UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Efeito de hormônios e citocinas na expressão da Indoleamina 2,3-dioxigenase
e na capacidade proliferativa de células de placenta bovina**

ANA RITA DE LIMA

São Paulo

2009

ANA RITA DE LIMA

Efeito de hormônios e citocinas na expressão da Indoleamina 2,3-dioxigenase e na capacidade proliferativa de células de placenta bovina

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

São Paulo

2009

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.2172
FMVZ

Lima, Ana Rita de
Efeito de hormônios e citocinas na expressão da Indoleamina 2,3-dioxigenase na capacidade proliferativa de células de placenta bovina / Ana Rita de Lima. – São Paulo : A. R. Lima, 2009.
73 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2009.

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. Placenta bovina. 3. Peroxidação lipídica. 4. Apoptose. 5. Proliferação celular. I. Título.

ERRATA

Folha Ficha catalográfica	Parágrafo 2ª	Linha 1	Onde se lê 2,3-dioxigenase na	Leia-se 2,3-dioxigenase e na
Ficha catalográfica	3º	1	73 f.	173 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência de hormônios e citocinas na expressão de indoleamina - 2,3 dioxigenase na cultura de células de placenta bovina", protocolado sob o nº963/2006, utilizando 30 (trinta) bovinos (peças de matadouro), sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/09/06".

(We certify that the Research "Influence of hormones and cytokines in the expression of indoleamine - 2,3 dioxigenase in the cell culture from bovine placenta", protocol number 963/2006, utilizing 30 (thirty) bovines, under the responsibility of Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 09/13/2006).

São Paulo, 14 de setembro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LIMA, Ana Rita de

Título: Efeito de hormônios e citocinas na expressão da Indoleamina 2,3-dioxigenase e na capacidade proliferativa de células de placenta bovina

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof Dr. _____ **Instituição:** _____

Assinatura: _____ **Julgamento:** _____

Prof Dr. _____ **Instituição:** _____

Assinatura: _____ **Julgamento:** _____

Prof Dr. _____ **Instituição:** _____

Assinatura: _____ **Julgamento:** _____

Prof Dr. _____ **Instituição:** _____

Assinatura: _____ **Julgamento:** _____

Prof Dr. _____ **Instituição:** _____

Assinatura: _____ **Julgamento:** _____

Dedicalórias

Dedico

*Aos meus pais José e Maria,
que sempre acreditaram e torceram por mim.*

*Aos meus irmãos Danilo e Eliane,
às minhas sobrinhas, Píntia e Sara,
pelo companheirismo.*

*Ao meu grande Amor, Emerson Fioretto, que tanto me faz feliz
quanto me faz sofrer...*

Dois Corações

*Encontrei minha paz no teu sorriso
Minha força no teu existir.
São dois corações
Num mesmo destino,
Num mesmo segredo...
São dois corações numa mesma vida,
Que se encaixam perfeitamente,
E dependem um do outro.
Apenas um coração seria solidão,
Seria um céu nublado sem estrelas,
Seria um espetáculo sem público,
Um coração sem sentimentos...
A alma se identifica,
Quando há uma história de Dois Corações.
As estrelas renascem
E o espetáculo é aplaudido de pé.
A força de Dois Corações
É imensa,
Ultrapassa o tempo
E navega com a
Felicidade!!!*

Agradecimientos

"Amizade..."

"Qualquer hora dessas, o sol vai deixar de brilhar..."

Mas isso não importa, a lua brilhará dia e noite...

Qualquer dia desses, as estrelas vão cair...

Mas ninguém precisa ter medo, o oceano as receberá em suas águas...

Algumas coisas costumam acontecer na hora errada, outras coisas acontecem na hora exata. A sublimidade do ser humano, é capaz de tornar as coisas perfeitas...

A paz interior de cada um e o desejo de busca, influenciam o encontro...

Mesmo que o encontro seja virtual, ou imaginário. (Seria a mesma coisa?)

Sei que pode se tornar real, por causa da sublimidade e da paz interior, e da busca de felicidade que cada ser tem dentro de si.

Busco sem medo...

Encontro com medo...

Sinto, com desejo...

Às vezes correr o risco de não encontrar, é melhor do que nem tentar procurar.

Busquei e te encontrei!

Ou foi você que me encontrou???

Bom, o que importa é que o destino é amigo dos homens, e os homens são amigos entre si...

Mesmo que o destino se torne nosso inimigo, nós jamais poderemos fazer o mesmo, devemos continuar nos amando...

Os amigos se amam. Os verdadeiros...

As estrelas nem vão mais cair, nem o céu deixará de ter o brilho do sol, nem as coisas erradas irão acontecer.

Por que o amor e a amizade são maiores, e dominam o coração e o espaço.

A busca foi verdadeira e o verdadeiro sentido dessa busca..."

Agradeço à FAPESP

pelo apoio e financiamento deste projeto.

À Universidade de São Paulo

pela acolhida e oportunidade de realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

pelos anos de trabalho em seu laboratório, ensinamentos, dedicação e orientação no decorrer do doutorado.

"As dificuldades ensinam e fortalecem; as facilidades iludem e enfraquecem".

(Arnon de Mello)

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria

pela acolhida em seu laboratório para a realização de grande parte deste trabalho, peço-lhe desculpas pela correria mas agradeço-lhe infinitamente pela grande ajuda a mim dispensada nestes últimos meses.

Uma frase encontrada por acaso em um livro define a sua pessoa perfeitamente:

“O difícil fazemos agora, o impossível levará algum tempo”

Muito obrigada!!

À Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

que me acolheu em seu laboratório, ajudando e me ensinando, sempre estendendo suas mãos para que este trabalho se concretizasse em tempo hábil.

Pela disponibilidade de tempo até mesmo em finais de semana e feriados.

Por deixar seu laboratório à disposição para o que for necessário. Meu Muito Obrigada hoje e sempre.

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho e pela oportunidade de realização deste curso.

À Prof. Dra. Mariz Vainzof

pela ajuda dispensada neste momento decisivo e pela disponibilidade de tempo para troca de informações.

À Marta Canovas

pela realização das corridas de proteínas realizadas com extrema urgência em decorrência da pouca disponibilidade de tempo.

Agradeço aos amigos do laboratório (LTIAM), Thaís, Janaína, Rose, Letícia, Renata e Carlo, não posso esquecer também de agradecer a Juliana (pelos momentos de descontração muito importantes neste momento estressante) e a Gabriela pela amizade e companheirismo pois o valor de uma amizade é superior a qualquer preço.
“Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só”.

Amir Klink

Agradeço a minha grande amiga Thaís Martins Chucri

pela amizade e momentos de descontração.

"Amizade, palavra que designa vários sentimentos, que não pode ser trocada por meras coisas materiais. Deve ser guardada e conservada no coração."

(Autor desconhecido)

Agradeço a minha eterna amiga Lilian

que apesar da distância sempre esteve presente ao meu lado.

Agradeço às minhas amigas Érika e Alessandra

pelo apoio em momentos difíceis.

Agradeço aos meus colegas de pós-graduação

pelo companheirismo, atenção, ajuda e troca de informações especialmente a Luciana e Liza.

Agradeço à equipe de técnicos, funcionários e professores do Setor de Anatomia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

pela ajuda nos procedimentos da pós-graduação. Não vou nomeá-los para não correr o risco de me esquecer de alguém.

Agradeço ao Frigorífico Mantiqueira e seus funcionários

pela atenção e disponibilidade do material utilizado nesta pesquisa.

RESUMO

LIMA, A. R. de. **Efeito de hormônios e citocinas na expressão da Indoleamina 2,3-dioxigenase e na capacidade proliferativa de células de placenta bovina** [Effects of hormones and cytokines in the indoleamine 2,3-dioxygenase expression and the proliferative capacity of cells from bovine placenta]. 2009. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima que apresenta um importante papel na prevenção da rejeição fetal. A IDO demonstra efeitos na supressão da ativação de células T por catabolizar o aminoácido essencial Triptofano. Nós estudamos a expressão da IDO em cultura celulares de placenta com a adição individual de Estradiol, Progesterona, Interferon α , Triptofano e 1-Metil-Triptofano com o uso de citometria de fluxo, imunocitoquímica e quantificação celular, imunofluorescência, peroxidação lipídica, análise das fases do ciclo celular, imunoblotting e PCR em placentas bovinas nos três trimestres gestacionais. A quantificação celular revelou que em bovinos a atividade da IDO aumenta com o avanço do período gestacional e, sua expressão varia de acordo com os fatores, sendo o mesmo padrão observado pela imunofluorescência. O Imunoblotting mostrou a presença de possíveis isoformas desta proteína na espécie bovina que ainda não foram identificadas. A investigação pela lipoperoxidação revelou que os hormônios modularam diferencialmente a produção de radicais peroxidados nos três terços de gestação e, possivelmente atuam como fatores indutores de proliferação. As células placentárias apresentaram padrões diferenciados de proliferação e apoptose ao longo da gestação, principalmente nos tratamentos com Estradiol e Progesterona, sendo também variantes com outros fatores em todos os grupos. Observou-se que a Progesterona atua na maturação das células placentárias independente da concentração utilizada. Em todos os grupos uma grande proporção de células apresentava-se em estado de quiescência (G1). No terceiro trimestre foi detectado um aumento no número de células em G2/M, indicando a parada da capacidade proliferativa ou de progressão no ciclo celular (“arrest”). Maior taxa de apoptose foi observada nos animais de segundo trimestre gestacional. Baseados nisso, podemos concluir que a IDO é suscetível ao controle pelos mecanismos testados, o que nos leva a formular hipóteses de implantação de possíveis mecanismos terapêuticos para a reprodução com a participação da IDO.

Palavras-chave: Indoleamina 2,3-dioxigenase. Placenta bovina. Peroxidação lipídica. Apoptose. Proliferação celular.

ABSTRACT

LIMA, A. R. de. **Effects of hormones and cytokines in the indoleamine 2,3-dioxygenase expression and the proliferative capacity of cells from bovine placenta** [Efeito de hormônios e citocinas na expressão da Indoleamina 2,3-dioxigenase e na capacidade proliferativa de células de placenta bovina]. 2009. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) is an enzyme that plays an important role in preventing fetal rejection. IDO is related to the suppression of the T-cells activation due to the catabolism of essential amino acid Tryptophan. We studied the expression of IDO in bovine placenta cell culture with individual supplementation of factors as Estrogen, Progesterone, Interferon α , Tryptophan and 1-Methyl-Tryptophan. Evaluations were made by flow cytometry, immunocytochemistry and cellular quantification, lipidic peroxidation, cell cycle phases, immunoblotting, PCR and immunofluorescence in the three trimesters of pregnancy. Cellular quantification demonstrated that in bovines the activity of the IDO increases during pregnancy, and its expression is factor-dependent, which was also observed in immunofluorescence. Immunoblotting demonstrated the presence of possible unknown protein isoforms in bovine. Lipoperoxidation evaluation demonstrated that hormones distinguishingly modulated the production of peroxide radicals in the three trimesters of pregnancy and, possibly acting as inductive factors of proliferation. Placental cells demonstrated differentiated patterns of proliferation and apoptosis during the gestation, mainly in the presence of Estrogen and Progesterone, besides variant rates were also observed under other factors. Independent of the concentration, Progesterone influenced placental cells maturation. All groups presented great ratio of cells in quiescence state (G1). In third trimester, G2/M high rates indicated a pause in proliferative capacity or in cell cycle progression (arrest). High apoptosis rates were observed in animals at second pregnancy trimester. Based on the presented, we concluded that IDO is susceptible to be controlled by the applied-factors, what lead us to think about hypothetical therapeutic mechanism for reproduction with the participation of IDO.

Keywords: Indoleamine 2,3-dioxygenase. Bovine placenta. Lipidic peroxidation. Apoptosis. Cell proliferation.

