação a um trabalho anterior, no qual foi realizada uma avaliação da expressão da IDO por citometria de fluxo em células uterinas, de placentas e de embriões de ratas e camundongos fêmeas prenhes e não prenhes que foram mantidas em cultivo e suplementadas com estradiol, progesterona, interferon γ , triptofano e 1-metil-DL- triptofano. A avaliação das fases do ciclo celular foi realizada pela citometria de fluxo. De acordo com os resultados, em relação ao efeito dos tratamentos no comportamento das células no ciclo celular, podemos observar que, em ratas prenhes e não prenhes, ao adicionar estradiol, houve maior predominância das células em fase G1 nos períodos de 4 e 24 horas, bem como no grupo de camundongos fêmeas prenhes. Algumas células uterinas de ratas não prenhes tratadas com estradiol, assim como as tratadas com progesterona e interferon γ progrediram no ciclo para fase de síntese nos tempos de 24 e 48 horas. Com a adição de triptofano podemos notar nos grupos de ratas não prenhes, camundongos fêmeas prenhes e não prenhes, um aumento da quantidade de células na fase G1 nos três períodos analisados. No grupo de ratas prenhes foi observado uma predominância celular em fase G1 nos tempos de 4 e 24 horas, sendo que em 48 horas, as células sofreram fragmentação de DNA. As células que

foram suplementadas com 1- metil – DL - triptofano + triptofano mantiveram o mesmo comportamento no ciclo celular , se mantendo em fase G1 nos tempos de 4, 24 e 48 horas grupos prenhes e não prenhes de ratas e nos tempos de 4 e 24 horas nos grupos de camundongos fêmeas prenhes e não prenhes, estando com seu DNA fragmentado e em fase de síntese, respectivamente, no tempo de 48 horas. A suplementação dos diversos fatores aos cultivos celulares permitiu observar alterações na dinâmica do ciclo celular, representada principalmente por um aumento de células em fase G1 nos grupos de células placentárias e embrionárias que receberam progesterona, estradiol, interferon γ e triptofano e apresentaram um significativo aumento da expressão de IDO, e que permite inferir que provavelmente a síntese de RNAm esteja correlacionada à produção da IDO.

Palavras-chave: Indoleamina 2,3-dioxigenase. Estradiol. Triptofano. Progesterona. Placenta. Embrião.

ABSTRACT

SANTOS, G. M. F. **Evaluation of the influence of the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase on the cell cycle of murine and rat embryonic cells and placental cells in culture supplemented with hormones and cytokines.** [Avaliação da influência da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase no ciclo celular de células placentárias e embrionárias murinas e de ratas em cultivo celular, frente à ação de hormônios e citocinas]. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) plays an important role in maternal-fetal tolerance due to its capacity to catabolize tryptophan and thereby preventing the proliferation of T lymphocytes, necessary for their maintenance. Reproductive hormones are also involved in the process of survival of semi-allogeneic fetus, as progesterone that blocks mitogenic stimulation of T cell proliferation, modulates antibodies production, promotes production of IL-10, etc. and estradiol, that can modulate the Th1 or Th2 immune profile during pregnancy, depending on its concentration. However, there is very few evidences regarding a possible correlation between IDO expression and these hormones; thus this study examined the influence of the expression of IDO and the actions of reproductive hormones and cytokines in the cell cycle of cells derived from fetuses and placenta at term gestation of female rats and mice in culture. This study was conducted as a complement to an earlier work, in which an evaluation was made of the IDO expression by flow cytometry in uterine cells, placentas and embryos of pregnant rats and mice and non-pregnant females that were maintained in culture and supplemented with estradiol, progesterone, interferon γ , tryptophan and 1-methyl-DL-tryptophan. The cell cycle evaluation was conducted by flow cytometry. According to the results, regarding the effect of treatments on the behavior of the cells in the cell cycle, it was observed that in pregnant and non-pregnant rats after the addition of estradiol, there is a greater predominance of cells in G1 phase at periods of 4 and 24 hours, that also was noted in the group of pregnant female mice. Uterine cells from non-pregnant female rats treated with estradiol and progesterone as well as treated with interferon γ progressed to the phase of synthesis on the cycle, at 24 and 48 hours. With the addition of tryptophan the groups of non-pregnant rats, pregnant and non-pregnant mice, an increased amount of cells in the G1 phase were observed in the three periods analyzed. In the group of pregnant rats a predominance of cells in the G1 phase was observed in periods of 4 and 24 hours, and 48 hours, where the cells undergone DNA fragmentation. In pregnant and non-pregnant rats the

cells supplemented with 1 - methyl - DL - tryptophan + tryptophan remained at G1 phase in periods of 4, 24 and 48 hours and 4 and 24 hours for cells from pregnant and non-pregnant mice , that show ragmented DNA followed by synthesis at 48 hours period. Supplementation of the various factors to cell cultures allowed to observe dynamic changes in the cell cycle, represented primarily by an increase of cells in G1 phase in groups of embryonic and placental cells that received progesterone, estradiol, interferon γ and tryptophan and showed a significant increase in the expression of IDO, that allows us to infer that the mRNA synthesis is probably correlated to the production of IDO.

Keywords: Indoleamine 2,3-dioxygenase. Estradiol. Tryptophan. Progesterone. Placenta. Embryo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVO.....	21
2.1	GERAL.....	21
2.2	ESPECÍFICOS	21
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1	PLACENTA: RATO E CAMUNDONGO.....	22
3.2	TOLERÂNCIA MATERNO-FETAL.....	23
3.3	INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE.....	24
3.3.1	IDO: a enzima limitante para o metabolismo do Triptofano.....	27
3.3.2	Regulação da atividade enzimática.....	28
3.3.3	Mecanismos de imunossupressão.....	28
3.4	HORMÔNIOS.....	29
3.4.1	Progesterona	29
3.4.2	Estradiol	30
3.5	CICLO CELULAR.....	32
3.5.1	Fases do Ciclo Celular.....	32
3.5.2	Regulação do Ciclo Celular.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	MATERIAL.....	35
4.1.1	Análise das fases do ciclo celular das culturas primárias de células placentárias após a adição dos fatores estudados, por citometria de fluxo.....	35
4.2	MÉTODOS.....	36
4.2.1	Cultivo celular.....	36

4.2.2	Análise das fases do ciclo celular das culturas primárias de células placentárias após a adição dos fatores estudados, por citometria de fluxo.....	38
5	RESULTADOS	39
5.1	RATAS.....	39
5.2	CAMUNDONGOS FÊMEAS	48
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A gestação constitui um fenômeno ímpar no organismo no que se refere ao comportamento do sistema imune. O feto é resultante da união entre dois indivíduos incompatíveis do ponto de vista imunológico. Ele tem sido comparado com um enxerto semi-alogênico, pois expressa moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) tanto materno quanto paterno e, o sistema imune da mãe precisa driblar os antígenos fetais durante toda a gestação (KOLB; CHAOUAT; CHASSOUX, 1984; CROY; WOOD; KING, 1987; THELLIN, 2000), havendo o desenvolvimento de um complexo sistema de membranas denominado placenta, um órgão transitório, que envolve o conceito e se encontra fundida à mucosa uterina, realizando trocas materno-fetais de nutrientes e oxigênio. A placenta é a justaposição ou fusão de membranas fetais com o endométrio, que difere em muitos aspectos de outros órgãos e está ligada ao embrião pelo cordão umbilical. Sua forma definitiva é determinada pela distribuição das vilosidades sobre a superfície coriônica (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O paradoxo imunológico observado na reprodução de mamíferos, no qual antígenos fetais são tolerados pelo organismo materno, traz novos conceitos para a compreensão da imunomodulação (LUPPI et al., 2002). Durante a gravidez, o feto, que é considerado imunologicamente alogênico (por possuir metade dos genes paternos), não é rejeitado pela mãe. O intrigante mecanismo pelo qual o sistema imune da mãe reconhece o feto como dele mesmo ainda não foi completamente desvendado (THELLIN, 2000), porém existem fortes evidências que a enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) (MUNN et al., 1998), exerce um importante papel neste contexto, além do controle da citotoxicidade direta das células natural killer uterinas (uNK), atividade das células T regulatórias, a liberação de diferentes citocinas e a influência hormonal sobre o sistema imune materno (SARAFANA et al., 2007).

Um dos possíveis mecanismos pelo qual a IDO, que é produzida pelas células trofoblásticas (MUNN et al., 1998), exerce efeito imunomodulador, compreende a supressão de células T locais, dependentes de aminoácido L-triptofano, através de apoptose das mesmas e, promovendo assim uma tolerância imunológica (MELLOR; MUNN, 2001; MELLOR et al., 2002; TAKIKAWA, 2005; SAITO et al., 2007).

Outro caminho pelo qual a indoleamina 2,3 dioxigenase dribla o sistema imune dá-se pela produção de metabólitos gerados a partir do triptofano, derivados da quinurenina. Estudos demonstraram que células dendríticas expressando IDO inibem a proliferação de

linfócitos T “in vitro” e a adição de derivados da quinurenina potencializa esse efeito inibitório (TERNESS et al., 2002).

Contribuindo também com estabelecimento e a manutenção da gestação, a progesterona, possui diferentes funções nos eventos endócrinos e imunológicos relacionados ao período de crescimento e desenvolvimento fetal e mamário (ARCK et al., 2007). Esse hormônio promove a estimulação do crescimento e diferenciação do endométrio para a implantação do blastocisto e da inibição das contrações do miométrio (SZEKERES-BARTHO; SZEKERES, 1992; MANETTI et al., 1995), além de exibir diversas ações imunossupressoras contribuindo para o estado de tolerância contra os antígenos do conceito, a exemplo da inibição das células Th1 pela ação do fator bloqueador induzido pela progesterona (PIBF), que leva à redução dos agentes pró-inflamatórios, havendo consequente predominância das células Th2, responsáveis pela produção de citocinas favoráveis a gestação, dentre elas a IL-4 e a IL-10 (BARTHO; WEGMANN, 1996).

Além da progesterona, outro hormônio que possui papel importante na gestação é o estrogênio, atuando no crescimento placentário e no desenvolvimento embrionário, com propriedades pró e anti-inflamatórias, como produção de citocinas, afetando as funções celulares (IETTA et al., 2010), desta forma também interferindo nos mecanismos de tolerância materno-fetal. Outro papel desempenhado pelo estradiol é o aumento da expressão de IDO mRNA pelas células dendríticas comandando a supressão das funções das células T via IDO (PHAN; YANG; SHERRY, 2003).

Dentre as citocinas produzidas durante o período gestacional, o interferon- γ (IFN γ) é secretado pelas células T auxiliares do tipo 1 (Th1) e está envolvida na apresentação de antígenos para células dendríticas e epiteliais, monócitos, macrófagos, fibroblastos, bem como a estimulação de uma forte atividade bioquímica e funcional da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (WANG et al., 2010).

O interferon- γ estimula uma forte atividade bioquímica e funcional da IDO, pois induzem a expressão dos genes que codificam esta enzima (KUDO et al., 2004), estimulando deste modo a IDO a degradar o triptofano em quinurenina (YOSHIDA et al., 1981; YASUI et al., 1986; YOSHIDA et al., 1986; RUBIN et al., 1991; FROLOVA et al., 1993; FLECKNER et al., 1995; TOLSTRUP et al., 1995; WIRLEITNER et al., 2003; KUDO et al., 2004; BOASSO et al., 2005; SUGIMOTO et al., 2006).

De acordo com Muller et al. (2005), há um potente inibidor da atividade enzimática da IDO, denominado 1-metil- DL- triptofano, que reverteu o efeito supressor sobre as células T, facilitando uma resposta proveniente dessas células contra os antígenos (GROHMANN;

FALLARINO; BIANCHI, 2001; GROHMANN; FALLARINO; SILLA, 2001; QIAN et al., 2009), assim como a inibição da produção de catabólitos do triptofano, como a quinurenina (MUNN et al., 1999; HWU et al., 2000; MELLOR et al., 2003).

Considerando que a enzima indoleamina 2,3 dioxigenase apresenta níveis elevados em mulheres grávidas (STREHLOW; SEEGERT; FRICK, 1993) e que há evidências de sua expressão em células uterinas, placentárias e embrionárias (ratas e camundongos fêmeas prenhes) em cultivo, as quais se mostraram sensíveis aos fatores (estradiol, progesterona, interferon γ , triptofano e 1- metil – DL - triptofano + triptofano), segundo Salvadori (2011), este estudo busca avaliar o comportamento no ciclo celular destas mesmas células e a correlação desta dinâmica com a expressão da IDO.

2 OBJETIVO

2.1 GERAL

Verificar a influência das ações de hormônios da reprodução e citocinas no ciclo celular de células oriundas de fetos e placenta de fêmeas de camundongos e ratos em cultivo, bem como se existe alguma correlação entre a expressão de IDO e a adição desses fatores.

2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar, pela citometria de fluxo, a expressão da IDO e o ciclo celular de células placentárias e embrionárias murinas e de ratas frente à adição de:

- a. Estradiol
- b. Progesterona;
- c. Triptofano;
- d. Interferon γ ;
- e. 1-Metil-DL-Triptofano.

2.2.2 Verificar a existência da correlação da expressão da IDO e a adição dos hormônios e citocinas no ciclo celular de células placentárias e embrionárias murinas e de ratas em cultivo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura consultada neste trabalho segue abaixo.