INDICE

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVO	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	BOVINOCULTURA NO BRASIL	24
3.2	PLACENTA BOVINA	24
3.3	TOLERÂNCIA MATERNO-FETAL	25
3.4	INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE	26
3.5	MECANISMOS DE RELAÇÃO	31
3.6	HORMÔNIOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	MATERIAL	37
4.2	MÉTODOS	37
5	RESULTADOS	53
5.1	CITOMETRIA DE FLUXO	53
5.2	IMUNOCITOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO CELULAR	57
5.3	IMUNOBLOTTING	63
5.4	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) POR MEIO DA QUANTIFICAÇÃO ESPECTOFOTOMÉTRICA DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) NO SOBRENADANTE DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS PLACENTÁRIAS	65
5.5	ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR DAS CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS PLACENTÁRIAS APÓS A ADIÇÃO DOS FATORES ESTUDADOS, POR CITOMETRIA DE FLUXO	88
5.6	PCR	119
5.7	IMUNOFLUORESCÊNCIA	120
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	122

6	DISCUSSÃO	124
6.1	CITOMETRIA DE FLUXO	124
6.2	IMUNOCITOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO CELULAR	126
6.3	IMUNOBLOTTING.....	128
6.4	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	128
6.5	CICLO CELULAR	131
6.6	PCR.....	134
6.7	ANÁLISE FINAL.....	136
7	CONCLUSÕES	139
	REFERÊNCIAS	142
	ANEXOS	155

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O período gestacional compreende um estado imunológico altamente complexo. Assim, lançou-se o grande desafio de se tentar entender quais os mecanismos estão envolvidos na não-rejeição do embrião semi-alogênico pelo sistema imunológico materno, uma vez que o feto também contém material genético paterno, que ao ser expressado por este, geneticamente estranho à mãe, podem incitar reações de intolerância imunológica como observadas nos tecidos enxertados.

Desde fins dos anos 90, a IDO (Indoleamina 2,3-dioxigenase) tem sido tema de investigações devido à sua relação com a tolerância materno-fetal, atuando sobre o controle dos níveis de Triptofano-quinurenina impedindo desta forma a proliferação das células do sistema imune, que em sua ausência ou em baixos níveis reduzem a possibilidade de rejeição do feto alogênico. IDO é uma enzima relacionada à degradação do Triptofano que foi originalmente identificada no intestino de coelhos. Sendo subsequente encontrada com outros mediadores, tais como o Interferon γ , que induz a expressão da IDO em vários tecidos. Alguns autores descreveram a habilidade da IDO em inibir a proliferação de patógenos intracelulares e células tumorais *in vitro* pelo consumo do aminoácido essencial Triptofano.

Durante o período de gestação, vários mecanismos imunes encontram-se ativados na interface materno fetal, incluindo o aumento do nível local de Progesterona e expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) não clássica classe I denominada HLA-G. Esses mecanismos são responsáveis pela diminuição da resposta imune, particularmente sobre a atividade dos linfócitos T e célula natural killer (NK), relacionado aos mediadores primários de rejeição alogênica presentes no tecido. O embrião também adota estratégias para regular o sistema imune com a produção da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase, a qual se refere ao catabolismo do Triptofano necessário a ativação das células T (DRAKE; GUNN; CHARO, 2001).

Em placentas humanas foi encontrada intensa marcação para IDO no sinciciotrofoblasto no primeiro e segundo terços gestacionais e, com seis semanas de gestação no epitélio glandular e estroma da decídua (MEISEL et al., 2004). Na placenta bovina descreveu-se que a atividade da IDO aumenta com o avanço do período gestacional, em razão da placenta bovina no início do desenvolvimento apresentar-se somente justaposta ao epitélio uterino. Com o avanço da idade gestacional a interação entre a porção materna e fetal torna-se mais íntima, e

os capilares placentários aumentariam a exposição dos antígenos fetais ao sistema imune materno (OLIVEIRA, 2005).

Devido ao importante papel da IDO na não-rejeição do embrião semi-alogênico pelo sistema imunológico materno, avaliamos o comportamento da IDO nas células da placenta bovina, oriunda dos três terços gestacionais, em cultivo, sob diferentes tratamentos: Estradiol, Progesterona, Triptofano, Interferon γ e inibidor de IDO, o 1-Metil-D-Triptofano.

Objetivo

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos hormônios e citocinas (Estradiol, Progesterona, Interferon γ , Triptofano e 1-Metil-D-Triptofano) na expressão da IDO, em células da placenta bovina submetidas ao cultivo celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar o número de células que expressam a Indoleamina 2,3-dioxigenase nas células da placenta bovina em cultivo, pela técnica de Imunocitoquímica e Quantificação celular por métodos estereológicos;
2. Avaliar a expressão de Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) na placenta bovina com o uso de Immunoblotting, Imunofluorescência e RT-PCR;
3. Realizar ensaio de inibição com o uso de hormônios e citocinas e do anticorpo anti-IDO nas células da placenta bovina submetidas ao cultivo celular pela técnica de Peroxidação Lipídica ou Lipoperoxidação e,
4. Avaliar as fases do Ciclo Celular.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

A literatura consultada para embasamento científico é discriminada nesta seção dividida em capítulos pertinentes a cada item de relevância para a condução desta pesquisa.

3.1 BOVINOCULTURA NO BRASIL

O Brasil destaca-se no cenário internacional dos líderes da produção bovina com um total de mais de 207 milhões de cabeças de gado. O crescimento da bovinocultura é estimulado pela ampliação do mercado interno e pelo aumento da demanda internacional. (http://members.tripod.com/~netopedia/geogra/rebanhos_brasileiros.htm, Acesso: 22/05/2006; http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producao_agropecuaria/abate_leite_couro_ovos_200704_1.shtm, Acesso: 31/03/2008).

O Brasil é o maior exportador de carne bovina, com cerca de 3.366.099 toneladas de carne oriundas de 14.815.818 animais abatidos em 2008 (<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos>, Acesso em 23/11/2008). Detêm 15% do rebanho, 12% da produção e pouco mais de 10% do comércio global. O Brasil é o 5º maior consumidor per capita de carne bovina do mundo, com uma disponibilidade média de 40 kg/hab/ano (FLORIANI, 2001).

3.2 PLACENTA BOVINA

A placenta bovina é classificada como cotiledonária apresentando macroscopicamente dois componentes: 1) a membrana intercotiledonar, que ocupa cerca de 80% da superfície endometrial e constituída por uma camada simples de células trofoblásticas uninucleadas mantidas por tecido conjuntivo e suprida pelos vasos alantóicos; 2) os placentônios geralmente em números entre 70 a 140 (ANDERSEN, 1927), apresentando um complexo interdigitante na interface materno-fetal com vilos primários, secundários e terciários. Seu interior é constituído por células fetais binucleadas (BNC), as quais migram para formar

células tri e multinucleadas por fusão com as células epiteliais endometriais as quais são susceptíveis a apoptose no interior do placentônio. Os placentônios são responsáveis pela nutrição fetal pelo provimento de nutrientes oriundos da secreção de glândulas uterinas adjacentes às membranas intercotiledonárias (HOFFMAN; SCHULER, 2002).

3.3 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 do sistema imune materno. 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 intervilo (FOIDART, 1992; BURTON; JAUNIAUX; WATSON, 1999; JAFFE; JAUNIAUX; HUSTIN, 1997; 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. Conseqüentemente, 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).

3.4 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 catabolismo 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 sinciciotrofoblasto 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). Em bovinos, a progressão da atividade da IDO foi descrita de acordo com a progressão da gestação, em direta relação, sendo explicado pelo comportamento placentário diferenciado durante a gestação, ou seja, no início da gestação, a placenta bovina apresentava-se justaposta ao epitélio uterino enquanto que em idade gestacional avançada, verificava-se uma maior interação materno-fetal devido ao maior desenvolvimento dos

capilares uterinos levando a um aumento da exposição dos antígenos fetais ao sistema imune materno (OLIVEIRA, 2005).

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 et al., 2003); rejeição de fetos alogênicos (KAMIKURA 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 (REIBNEGGER; EGG; FUCHS, 1986; KRISTIANSEN; LARSEN; POCIOT, 2000; SALOMON; BLUESTONE, 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, 2003; LIANG et al., 2006;). Além disso, sugere-se que as células produtoras de IDO possuem um papel na prevenção do início de desordens auto-imunes (LIANG et al., 2006). Alguns mediadores de inflamação incluindo o mais potente, Interferon γ (IFN- γ) induz a produção de IDO. Provou-se pela primeira vez que a enzima IDO tem ampla ação antiinflamatória em investigações realizadas em biopsias de lesões de pacientes com doença inflamatória e também demonstrado que o T helper 1 (Th-1), IFN- γ e o fator de necrose tumoral (TNF- α) 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).

3.4.1 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 do 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 freqüentemente 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).

3.4.2 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 (MOFFETT; NAMBOODIRI, 2003).

3.4.3 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 subsequente 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 a 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.

3.5 MECANISMOS DE RELAÇÃO

A expressão da IDO parece estar relacionada à produção de Interferon γ (INF- γ) pelas células dendríticas sendo esta desencadeada pelo estabelecimento de ligação com o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4) (FINGER; BLUESTONE, 2002; GROHMANN et al., 2002).

O CTLA-4 é expresso nas células T após a ativação, e pode se ligar ao B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) em células apresentadoras de antígenos (APCs), com alta afinidade por CD28 (OOSTERWEGEL, et al. 1999; GREEN, 2000; ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001). O CTLA-4 é um regulador negativo da ativação de células T, mas este mecanismo não está completamente entendido (LEE; CHUANG; GRIFFIN, 1998; OOSTERWEGEL et al., 1999; ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001). As formas recombinantes solúveis do CTLA-4 (CTLA-4-Fc) mostraram a indução da expressão de IDO em ratos (FINGER; BLUESTONE, 2002; GROHMANN; FALLARINO; BIANCHI, 2003) e nas células dendríticas de humanos (MUNN; SHARMA; LEE, 2002).

O CTLA-4 ligado a moléculas B7 nas células dendríticas desencadeia a produção de Interferon γ (INF- γ), resultando na indução da expressão de IDO. A fusão da proteína solúvel CTLA-4 imunoglobulina (CTLA-4 Ig), que bloqueia competitivamente os ligantes do CD28, B7.1 e B7.2, pode prevenir a rejeição de alotransplantes e xenotransplantes em modelos murinos de transplantes cardíacos (TURKA, 1992), hepáticos (LI, 2001) e de ilhotas pancreáticas (LENSCHOW, 1992).

Da mesma forma que a relação entre o INF- γ e a IDO estabelece-se, o B7.1 e o B7.2, proteínas do tipo I da superfamília das imunoglobulinas, expressas pelas células B ativas, células T ativas (B7.1), macrófagos, células dendríticas interdigitantes, células de Langerhans, células dendríticas do sangue periférico, células B de memória e células B em

centros germinativos (B7.2), demonstram agir sobre a expressão da IDO, devido a sua capacidade em ligar-se aos receptores CD28 e CTLA-4 (ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001; COILE; GUTIERREZ-RAMOS, 2001; SHARPE; FREEMAN, 2002). Relata-se ainda que as células dendríticas respondendo ao CTLA4-Ig ligada a moléculas de B7 (CD80/86) que expressavam IDO funcional e, a habilidade do CTLA4-Ig em atrasar a rejeição de transplantes alográficos parcialmente dependente de IDO (GROHMANN et al., 2002).

3.6 HORMÔNIOS

Este capítulo será dividido em subitens para melhor entendimento.

3.6.1 Progesterona

A gestação é uma condição fisiológica na qual ocorrem várias mudanças imunoendócrinas com a finalidade de facilitar a imunossupressão e a tolerância aos antígenos paternos e fetais (PEREIRA, 2005). Nos mamíferos é caracterizada por um aumento de Progesterona, Estradiol e prolactina, além de vários hormônios placentários (BAXTER; SMYTH, 2002). Sugere-se que a Progesterona inibe a resposta imune para manter a gestação produzindo mais células dendríticas imaturas.

A Progesterona é um importante fator na manutenção da gestação em humanos e animais. Estudos têm mostrado uma baixa resposta imune durante a gestação sendo uma das muitas hipóteses para tentar explicar a tolerância fetal. Siiteri et al. (1977) e Steckel et al. (2003) propuseram que a Progesterona é responsável por proteger o conceito do ataque do sistema imune materno por inibição de células T. Outros estudos também foram desenvolvidos atentando para o papel regulatório da Progesterona na biologia de linfócitos uterinos, pois a mesma apresenta 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). A Progesterona pode modular a diferenciação, maturação e função das células

dendríticas para mudar a função do sistema imune materno (LIGAM et al., 2005). 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. Proteínas com atividade imunossupressiva produzidas sob a influência de Progesterona são encontradas no endométrio de ruminantes e podem alterar a proliferação, ativação e funções efetoras de células neste local, promovendo mecanismos indiretos para a Progesterona mediar a imunossupressão (PELTIER, 2003).

O imuno-modulador melhor estudado da interface materno fetal é a Progesterona, que tem um papel evidente na sobrevivência do enxerto fetal. Numerosas experiências têm demonstrado que a Progesterona bloqueia o estimulador da proliferação mitogênica linfocitária, melhora o tempo de sobrevivência do enxerto, modula a produção de anticorpos, diminui a quebra oxidativa dos monócitos, reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos na resposta a produtos bacterianos, e altera a secreção de citocinas nos clones das células T para favorecer a produção de IL-10. Deste modo, observa-se que a Progesterona atua diretamente na desestimulação da resposta imuno-endócrina pela sua interação com diversos receptores de membrana responsáveis pelo aumento da resposta imune, como o aumento da proliferação de linfócito T (dependente de Triptofano), em adição, observa-se a diminuição da resposta imune em presença de níveis de IDO que interfere sobre o Triptofano circulante (PELTIER, 2003).

O Estradiol e Progesterona desempenham efeitos diferenciados na regulação do equilíbrio Th1/Th2, observa-se que a Progesterona atua no aumento da produção de IL-4 e IL-10 pelas células T, promovendo assim a diferenciação das células T. A gestação resulta em uma supressão da resposta imune celular, e, também na preservação, sendo em algumas vezes relacionado ao aumento da imunidade humoral (PEREIRA, 2005).

3.6.2 Estradiol

O placentônio é um componente crucial da placenta bovina, sendo o maior local de esteroidogênese placentária, ao 150º dia de gestação evidencia-se a síntese de Progesterona que não somente suporta o corpo lúteo durante a gestação, mas também estimula o crescimento dos placentônios (HOFFMAN; SCHULER, 2002). O desenvolvimento vascular dentro do placentônio possui uma correlação direta com o crescimento fetal, sobre o qual,

observa-se que o aumento da exigência nutricional reflete significativamente sobre a função e desenvolvimento do placentônio no primeiro terço da gestação (PETTERSSON et al., 2004; KANNEKENS et al., 2006).

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 Tryptofano (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; STOBER; 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). Estrogênio 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 (ITO et al., 2002; MUNN et al., 1999), 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-d-Triptofano (1-MT), indicando que a exposição das células dendríticas ao Estradiol induz a supressão de células T dependentes da IDO (TERNESS, et al. 2002; XIAO; LIU; LINK, 2004; LIANG et al., 2006).

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e os métodos empregados nesta investigação são descritos neste capítulo.

4.1 MATERIAL

O material utilizado é oriundo de placentônios de gestações de fetos normais coletados em abatedouro localizado em São José dos Campos (Frigorífico Mantiqueira). Foram utilizadas 15 amostras de cinco vacas prenhes em cada um dos três terços gestacionais para a técnica de citometria de fluxo e amostras de quatro vacas prenhes em cada um dos três terços de gestação para a realização das outras técnicas.

O projeto foi desenvolvido com aprovação da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo nº 963/2006).

4.2 MÉTODOS

Os métodos utilizados estão descritos no item que se segue.

4.2.1 Cultivo Celular

Os placentônios coletados foram lavados em tampão fosfato (PBS) e mantidos em gelo até o processamento. O material coletado foi colocado sobre uma placa de Petri para a retirada do excesso de epitélio alantoidiano com o uso de pinça e tesoura estéreis. Os placentônios foram então seccionados e fragmentos da região da interface materno fetal (entre a carúncula uterina e o cotilédone fetal) foram coletados. Com a aplicação da técnica de separação mecânica os fragmentos foram colocados sobre uma malha de aço com 300 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 (270 G, por 5 minutos à 4°C). Após a centrifugação o meio foi removido e as células foram suspensas em 30 ml de meio de cultura. O passo seguinte foi à 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 1×10^7 células foi colocada em placas de cultura contendo 24 wells com área de 1,76 cm² e estas células foram mantidas por 3 dias para a realização das análises nos dias propostos (D0-2h, D1-24h e D3-72h). As placas foram cultivadas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ com 2 ml de D-MEM. O meio de cultura foi trocado 24 horas após o início do cultivo.

Inicialmente, fizemos o cultivo celular e analisamos as células nos dias 0, 1, 5 e 10, mas devido a problemas com contaminação das células, quando trocamos a técnica de citometria pela imunocitoquímica, alteramos os dias de análises e passamos a utilizar os dias 0, 1 e 3.

As condições experimentais foram:

- Meio de cultura (D-MEM);
- Meio de cultura com Progesterona (Imunossupressor durante a gestação) (0,08µl Acetato de medroxi Progesterona Promone-E®);
- Meio de cultura com Estradiol (0,25ml E.C.P.® (Cipionato de Estradiol) (XIAO; LIU; LINK, 2004);
- Meio de cultura com Triptofano (substrato para proliferação de linfócitos T) (250µM) (MUNN; SHARMA; MELLOR, 2004);
- Meio de cultura com inibidor da IDO (1- Metil – D - Triptofano) (1 mg /ml) (BOASO, et al.2005);
- Meio de cultura com Interferon γ (10ng/ml) (GROHMANN; FALLARINO; PUCCETTI, 2003; HEIKKINEN et al., 2003).

4.2.2 Citometria de Fluxo

Com a utilização da citometria de fluxo mensuramos a porcentagem de células expressando IDO. Nos dias estabelecidos para as análises, as células foram desprendidas das placas e a suspensão celular foi lavada em três ciclos de 1600rpm por 5 minutos a 20°C.

Depois de eliminado o sobrenadante o pellet de células foi re-suspenso em volume adequado de D-MEM com 10% de soro fetal bovino para a obtenção de uma suspensão contendo 1×10^6 células.

As células foram incubadas anticorpo primário anti-IDO sheep anti human policlonal IgG anti IDO, Chemicon, USA), por 30 min. Após esse período, as células foram lavadas por três vezes com PBS 0,1M e incubadas com 50 μ l anticorpo secundário de goat anti-sheep marcado com Texas Red (diluição de 1:100 em PBS 0,1M, pH 7,4) por 20 min protegido da luz. As células foram lavadas por três vezes em PBS 0,1M e depois analisadas em citômetro de fluxo (BD FACScalibur).

Foi utilizado também, o anticorpo primário anti-IDO mouse anti human monoclonal IgG (Upstate, USA), por 30 min. Após esse período, as células foram lavadas por três vezes com PBS 0,1M e incubadas com 50 μ l anticorpo secundário de goat anti-mouse marcado com FITC (diluição de 1:100 em PBS 0,1M, pH 7,4) por 20 min protegido da luz. As células foram lavadas por três vezes em PBS 0,1M e depois analisadas em citômetro de fluxo (BD FACScalibur).

Foram testados protocolos de permeabilização celular com Triton X-100 e com Tween 20 em diferentes concentrações, tempos e temperaturas, conforme descritos abaixo:

- Protocolo 1- permeabilização com Tween 20 (0,2%) por 15 minutos a 37°C;
- Protocolo 2- permeabilização com Triton X-100 (0,1%) em temperatura ambiente por 30 minutos, após este período foi adicionado metanol 50% e foi feita incubação de 10 minutos a 4°C;
- Protocolo 3- permeabilização com Triton X-100 (0,1%) a 37°C por 30 minutos; após este período foi adicionado metanol 50% e foi feita incubação de 10 minutos a 4°C;
- Protocolo 4- permeabilização com Triton X-100 (0,3%) a 4°C por 15 minutos; após este período foi adicionado metanol 70% e foi feita incubação a 4°C por 45 minutos;

Logo após as incubações com os permeabilizantes as células foram lavadas e incubadas com o anticorpo primário por uma hora em temperatura ambiente e posteriormente com o anticorpo secundário. Foram testados os dois anticorpos primários descritos acima e, conseqüentemente os dois anticorpos secundários.

4.2.3 Imunocitoquímica e quantificação celular

Devido ao fato de ocorrência de inespecificidade dos anticorpos à IDO-bovina o uso de citometria de fluxo proposta anteriormente foi alterado, desta forma, decidimos quantificar as células que expressam IDO com o emprego dos princípios da Estereologia associada à imunocitoquímica.

A estereologia baseia-se em fazer estimativas quantitativas em todo o padrão geométrico do objeto de interesse. Os padrões disponíveis para quantificação são número, comprimento, área de superfície e volume. Neste caso estamos quantificando o número de células que expressam IDO. Fizemos as reações de imunocitoquímica utilizando as células em cultivo nos mesmos dias e condições experimentais já citados anteriormente (Capítulo 4.2.2), o anticorpo de escolha foi o anti-IDO sheep anti human policlonal IgG (Chemicon, USA), pois em testes prévios este anticorpo mostrou um melhor desempenho quando comparado ao outro anticorpo (anti-IDO mouse anti human monoclonal IgG - Upstate, USA).

As células em cultivo foram desprendidas das placas e centrifugadas por 5 minutos, 400 G a 4°C. Após a centrifugação foi feita a contagem das células com o uso da câmara de Neubauer e corante Azul de Tripán para determinar a concentração de células viáveis. 1×10^5 células foram separadas e suspensas em 100µl de tampão fosfato (PBS), este volume foi dividido em 2 lâminas com 50µl onde foi feito um esfregaço celular. O mesmo procedimento foi realizado para a confecção de duas lâminas que foram utilizadas como controle negativo. As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e, imediatamente após a secagem das lâminas as mesmas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena seguido do bloqueio com albumina sérica bovina (BSA) e incubação com o anticorpo primário overnight. Seguindo-se a incubação com o anticorpo secundário e Streptavidina e finalmente a revelação com DAB (Diaminobenzidina).