3.1 PLACENTA: RATO E CAMUNDONGO

A gravidez é caracterizada pelo estímulo do sistema imunológico inato e supressão do sistema imunológico adaptativo (LUPPI et al., 2002). A placenta desempenha um papel importante na vigilância imunológica e nos mecanismos da tolerância materna ao feto. (THELLIN et al., 2000).

Em roedores, a placenta é constituída pela porção materna, a decídua, além de apresentar duas regiões distintas denominadas zona juncional e a zona do labirinto. A zona juncional está localizada próxima à decídua materna e ambas as regiões possuem funções endócrinas (GIBORI, 1994; SOARES et al., 1996), sendo irrigadas apenas pelo sangue materno e tendo como barreira placentária, camadas trofoblásticas junto ao endotélio fetal.

O desenvolvimento da placenta hemotricorial resulta do crescimento do cone ectoplacentário e da associação das suas células com células de origem alantóica. As células da trofotoderme do blastocisto transformam-se em células gigantes do trofoblasto por volta do 5º - 6º dia. Durante o crescimento do cone, células da periferia destacam-se formando as células gigantes do trofoblasto secundárias enquanto as outras células na região central dão origem aos outros componentes trofoblásticos da placenta (ENDERS, 1965; HOFFMAN; WOODING, 1993). As células gigantes do trofoblasto têm propriedades fagocíticas e invasivas, produzindo enzimas proteolíticas. Estas células invadem a decídua e migram para os vasos maternos ocupando o lugar das células endoteliais (WELSH; ENDERS, 1987).

Após ruptura dos vasos maternos, o sangue migra para os espaços intercelulares gigantes de células trofoblásticas. Assim, o cone ectoplacentário aparece com lacunas vasculares maternas, sendo externamente limitado por uma camada de células gigantes. Em relação à parte superficial do cone ectoplacentário surge a mesoderme corioalantóide, que se diferencia em mesênquima fetal e nos canais vasculares (DAVIES; GLASSER, 1968).

A mesoderme estende-se profundamente por todo o trofoblasto do cone ectoplacentário, onde já existem os canais vasculares maternos, formando assim o início da

zona do labirinto, que recebe tanto sangue materno quanto sangue fetal, constituindo a principal região de trocas metabólicas da placenta (DAVIES; GLASSER, 1968; FERRO, 1991).

As camadas trofoblásticas, em ratos e camundongos, são organizadas em três camadas, dentre elas:

- Camada I: células individualizadas, sendo algumas gigantes e com funções endócrinas (SOARES et al., 1996) , entram em contato com sangue materno. Nesta camada podem ocorrer fenestrações (TAKATA et al., 1997);
- Camada II: podendo ser denominada também como intermédia, esta camada tem como característica presença de células sinciciais com função exclusivamente endocítica, contendo vesículas cobertas por clatrina (TAKATA et al., 1997);
- Camada III: é uma camada sincicial, impedindo a passagem de macromoléculas, com função de barreira (ENDERS et al., 1998).

3.2 TOLERÂNCIA MATERNO FETAL

O genoma do conceito semi-alogênico é composto por metade materna e metade paterna, desta forma presume-se que o sistema imune da mãe possa rejeitá-lo por representar um enxerto paterno (BOUMA et al., 1996), mas isso geralmente não ocorre. A tolerância do “enxerto” fetal alogênico pelo sistema imune materno continua sendo um enigma médico que estimula pesquisas por mais de meio século (THELLIN, 2000).

Em humanos a placenta hemocorial e as células trofoblásticas fetais apresentam um contato muito próximo com as células imunes maternas. A razão para isso é que as células trofoblásticas extravilosas (EVT) invadem a mucosa uterina materna (chamada “decídua” durante a gravidez). Além disso, no primeiro trimestre o miométrio, assim como as artérias espirais decíduais são invadidos pelas EVT. Estes processos são denominados invasão intersticial e endovascular, respectivamente (VON RANGO, 2008). A invasão do trofoblasto assegura a ancoragem da placenta dentro da parede uterina e o acesso do feto ao sistema vascular materno para manter a fonte do oxigênio e dos nutrientes. A capacidade invasora das EVT é a mais forte durante o primeiro trimestre (1-12 semanas da gravidez) declinando posteriormente. Durante o primeiro trimestre o contato íntimo entre as células imunes materna

e as células fetais são restringidas a decídua. No início do segundo trimestre o sangue materno começa a perfundir o espaço intervilloso (FOIDART, 1992; JAFFE; JAUNIAUX; HUSTIN, 1997; BURTON; JAUNIAUX; WATSON, 1999; SCHAAPS et al., 2005). Isto significa que durante o segundo trimestre o local inicial de contato entre as células fetais e a decídua materna é estendido ao corpo inteiro e o sistema imune da mãe entra em contato com os imunógenos fetais.

Não obstante, em gestações bem sucedidas o conceito é tolerado e a gravidez chega ao termo sem problemas imunológicos. Consequentemente sugeriu-se que a gravidez exigisse uma imunossupressão materna geral. Entretanto, o status imune das mulheres grávidas bem como sua resposta aos vários estímulos mostrou que a resposta imune das mulheres grávidas não é reduzida significativamente quando em comparação com mulheres não-grávidas (THELLIN, 2000).

Numerosas hipóteses têm sido descritas para explicar o sucesso na gestação de fetos semi-alogênicos de mamíferos em mães imunocompetentes. A modulação de células maternas que medeiam respostas imunes contribui diretamente para a sobrevivência celular. Além da possível ausência de linfócitos T na decídua, inclui-se uma variedade de agentes responsáveis pela redução dos linfócitos responsivos às células alogênicas, os próprios tecidos embrionários e os fatores derivados de células fetais e deciduais (KOLB; CHAOUAT; CHASSOUX, 1984; CROY; WOOD; KING, 1987).

O sistema imune é bem controlado pelo balanço entre imunoestimulação e imunoregulação. CD4⁺ e CD25⁺ (células T regulatórias) e a IDO mediam a tolerância materna ao feto alogênico (SAITO et al., 2007).

A produção de IDO pelas células trofoblásticas representa um pré-requisito para a tolerância do feto semi-alogênico, já que as células fetais não sendo idênticas às da mãe podem ser passíveis a ocorrência de reação imune (MUNN et al., 1998). Estudos com células humanas indicam que altas concentrações dos metabólitos do Triptofano inibem a proliferação de células T (FRUMENTO et al., 2002; MUNN; SHARMA; LEE, 2002; TERNESS et al., 2002).

3.3 INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE

As oxigenases são metais contendo enzimas que catalisam a incorporação de uma

molécula de oxigênio (O₂) dentro do substrato, e isso leva a um modelo no metabolismo e síntese de uma variedade de substâncias biológicas. Dois tipos de oxigenases são conhecidos: monooxigenases e dioxigenases (MELLOR; MUNN, 2001).

Estudos realizados nas décadas de 50 e 60 descrevem que dois hemes contendo dioxigenases - indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3-dioxigenase (TDO), catalisam o metabolismo do L-Triptofano (L-Trp) em quinurenina (Kyn). O aumento nos níveis de Kyn, metabólitos do ácido quinolínico e 3-hidroxiquinurenina (3 OHKyn) podem ser observados em um número de desordens psiquiátricas ou neurológicas. O L-Trp serve como precursor na síntese do neurotransmissor serotonina e do hormônio melatonina. A IDO exibe um substrato de especificidade mais amplo que o TDO, pois esta forma pode degradar indoleaminas, incluindo o L-Trp, o D-Trp, a serotonina, a melatonina e a triptamina (MELLOR; MUNN, 2001).

A IDO está envolvida no sistema de imunoregulação. A supressão de células T dependente de IDO e a indução por células dendríticas sugerem que o catabolismo do L-Trp tem efeitos profundos na proliferação e diferenciação das células T que implicam em manipulações imuno-terapêuticas de pacientes com câncer e doenças infecciosas crônicas. Sugere-se que a atividade da IDO reduziria a concentração de Triptofano e desta forma as células do sistema imune ativadas não conseguiriam proliferar e entrariam em apoptose devido a este estado de carência no micro ambiente placentário (MELLOR; MUNN, 2001; TAKIKAWA, 2005).

A modulação, ativação, proliferação e mesmo a indução de processos apoptóticos em células T tem sido demonstrada como secundários a ação da IDO, cuja expressão foi observada em macrófagos, células dendríticas, células gigantes trofoblásticas em camundongos, no trofoblasto extraviloso e viloso em humanos (MUNN et al., 1999; MELLOR; BABAN; CHANDLER, 2003; MUNN; SHARMA; MELLOR, 2004; HAINZ; OBEXER; WINKLER, 2005), e, pelos catabólitos da degradação do Triptofano (FALLARINO; GROHMANN; VACCA, 2002; LEE et al., 2002). O aumento na degradação de Triptofano é observado em pacientes com ativação de células imunes (WIRLEITNER et al., 2003).

O Interferon- γ estimula a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) que degrada o Triptofano em quinurenina (YOSHIDA et al., 1981; YOSHIDA et al., 1986; YASUI et al., 1986; RUBIN et al., 1991; FROLOVA et al., 1993; FLECKNER et al., 1995; TOLSTRUP et al., 1995; WIRLEITNER et al., 2003; BOASO et al., 2005; SUGIMOTO et al., 2006). A atividade da IDO pode ser estimada pela razão quinurenina/triptofano (kyn/trp). A deprivação

do triptofano via IDO também suprime células T responsivas, que podem ser importantes na indução da tolerância (MUNN et al., 1999; LIANG et al., 2006).

Verifica-se alta expressão de IDO pelo sincício trofoblasto em placentas humanas principalmente nos estágios evolutivos fetais do primeiro e segundo terços, crescendo-se também sua expressão no epitélio glandular e estroma da decídua com seis semanas de gestação (MEISEL et al., 2004).

Defeitos no mecanismo imunomodulador iniciado pela IDO podem estar envolvidos no desenvolvimento de condições autoimunes, como a esclerose múltipla e o diabetes autoimune (SAKURAI et al., 2002; GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; BIANCHI, R. A., 2003); rejeição de fetos alogênicos (KAMIMURA et al., 1991; MUNN et al., 1998; KUDO; BOYD, 2000; MELLOR; MUNN, 2001; MELLOR; BABAN; CHANDLER, 2003; SCHROCKSNADDEL; WIDNER; BERGANT, 2003); e a demência em pacientes com AIDS (CHANG; KUCHROO; SHARPE, 2002). Recentes estudos demonstraram o envolvimento do CTLA-4 no controle de condições autoimunes, correlacionando-o funcionalmente à IDO (FUCHS, 1986; KRISTIANSEN; LARSEN; POCIOT, 2000; REIBNEGGER et al., 2001; CHANG; KUCHROO; SHARPE, 2002; CHISTIakov; TURAKULOV, 2003; EINARSDOTTIR; SODERSTROM; LOFGREN-BURSTROM, 2003).

O aminoácido triptofano caracteriza-se unicamente por relacionar seu metabolismo a processos imunes. Vários estudos têm demonstrado que o catabolismo do triptofano ocorre em sítios de inflamação, e a expressão de IDO pode vincular-se à resposta antiinflamatória por reduzir os danos nos tecidos e seus sítios (MELLOR; MUNN, 2001; LIANG et al., 2006). Além disso, sugere-se que as células produtoras de IDO possuem um papel na prevenção do início de distúrbios auto-imunes (LIANG et al., 2006). Alguns mediadores de inflamação incluindo o mais potente, interferon ($\text{IFN-}\gamma$) induz a produção de IDO. Provou-se pela primeira vez que a enzima IDO tem ampla ação antiinflamatória em investigações realizadas em biópsias de lesões de pacientes com doença inflamatória e também demonstrado que o T helper 1 (Th-1), $\text{IFN-}\gamma$ e o fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) são potentes indutores da expressão de IDO (WOLF; WOLF; RUMPOLD, 2004).

A atividade da IDO que está presente em células da linhagem dos monócitos e macrófagos pode privar os patógenos do acesso ao triptofano e expor os mesmos a metabólitos tóxicos do triptofano e, deste modo ajudar a acabar com infecções. Recentes estudos têm dirigido os efeitos imunomodulatórios da IDO em muitos aspectos, incluindo alergia, imunologia de tumores, autoimunidade e infecção por HIV (FUCHS; FORSMAN; HAGBERG, 1990; MELLOR; BABAN; CHANDLER, 2003; MURRAY, 2003; VON

BUBNOFF; KOCH; BIEBER, 2003; MULLER; MALACHOWSKI; PREDERGAST, 2005).

No contexto apropriado, a IDO pode contribuir para limitar os mecanismos imunes efetores e prevenir a atividade imune exagerada, ou em circunstâncias de atividade sustentada, gerar um estado de imunossupressão. Desta forma a atividade da IDO é considerada como tendo um potencial ambivalente podendo atuar em benefício ou detrimento do hospedeiro. A atividade imunológica da IDO pode ser vista como um mecanismo de feedback que contra regula a ativação imune (MUNN, 2006). A expressão e atividade da IDO podem ser induzidas pelos mesmos mecanismos e moléculas que iniciam a ativação imune (HAINZ; OBEXER; WINKLER, 2005).

3.3.1 IDO: a enzima limitante para o metabolismo do triptofano

O triptofano é obtido na dieta, geralmente é a parcela menos abundante de aminoácidos essenciais no organismo dos mamíferos (SIITERI; FEBRES; CLEMENS, 1977). A metabolização do triptofano pode ocorrer de diferentes formas, uma pequena proporção do triptofano ingerido (1%) é convertido em serotonina no sistema nervoso e intestino ou usado na síntese de melatonina na glândula pineal. A proporção principal (>95%) é metabolizada juntamente com a quinurenina (SIITERI; FEBRES; CLEMENS, 1977) na biosíntese de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD).