Com as lâminas prontas iniciamos os trabalhos de quantificação. De posse das lâminas, estas foram levadas ao microscópio óptico para captura das imagens. Todos os campos do esfregaço foram fotografados. Após a obtenção das imagens estas foram analisadas com o uso de sistemas teste colocados sobre a tela do computador para a quantificação das células marcadas. O sistema teste é composto por 4 grids contendo linhas de inclusão (linhas cheias) e linhas de exclusão (linhas pontilhadas) (Figura 1). Toda a célula presente no interior das grids que não toquem nas linhas de exclusão serão computadas, ao

término da contagem fizemos o cálculo do número total de células que expressam IDO com o uso da seguinte fórmula:

$$N_{\text{total}} = \sum \text{células} \times \sum n^{\circ} \text{ grids}$$

Onde:

N_{total} = número total de células que expressam IDO

$\sum \text{células}$ = número de células marcadas contadas

$\sum n^{\circ} \text{ grids}$ = número total de grids contadas

Figura 1 - Fotomicrografias as quais foram adicionados os sistemas teste composto por linhas de inclusão (linhas pontilhadas) e linhas de exclusão (linhas cheias). Toda célula positiva (citoplasma castanho) presentes no interior do sistema teste ou tocando as linhas de inclusão são contados (setas), as células negativas ou as positivas que tocarem nas linhas de exclusão não são contadas (*)

4.2.4 Immunoblotting

Com o método de Immunoblotting buscamos qualificar e quantificar a expressão da IDO nos placentônios usando anticorpo contra IDO. Para isso, utilizamos eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas de acordo com o peso molecular. As proteínas foram extraídas com a utilização de solução de extração composta por DTT (Diidroteridol), PMSF (Fenil Metilsulfonil fluoreto), SDS (Sódio dodecil sulfato), glicerol, e Tris (pH 6,8) e a quantificação das mesmas foi realizada pelo método de Bradford com o uso da técnica de ELISA. As amostras excedentes foram alíquotadas e congeladas a -20°C para outras análises. Alíquotas contendo 160µg de proteína adicionadas de tampão de amostra (composto por TRIS, glicerol, SDS - sódio dodecil sulfato e β mercaptoetanol), foram colocadas no gel de poliacrilamida. As amostras foram submetidas a uma voltagem de 100V para que pudessem correr no gel, o tempo de corrida variou entre 2h a 2h e 30 min. Após a corrida as amostras presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde a membrana foi colocada face-a-face com o gel, e uma corrente elétrica foi aplicada entre grandes placas de cada lado, então as proteínas carregadas se moveram do gel para a membrana mantendo a mesma disposição que continham no gel. Ao término da transferência testamos, na membrana de nitrocelulose, o mesmo anticorpo primário descrito na técnica de citometria de fluxo (anti-IDO monoclonal mouse anti human - Upstate, USA) e posteriormente utilizamos o anticorpo secundário (Blotting Grade Affinity Purified, Goat Anti-Mouse IgG (H+L) – HRP Conjugate, Bio Rad) e revelamos com o kit ECL. Após a revelação das amostras passamos para a etapa final onde revelamos a membrana em filmes de Raio X.

4.2.5 Peroxidação lipídica (LPO) por meio da quantificação espectrofotométrica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no sobrenadante da cultura primária de células placentárias

Efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos já eram conhecidos no final do século XIX (LORRAIN-SMITH, 1899), tornando-se objeto de intensa investigação científica nos últimos anos (HALLIWELL, 2000). Estes efeitos são resultantes da oxidação de

componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lípidos, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), mediada por espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), conhecidas genericamente como radicais livres (RL) (GILLER; SIGLER, 1995; ROMERO et al., 1998). A reação destas espécies com os AGPI, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001).

O método da peroxidação lipídica segue o que foi descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990), que se baseia na determinação de malonaldeído (MDA) devido à sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Aldeídos sempre são produzidos em processos de peroxidação lipídica, sendo o malonaldeído o mais abundante. Cada molécula de MDA reage com duas moléculas de TBARS, gerando uma coloração que pode ser detectada em espectrofotômetro.

Para a avaliação da peroxidação foi utilizada a técnica de Ohkawa et al. (1979), baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), predominantemente o malonaldeído (MDA), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. Estes compostos produzem uma coloração característica (rosa), que foi medida espectrofotometricamente no comprimento de onda de 535nm. Com esta técnica avaliamos a degradação oxidativa de ácidos graxos presentes em sobrenadante da cultura de células placentárias adicionadas de fatores conforme descrito na tabela abaixo (Tabela 1). Foram feitas duas seqüências de *wells* com os fatores, sendo que, em uma das seqüências também adicionamos 0,54µg de anticorpo anti-IDO (anti-IDO monoclonal mouse anti human - Upstate, USA).

Tabela 1 - Dosagens dos fatores utilizados no delineamento experimental

Fatores	Concentração
Controle	--
Estradiol	1 µl/ml
Estradiol	10 µl/ml
Progesterona	0,04 µl/ml
Progesterona	0,4 µl/ml
Progesterona	4 µl/ml
Interferon α	10 µl/ml
Triptofano	10 µl/ml
1-Metil Triptofano	10 µl/ml

Alíquotas de 50µL do sobrenadante da cultura primária de cada amostra, conforme delineamento experimental foi avaliado nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Em uma série foram adicionados 250µL de TCA (ácido tricloroacético 20%) e em outra 250µL de TCA 20% e TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,86% na proporção v/v. As amostras foram mantidas por 10 minutos em banho-maria, a 100°C. Após este período os tubos correspondentes de TCA e TCA/TBA foram imediatamente imersos em gelo por 10 minutos e centrifugados por 4 minutos a 10000 G.

Foram retirados 50µL do sobrenadante de cada amostra e acondicionados em placa de 96 orifícios, conforme delineamento experimental. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535nm. O cálculo da medida da lipoperoxidação foi realizado subtraindo-se os valores do branco de cada série e a absorbância média da série de TCA foi obtida pela diferença da absorbância da TCA/TBA e dividindo-se pelo coeficiente molar do malonaldeído (MDA), conforme a expressão matemática:

$$LPO = \frac{(\text{média da absorbância TCA/TBA - branco}) - (\text{média da absorbância TCA - branco})}{0,0312 \text{ (coeficiente de molar MDA)}}$$

Os resultados foram expressos em nmoles de MDA/mL de sobrenadante (nmoles/mL).

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

Em biologia, chama-se ciclo celular o conjunto de processos 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).

4.2.6.1 Fases do ciclo celular – Interfase

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 G_1 :** 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 G_2 :** período de síntese de moléculas necessárias à divisão celular.

4.2.6.2 Regulação do ciclo celular

O ciclo celular pode parar em determinados pontos e só avança se determinadas condições se verificarem, tais como a presença de uma quantidade adequada de nutrientes ou quando a célula atinge determinadas dimensões. A regulação do ciclo celular é realizada por ciclinas e por quinases ciclino-dependentes. Certas células, como os neurônios, param de se dividir quando o animal atinge o estado adulto, mantendo-se durante o resto da vida do indivíduo na fase G_0 . Existem três momentos em que os mecanismos de regulação atuam:

- **Na fase G_1 :**

No fim desta fase existem células que não iniciam um novo ciclo ou que não estão em condições de fazê-lo, essas células permanecem num estágio denominado G_0 .

As razões para a célula passar para o estágio G_0 podem ser:

- Células que não se dividem mais, essas células permaneceram neste estágio até a sua morte, são exemplos os neurônios e as células das fibras musculares;
- Células que não obtiveram a quantidade de nutrientes necessária;
- Células que não atingiram o tamanho requerido.

- **Na fase G_2 :**

- Antes de iniciar-se a mitose existe outro momento de controle caso a replicação do DNA não tenha ocorrido corretamente o ciclo pode ser interrompido e a célula volta a iniciar a fase S.

- **Na metáfase:**

- No final da metáfase evidenciam-se mais um mecanismo de regulação responsável pela verificação da ligação do fuso acromático com os cromossomos, de forma a que migre sempre uma das cromátides para os pólos.

A citometria de fluxo aplicada no estudo do ciclo celular registra os parâmetros cinéticos da população, revelando o índice de DNA, ploidia, a fração de proliferação celular, a porcentagem de células encontradas nas fases G0/G1, S e G2/M, indicando parâmetros uni ou multivariáveis, prognósticos e possíveis direções terapêuticas.

Foram separadas $2,5 \times 10^5$ células/mL ressuspendidas em etanol 70% na presença de 1µg de RNase por 2 horas, ou a -20°C para posterior análise das fases do ciclo celular. As suspensões celulares foram centrifugadas duas vezes a 3000rpm com solução *PBS* e ressuspendidas em 200µL solução de iodeto de propídio (20mg/mL, Sigma®), 20µL de Triton X-100 e 4mg RNase - A, por trinta minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz e transferidas para tubos de citometria, as imagens adquiridas em citômetro de fluxo (Scalibur-Becton e Dickson). As fases do ciclo celular pré e pós-mitóticas (hipodiplóide, G0-G1, fase S e G2-M) foram analisadas em software Modi-fit.

4.2.7 PCR

A extração do RNA total foi realizada a partir do protocolo de Trizol®. Cerca de 20mg de tecido (placentônios de 4 animais de cada trimestre gestacional) foi pesado ainda congelado e acrescido de 300µl de Trizol e homogeneizados manualmente com o uso de um pistilo de vidro. O homogenato foi armazenado em gelo e acrescido de 700µl de Trizol. Foi centrifugado a 12000G por 10 minutos a 4°C , o sobrenadante foi removido e mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período, 200µl de clorofórmio foram adicionados e as amostras centrifugadas por 15 minutos a 4°C e 12000G.

Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 500µl de isopropanol, homogeneizados suavemente e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas (10 minutos, 4°C , 12000G) e o sobrenadante foi descartado, o precipitado composto pelo RNA-Total foi solubilizado com 1ml de álcool 75% diluído em água DMPC (Dimetilpropil Carbonato, 0,1%). Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos, 7500G a 4°C , o excesso de álcool foi removido e o precipitado foi solubilizado em 49µl de água destilada tratada com DMPC.

Para a quantificação do RNA total as amostras foram diluídas na proporção de 1µl de amostra para 49µl de água destilada tratada com DMPC. A quantificação foi realizada no

Biofotômetro (Eppendorf, Deutschland, Germany) 260/280nm. A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR. Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen®, Carlsband, USA), o volume da solução de RNA total a ser tratado com DNase foi calculado a fim de conter 1µg de RNA total, a este volume foi adicionado 1µl de tampão DNase, 1µl de DNase I e água “RNase free” (água MilliQ autoclavada) suficiente para completar 10µl. Essa solução foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1µl de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10 minutos no Termociclador, em seguida foi adicionado 1 µl de dNTP e 1 µl de Oligo dt, sendo novamente incubado em Termociclador por 5 minutos a 65°C.

Para a reação de transcrição reversa (RT), foi utilizado o Kit Superscript III (Invitrogen®, Carlsband, USA) cujo protocolo iniciou-se pela adição em tubo estéril de 8µl de uma solução composta por 4µl de tampão, 1µl de DTT (0,1M), 1 µl de “RNase OUT Inhibitor” (40 unidades/µl), 1µl de SuperScript III (transcriptase reversa), 1µl de água e, iniciou-se a incubação por 50 minutos a 37°C seguida de incubação a 70°C por 15 minutos e finalmente a 4°C por 2 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação do gene alvo pela técnica de PCR em tempo real.

Após a transcrição reversa (RT), foi realizado o PCR em Tempo Real no aparelho ABIPrism® 7500 (Applied Biosystems, Foster, USA). Neste sistema, as fases de anelamento, extensão e desnaturação ocorrem durante os ciclos de maneira similar quando da utilização do termociclador comum, uma vez que o ABIPrism 7500 é um termociclador acoplado a uma câmera CCD. A diferença é que a amplificação da seqüência alvo é detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre quando há formação de dupla fita na região codificada pelo par de primers. A quantificação relativa da amplificação é feita pela fluorescência captada pela unidade óptica do aparelho, sendo detectada onde as condições “ótimas” para o PCR são mantidas, ou seja, na fase exponencial.

Como controle interno das reações de PCR em tempo real foi utilizada a amplificação do gene Tubulina a fim de normalizar os resultados obtidos para o gene-alvo (IDO). O PCR para amplificação do gene alvo e da Tubulina foi realizado utilizando o sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Foster, USA). Foi preparada uma mistura (Mix) para cada gene, neste mix foram adicionados, por amostra a ser analisada, 6,25µl de tampão Universal PCR Máster Mix (Applied Biosystems, Foster, USA), 0,5µl de primer sense e 0,5µl de primer anti-sense (concentração final de 900mM) e 0,5µl de sonda (concentração final de 250mM) 3,25µl de

água milliQ autoclavada e 2,5µl de cDNA para um volume de 13µl que foi dividido em dois tubos ou poços contendo 12,5µl cada.

O cálculo de eficiência para o gene alvo foi feito através do programa “LinRegPCR” (RAMAKERS et al., 2003). Para isso, considerou-se a eficiência média com base na curva de amplificação individual de cada amostra. O cálculo da eficiência foi feito pela fórmula $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, na qual E= eficiência e slope = valor obtido a partir da curva padrão gerada pelo aparelho ABI 7500.

O cálculo da quantificação relativa do gene alvo foi feito com o uso da fórmula de Pfaffl:

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}} (\text{calibrador} - \text{amostra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}} (\text{calibrador} - \text{amostra})}}$$

R (ratio) = expressão relativa do gene alvo

E_{target} = eficiência de amplificação do gene alvo (IDO)

E_{ref} = eficiência de amplificação do gene de referência (Tubulina)

$\Delta CP_{\text{target}}$ = CP do gene alvo – CP do gene referência

ΔCP_{ref} = CP do gene alvo – CP do gene referência

O oligonucleotídeo iniciador ou primer foi selecionado no GeneBank, obtidas por meio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>), sendo esta sequência utilizada para a confecção do primer G A G G A C C T A C C T C A T C C T T A T G A T G C C T G G A T C T C T A T T G C T A G A A A T C T G C C T G A A C T G A T C A A G A A C A A C C A G T G T G G A A G T T G A G A A G T T A G C A A C A C T C A A C A T T G A T G G C C T C C G A G C C A C A G G G C A C A G C G C C T G G C A C A C T T G G T T C T G G G A T A C A T C A C G A T G G C G T A T G T G T G G G G T C A A G G C G A T G G A G A C A T C C G A A A G.

4.2.8 Imunofluorescência

Os placentônios coletados foram recortados em pequenos fragmentos e congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente o material foi seccionado com o auxílio de criostato em uma espessura de 7µm e colocados sobre lâminas silanizadas. Foi feito o bloqueio com BSA (albumina sérica bovina) seguido da incubação com os anticorpos primários separadamente: anticorpo primário anti-IDO mouse anti human monoclonal IgG (Upstate, USA), anti-IDO sheep anti human policlonal IgG (Chemicon, USA), anti-CTLA-4 anti mouse (R&D Systems, USA), anti-CD80 (anti human B7.1) (R&D Systems, USA) e anti-CD86 (anti human B7.2) (R&D Systems, USA) “overnight”. Após esse período as amostras foram lavadas e incubadas com os anticorpos secundários com o uso de duas fluorescências (FITC equino conjugado com anti-mouse e TEXAS RED ovelha conjugado com anti-coelho) em PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo as amostras foram lavadas por três vezes e feita a contra-coloração com DAPI ou PI por 20 minutos.

Os cortes de tecidos placentários foram observados em microscópio de captura de imagem Zeiss para análise da marcação com os anticorpos.

Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados encontrados nesta pesquisa são discorridos em tópicos.

5.1 CITOMETRIA DE FLUXO

As células isoladas dos placentônios bovinos de 15 gestações de fetos normais (cinco em cada trimestre gestacional) foram analisadas quanto à expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase por Citometria de fluxo.

A viabilidade celular encontrada foi de aproximadamente 50%. E a marcação das células que expressam IDO foi extremamente baixa estando os valores médios obtidos descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Valores médios (%) obtidos pela citometria de fluxo quando analisamos a quantidade de células que expressam IDO

		Controle	Estradiol	Progesterona
D0	Primeiro trimestre	0,025	0,025	0,175
D1		0,015	0,02	0,05
D5		0,02	0,01	0,02
D10		0,01	0,015	0,03
D0	Segundo trimestre	0,04	0,09	0,145
D1		0,02	0,025	0,025
D5		0,03	0,04	0,02
D10		0,025	0,02	0,04
D0	Terceiro trimestre	0,015	0,01	0,035
D1		0,01	0,025	0,01
D5		0,03	0,04	0,02
D10		0,04	0,015	0,03

As células submetidas à citometria de fluxo nos dias determinados anteriormente, demonstraram expressão inespecífica para o anticorpo em questão, como é demonstrado na figura 2 (*Density plots* e Histogramas). A permeabilização das células também não levou a resultados favoráveis (Figura 3).

Figura 2 - *Density plot* e histograma de culturas celulares de placentônios bovinos em primeiro trimestre gestacional. O *density plot* (vermelho) representa as populações celulares encontradas, enquanto que o histograma (azul) demonstra a porcentagem de células que expressam IDO, neste caso não observamos marcação

Figura 3 - *Density plot* e histograma de cultura celular de placentônio bovino em primeiro trimestre gestacional mantida em cultura por um período de 24h. O *density plot* (vermelho) representa as populações celulares encontradas, enquanto que o histograma (azul) demonstra a porcentagem de células que expressam IDO

Devido aos resultados obtidos para a placenta bovina serem inespecíficos decidiu-se testar o anticorpo em questão em placenta humana a termo, desta forma os resultados obtidos estão descritos na tabela 3 e gráfico 1.

Tabela 3 - Valores em porcentagem obtidos pela citometria de fluxo quando analisamos a quantidade de células que expressa IDO na placenta humana a termo

	Controle	Estradiol	Progesterona	Interferon	Triptofano	1MT
D0	29,46	41,61	33,14	37,04	48,41	32,27
D1	27,83	27,82	27,92	24,56	32,06	22,73
D3	1,45	3,31	8,39	2,99	1,45	1,45

Gráfico 1 – A adição de todos os fatores às células da placenta humana a termo, quando comparamos com o grupo Controle, leva ao aumento no número de células que expressam IDO (Dia 0), analisadas por citometria de fluxo. Com o uso de Estradiol e Progesterona observamos que no Dia 1 os valores diferem pouco e com três dias de cultivo (D3) ocorre o aumento na porcentagem de células que expressam IDO. A adição de Interferon $\square$ reduz e o uso de Triptofano aumenta a quantidade de células que expressam IDO, no Dia 1. Após 3 dias de cultivo a adição de Interferon $\square$ leva ao aumento e a adição de Triptofano leva a diminuição na porcentagem de células que expressam IDO. A adição de 1-Metil-Triptofano às células da placenta humana a termo, quando comparamos com o grupo Controle, leva a uma redução na porcentagem de células que expressam IDO, no Dia 1. Após 3 dias de cultivo a adição de 1-Metil-Triptofano mostra a mesma quantidade de células que expressam IDO quando comparado com o grupo Controle

5.2 IMUNOCITOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO CELULAR

Foram quantificados doze animais, sendo quatro em cada trimestre gestacional, os resultados obtidos estão descritos nas tabelas e gráficos abaixo (Tabelas 4 a 6 e Gráficos 2 a 4).

Tabela 4 - Valores médios demonstrando a porcentagem de células que expressam IDO. 1T –primeiro trimestre de gestação. Nenhum dos resultados obtidos diferiram entre si estatisticamente, quando comparamos os grupos tratados com o Controle

1 T		Controle	Estradiol	Progesterona	Interferon	Triptofano	1- MT
D0	Média	16,87	17,53	19,10	13,70	14,23	14,00
	Erro Padrão	3,2	2,70	4,16	2,70	2,23	1,13
D1	Média	18,50	19,30	21,23	17,77	15,07	14,40
	Erro Padrão	4,12	4,27	5,28	2,03	2,40	0,18
D3	Média	12,87	15,30	12,93 ^b	14,67	14,90	13,00
	Erro Padrão	3,41	2,58	1,85	1,65	2,83	1,85

Gráfico 2 - Valores em porcentagem de células que expressam IDO. Podemos observar que a adição de Estradiol, Progesterona, Interferon ou Triptofano levam ao aumento no número de células que expressam IDO nos três dias analisados. Com a adição de 1-Metil-Triptofano ocorre a redução no número de células produtoras de IDO nos três dias analisados para os animais no primeiro trimestre gestacional

Tabela 5 - Valores médios demonstrando a porcentagem de células que expressam IDO. 2T –segundo trimestre de gestação. Nenhum dos resultados obtidos diferiram entre si estatisticamente, quando comparamos os grupos tratados com o Controle

2 T		Controle	Estradiol	Progesterona	Interferon	Triptofano	1- MT
D0	Média	8,88	7,95	9,35	14,38	10,78	7,30
	Erro Padrão	1,40	1,82	2,21	4,21	1,68	2,70
D1	Média	7,50	9,73	8,63	8,10	9,13	7,43
	Erro Padrão	2,21	2,57	1,81	0,51	3,15	1,49
D3	Média	12,05	10,75	10,00	12,68	14,45	11,60
	Erro Padrão	4,01	0,55	2,50	2,80	1,56	3,16

Gráfico 3 - Valores em porcentagem de células que expressam IDO. Podemos observar que a adição de Estradiol, Progesterona, Interferon ou Triptofano leva ao aumento no número de células que expressam IDO nos três dias analisados. Com a adição de 1-Metil-Triptofano ocorre a redução no número de células produtoras de IDO nos três dias analisados para os animais no segundo trimestre gestacional

Tabela 6 - Valores médios demonstrando a porcentagem de células que expressam IDO. 3T – animal de terceiro trimestre de gestação. Nenhum dos resultados obtidos diferiram entre si estatisticamente, quando comparamos os grupos tratados com o Controle

3 T		Controle	Estradiol	Progesterona	Interferon	Triptofano	1- MT
D0	Média	11,28	10,78	10,50	13,90	10,00	9,45
	Erro Padrão	1,90	3,06	1,85	3,56	2,00	2,64
D1	Média	11,15	17,43	14,9	14,98	12,20	8,13
	Erro Padrão	1,37	5,53	3,15	1,13	1,59	0,95
D3	Média	15,00	12,15	17,33	15,53	14,28	11,60
	Erro Padrão	4,40	6,26	4,20	3,07	1,70	1,48

Gráfico 4 - Valores em porcentagem de células que expressam IDO. Podemos observar que a adição de Estradiol, Progesterona, Interferon ou Triptofano leva ao aumento no número de células que expressam IDO nos três dias analisados. Com a adição de 1-Metil-Triptofano ocorre a redução no número de células produtoras de IDO nos três dias analisados para os animais no terceiro trimestre gestacional

5.3 IMUNOBLOTTING

Várias adaptações para a técnica de Imunoblotting foram testadas, no entanto, os resultados foram considerados em sua grande maioria inconclusivos, apesar de alguns ensaios terem demonstrado resultados plausíveis de análise. Os resultados foram considerados inconclusivos, pois na maioria dos casos, encontramos a proteína indoleamina marcada com anticorpo entre 90 e 119kDa (figura 4), para as amostras de proteína extraídas de células tanto da placenta humana quanto da placenta bovina, por outro lado quando observamos o gel antes da incubação com o anticorpo encontramos proteínas entre 30 e 35kDa (figura 5), sendo que o certificado comercial indica que a indoleamina deveria ser identificada a 42kDa.

Após a obtenção dos resultados inconclusivos quando foram utilizadas as células em cultura (~100kDa), decidimos testar o Imunoblotting com tecido, ou seja, utilizamos fragmentos dos placentônios dos quais a proteína foi extraída e o Imunoblotting realizado, com isso conseguimos observar bandas de proteínas com aproximadamente 35kDa (Figura 4).