O passo limitante para o metabolismo da quinurenina é a clivagem oxidativa do anel pirrólico que converte o triptofano em quinurenina. Este passo é catalisado por duas enzimas, triptofano 2,3 dioxigenase (TDO), que é expresso exclusivamente no fígado (KNOX, 1955), e IDO, que é induzida em muitos tecidos e tipos celulares, incluindo células tumorais (UYTTENHOVE; PILOTTE; THEATE, 2003), células estromais de medula óssea (MELLOR; MUNN, 1999), granulócitos eosinofílicos (ASTIGIANO; MORANDI; COSTA, 2005), astrócitos (GUILLEMIN et al., 1999), células endoteliais (BEUTELSPACHER et al., 2006), sendo mais proeminente em células apresentadoras de antígenos (APCs). Em condições estáveis o metabolismo do triptofano alcança o fígado através da atividade da TDO (ESPEY; NAMBOODIRI, 2000; MOREAU; LESTAGE; VERRIER, 2005).

Em um ambiente inflamatório o metabolismo do triptofano pode ser ampliado pelo aumento da atividade da IDO. In vivo, níveis reduzidos de triptofano no soro e aumento simultâneo nos níveis de metabólitos do triptofano, ou seja, quinureninas podem ser

resultantes da atividade sistêmica da IDO que são frequentemente encontrados em estados de manutenção da ativação, tais como doenças autoimunes, gestação ou transplantes (WIDNER; SEPP; KOWALD, 2000; KUDO et al., 2003; FORREST et al., 2003; HAINZ; OBEXER; WINKLER, 2005).

3.3.2 Regulação da atividade enzimática

Geneticamente, a IDO em camundongos e humanos é codificada por um único gene terminado em *Indo*, localizado no braço curto do cromossomo 8 (FORREST et al., 2003). A transcrição do gene ocorre em resposta a mediadores inflamatórios, mais predominantemente o Interferon- γ (IFN- γ) ou “toll-like receptor” (TLR) (ou seja, por meio de lipopolisacarídeos) (MELLOR; MUNN, 2004). Para o entendimento do papel da IDO na imunorregulação é fundamental o entendimento que a expressão celular da proteína IDO não necessariamente precisa da atividade da IDO (TERNESS; CHUANG; OPELZ, 2006). A proteína IDO pode ser expressa por alguns subgrupos de células dendríticas (DCs), mas precisa de sinais estimulatórios para ser ativada (KUDO; BOYD, 2000). A atividade da IDO é dependente de um ambiente enriquecido por componentes redutores ativos, tal como um ambiente com tecido inflamado. Isso explica a aparente associação da inflamação (ativação imune) e atividade enzimática da IDO (MOFFET; NAMBOODIRI, 2003).

3.3.3 Mecanismos de imunossupressão

Duas teorias têm sido propostas para explicar como o catabolismo do triptofano regula a resposta imune, a depleção e o acúmulo de componentes metabólitos do triptofano no microambiente. A teoria da depleção do triptofano é fundamentada no conceito de que o triptofano é essencial para a síntese de proteínas e, deste modo considera-se necessário para a proliferação de células T. A ativação *in vitro* de células T (humanas e de camundongos) quando privadas do acesso ao triptofano, ou seja, pelo uso de depletors do triptofano em meios de cultura, mostraram passar por um passo inicial de ativação, mas subsequentemente exibem paradas no ciclo celular (MUNN et al., 1999) e início de sensibilidade a apoptose

(LEE et al., 2002). Algumas observações recentes demonstraram a IDO mediando à modulação da função da célula T, apesar do triptofano estar disponível, contradizendo o conceito de que a depleção de triptofano é o primeiro mecanismo que modula a inibição de células T mediada pela IDO (MOFFETT; NAMBOODIRI, 2003). Em ensaios de estimulação in vitro de células T produtos metabólicos do triptofano (MOFFETT; NAMBOODIRI, 2003) foram observados como tendo efeito imunossupressivo direto induzindo a apoptose seletiva de timócitos e Th1, mas não Th2 (MELLOR; BABAN; CHANDLER, 2003). Quinurenina e 3-hidroxiquinurenina também mostraram serem citotóxicos para células T, B e NK (MELLOR; MUNN, 2001; MELLOR; CHANDLER; LEE, 2002). A ativação da IDO pode causar depleção de triptofano e acúmulo de componentes do metabolismo do triptofano, isso é concebível para especular que in vivo ambos os mecanismos podem contribuir para efeitos imunorregulatórios da IDO.

3.4 HORMÔNIOS

3.4.1 Progesterona

As condições hormonais maternas, no período gestacional, também são necessárias para o bom desenvolvimento embrionário, sendo amplamente conhecido que níveis sanguíneos de progesterona inadequados interferem com a viabilidade do embrião, por não permitirem que o endométrio esteja adequadamente preparado para a sustentação da gestação (NEPOMUCENO et al., 2005).

A progesterona é um hormônio que contribui para a imunomodulação associada à gravidez (BROSENS; GELLERSEN, 2006), protegendo o conceito do ataque do sistema imune materno por inibição de células T (STECKEL et al., 2003). Os efeitos imunológicos deste hormônio são mediados, parcialmente, por um fator denominado PIBF (fator bloqueador induzido pela progesterona) (DRUCKMANN; DRUCKMANN, 2005), que é sintetizado pelas células T ativadas, expostas à progesterona, atuando nos macrófagos, nas células NK placentárias e, também, nas células circulantes (FAUST et al., 1999), possuindo efeito inibitório direto ou indireto na proliferação de linfócitos para induzir a tolerância de fetos geneticamente incompatíveis pelo sistema imune materno (LIGAM et al., 2005).

Sugere-se que a progesterona inibe a resposta imune para manter a gestação produzindo mais células dendríticas imaturas. Alguns autores demonstraram que a progesterona pode modular a diferenciação, maturação e função das células dendríticas para alterar a função do sistema imune materno (LIGAM et al., 2005).

O PIBF contém propriedades imunomoduladoras, tais como a regulação da expressão de perforinas pelas células NK (SZEKERES-BARTHO et al., 1989). Também atua no equilíbrio Th1/Th2 através do aumento da produção de IL-3, IL-4 e IL-10 e da diminuição da produção de IL-12 nos linfócitos e macrófagos (SZEKERES-BARTHO; WEGMANN, 1996; PEREIRA et al., 2005).

A progesterona também apresenta um papel na sobrevivência do enxerto fetal por bloquear a proliferação de linfócitos, modulando a produção de anticorpos, reduzindo o “burst” oxidativo em monócitos, alterando a secreção de citocinas de células T (PELTIER, 2003).

A progesterona é o hormônio que melhor representa o papel da imunomodulação na sobrevivência do enxerto fetal, sendo assim o mais estudado. Vários estudos comprovam que a progesterona bloqueia o estímulo mitogênico dos linfócitos (dependente de triptofano), ampliando o tempo de sobrevivência do enxerto, modulando a produção de anticorpos, diminuindo a quebra oxidativa dos monócitos, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos na resposta antígenos, e alterando a secreção de citocinas nos clones das células T para favorecer a produção de IL-10. Juntamente, observa-se a diminuição da resposta imune em presença de níveis de IDO que interfere sobre o triptofano circulante (PELTIER, 2003).

3.4.2 Estradiol

Efeitos imunomodulatórios do estradiol têm sido demonstrados em observações clínicas e experimentais. Estudos in vitro indicam que a exposição das células dendríticas ao estradiol pode inibir a habilidade destas células em estimular a proliferação e apoptose de células T (PHAN; YANG; SHERRY, 2003; YANG; HU; HOU, 2006). IDO é uma importante molécula regulatória das células dendríticas que participam da resposta e modulação das células T e pode controlar as células T autoreativas por depleção do triptofano (MUNN et al., 1999; LIANG et al., 2006). O estradiol modula múltiplos aspectos do sistema imune

(STEFANO et al., 2000; VEGETO et al., 2001) apresenta efeitos específicos em células imunes e pode atuar como estímulo pró-inflamatório e antiinflamatório de acordo com o ambiente (BRUCE-KELLER et al., 2000 ;VEGETO et al., 2001).

O estradiol também aumenta a expressão intracelular de IL-6 e IL-10, mas não aparecem mudanças evidentes em IL-12 e TNF- α . Como profissionais as células apresentadoras de antígenos e as células dendríticas do baço podem ser ativadas e podem induzir as células T a secretarem citocinas, que podem regular a resposta imune celular e humoral. Quando ativadas, as células dendríticas por si só podem produzir muitas citocinas como IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α (HOCHREIN et al., 2001; STOBBER; SCHIRMBECK; REINNMANN, 2001; BERTHIER et al., 2003).

Durante o processo de gestação ocorre o predomínio de estradiol que está associado com perfil de citocinas Th2, essencial para a tolerância materna ao feto e manutenção da gravidez (PELTIER, 2003).

O estradiol possui atividade biológica em vários órgãos e sistemas incluindo o imune, reprodutivo, cardiovascular e sistema nervoso central (XIAO; LIU; LINK, 2004). estradiol estimula a secreção de prolactina, esta por sua vez é um hormônio polipeptídico secretado pela hipófise, que aumenta durante a gravidez e no período da lactação (ØSTENSEN, 1999), apresentando efeito sobre as células B e células T (LEANOS-MIRANDA et al., 2001), e envolvida na proliferação e diferenciação celular, tendo múltiplos efeitos sobre o sistema imune (PEREIRA et al., 2005). O estradiol super regula a expressão de IDO mRNA pelas células dendríticas comandando a supressão das funções das células T via IDO (PHAN; YANG; SHERRY, 2003).

Considerando que a IDO apresenta níveis elevados em mulheres grávidas (STREHLOW; SEEGERT; FRICK, 1993) e que células dendríticas IDO⁺ possui um importante papel na inibição das funções das células T (MUNN et al., 1999; ITO et al., 2002), foi estudada a atuação do estradiol na indução da regulação ascendente da IDO por células dendríticas. Em ratos a utilização de estradiol não afetou a expressão de MHC-classe II, CD 80 e CD86 pelas células dendríticas, mas inibiu a habilidade destas células em estimular a proliferação de células T e produção de citocinas (Th1 e Th2). Isso foi acompanhado pelo aumento da apoptose de células T. A regulação ascendente da IDO promovida pelo estradiol pode limitar a resposta das células T. Os efeitos da exposição das células dendríticas ao estradiol na proliferação e apoptose foram parcialmente abolidos com a adição de um inibidor da IDO, o 1-metil-DL-triptofano (1-MT), indicando que a exposição das células dendríticas ao

estrógeno induz a supressão de células T dependentes da IDO (TERNESS et al., 2002; XIAO; LIU; LINK, 2004; LIANG et al., 2006).

3.5 CICLO CELULAR

Em biologia, chama-se ciclo celular uma sequência organizada de eventos que se passam numa célula viva entre duas divisões celulares. O ciclo celular consiste na interfase e na fase mitótica, que inclui a mitose e a divisão celular (citocinese), tendo como finalidade duplicar, de forma exata, a quantidade de DNA nos cromossomos e segregar as duas células filhas geneticamente idênticas (NELSON; COX, 2008; GIORDANO; GALDERISI, 2010).

O início dos principais processos que ocorrem no ciclo celular é desencadeado por mudanças bioquímicas e pela atividade de proteínas reguladoras, responsáveis pelo controle do ciclo (ALBERTS et al., 2010).

3.5.1 Fases do Ciclo Celular

A fase revisada abaixo será a interfase devido à proposta da pesquisa.

Segundo Alberts et al. (2010), a vida de uma célula começa no momento em que a divisão celular que a originou acaba e o momento em que ela se divide ou morre. A interfase corresponde ao período entre o final de uma divisão celular e o início da segunda. Trata-se de um período de intensa atividade na célula, sendo neste momento que ocorre a duplicação do material genético. Geralmente a célula encontra-se nesta fase durante a maior parte da sua vida. A interfase divide-se em três fases:

- Fase G1: fase de síntese de proteínas, enzimas e RNA.
- Fase S: fase de auto-replicação das moléculas de DNA, a partir deste momento os cromossomos passam a possuir duas cromátides ligadas por um centrômero.
- Fase G2: período de síntese de moléculas necessárias à divisão celular.

3.5.2 Regulação do Ciclo Celular

O controle e a regulação do ciclo celular são realizados através de sistemas que ativam processos bioquímicos, dando início aos eventos no ciclo celular (ALBERTS et al., 2010).

O ciclo celular pode parar em determinados pontos e só avançar se determinadas condições forem verificadas, tais como a presença de uma quantidade adequada de nutrientes ou no estágio em que a célula atinge determinado tamanho. Existem três momentos em que os mecanismos de regulação atuam: na fase G1 não há início de um novo ciclo ou que não há condições de fazê-lo, essas células permanecem num estágio denominado G0 (período de quiescência); na fase G2, antes de iniciar-se a mitose, caso a replicação do DNA não tenha ocorrido corretamente o ciclo pode ser interrompido e a célula volta a iniciar a fase S; ao final da metáfase, onde mais um mecanismo de regulação responsável pela verificação da ligação do fuso acromático com os cromossomos fica evidenciado, de forma que uma das cromátides sempre migra para os polos (NELSON; COX, 2008; GIORDANO; GALDERISI, 2010).

Uma divisão celular normal é positivamente regulada ou estimulada através de vias sinalizadoras. Estas vias respondem a fatores extracelulares, os quais agem através de uma sequência de proteínas, como por exemplo, as proteínas quinases dependentes de ciclinas (CdKs), que atuam principalmente nas transições das fases G1-S como na fase G2-M (PAULOVICH; TOCZYSKI, 1997; VAN DER HEUVEL, 2005). Durante as fases do ciclo, ocorrem processos de síntese e degradação das ciclinas, determinando o momento apropriado de sua ligação com CdKs. Este grupo de enzimas, por sua vez, fosforila uma série de substratos chave que permitirão a progressão interfásica do ciclo celular (PAULOVICH; TOCZYSKI, 1997).

Por outro lado, há um grupo de inibidores do ciclo que atua regulando negativamente ou impedindo as vias sinalizadoras da progressão no ciclo de divisão celular. Bem como os fatores estimuladores que levam à produção de ciclinas/CDKs, os reguladores negativos ativarão inibidores dos CDKs, denominados CDKIs, os quais são separados em duas famílias, de acordo com seu mecanismo de ação, homologia e CDK alvo, constituindo a família do p21, p27 e p57 e a família do p16, p15, p18 e p19 (HARTWELL; KASTAN, 1994; MASSAGUÉ, 2004; VAN DER HEUVEL, 2005; OKAYAMA, 2012).

Os genes que atuam de forma positiva, induzindo ou estimulando a progressão do ciclo, são chamados proto oncogenes, pois ao sofrerem mutações se tornarão oncogenes (genes estimuladores de divisão celular). Ao contrário, as proteínas envolvidas no controle

negativo do ciclo celular são codificadas pelos assim chamados genes supressores tumorais. Anormalidades tanto nos oncogenes, como nos genes supressores tumorais podem conferir a célula vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre células normais, consequências estas de mutações que desregulam o ciclo celular, favorecendo a perda dos mecanismos controladores do ciclo celular normal. Devido a esta mutação, os receptores ou fatores de crescimento são expressos inadequadamente, contribuindo para o desenvolvimento de tumores (WARD, 2000).

Outro fator intimamente ligado ao sistema de controle do ciclo celular é a ativação do gene supressor de tumor TP53 (ou p53), que desempenha um importante papel na prevenção do aparecimento do câncer. A proteína p53 bloqueia a divisão celular em células que sofreram injúrias no seu DNA, dando tempo para a sua reparação. Se o mecanismo de reparo de DNA falhar, há um disparo na cascata de apoptose pela expressão do gene p53 (BARBARESCHI et al., 1992; NAGAI, 1995). Mutações em regiões diferentes da proteína p53 podem resultar em diferentes efeitos biológicos, como a anormalidade molecular encontrada em tumores, indicativa de maior agressividade e pior prognóstico (ELLEDEGE; ALLRED, 1994; OZBUN; BUTEL, 1995).

Não se têm informações na literatura da existência ou não de influencia da expressão de IDO sobre o ciclo celular de células placentárias e embrionárias de ratas e camundongos fêmeas em cultivo frente á adição de hormônios e citocinas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material empregado neste estudo é descrito a seguir.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Análise das fases do ciclo celular das culturas primárias de células placentárias após a adição dos fatores estudados, por citometria de fluxo

Os tecidos uterinos, as placentas e os embriões de 6,5 dias (SUZUKI et al., 2001) utilizados, foram de ratas adultas Wistar e camundongos fêmeas adultas Balb-c, obtidas no biotério do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), da Universidade de São Paulo - USP. Os animais foram eutanasiados, por overdose de anestésico (Cloridrato de Cetamina 10% + Cloridrato de Xilazina 2%), intra-peritônio. O controle foi realizado com amostras de tecidos uterino de ratas adultas Wistar e camundongos fêmeas adultas Balb-c, obtidas no biotério do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), da Universidade de São Paulo - USP. Foram utilizados 3 (três) pools e cada um contendo 5 (cinco) animais de cada espécie estudada, pois com um útero gravídico (embriões + placenta) de 6,5 dias após cópula foi obtido uma média de células de $3,8 \times 10^6$ células/ml e o número alcançado quando feito o “pool” de cinco animais foi em média de $2,0 \times 10^7$ células/ml, suficientes para ser colocado 1×10^6 células por poço da placa de 24 *wells*, sendo seis testes e controles feitos em duplicata, totalizando 72 poços.

O projeto foi desenvolvido com aprovação da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), sob o protocolo nº 2648/2012.

4.2 MÉTODOS

Os métodos empregados neste estudo são descritos a seguir.

4.2.1 Cultivo celular

A metodologia descrita neste item foi extraída da pesquisa de Salvadori (2011).

Os tecidos uterinos, as placentas e os embriões de 6,5 dias foram retirados dos animais após eutanásia. O material coletado foi colocado sobre uma placa de Petri para a retirada do excesso de tecido adiposo com o uso de pinça e tesoura estéreis. Os tecidos uterinos, as placentas e os embriões de 6,5 dias foram seccionados e submetidos à técnica de separação mecânica, na qual os fragmentos foram colocados sobre uma malha de aço com 150 mesh de diâmetro e com o auxílio de uma seringa de 1ml e meio de cultura (D-MEM) com 10% de soro fetal bovino e antibiótico, os fragmentos foram pressionados contra a malha para a separação celular.

As células separadas foram colocadas em tubos de 50 ml e submetidas à centrifugação (1200 rpm, por 5 minutos à 20°C). Após a centrifugação o meio foi removido e as células foram suspensas em 30 ml de meio de cultura. O passo seguinte foi a contagem das células em câmara de Neubauer com o uso do corante Azul de Tripán, onde uma alíquota das células foi coletada e misturada com o corante e as células viáveis foram contadas. Uma concentração de 1×10^6 células foi colocada em placas de cultura contendo 24 *wells* com área de 1,76 cm² e estas células foram mantidas por 2 (dois) dias para a realização das análises nos dias propostos (D0- 4h, D1-24h e D2-48h). As placas foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ com 2 ml de D-MEM. Os fatores foram colocados 24 horas após o início do cultivo.

As concentrações dos hormônios e das citocinas foram previamente testadas, e foi observada uma maior expressão de IDO quando adicionado uma menor concentração dos fatores (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação das quantidades de hormônios e citocinas e a expressão de IDO

	Expressão de IDO [↓]	Expressão de IDO [↑]
Controle (D-MEM)	1,0 µl/ 0,19 %	10µl / 0,15%
Estrógeno ¹	1,0 µl/ 0,55%	10µl / 0,02%
Progesterona ²	0,08µl/ 10,2%	0,8µl/ 0,51%
Interferon γ ³	1,0 µl/ 9,03%	10µl / 1,23%
Triptofano ⁴	1,0 µl/ 15,16%	10µl / 3,47%
1 - Metil – DL – Triptofano + Triptofano ⁵	1,0 µl/ 3,28%	10µl / 2,14%

SALVADORI (2011)

- ¹. E.C.P.® - Cipionato de Estradiol (2mg/ml)
- ². Promone-E®- Acetato de medroxiprogesterona (50mg/ml)
- ³. Interferon γ (1mg/ml)
- ⁴. L-triptofano (10mg/ml)
- ⁵. 1- metil – D – triptofano (1 mg/ml) + triptofano (10mg/ml)

As condições experimentais foram:

- Meio de cultura (D-MEM);
- Meio de cultura com Progesterona (Imunossupressor durante a gestação) (0,08µl Acetato de medroxiprogesterona Promone-E® 50mg/ml);
- Meio de cultura com Estradiol (1µl E.C.P.® Cipionato de Estradiol 2mg/ml)(XIAO; LIU; LINK, 2004);
- Meio de cultura com L-triptofano (10mg/ml) (substrato para proliferação de linfócitos T) (1µl) (MUNN; SHARMA; MELLOR, 2004);
- Meio de cultura com inibidor da IDO (1- metil – D - triptofano 1 mg/ml) (1µl) (BOASO et al., 2005) mais triptofano (10mg/ml) (substrato para proliferação de linfócitos T) (1µl) (MUNN; SHARMA; MELLOR, 2004);
- Meio de cultura com Interferon γ (1mg/ml) (1µl) (GROHMANN; FALLARINO; PUCETTI, 2003; HEIKKINEM et al., 2003).

4.2.2 Análise das fases do ciclo celular das culturas primárias de células placentárias após a adição dos fatores estudados, por citometria de fluxo

Foram separadas $2,5 \times 10^5$ células/ml de cada tratamento, ressuspendidas em etanol 70% na presença de 1µg de RNase e mantidas em freezer a -20°C para posterior análise das fases do ciclo celular. No momento do processamento das amostras, estas foram retiradas do freezer e mantidas em gelo. Adicionou-se 500 µl de tampão *Facs*, às suspensões celulares e estas foram centrifugadas ($1975 \times g$ por 10 minutos a 4°C) e ressuspendidas em 100µl de tampão *Facs* e 10 µl de Triton X-100. Em seguida adicionou-se 100 µl de solução de *PI* (iodeto de propídio, 20mg/ml, Sigma®) e as amostras foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após a incubação, as amostras foram submetidas à adição de 500 µl de tampão *Facs*, centrifugadas ($1975 \times g$ por 10 minutos a 4°C) e novamente ressuspendidas em 300 µl do mesmo tampão, permanecendo em ambiente escuro. Transferidas para tubos de citometria, as amostras foram analisadas pelo citômetro de fluxo (FACSCalibur- Becton e Dickson, USA), possibilitando a visualização das fases do ciclo celular pré e pós-mitóticas (hipodiplóide, G0-G1, fase S e G2-M) que foram analisadas em software WinMDI versão 2.8.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos do presente estudo são apresentados a seguir, distintos por espécie animal.

5.1 RATAS

As células obtidas dos tecidos uterinos, das placentas e dos embriões de 6,5 dias de ratas adultas Wistar foram analisadas quanto ao seu comportamento no ciclo celular nos tempos de 4, 24 e 48 horas (D0, D1 e D2 respectivamente), mediante a adição de hormônios e citocinas e sua relação com a expressão da indoleamina 2,3- dioxigenase por citometria de fluxo.

No pool das ratas prenhes, a média da viabilidade celular encontrada foi de aproximadamente 70% e das ratas não prenhes de aproximadamente 68%. Os valores médios obtidos por citometria de fluxo, referente ao comportamento das células na dinâmica do ciclo celular em ratas não prenhes e não prenhes (Tabelas 2 e 4 , respectivamente).

Comparando o comportamento das células de ratas não prenhes e células de ratas prenhes submetidas ao tratamento de estradiol, notamos que nos dois primeiros períodos houve um aumento da quantidade de células em fase G0/G1 e em 48 horas em fase de síntese, assim como as células uterinas de ratas não prenhes no tempo de 24 horas.

Ao adicionar progesterona, observamos uma predominância de células de ratas prenhes em G0/G1 nos tempos de 4, 24 e 48 horas, entretanto, as células uterinas de ratas não prenhes se comportam de maneira que prosseguem para fase S no período de 24 horas, permanecendo em G0/G1 nos períodos de 4 e 48 horas.

Com a adição de interferon γ , houve uma predominância celular em fase S nos períodos de 4, 24 e 48 horas das células uterinas de ratas não prenhes. Já em ratas prenhes houve um aumento da quantidade de células em fase de síntese nos tempos de 4 e 48 horas e em fase mitótica no período de 24 horas.

Os grupos nos quais às células foi adicionado triptofano, podemos observar que o comportamento das células uterinas de ratas não prenhes nos períodos de 4, 24 e 48 horas se mostra aumentado em fase G0/G1 e que, em células uterinas, placentárias e embrionárias de

ratas prenhes, se mostrou aumentado somente nos períodos de 4 e 24 horas, tendo no período de 48 horas um aumento na quantidade celular em fase G2/M.

A dinâmica do ciclo das células uterinas de ratas não prenhes do grupo que recebeu 1-metil – DL - triptofano + triptofano, apresentou um aumento da quantidade celular em G0/G1 nos períodos de 4, 24 e 48 horas, fenômeno também notado em células uterinas, placentárias e embrionárias de ratas prenhes.

Observamos o comportamento das células de ratas não prenhes e prenhes nos períodos de 4, 24 e 48h após a adição de fatores através dos exemplos das aquisições em histograma, que nos mostram o ciclo celular (Gráficos 1 e 2, respectivamente).

Podemos correlacionar os dados presentes com a expressão da indoleamina 2,3 dioxigenase das células uterinas de ratas não prenhes e uterinas, placentárias e embrionárias de ratas prenhes através das tabelas 3 e 5, respectivamente, fornecidas por Salvadori (2011), que evidenciou a expressão da enzima nessa espécie.