Figura 4 – Fotografia da membrana de PVDF com as amostras das proteínas das células em cultura de um animal de de terceiro trimestre de gestação e uma amostra de células de placenta humana demonstrando a presença de proteína com massa molecular entre 90 e 119kDa (3T e PH – centro da imagem). Amostras dos placentônios de quatro animais de terceiro trimestre (3T, 1, 2 e 3), três animais de segundo trimestre (2T, 4 e 5) e três animais de primeiro trimestre de gestação (1T, 6 e 7). Observamos que, nas amostras de tecido, a proteína aparece com aproximadamente 35kDa

Figura 5 - Gel de poliacrilamida, anterior a incubação com o anticorpo, fotografado em câmara escura e analisado em programa Kodak 1D. Legenda: PH-Placenta Humana, IT - amostras de placenta bovina oriundas de três animais de primeiro trimestre de gestação (100µg de proteína). 1 a 7- Pesos moleculares: 1 – 195,535kDa; 2- 127,694; 3- 83,769; 4 – 40,188; 5 – 32,180; 6 – 17,188; 7 – 6,995. Podemos observar que a amostra da placenta humana apresentou peso molecular de aproximadamente 34kDa, e as amostras de placenta bovina apresentaram peso molecular de aproximadamente 36kDa

5.4 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO) POR MEIO DA QUANTIFICAÇÃO ESPECTOFOTOMÉTRICA DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) NO SOBRENADANTE DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS PLACENTÁRIAS

Os fatores adicionados nas culturas primárias de células placentárias, nos três trimestres gestacionais, e avaliados após 24, 48 e 72h mostraram diversidade nos resultados. Os dados estão descritos na tabela 7 (Anexo A).

5.4.1 Estradiol

Nossos resultados, quando comparamos o Grupo Controle ao Grupo Estradiol, para 1º terço de cultura de células avaliada com 24h de exposição ao Estradiol demonstraram que a adição do mesmo nas concentrações de 1 e 10µl/ml, na presença do anticorpo anti-IDO, levou ao aumento do potencial antioxidante. Apenas a concentração de 1µl/ml de Estradiol na ausência de anticorpo mostrou aumento no potencial antioxidante, enquanto que a concentração de 10µl/ml na ausência do anticorpo anti-IDO demonstrou redução na produção de radicais livres. Deste modo, o Estradiol a 1µl/ml, demonstrou uma ação protetora das células, uma vez que o aumento do potencial antioxidante reduz a disponibilidade de radicais livres, beneficiando a cultura celular. O Grupo Controle sem adição de anticorpo mostrou maior potencial antioxidante que o Grupo Controle com anticorpo (Gráfico 5).

Quando comparamos o Grupo Controle ao Grupo Estradiol, para 2º terço em cultura de células avaliada com 24h de exposição ao Estradiol demonstraram que a adição do mesmo nas duas concentrações utilizadas (1 e 10µl/ml), na ausência do anticorpo anti-IDO aumentaram o potencial antioxidante. Na presença do anticorpo anti-IDO, todas as concentrações utilizadas diminuíram o potencial antioxidante. O Grupo Controle com anticorpo anti-IDO apresentou maior potencial antioxidante que o Grupo Controle sem anticorpo (Gráfico 6).

Nossos resultados, quando comparamos o Grupo Controle ao Grupo Estradiol, para 3º trimestre gestacional em cultura de células avaliada com 24h demonstraram que a adição do mesmo nas duas concentrações (1 e 10µl/ml), na ausência do anticorpo anti-IDO levou ao aumento do potencial antioxidante. No grupo com adição de anticorpo somente a

concentração de 1µl/ml apresentou aumento no potencial antioxidante quando comparado ao Grupo Controle, enquanto que a concentração de 10µl/ml na presença do anticorpo anti-IDO demonstrou menor potencial antioxidante. O Grupo Controle com adição de anticorpo apresentou maior potencial antioxidante que o Grupo Controle sem anticorpo (Gráfico 7).

Gráfico 5 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o primeiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Estradiol 1 e 10µl/ml com e sem adição do anticorpo anti-IDO avaliados após 24h de cultivo

Gráfico 6 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o segundo trimestre gestacional, Grupo Controle, Estradiol 1 e 10 μ l/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 24 h de cultivo

Gráfico 7 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o terceiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Estradiol 1 e 10 μ l/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 24h de cultivo

Com 48 horas de cultivo no primeiro trimestre de gestação, a adição de anticorpo anti-IDO no Grupo Controle demonstrou um maior potencial antioxidante que o Grupo Controle sem anticorpo. Na ausência de anticorpo a adição de Estradiol nas concentrações de 1 e 10 μ l/ml ocasionaram o aumento no potencial antioxidante (Gráfico 8).

No segundo trimestre de gestação, o Grupo Controle sem anticorpo anti-IDO demonstrou um maior potencial antioxidante que o Grupo Controle com anticorpo. A adição de Estradiol nas duas concentrações utilizadas na ausência do anticorpo anti-IDO apresentaram menor potencial antioxidante quando comparados ao Grupo Controle e, na presença de anticorpo ocorreu o aumento no potencial antioxidante somente no grupo onde a concentração utilizada foi de 10 μ l/ml (Gráfico 9).

No terceiro trimestre de gestação, a ausência de anticorpo anti-IDO no Grupo Controle demonstrou um maior potencial antioxidante que o Grupo Controle com anticorpo. A adição de Estradiol nas duas concentrações na presença do anticorpo anti-IDO apresentaram maior potencial antioxidante em comparação ao Grupo Controle e, na ausência de anticorpo as concentrações de 1 e 10 μ l/ml de Estradiol levaram ao aumento do potencial antioxidante (Gráfico 10).

Gráfico 8- Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o primeiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Estradiol 1 e 10 μ l/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO avaliados após 48 h de cultivo

Gráfico 9 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o segundo trimestre gestacional, Grupo Controle, Estradiol 1 e 10 μ l/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 48 h de cultivo

Gráfico 10 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o terceiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Estradiol 1 e 10 μ l/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 48h de cultivo

Após 72 horas de cultivo, no primeiro trimestre gestacional apenas a concentração de 10 μ l/ml de Estradiol sem o anticorpo apresentou maior potencial antioxidante quando

comparados ao Grupo Controle, os Grupos Estradiol com adição de anticorpo anti-IDO nas concentrações de 1 e 10µl/ml apresentaram maior potencial antioxidante quando comparados ao Grupo Controle. A ausência de anticorpo anti-IDO no Grupo Controle demonstrou um maior potencial antioxidante que o Grupo Controle com anticorpo (Gráfico 11).

No segundo trimestre gestacional, após 72 horas de cultivo a concentração de 10µl/ml de Estradiol sem o anticorpo apresentou maior potencial antioxidante quando comparado ao Grupo Controle, apenas o Grupo com concentração 10µl/ml na presença do anticorpo demonstrou maior potencial antioxidante quando comparado ao Grupo Controle. A adição de anticorpo anti-IDO no Grupo Controle demonstrou um maior potencial antioxidante que o Grupo Controle sem anticorpo (Gráfico 12).

No terceiro trimestre gestacional, após 72 horas de cultivo a concentração de 1µl/ml de Estradiol na ausência de anticorpo apresentou maior potencial antioxidante quando comparado ao Grupo Controle sem anticorpo. O Grupo Estradiol com IDO na concentração de 10µl/ml apresentou maior potencial antioxidante que o Grupo Controle com IDO. O Grupo Controle sem anticorpo apresentou maior potencial antioxidante que o Grupo Controle com anticorpo (Gráfico 13).

Gráfico 11 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o primeiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Estradiol 1 e 10µl/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 72 h de cultivo

Gráfico 12 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o segundo trimestre gestacional, Grupo Controle, Estradiol 1 e 10 μ l/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 72h de cultivo

Gráfico 13 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o terceiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Estradiol 1 e 10 μ l/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 72h de cultivo

5.4.2 Progesterona

A comparação do Grupo Controle com o Grupo Progesterona, para 1º terço de cultura de células avaliada com 24h de exposição à Progesterona demonstraram que a adição deste hormônio na concentração de 0,4µl/ml, na ausência do anticorpo anti-IDO, apresenta maior potencial antioxidante em relação às outras concentrações, mas apresentando menor potencial antioxidante que o grupo controle. As amostras as quais foi adicionado Progesterona, nas três concentrações, e o anticorpo anti-IDO apresentaram maior potencial antioxidante que o grupo controle com adição de anticorpo (Gráfico 14).

A comparação do Grupo Controle com o Grupo Progesterona, para 2º trimestre gestacional em cultura de células e avaliada com 24h demonstraram que a adição deste hormônio na concentração de 0,04 e 0,4µl/ml, na ausência do anticorpo anti-IDO, apresentam maior potencial antioxidante em relação ao Grupo Controle. As amostras as quais foi adicionado Progesterona, nas três concentrações, e o anticorpo anti-IDO apresentaram menor potencial antioxidante que o Grupo Controle com adição de anticorpo (Gráfico 15).

A comparação do Grupo Controle com o Grupo Progesterona, para o 3º trimestre gestacional em cultura de células avaliada com 24h demonstrou que somente a adição deste hormônio na concentração de 4µl/ml na presença de anticorpo aumenta o potencial antioxidante. A adição de Progesterona em todas as concentrações utilizadas (0,04, 0,4 e 4µl/ml) na ausência do anticorpo anti-IDO, apresentaram maior potencial antioxidante em relação ao Grupo Controle (Gráfico 16).

Gráfico 14 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o primeiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Progesterona 0,04, 0,4 e 4µl/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 24h de cultivo

Gráfico 15 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o segundo trimestre gestacional, Grupo Controle, Progesterona 0,04, 0,4 e 4µl/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 24h de cultivo

Gráfico 16 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o terceiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Progesterona 0,04, 0,4 e 4 μ l/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 24h de cultivo

No primeiro trimestre gestacional, com 48 horas de cultivo, a adição de Progesterona nas concentrações de 0,04 e 0,4 μ l/ml na ausência do anticorpo anti-IDO apresentou maior potencial antioxidante em comparação às outras concentrações utilizadas e, na presença de anticorpo que aumentam o potencial antioxidante, quando comparadas com o grupo controle (Gráfico 17).

No segundo trimestre gestacional com 48 horas de cultivo, a adição de Progesterona nas concentrações de 0,4 e 4 μ l/ml na presença do anticorpo anti-IDO apresentou maior potencial antioxidante em comparação ao Grupo Controle. Os grupos sem adição de anticorpo apresentaram menor potencial antioxidante em todas as concentrações utilizadas (Gráfico 18).

Com 48 horas de cultivo no terceiro trimestre, a adição de Progesterona nas concentrações de 0,04 e 0,4 μ l/ml na presença do anticorpo anti-IDO apresentou maior potencial antioxidante em comparação ao Grupo Controle com anticorpo. Nas amostras sem a presença de anticorpo, todas as concentrações de Progesterona utilizadas levaram ao

aumentam do potencial antioxidante, quando comparadas com o Grupo Controle sem anticorpo (Gráfico 19).

Gráfico 17 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o primeiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Progesterona 0,04, 0,4 e 4µl/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 48h de cultivo

Gráfico 18 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o segundo trimestre gestacional, Grupo Controle, Progesterona 0,04, 0,4 e 4µl/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 48h de cultivo

Gráfico 19 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o terceiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Progesterona 0,04, 0,4 e 4μl/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 48h de cultivo

Após 72 horas de cultivo no primeiro trimestre de gestação, as concentrações de 0,04 e 4μl/ml de Progesterona na presença de anticorpo apresentaram maior potencial antioxidante quando comparados ao Grupo Controle com IDO. Apenas o Grupo Progesterona na concentração de 0,04μl/ml e sem anticorpo apresentou maior potencial antioxidante (Gráfico 20).

No segundo trimestre de gestação, após 72 horas de cultivo todas as concentrações de Progesterona utilizadas (0,04; 0,4 e 4μl/ml) na ausência do anticorpo apresentaram maior potencial antioxidante quando comparados ao grupo com IDO. Todos os Grupos Progesterona com adição de anticorpo demonstraram menor potencial antioxidante quando comparados ao Grupo Controle com anticorpo (Gráfico 21).