Tabela 2 – Valores médios (%) obtidos da quantidade de células uterinas de ratas não prenhes em cada fase do ciclo celular, após a adição de hormônios e citocinas

		Média (%)		
		4h	24h	48h
Controle (D-MEM)	Sub G1	6,10	31,18	37,31
	G0/G1	44,62	37,20	39,01
	S	34,21	23,11	14,48
	G2/M	9,96	7,01	5,94
Estradiol	Sub G1	26,26	31,42	26,03
	G0/G1	33,10*	27,81*	28,03
	S	10,12	27,60*	39,14
	G2/M	6,58	10,16	3,84
Progesterona	Sub G1	38,24	26,42	29,08
	G0/G1	38,40*	27,82	37,05*
	S	17,30	30,30*	23,39
	G2/M	4,32	14,75	8,65
Interferon γ	Sub G1	18,15	17,76	17,85
	G0/G1	33,96	27,13	29,97
	S	34,01*	36,12*	34,60*
	G2/M	12,70	8,80	9,29
Triptofano	Sub G1	30,49	19,56	19,60
	G0/G1	39,35*	45,07*	44,86*
	S	23,41	18,04	23,20
	G2/M	5,50	7,50	6,44
1 - Metil – DL – Triptofano + Triptofano	Sub G1	24,57	23,10	30,28
	G0/G1	34,13*	33,85*	49,52*
	S	32,10	23,89	14,87
	G2/M	9,22	7,09	4,04

* $p < 0,001$

Gráfico 1 – Exemplos de aquisições em histograma do comportamento das células uterinas de ratas Wistar não prenhes no ciclo celular, nos períodos de 4 (D0), 24 (D1) e 48 (D2) horas, sob adição dos fatores mencionados abaixo

CONTROLE (D-MEM)

ESTRÓGENO

PROGESTERONA

INTERFERON γ

4 horas

24 horas

48 horas

TRIPTOFANO

4 horas

24 horas

48 horas

1 - METIL - DL - TRIPTOFANO + TRIPTOFANO

4 horas

24 horas

48 horas

Tabela 3 – Valores (%) obtidos pela Citometria de Fluxo analisando a quantidade de células do pool de ratas não prenhes que expressam IDO

	Pool 1			Pool 2			Pool 3		
	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h
Controle (D-MEM)	0,21	0,00	0,05	0,02	0,01	0,08	1,22	0,01	0,05
Estrógeno	0,54	0,06	0,71	0,57	1,09	0,86	0,48	0,08	0,73
Progesterona	0,03	2,13	0,33	0,08	2,58	0,37	0,07	2,58	0,37
Interferon γ	0,38	1,73	0,31	0,51	2,05	0,39	0,41	1,78	0,34
Triptofano	1,20	5,13	1,20	0,78	3,79	0,61	0,83	4,43	0,64
1 - Metil – DL - Triptofano + Triptofano	1,99	3,80	1,70	1,63	2,45	0,49	1,99	2,57	0,53

SALVADORI, 2011

Tabela 4 – Valores médios (%) obtidos da quantidade de células uterinas de ratas prenhes em cada fase do ciclo celular, após a adição de hormônios e citocinas

		Média (%)		
		4h	24h	48h
Controle (D-MEM)	Sub G1	12,26	28,87	48,16
	G0/G1	17,95	48,65	24,60
	S	33,09	17,96	22,81
	G2/M	36,97	4,87	4,78
Estradiol	Sub G1	29,97	21,03	22,39
	G0/G1	37,68*	33,54*	25,71
	S	23,73	32,22	38,13*
	G2/M	9,01	13,65	14,34
Progesterona	Sub G1	25,51	37,78	35,44
	G0/G1	37,10*	42,55*	54,16*
	S	19,87	13,21	6,01
	G2/M	7,76	6,65	4,71
Interferon γ	Sub G1	25,5	35,69	34,41
	G0/G1	43,53	45,73	17,00
	S	28,00*	14,34	18,03*
	G2/M	3,42	4,54	31,20*
Triptofano	Sub G1	22,56	26,03	34,3
	G0/G1	50,80*	43,97*	18,6
	S	24,05	13,00	20,2
	G2/M	3,00	8,18	27,60*
1 - Metil – DL – Triptofano + Triptofano	Sub G1	24,69	45,10	35,35
	G0/G1	51,52*	36,42*	40,29*
	S	21,29	15,02	19,82
	G2/M	2,93	3,79	4,97

* $p < 0,001$

Gráfico 2 – Exemplos de aquisições em histograma do comportamento das células uterinas, placentárias e embrionárias de ratas Wistar prenhes no ciclo celular, nos períodos de 4 (D0), 24 (D1) e 48 (D2) horas, sob adição dos fatores mencionados abaixo

CONTROLE (D-MEM)

ESTRÓGENO

PROGESTERONA

INTERFERON γ

TRIPTOFANO

1 - METIL – DL – TRIPTOFANO + TRIPTOFANO

Tabela 5 – Valores (%) obtidos pela Citometria de Fluxo analisando a quantidade de células do pool de ratas prenhes que expressam IDO

	Pool 1			Pool 2			Pool 3		
	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h
Controle (D-MEM)	0,21	0,00	0,05	0,02	0,01	0,08	1,22	0,01	0,06
Estrógeno	0,54	0,06	0,71	0,57	1,09	0,86	0,48	0,08	0,77
Progesterona	0,03	2,13	0,33	0,08	2,58	0,37	0,07	2,58	0,34
Interferon γ	0,38	1,73	0,31	0,51	2,05	0,39	0,41	1,78	0,34
Triptofano	1,20	5,13	1,20	0,78	3,79	0,61	0,83	4,43	0,27
1 - Metil – DL -Triptofano + Triptofano	1,99	3,80	1,70	1,63	2,45	0,49	1,99	2,57	0,00

SALVADORI,2011

5.2 CAMUNDONGOS FÊMEAS

As células obtidas dos tecidos uterinos, das placentas e dos embriões de 6,5 dias de camundongos fêmeas adultas Balb-c foram analisadas quanto ao seu comportamento no ciclo celular nos tempos de 4, 24 e 48 horas (D0, D1 e D2 respectivamente), mediante a adição de hormônios e citocinas e sua relação com a expressão da indoleamina 2,3- dioxigenase por citometria de fluxo.

No pool de camundongos fêmeas prenhes, a média da viabilidade celular encontrada foi de aproximadamente 64% e de camundongos fêmeas não prenhes de aproximadamente 53%. Os valores médios obtidos por citometria de fluxo, referente ao comportamento das células na dinâmica do ciclo celular em camundongos fêmeas não prenhes e camundongos fêmeas prenhes, estão descritos a seguir (Tabelas 6 e 8, respectivamente).

Ao analisar a dinâmica do ciclo celular nas células uterinas e células uterinas, placentárias e embrionárias desta espécie, podemos observar que houve um aumento da fragmentação de DNA (fase subG1) em ambas que foram tratadas com estradiol, nos períodos de 4 e 48 horas. Em 24 horas, houve uma predominância das células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes em fase G0/G1 e nos três períodos de células de camundongos fêmeas prenhes.

Ao receberem progesterona, as células dos grupos prenhes em estudo sofreram fragmentação de DNA em todos os períodos, de acordo com o que ocorreu no período de 24 horas das células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes, que permaneceram na fase S nos períodos de 4 e 48 horas.

De acordo com os resultados apresentados, as células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes que receberam tratamento de interferon γ predominaram em fase G0/G1 nos períodos de 24 e 48 horas, diferentemente do comportamento das células uterinas, placentárias e embrionárias, que permaneceram em fase subG1 nos mesmos períodos. Houve um aumento da quantidade celular em fases de síntese e mitótica, no período de 4 horas tanto em animais prenhes como em não prenhes.

As células suplementadas com triptofano se mostraram em maior número na fase G0/G1, em ambos os grupos, nos períodos de 4, 24 e 48 horas. Observou-se também um aumento de células de camundongo fêmea não prenhe na fase S, no período de 48 horas.

Ao receberem tratamento com inibidor de IDO, 1-metil-DL-triptofano, as células apresentaram um aumento sutil de sua quantidade em fase G0/G1 nos períodos de 4 e 24

horas. As células uterinas de animais não prenhes permaneceram em fase de síntese, nos tempos de 4 e 48 horas e nas células uterinas, placentárias e embrionárias de animais prenhes sofreram fragmentação de DNA em 48 horas.

É possível observar a ciclagem celular das células uterinas, placentárias e embrionárias de camundongos fêmeas nos períodos de 4, 24 e 48h após a adição de fatores através dos exemplos das aquisições em histograma mostrados no conjunto de gráficos 3 e 4.

Podemos correlacionar os dados presentes com a expressão da indoleamina 2,3 dioxigenase das células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes e uterinas, placentárias e embrionárias da mesma espécie estando prenhe através das tabelas 7 e 9, respectivamente, fornecidas por Salvadori (2011), que também pôde estar comprovando a expressão da enzima nesses animais.

Tabela 6 – Valores médios (%) obtidos da quantidade de células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes, em cada fase do ciclo celular após a adição de hormônios e citocinas

		Média (%)		
		4h	24h	48h
Controle (D-MEM)	SubG1	18,54	21,43	25,41
	G0/G1	45,79	40,71	35,14
	S	29,43	26,16	23,65
	G2/M	6,72	6,40	6,73
Estradiol	SubG1	32,69*	32,17	35,06*
	G0/G1	28,15	44,20*	29,54
	S	19,72	20,91	17,52
	G2/M	8,44	3,08	4,54
Progesterona	SubG1	30,57	33,01*	19,78
	G0/G1	26,89	30,92	18,03
	S	31,68*	29,43	40,89*
	G2/M	11,07	7,04	7,75
Interferon γ	SubG1	23,74	34,30	9,78
	G0/G1	28,64	40,42*	45,88*
	S	29,90*	21,64	17,71
	G2/M	7,63	4,07	6,74
Triptofano	SubG1	31,62	25,73	22,11
	G0/G1	42,06*	42,76*	27,59
	S	21,41	20,64	27,87*
	G2/M	5,19	5,21	12,35
1 - Metil – DL – Triptofano + Triptofano	SubG1	31,37	25,88	30,68
	G0/G1	31,11	43,61*	25,68
	S	31,33	18,88	33,87*
	G2/M	3,59	6,00	10,05

* $p < 0,001$

Gráfico 3 – Exemplos de aquisições em histograma do comportamento das células uterinas de camundongos fêmeas Balb-C não prenhes no ciclo celular, nos períodos de 4 (D0), 24 (D1) e 48 (D2) horas, sob adição dos fatores mencionados abaixo

CONTROLE (D-MEM)

ESTRÓGENO

PROGESTERONA

INTERFERON γ

TRIPTOFANO

1 - METIL – DL – TRIPTOFANO + TRIPTOFANO

Tabela 7 – Valores (%) obtidos pela Citometria de Fluxo analisando a quantidade de células do pool de camundongos fêmeas não prenhes que expressam IDO

	Pool 1			Pool 2			Pool 3		
	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h
Controle (D-MEM)	0,00	0,21	1,29	0,01	0,30	1,66	0,78	0,31	0,00
Estrógeno	1,00	2,68	1,50	0,03	4,42	1,70	0,06	4,84	0,97
Progesterona	1,11	1,25	1,99	1,15	2,35	2,41	1,18	2,63	1,08
Interferon γ	0,94	0,16	1,95	1,06	0,35	2,02	1,11	0,48	0,89
Triptofano	3,09	0,27	0,95	3,31	0,58	1,73	3,57	1,42	2,83
1- Metil – DL -Triptofano + Triptofano	0,59	0,33	1,11	0,93	0,42	1,59	1,22	1,26	0,30

SALVADORI, 2011

Tabela 8 – Valores médios (%) obtidos da quantidade de células uterinas de camundongos fêmeas prenhes, em cada fase do ciclo celular, após a adição de hormônios e citocinas

		Média (%)		
		4h	24h	48h
Controle (D-MEM)	SubG1	26,65	35,68	32,73
	G0/G1	48,62	31,94	32,78
	S	16,61	18,21	21,06
	G2/M	8,45	14,90	7,22
Estradiol	SubG1	38,22	14,40	27,96
	G0/G1	45,49*	35,74*	31,32*
	S	14,16	26,88	11,37
	G2/M	2,46	3,14	14,49
Progesterona	SubG1	29,84*	36,81*	40,37*
	G0/G1	28,24	36,27	32,41
	S	27,38	17,60	26,72
	G2/M	14,87	9,64	1,03
Interferon γ	SubG1	16,84	37,18*	39,61*
	G0/G1	50,66*	33,48	34,23
	S	20,39	22,92	21,39
	G2/M	2,89	6,84	5,15
Triptofano	SubG1	20,99	36,83	40,51
	G0/G1	35,09*	40,00*	49,49*
	S	18,62	16,74	9,76
	G2/M	15,18	6,74	0,51
1 - Metil – DL – Triptofano + Triptofano	SubG1	29,33	30,88	44,97*
	G0/G1	39,45*	32,27*	43,55
	S	25,52	24,16	11,48
	G2/M	6,12	5,85	0,31

* $p < 0,001$

Gráfico 4 – Exemplos de aquisições em histograma do comportamento das células uterinas, placentárias e embrionárias de camundongos fêmeas Balb-C prenhes no ciclo celular, nos períodos de 4 (D0), 24 (D1) e 48 (D2) horas, sob adição dos fatores mencionados abaixo

CONTROLE (D-MEM)

ESTRÓGENO

PROGESTERONA

INTERFERON γ

TRIPTOFANO

1 - METIL – DL – TRIPTOFANO + TRIPTOFANO

Tabela 9 – Valores (%) obtidos pela Citometria de Fluxo analisando a quantidade de células do pool de camundongos fêmeas prenhes que expressam IDO

	Pool 1			Pool 2			Pool 3		
	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h
Controle (D-MEM)	0,00	0,00	2,57	0,00	0,04	2,83	0,00	0,00	2,57
Estrógeno	3,03	0,96	10,15	3,84	1,62	9,80	3,06	1,03	10,19
Progesterona	2,85	0,45	10,68	4,77	0,64	11,98	8,02	0,97	10,83
Interferon γ	2,85	0,65	21,66	3,85	0,77	21,90	2,88	1,93	21,70
Triptofano	5,19	0,74	10,64	5,69	0,99	10,80	5,84	9,74	10,77
1- Metil – DL - Triptofano + Triptofano	1,39	0,27	18,68	2,13	1,64	19,47	1,67	0,47	18,73

SALVADORI, 2011

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das médias dos valores dos grupos foram comparados entre a relação células *versus* ciclo celular frente à adição dos diversos fatores utilizados e analisados pelo teste estatístico denominado Modelo Linear Generalizado, sendo considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,001$, na primeira análise.

As análises referentes à correlação expressão de IDO *versus* ciclo celular foram também submetidas ao mesmo teste estatístico, do Modelo Linear Generalizado, sendo considerados estatisticamente significantes quando $p = 0,02$.

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados anteriormente serão discutidos a seguir.

O estudo realizado atingiu os objetivos propostos, demonstrando o comportamento de células uterinas, placentárias e embrionárias, submetidas às suplementações de hormônios e citocinas, no ciclo celular, bem como sua relação com a expressão de IDO por essas células sob efeito da adição dos fatores correspondentes.

Salvadori (2011), ao adicionar estrógeno às células em cultivo de camundongos fêmeas prenhes, observou uma maior expressão de IDO nos períodos de 4 e 48 horas, quando comparada aos outros grupos e dias.

No ciclo celular, quanto ao comportamento das células em cultivo de ratas não prenhes e prenhes sob adição de estrógeno, observou-se um aumento da quantidade de células em fase G1 nos tempos de 4 e 24 horas, posteriormente uma progressão à fase de síntese do tempo seguinte.

Ocorre um efeito sobre a expressão de um determinado gene, quando há um aumento dos níveis de receptores de estrógeno (ER). Esse gene trata-se de uma proteína atuante na regulação do ciclo celular e é denominado gene da ciclina, que por sua vez, ativa a proteína ciclina D1, promovendo o acúmulo e a síntese de alguns complexos de ciclina D1-Cdk4 com proteínas de retinoblastoma, as pRBs quinases, removendo o gene p21 a partir de ciclina E-cdk2. As pRBs quinases sofrem uma fosforilação, que antecede a entrada das células na fase de síntese do ciclo celular (PRALL et al., 1997; PLANNAS-SILVA; WEINBERG, 1997), de acordo com o resultado obtido no tempo de 48 horas.

As proteínas CDKs podem sofrer um bloqueio através da atividade das proteínas CDKs inibidoras (denominadas CKIs). Estas, por serem inibidoras, controlam negativamente as proteínas pRBs por bloqueio da atividade cinase dos complexos ciclina-CDKs, mantendo assim a célula em fase G1 (LORA, 2010), podendo explicar o comportamento das células de ambos os grupos de camundongos fêmeas.

Ao tentarmos correlacionar a expressão de IDO com o comportamento do ciclo celular neste caso, sugerimos que, possivelmente no estágio G1 há uma maior expressão de IDO pelas células uterinas, placentárias e embrionárias de camundongos fêmeas prenhes nos períodos de 4 e 48 horas.

Segundo Salvadori (2011), as células uterinas de ratas e camundongos fêmeas não prenhes apresentaram uma discreta expressão de IDO, sendo evidenciada após a suplementação de progesterona, sugerindo que algum outro tipo celular, independente das células relacionadas à tolerância imunológica, possa induzir essa expressão, como as células uterinas ou até mesmo células dendríticas, como atestam estudos referentes à presença de receptores de progesterona em algumas células do sistema imune (DRUCKMANN; DRUCKMANN, 2005).

A expressão da IDO se mostrou aumentada nos grupos de ratas e camundongos fêmeas prenhes, no tempo de 4 horas (SALVADORI, 2011). Isso pode ser explicado devido à progesterona inibir diretamente a estimulação da resposta imuno-endócrina através da sua interação com receptores de membrana responsáveis pelo aumento da resposta imunológica, promovendo a proliferação de linfócito T (PELTIER, 2003).

Analizando o ciclo celular, notamos um aumento da quantidade das células das ratas prenhes na fase G1 em todos os períodos avaliados, quando suplementadas com progesterona, ocorrendo essa permanência, pois o hormônio tem a capacidade de impedir a indução de síntese de DNA no epitélio uterino realizada pelo estrógeno, devido a progesterona ser hábil em inibir a progressão do ciclo celular à partir da fase G1, sendo assim um antagonista do estrógeno na proliferação celular (SUTHERLAND et al., 1998), corroborando com o que ocorreu com as células uterinas das ratas não prenhes nos períodos de 4 e 48 horas.

As proteínas CDKs contém alguns substratos, incluindo as pRBs, que comandam o controle da progressão do ciclo celular, bem como sua ação em fase G1. Essas proteínas exercem atividade em parte do ciclo e estão relacionadas ao estímulo do sinal mitogênico. Quando ocorre alteração na quantidade dessas ciclinas, pode haver uma mudança na dinâmica do ciclo celular, não permitindo a progressão para a fase de síntese (SHERR, 1994).

Concomitantemente com esses fenômenos bioquímicos que desencadeiam o controle do ciclo, há a presença do C- Myc, um oncogene que entra na regulação da ciclagem celular. Esse oncogene pode sofrer ação de sinais externos, internos e pode ativar complexos de ciclinas quinases (CDKs), possibilitando que essas proteínas fosforilem as pRBs, promovendo a liberação dos fatores de transcrição E2F, dando impulso a continuidade do ciclo celular (FARIA; RABENHORST, 2006). Ocorre, por sua vez, uma diminuição na atividade de ciclina D1-CDK4, ciclina D3-CDK4 e ciclina E-CDK2, com conseqüente diminuição na fosforilação de pRB, impedindo a replicação de DNA, a transcrição e a tradução de genes que codificam proteínas necessárias para a mitose (SUTHERLAND et al., 1998).

Em contrapartida do que ocorreu com o comportamento das células em cultivo de camundongos fêmeas dos grupos avaliados, as células uterinas, placentárias e embrionárias sofreram uma possível ação do controle negativo das CKIs, por inativação das proteínas CDks e consequente bloqueio da progressão do ciclo, levando as células à apoptose (SKILDUM; FAIVRE; LANGE, 2004), tendo em vista que houve um maior índice de fragmentação de DNA. No caso das células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes, foi observado um avanço até a fase S nos períodos de 4 e 48 horas, demonstrando uma progressão no ciclo celular, possivelmente através da ativação da ciclina D1, consequentemente das CDks e fosforilação de pRB (MCGOWAN et al., 2007).

Avaliando a expressão de IDO no ciclo celular das células do tecido uterino, placentário e embrionário das ratas suplementadas com progesterona, podemos sugerir que houve uma maior expressão de IDO na fase G1 no tempo de 4 horas.

Um forte estimulador da atividade bioquímica e funcional da IDO, segundo Kudo et al. (2004), é o interferon- γ . Os resultados de Salvadori (2011) demonstraram que essa citocina possibilitou um aumento da expressão da IDO nos grupos das ratas no período de 24 horas e no grupo de camundongos fêmeas prenhes no período de 48 horas.

De acordo com Xaus et al. (1999), o interferon- γ , dependendo das células, pode induzir morte celular, como ocorre com linfócitos do tipo T e B ou proteger a célula de apoptose, por exemplo, macrófagos ativos, havendo a expressão do gene p21 e a parada do ciclo no ponto de restrição G1-S, atuando assim na ciclagem celular, resultado este obtido nas células em cultivo camundongos fêmeas prenhes no tempo de 4 horas, não prenhes nos períodos de 24 e 48 horas e em células do grupo de ratas prenhes nos tempos de 4 e 24 horas.

O interferon- γ , atua juntamente na diminuição da fosforilação de pRb, tornando-a hipofosforilada, descaracterizando os mecanismos de Cdks, com consequente bloqueio da formação dos complexos Cdks – pRbs, reduzindo seus níveis, aumentando a expressão de Cdks inibidoras ou influenciando sua fosforilação (SANGFELT; ERICKSON; GRANDÉR, 2000).

Havendo esta influência na fosforilação de transdutores de sinais e ativadores de transcrição de RNAm (denominados STATs), devido ao estímulo provocado pelo interferon- γ nas células, são sintetizados homodímeros de STAT 1, que induzem a transcrição de alguns genes participantes da resposta antiviral e bloqueadores da síntese de proteínas através da clivagem do RNA, controlando a proliferação e diferenciação celular e apoptótica (SANGFELT; ERICKSON; GRANDÉR, 2000), o que corrobora com os resultados obtidos nos períodos de 24 e 48 horas do grupo de camundongos fêmeas prenhes.

No grupo de ratas e de camundongos fêmeas não prenhes nota-se uma progressão da ciclagem celular, promovendo uma permanência das células em fase S no período de 4 horas. Isso ocorre, pois as células possivelmente driblaram o sistema de apoptose, não havendo expressão do gene p21 (XAUS et al., 1999).

No último período, observamos que as células uterinas, placentárias e embrionárias de ratas prenhes se encontram em fase G2/M, indicando assim que houve uma progressão na ciclagem celular, por provável escassez do substrato interferon- γ .

No ciclo celular das células do tecido uterino, placentário e embrionário das suplementadas com interferon- γ , entendemos que a expressão de IDO mais significativa esteve presente na fase G1 no grupo de ratas e camundongos fêmeas respectivamente, nos tempos de 24 e 48 horas.

Foi realizada uma suplementação de triptofano às células em cultivo, e isso demonstrou um aumento da expressão de IDO pelas mesmas nos grupos de ratas não prenhes e prenhes e de camundongos fêmeas prenhes (SALVADORI, 2011).

O triptofano é um aminoácido que se destaca dos demais por suas peculiaridades, dentre elas, pertencer ao grupo dos aminoácidos essenciais para as células T e ser o principal substrato da IDO, sendo degradado em quinurenina. Quando ocorre uma gestação, os níveis de triptofano diminuem devido à imunossupressão, promovendo uma parada das células do sistema imunológico no ciclo celular em fase G1 (MELLOR; MUNN, 2001; CHAMULEAU et al., 2008), sendo este fenômeno observado em todos os grupos submetidos à análise e possivelmente sendo a fase de maior expressão de IDO.

A depleção de triptofano afeta especificamente linfócitos e, como nestas células, a enzima triptofanil-tRNA sintetase (envolvida na via de tradução, podendo ou não interferir no gene do RNAm) (SANCHEZ, 2007), não é induzida por interferon- γ , exceto nas células monocíticas, fibroblásticas ou epiteliais. Isso explica a parada do ciclo em fase G1, conferindo uma desvantagem aos linfócitos quando comparados a outras células, na competição por triptofano (FLECKNER et al., 1995; BOASSO et al., 2005).

A adição do 1-metil-DL-triptofano + triptofano, inibidor competitivo da IDO, promoveu uma diminuição da expressão da enzima pelas células em cultivo do grupo das ratas prenhes, entretanto, há uma expressão significativa pelas células uterinas, placentárias e embrionárias de camundongos fêmeas prenhes no tempo de 48 horas, possivelmente pela escassez de substrato (SALVADORI, 2011).

As células de todos os grupos, tanto de ratas como de camundongos fêmeas prenhes, tiveram um comportamento parecido, permanecendo em fase G1 em praticamente todos os

períodos analisados, exceto pela progressão à fase S das células uterinas de camundongos fêmeas nos períodos de 4 e 48 horas. Segundo pesquisas, o 1-metil-DL- triptofano tem uma ação antitumorigênica e de supressão da proliferação de células T, tendo a capacidade de alterar a polarização de células dendríticas por modulação de proteínas, como a p38, inibindo sua fosforilação e consequentemente prevenindo a síntese de RNAm (OPTIZ et al., 2011), mantendo as células na fase em questão, sem que ela progrida à fase de condensação de cromossomos.

Relacionando a expressão de IDO com o comportamento das células no ciclo celular, podemos sugerir que há uma maior expressão da enzima à partir das células em cultivo de camundongos fêmeas prenhes em fase G1 no período de 48 horas.

Em suma, a suplementação dos diversos fatores aos cultivos celulares permitiu observar alterações na dinâmica do ciclo celular, representada principalmente por um aumento de células em fase G1 nos grupos de células placentárias e embrionárias que receberam progesterona, estradiol, interferon γ e triptofano e apresentaram um significativo aumento da expressão de IDO, e que permite inferir que a síntese de RNAm esteja provavelmente correlacionada à produção da IDO.

7 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu concluir que:

- Foi possível evidenciar que houve uma alteração na dinâmica do ciclo celular das células placentárias e embrionárias de ratas e camundongos fêmeas, após a suplementação com os fatores propostos (estradiol, progesterona, interferon γ , triptofano e 1- metil – DL - triptofano + triptofano).
- Podemos observar que há uma correlação entre a enzima indoleamina 2,3 dioxigenase e o ciclo celular, possivelmente expressada por células placentárias e embrionárias encontradas em fase G1, em ambas as espécies animais, permitindo-nos sugerir que a síntese de RNAm esteja ligada à produção de IDO.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**, 4th ed., Garland Science, 2002.

ARCK, P.; HANSEN, P. J.; JERICEVIC, M. B.; PICCINNI, M. P.; SZEKERES-BARTHO, J. Progesterone during pregnancy : endocrine – immune cross talk in mammalian species and the role of stress. **American Journal of Reproductive Immunology**, p. 268-79, 2007.

ASTIGIANO, S.; MORANDI, B.; COSTA, R. Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer. **Neoplasia**, v.7, p. 390, 2005.