No terceiro trimestre, após 72 horas de cultivo todas as concentrações de Progesterona utilizadas (0,04; 0,4 e 4μl/ml) na ausência do anticorpo apresentaram menor potencial antioxidante quando comparados ao Grupo Controle sem IDO. O grupo Progesterona nas concentrações de 0,04 e 0,4μl/ml com adição de anticorpo apresentaram aumento do potencial antioxidante quando comparado com o Grupo Controle com anticorpo (Gráfico 22).

Gráfico 20 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o primeiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Progesterona 0,04, 0,4 e 4µl/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 72h de cultivo

Gráfico 21 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o segundo trimestre gestacional, Grupo Controle, Progesterona 0,04, 0,4 e 4µl/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 72h de cultivo.

Gráfico 22 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o terceiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Progesterona 0,04, 0,4 e 4μl/ml, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 72h de cultivo

5.4.3 Interferon

Nossos resultados, quando comparamos o Grupo Controle com o Grupo Interferon $\square$ para o 1º terço de cultura de células avaliada com 24h de cultivo demonstrou que a adição deste fator na presença do anticorpo anti-IDO, apresenta maior potencial antioxidante que o grupo controle com anticorpo. Nas amostras sem a adição de anticorpo o uso de Interferon $\square$ aumentou a produção de radicais livres, ou seja, apresentou menor potencial antioxidante, sendo deletério para as células (Gráfico 23).

Nossos resultados, quando comparamos o Grupo Controle com o Grupo Interferon $\square$ para o 2º trimestre gestacional em cultura de células avaliada com 24h de cultivo demonstrou que a adição deste fator na presença do anticorpo anti-IDO, apresentou menor potencial antioxidante que Grupo Controle com IDO. O Grupo Interferon $\square$ sem anticorpo apresentou maior potencial antioxidante que o Grupo Controle sem anticorpo (Gráfico 24).

Nossos resultados, quando comparamos o Grupo Controle com o Grupo Interferon $\square$ para o 3º trimestre de gestação em cultura de células avaliada com 24h de cultivo demonstraram que a adição deste fator na presença do anticorpo anti-IDO, apresentou maior potencial antioxidante que o Grupo Controle com IDO. A adição de Interferon $\square$ na presença de anticorpo reduziu o potencial antioxidante (Gráfico 25).

Gráfico 23 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o primeiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Interferon $\square$, Triptofano e 1-metil-triptofano, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 24h de cultivo

Gráfico 24 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o segundo trimestre gestacional, Grupo Controle, Interferon $\square$, Triptofano e 1-metil-triptofano, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 24h de cultivo

Gráfico 25 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o terceiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Interferon $\square$, Triptofano e 1-metil-triptofano, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 24h de cultivo

No primeiro trimestre, com 48 h de cultivo, a adição de Interferon α em ambos os grupos, com ou sem adição de anticorpo levou ao aumento na produção de radicais livres (Gráfico 26).

Com 48 h de cultivo no segundo trimestre de gestação, a adição de Interferon α em ambos os grupos, levou a redução do potencial antioxidante o que promove o aumento na produção de radicais livres (Gráfico 27).

No terceiro trimestre, com 48 h de cultivo, a adição de Interferon α no grupo sem anticorpo ocorreu o aumento no potencial antioxidante, já o grupo com adição de anticorpo apresentou menor potencial antioxidante quando comparados aos Grupos Controle (Gráfico 28).

Gráfico 26 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o primeiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Interferon α , Triptofano e 1-metil-triptofano, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 48h de cultivo

Gráfico 27 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o segundo trimestre gestacional, Grupo Controle, Interferon $\square$, Triptofano e 1-metil-triptofano, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 48h de cultivo

Gráfico 28 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o terceiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Interferon $\square$, Triptofano e 1-metil-triptofano, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 48h de cultivo

Após 72 horas de cultivo, a adição de Interferon α tanto na ausência quanto na presença de anticorpo demonstraram um maior potencial antioxidante, quando comparados aos seus respectivos Grupos Controle (Gráfico 29).

Após 72 horas de cultivo, a adição de Interferon α tanto na ausência quanto na presença de anticorpo demonstraram um menor potencial antioxidante quando comparados aos Grupos Controle (Gráfico 30).

Após 72 horas de cultivo, a adição de Interferon α na presença de anticorpo demonstrou um maior potencial antioxidante. Por outro lado, a adição de Interferon α na ausência de anticorpo apresentou menor potencial antioxidante (Gráfico 31).

Gráfico 29 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o primeiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Interferon α , Triptofano e 1-metil-triptofano, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 72h de cultivo

Gráfico 30 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o segundo trimestre gestacional, Grupo Controle, Interferon $\square$, Triptofano e 1-metil-triptofano, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 72h de cultivo

Gráfico 31 - Resultados obtidos com a Lipoperoxidação para o terceiro trimestre gestacional, Grupo Controle, Interferon $\square$, Triptofano e 1-metil-triptofano, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e avaliados após 72h de cultivo

5.4.4 Triptofano

A comparação do Grupo Controle com o Grupo Triptofano em cultura de células avaliada com 24h de cultivo, no primeiro trimestre gestacional, demonstrou que a adição deste fator na presença do anticorpo anti-IDO, apresenta maior potencial antioxidante que o grupo controle com anticorpo. Nas amostras sem a adição de anticorpo o uso de Triptofano aumentou a produção de radicais livres, ou seja, apresentou menor potencial antioxidante, sendo deletério para as células (Gráfico 23).

No segundo trimestre gestacional, a comparação do Grupo Controle com o Grupo Triptofano em cultura de células avaliada com 24h de cultivo demonstraram que a adição deste fator na ausência do anticorpo anti-IDO, apresenta maior potencial antioxidante que o Grupo Controle sem anticorpo. Nas amostras com a adição de anticorpo o uso de Triptofano aumentou a produção de radicais livres, ou seja, apresentou menor potencial antioxidante, sendo deletério para as células (Gráfico 24).

A comparação do Grupo Controle com o Grupo Triptofano em cultura de células avaliada com 24h de cultivo, no terceiro trimestre, demonstraram que a adição deste fator tanto na presença quanto na ausência do anticorpo anti-IDO, levam ao aumento do potencial antioxidante que os respectivos Grupos Controle (Gráfico 25).

Com 48 h de cultivo, no primeiro e segundo trimestres, a adição de Triptofano em ambos os grupos, com ou sem adição de anticorpo levou ao aumento na produção de radicais livres (Gráfico 26 e 27).

No terceiro trimestre, com 48 h de cultivo, a adição de Triptofano na presença de anticorpo ocorreu o aumento do potencial antioxidante. O Grupo Triptofano sem anticorpo levou a redução do potencial antioxidante (Gráfico 28).

Após 72 horas de cultivo, no primeiro trimestre, a adição de Triptofano em ambos os grupos demonstrou um maior potencial antioxidante quando comparados ao grupo Controle (Gráfico 29).

No segundo trimestre, após 72 horas de cultivo, a adição de Triptofano na ausência de anticorpo ocorreu maior potencial antioxidante, o grupo com adição de anticorpo apresentou

menor potencial antioxidante, quando comparados aos respectivos Grupos Controle (Gráfico 30).

Após 72 horas de cultivo no terceiro trimestre de gestação, a adição de Triptofano no grupo sem anticorpo levou ao aumento do potencial antioxidante quando comparado ao Grupo Controle. O Grupo Triptofano com anticorpo apresentou maior potencial antioxidante que o Grupo Controle com anticorpo (Gráfico 31).

5.4.5 1-Metil-Triptofano

Nossos resultados, quando comparamos o Grupo Controle com o Grupo 1-Metil-Triptofano (1MT) para o 1º terço de cultura de células avaliada com 24h de cultivo demonstrou que a adição deste fator na presença do anticorpo anti-IDO, apresenta maior potencial antioxidante que o grupo controle com anticorpo. Nas amostras sem a adição de anticorpo o uso de 1MT aumentou a produção de radicais livres, ou seja, apresentou menor potencial antioxidante, sendo deletério para as células (Gráfico 23).

Quando comparamos o Grupo Controle com o Grupo 1-Metil-Triptofano (1MT) para o 2º trimestre gestacional em cultura de células avaliada com 24h de cultivo os resultados demonstraram que a adição deste fator na ausência do anticorpo anti-IDO, apresenta maior potencial antioxidante que o Grupo Controle sem anticorpo. Nas amostras com a adição de anticorpo o uso de 1MT aumentou a produção de radicais livres, ou seja, apresentou menor potencial antioxidante, sendo deletério para as células (Gráfico 24).

Nossos resultados, quando comparamos o Grupo Controle com o Grupo 1-Metil-Triptofano (1MT) para o 3º trimestre de gestação em cultura de células avaliada com 24h de cultivo demonstrou que a adição deste fator tanto na presença quanto na ausência do anticorpo anti-IDO, apresentam maior potencial antioxidante que os respectivos Grupos Controle (Gráfico 25).

No primeiro e segundo trimestres gestacionais, com 48 h de cultivo, a adição de 1MT no grupo sem anticorpo mostrou maior potencial antioxidante, o grupo com adição de anticorpo apresentou menor potencial antioxidante (aumento na produção de radicais livres) (Gráfico 26 e 27).

Com 48 h de cultivo, no terceiro trimestre, a adição de 1MT em ambos os grupos, com ou sem adição de anticorpo, levou ao aumento do potencial antioxidante (Gráfico 28).

No primeiro trimestre, após 72 horas de cultivo, a adição de 1MT na ausência de anticorpo demonstrou um maior potencial antioxidativo. Por outro lado, a adição de 1MT na presença de anticorpo apresentou menor potencial antioxidante (Gráfico 29).

Após 72 horas de cultivo no segundo trimestre, a adição de 1MT tanto na ausência quanto na presença de anticorpo demonstraram um maior potencial antioxidante que os respectivos Grupos Controle (Gráfico 30).

No terceiro trimestre, após 72 h de cultivo, a adição de 1MT no grupo com anticorpo apresentou aumento do potencial antioxidante, enquanto que o grupo sem anticorpo apresentou redução do potencial antioxidante quando comparados aos seus respectivos grupos (Gráfico 31).

5.5 ANÁLISE DAS FASES DO CICLO CELULAR DAS CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS PLACENTÁRIAS APÓS A ADIÇÃO DOS FATORES ESTUDADOS, POR CITOMETRIA DE FLUXO

O delineamento experimental utilizado para a avaliação das fases do ciclo celular foi preconizada pelo método do iodeto de propídeo que foi incorporado/intercalado às fitas de DNA. Foram avaliadas separadamente as populações de células placentárias contidas no ciclo celular e as células mortas/debris ou as que apresentaram DNA fragmentado. Os dados estão descritos sumariamente nas tabelas 8 a 10 (Anexo B, C e D) e gráficos 32 a 58.

5.5.1 Necrose e Apoptose

Quando comparamos os valores em porcentagem de células em necrose e apoptose quanto à adição ou não do anticorpo anti-IDO em células de placenta cultivadas por 24 horas, observamos que, com a adição do anticorpo, a porcentagem de células nestas condições foi reduzida. Esta redução ocorre no primeiro trimestre após a adição de todos os fatores analisados. No terceiro trimestre há o aumento das células em necrose e apoptose após a adição do Estradiol 10µl/ml.

Com 48 horas de cultivo, no primeiro trimestre de gestação ocorre a diminuição da porcentagem de células em necrose e apoptose nos grupos Controle e Progesterona 0,04µl/ml.

No segundo trimestre, ocorre a diminuição na porcentagem de células necróticas somente quando adicionamos o 1-Metil-Triptofano e Triptofano. Os outros fatores apresentaram aumento na porcentagem de células em necrose e apoptose.

No terceiro trimestre ocorreu diminuição na porcentagem de células em necrose e apoptose, quando adicionamos 1-Metil-Triptofano, Progesterona 0,04 e 4µl/ml e Triptofano. Ocorreu aumento na porcentagem de células em necrose e apoptose na Progesterona 0,4µl/ml. Aumento na apoptose e diminuição na necrose ocorreu nos grupos Controle, Estradiol 1 e 10µl/ml e Interferon α .