BARBARESCHI, M.; GIRLANDO, S.; MAURI, F. A.; ARRIGONI, G.; LAURINO, L.; PALMA, P. D.; DOGLIONI, C. Tumour suppressor gene products, proliferation, and differentiation markers in lung neuroendocrine neoplasms. **The Journal of Pathology**, v. 166, p. 343–350, 1992.

BARTHO, J. S.; WEGMANNT, G. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 31, p. 81-95, 1996.

BAXTER, A. G.; SMYTH, M. J. The role of NK cells in autoimmune disease. **Autoimmunity**, v. 35, p. 1-14, 2002.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H.; TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science**, v. 43, p. 824-840, 2006.

BERTHIER, R.; RIZZITELLI, A.; MARTINON-EGO, C.; LAHARIE, A. M.; COLLIN, V.; CHESNE, S.; MARCHE, P. N. Fibroblasts inhibit the production of interleukin-12 P70 by murine dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 108, p. 391–400, 2003.

BEUTELSPACHER, S. C.; TAN, P. H.; MCCLURE, M. O.; LARKIN, D. F.; LECHLER, R. I.; GEORGE, A. J. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by endothelial cells: implications for the control of alloresponses. **American Journal of Transplantation**, v. 6, p. 1320, 2006.

BOASSO, A.; HERBEUVAL, J. P.; HARDY, A.W.; WINKLER, C.; SHEARER, G. M. Regulation of indoleamina 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. **Blood**, v. 105, p. 1574-1581, 2005.

BOUMA, G. S.; VAN CAUBER, G. H. P.; VAN BREE, S. P.; CASTELLI-VISSER, R. M.; WITVLIET, M. D.; VAN DER MEER-PRINS, E. M.; VAN ROOD, J. J.; CLAAS, F. H. Pregnancy can induce priming of cytotoxic T lymphocytes specific for paternal HLA antigens that is associated with antibody formation. **Transplantation**, v. 62, p. 672-678, 1996.

BROSENS, J. J.; GELLERSEN, B. Death or survival – progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 36, p. 389-398, 2006.

BRUCE-KELLER, A. J.; KEELING, J. L.; KELLER, J. N.; HUANG, F. F.; CAMONDOLA, S.; MATTSON, M. P. Antinflammatory effects of estrogen on microglia activation. **Endocrinology**, v. 141 (10), 3646–3656, 2000.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E.; WATSON, A. L. Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 181, p. 718–724, 1999.

CHAMULEAU, M. E. D.; VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; HESS, C. J.; JANSSEN, J. J. W. M.; ZEVENBERGEN, A.; DELWEL, R.; VALK, P. J. M.; LÖWENBERG, B.; OSSENKOPPELE, G. J. High *INDO* (indoleamine 2,3-dioxygenase) mRNA level in blasts of acute myeloid leukemic patients predicts poor clinical outcome. **Haematologica**, v. 93, p. 1894- 1898, 2008.

CHANG, T. T.; KUCHROO, V. K.; SHARPE, A. H. Role of the B7-CD28/CTLA-4 pathway in autoimmune disease. **Current Direct Autoimmunity**, v. 5, p. 113-130, 2002.

CHISTIAKOV, D. A.; TURAKULOV, R. I. CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 31, p. 21-36, 2003.

CROY, B. A.; WOOD, W.; KING, G. J. Evaluation of Intrauterine Immune Suppression During Pregnancy in a Species with Epitheliochorial Placentation. **The Journal of Immunology**, v. 139, n. 4, p. 1088-1095, 1987.

DAVIES, J.; GLASSER, S. R. Histological and fine structural observations on the placenta of the rat. **Acta Anatomica**, v. 69, p. 542-608, 1968.

DRUCKMANN, R.; DRUCKMANN, M. A. Progesterone and the immunology of pregnancy. **Journal of Steroid and Biochemical Molecular Biology**, v. 97, p. 389–396, 2005.

EINARSDOTTIR, E.; SODERSTROM, I.; LOFGREN-BURSTROM, A. The CTLA4 region as a general autoimmunity factor: an extended pedigree provides evidence for synergy with the HLA locus in the etiology of type 1 diabetes mellitus, Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. **European Journal of Human Genetic**, v. 11, p. 81-84, 2003.

ELLEDGE, R. M.; ALLRED, C. The p53 tumor suppressor gene in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 32, p. 39-47, 1994.

ENDERS, A. C. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. **The American Journal of Anatomy**, v. 116, n. 1, p. 29-68, 1965.

ENDERS, A. C.; BLANKENSHIP, T. N.; LANTZ, K. C.; ENDERS, S. Morphological variation in the areas of chorioallantoic placenta. **Trophoblast Research**, v. 12, n. 1, p. 1-19, 1998.

ESPEY, M. G.; NAMBOODIRI, M. A. Selective metabolism of kynurenine in the spleen in the absence of indoleamine 2,3-dioxygenase induction. **Immunology Letter**, v. 71, p. 67, 2000.

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; VACCA, C. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. **Cell Death Differentiation**, v. 9, p. 1069-1077, 2002.

FAUST, Z.; LASKARIN, G.; RUKAVINA, D.; SZEKERES-BARTHO, J. Progesterone-induced blocking factor inhibits degranulation of natural killer cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 42, p. 71-75, 1999.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene *C-MYC* no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, p. 165-171, 2006.

FERRO, E. A. V. **Estudo da interface materno-embrionária em etapas iniciais da implantação em *Calomys callosus***. 1991. 130f. Dissertação (Mestrado em Histologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

FLECKNER, J.; MARTENSEN, P. M.; TOLSTRUP, A. B.; KJELDGAARD, N. O.; JUSTESEN, J. Differential regulation of the human, Interferon inducible tryptophanyl-tRNA synthetase by various cytokines in cell lines. **Cytokine**, v. 7, p. 70-77, 1995.

FOIDART, J. M.; HUSTIN, J.; DUBOIS, M.; SCHAAPS, J. P. The human placenta becomes haemochorial at the 13th week of pregnancy. **International Journal of Developmental Biology**, v. 36, p. 451–453, 1992.

FORREST, C. M.; KENNEDY, A.; STONE, T. W.; STOY, N.; DARLINGTON, L. G. Kynurenine and neopterin levels in patients with rheumatoid arthritis and osteoporosis during drug treatment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 527, p. 287, 2003.

FROLOVA, L. Y.; GRIGORIEVA, A. Y.; SUDOMOINA, M. A.; KISSELEV, L. L. The human gene encoding tryptophanyl-tRNA synthetase: Interferon-response elements and exon-intron organization. **Gene**, v. 128, p. 237- 245, 1993.

FRUMENTO, G.; ROTONDO, R.; TONETTI, M.; DAMONTE, G.; BENATTI, U.; FERRARA, G. B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3- dioxygenase. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 459–468, 2002.

FUCHS, D.; FORSMAN, A.; HAGBERG, L. Immune activation and decreased tryptophan in patients with HIV-1 infection. **Journal of Interferon & Research**, v.10, p. 599, 1990.

GIBORI, G. The decidual hormones and their role in pregnancy recognition. In: GLASSER, S. R.; MULHOLLAND, J.; PSYCHOYOS, A. (Ed.). **Endocrinology of embryo-endometrium interactions**. New York: Plenum, 1994, p. 217-222.

GIORDANO, A.; GALDERISI, U. **Short Introduction to the Cell Cycle**. In: Cell Cycle Regulation and Differentiation in Cardiovascular and Neural Systems, 2010 Springer New York. USA.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; BIANCHI, R. IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8⁺ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 708–14, 2001.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; SILLA, S. CD40 ligation ablates the tolerogenic potential of lymphoid dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 277–83, 2001.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; BIANCHI, R. A defect in tryptophan catabolism impairs tolerance in nonobese diabetic mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, p. 153-160, 2003.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; PUCCETTI, P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. **Trends of Immunology**, v. 24, p. 242-248, 2003.

GUILLEMIN, G. J.; KERR, S. J.; SMYTHE, G. A.; ARMATI, P. J.; BREW, B. J. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 467, p. 125, 1999.

HAINZ, U.; OBEXER, P.; WINKLER, C. Monocyte-mediated T-cell suppression and augmented monocyte tryptophan catabolism after human hematopoietic stem-cell transplantation. **Blood**, v. 105, p. 4127, 2005.

HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v. 5192, p. 1821-1828, 1994.

HEIKKINEN, J.; MÖTTÖNEN, M.; KOMI, J.; ALANEN, A.; LASSILA, O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. **Clinical Experimental Immunology**, v. 131, p. 498–505, 2003.

HOFFMAN, B.; SCHULER, G. The bovine placenta; a source and target of steroid hormones: observations during the second half of pregnancy. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 309–320, 2002.

HOCHREIN, H.; SHORTMAN, K.; VREMEC, D.; SCOTT, B.; HERTZOG, P.; O'KEEFFE, M. Differential production of IL-12, IFN- α and IFN- γ by mouse dendritic cell subsets. **Journal of Immunology**, v. 9, p. 5448–5455, 2001.

HWU, P.; DU, M. X.; LAPOINTE, R.; DO, M.; TAYLOR, M. W.; YOUNG, H. A. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T-cell proliferation. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 3596–3599, 2000.

IETTA F, BECHI N, ROMAGNOLI R, BHATTACHARJEE J, REALACCI M, DIVITO M, FERRETTI C, PAULESU L: 17 β -Estradiol modulates the macrophage migration inhibitory factor secretory pathway by regulating ABCA1 expression in human first-trimester placenta. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, v. 298, p. E411-E418, 2010.

ITO, A.; BUENAFE, A. C.; MATEJUK, A.; ZAMORA, A.; SILVERMAN, M.; DWYER, J. Estrogen inhibits systemic T cell expression of TNF- α and recruitment of TNF- α (+) T cells and macrophages into the CNS of mice developing experimental encephalomyelitis. **Clinical Immunology**, v. 102, p. 275–82, 2002.

JAFFE, R.; JAUNIAUX, E.; HUSTIN, J. Maternal circulation in the first-trimester human placenta-myth or reality? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 176, p. 695–705, 1997.

KAMIMURA, S.; EGUCHI, K.; YONEZAWA, M.; SEKIBA, K. Localization and developmental change of indoleamina 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. **Acta Medica Okayama**, v. 45, p. 135-139, 1991.

KNOX, W. E. **Tryptophan oxidation**. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. Methods in Enzymology, New York: Academic Press, v. 2, p. 242–254. 1955.

KOLB, J. P.; CHAOUAT, G.; CHASSOUX, D. Immunoactive products of placenta. suppression of natural killing activity. **Journal of Immunology**, v. 132, 19, p. 2305, 1984.

KRISTIANSEN, O. P.; LARSEN, Z. M.; POCIOT, F. CTLA-4 in autoimmune diseases—a general susceptibility gene to autoimmunity? **Genes Immunology**, v. 1, p. 170-184, 2000.

KUDO, Y.; BOYD, C. A. Human placental indoleamina 2,3-dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 1500, p. 119-124, 2000.

KUDO, Y.; BOYD, C. A.; SARGENT, I. L.; REDMAN, C. W. Decreased tryptophan catabolism by placental indoleamine 2,3-dioxygenase in pre-eclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 188, p. 719, 2003.

KUDO, Y.; BOYD, C. A. R.; SPYROPOULOU, I.; REDMAN, C. W. G.; TAKIKAWA, O.; KATSUKI, T.; HARA, T.; OHAMA, K.; SARGENT, I. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 61, p. 87-98, 2004.

LEE, G. K.; PARK, H. J.; MACLEOD, M.; CHANDLER, P.; MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. **Immunology**, v. 107, p. 452-460, 2002.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: a comparative aspect. **Experimental Clinical Endocrinology**, v. 102, n.3, p. 122-134, 1994.

LIANG, J.; SUN, L.; WANG, Q.; HOU, Y. Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation. **International Immunopharmacology**, n. 6, p. 830– 838, 2006.

LIGAM, P.; MANUELPIILLAI, U.; WALLACE, E.M.; WALKER, D. Localisation of indoleamine 2,3-dioxygenase and kynurenine hydroxylase in the human placenta and decidua: implications for role of the kynurenine pathway in pregnancy. **Placenta**, v. 26, p. 498–504, 2005.

LORA, V. **Expressão gênica e protéica das isoformas A e B do receptor de progesterona, de p53 e de p21 em miométrio e leiomioma uterino**. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

LUPPI, P.; HALUSZCZAK, C.; BETTERS, D.; RICHARD, C. A. H.; TRUCCO, M.; DELOIA, J. A. Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 72, p. 874-884, 2002.

MANETTI, R.; ANNUNZIATO, F.; TOMASEVIC, L.; GIANNÒ, V.; PARRONCHI, P.; ROMAGNANI, R.; MAGGI, E. Polyinosinic acid: polycytidylic acid promotes T helper type 1-specific immune responses by stimulating macrophage production of interferon- α and interleukin-12. **European Journal of Immunology**, p. 2656–60, 1995.

MASSAGUÉ, J. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature**, v. 432, p. 298-306, 2004.

MCGOWAN, E. M.; RUSSELL, A. J.; BOONYARATANAKORNKIT, V.; DARREN, N.; SAUNDERS, D. N.; LEHRBACH, G. M. ; SERGIO, C. M.; MUSGROVE, E. A.; EDWARDS, D. P.; SUTHERLAND, R. L. Progestins reinitiate cell cycle progression in antiestrogen-arrested breast cancer cells through the B-Isoform of progesterone receptor. **Cancer Research**, v. 67, p. 8942-8951, 2007.

MEISEL, R.; ZIBERT, A.; LARYEA, M.; GOBEL, U.; DAUBENER, W.; DILLOO, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase mediated tryptophan degradation. **Blood**, v. 103, p. 4619, 2004.

MELLOR, A. L.; CHANDLER, P.; LEE, G. K.; JOHNSON, T.; KESKIN, D. B.; LEE, J.; MUNN, D. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, p. 143 -50, 2002.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal antifetal immune responses. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p. 5-13, 2003.

MELLOR, A. L.; BABAN, B.; CHANDLER, P. Cutting edge: induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 1652- 1655, 2003.

MELLOR, A. L.; CHANDLER, P.; LEE, G. K. Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 57, p. 143-150, 2002.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism and regulation of adaptative immunity. **Journal of Immunology**, v. 170, p. 5809–5813, 2003.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 762, 2004.

MOFFETT, J. R.; NAMBOODIRI, M. A. Tryptophan and the immune response. **Immunology Cell Biology**, v. 81, p. 247, 2003.

MOREAU, M.; LESTAGE, J.; VERRIER, D. Bacille Calmette- Guerin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. **Journal of Infectious Disease**, v. 192, p. 537, 2005.

MULLER, A. J.; DUHADAWAY, J. B.; DONOVER, P. S.; SUTANTO-WARD, E.; PRENDERGAST, G. C. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. **National Medicine**, v. 11, p. 312-318, 2005.

MULLER, A. J.; MALACHOWSKI, W. P.; PRENDERGAST, G. C. Indoleamine 2,3-dioxygenase in cancer: targeting pathological immune tolerance with small-molecule inhibitors. **Expert Opinion Ther Targets**, v. 9, p. 831, 2005.

MUNN, D. H.; ZHOU, M.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; CONWAY, S. J.; MARSHALL, B.; BROWN, C.; MELLOR, A. L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, v. 281, p. 1191–1193, 1998.

MUNN, D. H.; SHAFIZADEH, E.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; PASHINE, A.; MELLOR, A. L. Inhibition of T-cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 1663–1672, 1999.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; LEE, J. R. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Science**, v. 297, p. 1867-1870, 2002.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; MELLOR, A. L. Ligation of B7– 1/B7–2 by human CD4(+) T cells triggers indoleamina 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 172, p. 4100-4110, 2004.

MUNN, D. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. **Current Opinion Immunology**, v. 18, p. 220, 2006.

MURRAY, M. F. Tryptophan depletion and HIV infection: a metabolic link to pathogenesis. **Lancet Infectious Disease**, v. 3, p. 644, 2003.

NAGAI, H.; GUO, J.; CHOI, H.; KURUP, V. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α protect mice from invasive aspergillosis. **Journal of Infection Disease**, v. 6, p. 1554-1560, 1995.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Regulation of the cell cycle by protein kinases**. In Lehninger. Principles of Biochemistry, 5th ed. 2008. W. H. Freeman and Company, NY.USA. p. 469.

NEPOMUCENO, F.; LAS CASAS, L.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. O. Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com *Hypericum perforatum* durante o período de implantação. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 224-228, 2005.

NEVES, C.; MEDINA, J. L.; DELGADO, J. L. Alterações Endócrinas e Imuno-modulação na Gravidez. **Arquivos de Medicina**, v. 21, p. 175-182, 2007.

OPITZ, C. A.; LITZENBURGER, U. M.; OPITZ, U.; SAHM, F.; OCHS, K.; LUTZ, C.; WICK, W.; PLATTEN, M. The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-D-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. **Plos One**, v. 6, p. 1-11, 2011.

ØSTENSEN, M. Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Annual NY Academical Science**, v. 22; p. 131-43, 1999.

OZBUN, M. A.; BUTEL, J. S. Tumor suppressor *p53* mutations and breast cancer: a critical analysis. **Advances in Cancer Research**, v. 66, p. 71-141, 1995.

PAULOVICH, A.G.; TOCZYSKI, D.P.; HARTWELL, L.H. When checkpoints fail. **Cell**, v. 88, p. 315-321, 1997.

PELTIER, M. R. Immunology of term and labor. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 122, 2003.

PEREIRA, A. C.; RAMIRES DE JESÚS, N.; LAGE, L. V.; LEVY, R. A. Immunity in the normal pregnancy and in the patient with systemic lupus erythematosus (SLE). **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 45, n. 3, p. 134-40, 2005.

PHAN, G. Q.; YANG, J. C.; SHERRY, R. M. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. **Procedures National Academical Science USA.**, v. 100, p. 8372-8377, 2003.

PLANAS-SILVA, M. D.; WEINBERG, R. A. Estrogen-dependent cyclin E-cdk2 activation through p21 redistribution. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, p. 4059-4069, 1997.

PRALL, O. W. J.; SARCEVIC, B.; MUSGROVE, E. A.; WATTS, C. K. W.; SUTHERLAND, R. L. Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 10882–10894, 1997.

REIBNEGGER, G.; EGG, D.; FUCHS, D. Urinary neopterin reflects clinical activity in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatoids**, v. 29, 1986, p. 1063–1070, 1986.

RUBIN, B. Y.; ANDERSON, S. L.; XING, L.; POWELL, R. J.; TATE, W. P. Interferon induces tryptophanyl-tRNA synthetase expression in human fibroblasts. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 266, p. 24245-24248, 1991.

SAITO, S.; SHIMA, T.; NAKASHIMA, A.; SHIOZAKI, A.; ITO, M.; SASAKI, Y. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? **Journal of Assistant Reproduction Genetics**, v. 24, p. 379–386, 2007.

SAKURAI, K.; ZOU, J. P.; TSCHETTER, J. R.; WARD, J. M.; SHEARER, G. M. Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 129, p. 186-196, 2002.

SALVADORI, M. L. B. **Avaliação da influência de hormônios e citocinas na expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase, em cultivo celular de placenta e embrião murino e de ratas Wistar pela citometria de fluxo.** 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SARAFANA, S.; COELHO, R.; NEVES, A.; TRINDADE, J. C. Aspectos da Imunologia da gravidez. **Acta Medica Portuguesa**, v. 20, p. 355 -58, 2007.

SANGFELT, O.; ERICKSON, S.; GRANDÉR, D. Mechanisms of interferon – induced cell cycle arrest. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 479-487, 2000.

SCHAAPS, J. P.; TSATSARIS, V.; GOFFIN, F.; BRICHANT, J. F.; DELBECQUE, K.; TEBACHE, M. Shunting the intervillous space: new concepts in human uteroplacental vascularization. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, p. 323–332, 2005.

SCHROCKSNADEL, K.; WIDNER, B.; BERGANT, A. Longitudinal study of tryptophan degradation during and after pregnancy. **Life Science**, v. 72, p. 785- 793, 2003.

SHERR, C. J. G1 phase progression: cycling on cue. **Cell**, v. 79, p. 551-555, 1994.

SIITERI, P. K.; FEBRES, F.; CLEMENS, L. E. Progesterone and maintenance of pregnancy: is progesterone nature's immunosuppressant? **Annual NY Academical Science**, n. 11, v. 286, p. 384-97, 1977.

SKILDUM, A.; FAIVRE, E.; LANGE, C. A. Progesterone receptors induce cell cycle progression via activation of mitogen-activated protein kinases. **Molecular Endocrinology**, v. 19, p. 327-339, 2005.

SOARES, M. J.; CHAMPMAN, B. M.; RASMUSSEN, C. A.; KAMEL, T. Differentiation of trophoblast endocrine cells. **Placenta**, v. 15, p. 287-289, 1996.

STECKEL, N. K.; KUHN, U.; BEELEN, D.W.; ELMAAGACLI, A. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 57, p. 185–91, 2003.

STEFANO, G. B.; CADET, P.; BRETON, C.; GOUMON, Y.; PREVOT, V.; DESSAINT, J. P.; BEAUVILLAIN, J. C.; ROUMIER, A. S.; WELTERS, I.; SALZET, M. Estradiol-stimulated nitric oxide release in human granulocytes is dependent on intracellularcalcium transients: evidence of a cell surface estrogen receptor. **Blood**, v. 12, p. 3951–3958, 2000.

STOBER, D.; SCHIRMBECK, R.; REINNMANN, J. IL-12/IL-18-dependent IFN- γ release by murine dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 2, p. 957–965, 2001.

STREHLOW, I.; SEEGER, D.; FRICK, C. The gene encoding IFP 53/tryptophanyl-tRNA synthetase is regulated by the gamma-Interferon activation factor. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 268, p. 590-595, 1993.

SUGIMOTO, H.; ODA, S. I.; OTSUKI, T.; HINO, T.; YOSHIDA, T.; SHIRO, Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. **PNAS**, v. 103, n. 8, p. 2611–2616, 2006.

SUTHERLAND, R. L.; PRALL, O. W. J.; WATTS, C. K.W. ; MUSGROVE, E. A. Estrogen and progestin regulation of cell cycle progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 3, p. 63-72, 1998.

SZEKERES-BARTHO, J.; AUTRAN, B.; DEBRE, P.; ANDREU, G.; DENVER, L.; CHAOUAT, G. Immunoregulatory effects of a suppressor factor from healthy pregnant women's lymphocytes after progesterone induction. **Cell Immunology**, v. 122, p. 281-294, 1989.

SZEKERES-BARTHO, J.; WEGMANN, T. G. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 31, p. 81-95, 1996.

TAKATA, K.; FUJIKURA, K.; SHIN, B. C. Ultrastructure of rodent placental labyrinth: a site of barrier and transport. **Journal of Reproductive Development**, v. 43, n. 1, p. 1-17, 1997.

TAKIKAWA, O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. **Biochemical Biophysical Research Commun**, v. 338, p. 12, 2005.

TERNESS, P.; BAUER, T. M.; ROSE, L.; DUFTER, C.; WATZLIK, A.; SIMON, H.; OPELZ, G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3- dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 447–457, 2002.

TERNESS, P.; CHUANG, J. J.; OPELZ, G. The immunoregulatory role of IDO-producing human dendritic cells revisited. **Trends of Immunology**, v. 27, p. 68, 2006.

THELLIN, O.; COUMANS, B.; ZORZI, W.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, p. 731-737, 2000.

TOLSTRUP, A. B.; BEJDER, A.; FLECKNER, J.; JUSTESEN, J. Transcriptional regulation of the interferongamma- inducible tryptophanyl-tRNA synthetase includes alternative splicing. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 270, p. 397-403, 1995.

UYTTENHOVE, C.; PILOTTE, L.; THEATE, I. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Natural Medicine**, v. 9, p. 1269, 2003.

VEGETO, E.; BONINCONTRO, C.; POLLIO, G.; SALA, A.; VIAPPIANI, S.; NARDI, F.; BRUSARELLI, A.; VIVIANI, B.; CIANA, P.; MAGGI, A. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. **Journal of Neuroscience**, v. 6, p. 1809–1818, 2001.

VON BUBNOFF, D.; KOCH, S.; BIEBER, T. New jobs for an old enzyme: the revival of IDO. **Trends of Immunology**, v. 24, p. 296, 2003.

VON RANGO, U. Fetal tolerance in human pregnancy—A crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. **Immunology Letters**, v. 115, p. 21–32, 2008.

XAUS, J.; CARDO, M.; VALLEDOR, A. F.; SOLER, C.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. Interferon γ induces the expression of p21waf-1 and arrests macrophage cell cycle, preventing induction of apoptosis. **Immunity**, v. 11, p. 103–113, 1999.

XIAO, B.; LIU, X.; LINK, H. Antigen-specific T cell functions are suppressed over the estrogen-dendritic cell-indoleamine 2,3-dioxygenase axis. **Steroids**, v. 69, p. 653–659, 2004.

WANG, F.; WANG, X.; YUAN, C.; MA, J. Generating a Prion with Bacterially Expressed Recombinant Prion Protein. **Science**, v. 327, p. 1132–1135, 2010.

WELSH, A. O.; ENDERS, A. C. Trophoblast-decidual cell interactions and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat. **The Anatomical Record**, v. 217, p. 203–219, 1987.

WIDNER, B.; SEPP, N.; KOWALD, E. Enhanced tryptophan degradation in systemic lupus erythematosus. **Immunobiology**, v. 201, p. 621, 2000.

WIRLEITNER, B.; NEURAUTER, G.; SCHRÖCKSNADEL, K.; FRICK, B.; FUCHS, D. Interferon- γ -induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects. **Current Medicine Chemical**, v. 10, p. 1581–1591, 2003.

WOLF, A. M.; WOLF, D.; RUMPOLD, H. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. **Clinical of Immunology**, v. 113, p. 47–55, 2004.

YANG , L.; HU, Y.; HOU, Y. Effects of 17β -estradiol on the maturation, nuclear factor kappa B p65 and functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. **Molecular Immunology**, n. 43, p. 357–366, 2006.

YASUI, H.; TAKAI, K.; YOSHIDA, R.; HAYAISHI, O. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients. **Procedures National Academical Science USA.**, v. 83, 1986 p. 622-626, 1986.

YOSHIDA, R.; IMANISHI, J.; OKU, T.; KISHIDA, T.; HAYAISHI, O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by Interferon. **Procedures National Academical Science USA.**, v. 78, p. 129-132, 1981.

YOSHIDA, R.; OKU, T.; IMANISHI, J.; KISHIDA, T.; HAYAISHI, O. Interferon: a mediator of indoleamine 2,3-dioxygenase induction by lipopolysaccharide, poly(I) X poly(C), and pokeweed mitogen in mouse lung. **Archives of Biochemical and Biophysic**, v. 249, p. 596-604, 1986.