Após o período de 72 horas de cultivo, no primeiro trimestre de gestação, reduziu-se a porcentagem de células em necrose e apoptose nos grupos Estradiol 1 e 10µl/ml, Interferon α ,

1-Metil-Triptofano, Progesterona 0,04 e 4µl/ml e Triptofano. Aumento na apoptose e diminuição na necrose ocorreu nos grupos Controle e Progesterona 0,4µl/ml.

No segundo trimestre de gestação ocorreu a redução na porcentagem de células em necrose e apoptose nos grupos Estradiol 1 e 10µl/ml, Interferon $\square$, 1-Metil-Triptofano, Progesterona 0,04 e 0,4µl/ml e Triptofano. Ocorreu aumento na porcentagem de células em necrose e apoptose no grupo Controle e, aumento na necrose e diminuição na apoptose no grupo Progesterona 4µl/ml.

No terceiro trimestre ocorreu aumento na porcentagem de células em necrose e apoptose nos grupos Estradiol 1 e 10µl/ml, Interferon $\square$, 1-Metil-Triptofano e Progesterona 0,04, 0,4 e 4µl/ml. Aumento na apoptose e diminuição na necrose nos grupos Controle e Triptofano.

5.5.2 Fases G0/G1

Ao avaliarmos a porcentagem de células nas fases quiescentes (G0/G1), observamos que com 24 horas de cultivo em animais de primeiro trimestre de gestação a adição dos fatores levou ao aumento no número de células quiescentes, provavelmente por levarem a uma resposta anti-proliferativa. Este fato ocorreu nos grupos Controle, Estradiol 1 e 10µl/ml, Interferon $\square$ e Progesterona 0,04 e 4µl/ml. O inverso ocorreu com os grupos 1-Metil-Triptofano, Progesterona 2 e Triptofano.

No segundo trimestre de gestação o aumento nas células quiescentes ocorreu nos grupos Interferon $\square$, 1-Metil-Triptofano, Progesterona 1 e Triptofano. A redução ocorreu nos grupos Controle, Estradiol 1 e 10 µl/ml e Progesterona 0,4 e 4µl/ml.

No terceiro trimestre ocorreu aumento na porcentagem de células quiescentes nos grupos 1-Metil-Triptofano e Progesterona 0,4µl/ml e redução nos outros grupos.

Após 48 horas de cultivo, ocorreu aumento na porcentagem de células quiescentes em todos os grupos no primeiro trimestre de gestação.

No segundo trimestre ocorreu aumento nos grupos Controle, Estradiol 1 e 10µl/ml, Interferon $\square$, 1-Metil-Triptofano, Progesterona 0,4µl/ml e Triptofano. E redução nos grupos Progesterona 0,04 e 4µl/ml.

No terceiro trimestre, a porcentagem de células quiescentes aumentou nos grupos Controle, Estradiol 10µl/ml, Interferon $\square$, 1-Metil-Triptofano, Progesterona 0,04, 0,4 e 4µl/ml. E reduziu nos grupos Estradiol 1µl/ml e Triptofano.

As culturas de células da placenta bovina tratadas após 72 horas de cultivo, no primeiro trimestre de gestação, a porcentagem de células quiescentes aumentou nos grupos Controle, Interferon α , 1-Metil-Triptofano e Progesterona 0,4 μ l/ml. Reduzindo esta quantidade nos outros grupos, Estradiol 1 e 10 μ l/ml, Progesterona 0,04 e 4 μ l/ml e Triptofano.

Por outro lado, no segundo trimestre de gestação somente o grupo Progesterona 4 μ l/ml apresentou redução na porcentagem de células quiescentes.

5.5.3 Fase S

A capacidade de síntese com 24 horas de cultivo no primeiro trimestre de gestação foi aumentada em todos os grupos.

No segundo trimestre de gestação, somente os grupos de células da placenta tratados com 1-Metil-Triptofano e Triptofano apresentaram redução na porcentagem de células com capacidade de síntese.

No terceiro trimestre, apenas o Estradiol 1 μ l/ml apresentou redução na capacidade de síntese.

Após 48 horas de cultivo, ocorreu aumento na capacidade de síntese nos grupos 1-Metil-Triptofano e Progesterona 0,04, 0,4 e 4 μ l/ml. A redução na capacidade de síntese ocorreu nos grupos Controle, Estradiol 1 e 10 μ l/ml, Interferon α e Triptofano.

No segundo trimestre, o aumento na capacidade de síntese ocorreu apenas no grupo 1-Metil-Triptofano.

O terceiro trimestre apresenta aumento na capacidade de síntese nos grupos 1-Metil-Triptofano e Progesterona 4 μ l/ml.

As culturas de células de placenta cultivadas por 72 horas, no primeiro trimestre gestacional, a capacidade de síntese foi aumentada nos grupos Controle e 1-Metil-Triptofano, sendo reduzida nos outros grupos.

No segundo trimestre, o aumento na capacidade de síntese ocorreu nos grupos Estradiol 1 e 10 μ l/ml, Interferon α , 1-Metil-Triptofano, Progesterona 0,04, 0,4 e 4 μ l/ml e Triptofano.

No terceiro trimestre, todos os grupos estudados apresentaram redução na capacidade de síntese.

5.5.4 Fases G2/M

A fase de divisão mitótica no primeiro trimestre de gestação apresentou aumento em todos os grupos estudados com 24 horas de cultivo. No segundo e terceiro trimestres de gestação, todos os grupos apresentaram aumento na porcentagem de células nesta fase, ou seja aumento no número de células em divisão mitótica.

Após 48 horas de cultivo, todos os grupos do primeiro trimestre gestacional apresentaram redução na porcentagem de células em divisão mitótica. O mesmo ocorreu no segundo trimestre sendo exceção apenas o grupo 1-Metil-Triptofano. No terceiro trimestre, reduziu-se a porcentagem de células em divisão mitótica nos grupos Controle, Estradiol 1µl/ml, Interferon α e Progesterona 0,4µl/ml.

Ao analisarmos os grupos com 72 horas de cultivo, observamos aumento na porcentagem de células em divisão mitótica nos grupos Estradiol 1 e 10µl/ml, Interferon α , 1-Metil-Triptofano, Progesterona 0,04 e 4µl/ml e Triptofano, no primeiro e segundo trimestres gestacionais.

No terceiro trimestre gestacional, somente o grupo Progesterona 0,4µl/ml apresentou aumento na porcentagem de células em divisão mitótica.

Gráfico 32 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no primeiro trimestre gestacional e 24 horas de cultivo para os Grupos Controle e Estradiol 1 e 10 µl/ml

Gráfico 33 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no primeiro trimestre gestacional e 24 horas de cultivo para os Grupos Controle e Progesterona 0,04, 0,4 e 4µl/ml

Gráfico 34 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no primeiro trimestre gestacional e 24 horas de cultivo para os Grupos Controle, Interferon $\square$, Triptofano e 1MT

Gráfico 35 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no primeiro trimestre gestacional e 48 horas de cultivo para os Grupos Controle e Estradiol 1 e 10µl/ml

Gráfico 36 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no primeiro trimestre gestacional e 48 horas de cultivo para os Grupos Controle e Progesterona 0,04, 0,4 e 4 μ l/ml

Gráfico 37 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no primeiro trimestre gestacional e 48 horas de cultivo para os Grupos Controle, Interferon $\square$, Triptofano e 1MT

Gráfico 38 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no primeiro trimestre gestacional e 72 horas de cultivo para os Grupos Controle e Estradiol 1 e 10 μ l/ml

Gráfico 39 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no primeiro trimestre gestacional e 72 horas de cultivo para os Grupos Controle e Progesterona 0,04, 0,4 e 4 µl/ml

Gráfico 40 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no primeiro trimestre gestacional e 72 horas de cultivo para os Grupos Controle, Interferon $\square$, Triptofano e 1MT

Gráfico 41 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no segundo trimestre gestacional e 24 horas de cultivo para os Grupos Controle e Estradiol 1 e 10µl/ml

Gráfico 42 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no segundo trimestre gestacional e 24 horas de cultivo para os Grupos Controle e Progesterona 0,04, 0,4 e 4µl/ml

Gráfico 43 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no segundo trimestre gestacional e 24 horas de cultivo para os Grupos Controle, Interferon $\square$, Triptofano e 1MT

Gráfico 44 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no segundo trimestre gestacional e 48 horas de cultivo para os Grupos Controle e Estradiol 1 e 10 µl/ml

Gráfico 45 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no segundo trimestre gestacional e 48 horas de cultivo para os Grupos Controle e Progesterona 0,04, 0,4 e 4μl/ml

Gráfico 46 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no segundo trimestre gestacional e 48 horas de cultivo para os Grupos Controle, Interferon α , Triptofano e 1MT

Gráfico 47 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no segundo trimestre gestacional e 72 horas de cultivo para os Grupos Controle e Estradiol 1 e 10 µl/ml

Gráfico 48 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no segundo trimestre gestacional e 72 horas de cultivo para os Grupos Controle e Progesterona 0,04, 0,4 e 4 μ l/ml

Gráfico 49 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no segundo trimestre gestacional e 72 horas de cultivo para os Grupos Controle, Interferon $\square$, Triptofano e 1MT

Gráfico 50 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no terceiro trimestre gestacional e 24 horas de cultivo para os Grupos Controle e Estradiol 1 e 10 μ l/ml

Gráfico 51 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no terceiro trimestre gestacional e 24 horas de cultivo para os Grupos Controle e Progesterona 0,04, 0,4 e 4µl/ml

Gráfico 52 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no terceiro trimestre gestacional e 24 horas de cultivo para os Grupos Controle, Interferon α , Triptofano e 1MT

Gráfico 53 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no terceiro trimestre gestacional e 48 horas de cultivo para os Grupos Controle e Estradiol 1 e 10 μ l/ml

Gráfico 54 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no terceiro trimestre gestacional e 48 horas de cultivo para os Grupos Controle e Progesterona 0,04, 0,4 e 4µl/ml

Gráfico 55 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no terceiro trimestre gestacional e 48 horas de cultivo para os Grupos Controle, Interferon α , Triptofano e 1MT

Gráfico 56 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no terceiro trimestre gestacional e 72 horas de cultivo para os Grupos Controle e Estradiol 1 e 10µl/ml

Gráfico 57 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no terceiro trimestre gestacional e 72 horas de cultivo para os Grupos Controle e Progesterona 0,04, 0,4 e 4μl/ml

Gráfico 58 - Valores em porcentagem determinando a quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular e a concentração de células em Necrose e Apoptose, no terceiro trimestre gestacional e 72 horas de cultivo para os Grupos Controle, Interferon α , Triptofano e 1MT

5.6 PCR

O RNA total das células placentárias foi examinado pela PCR para revelar a expressão do gene IDO, em placentônios de quatro animais de cada trimestre gestacional. O Gráfico 59 mostra que ocorre uma forte expressão de IDO no segundo trimestre gestacional, sendo os valores obtidos estatisticamente significantes quando comparados os animais de primeiro e terceiro e segundo e terceiro trimestres gestacionais, não sendo significantes os valores obtidos quando comparamos o primeiro e o terceiro trimestre gestacionais (Anexo).

Gráfico 59 - Valores determinando a expressão do gene IDO em placentônios de animais nos três trimestres gestacionais

5.7 IMUNOFLOURESCÊNCIA

Foram testados três placentônios oriundos de três animais (um em cada trimestre gestacional) para os anticorpos:

- Anticorpo primário anti-IDO mouse monoclonal IgG (Upstate, USA),
- Anti-IDO sheep policlonal IgG (Chemicon, USA),
- Anti-CTLA-4 anti-mouse (R&D Systems, USA),
- Anti-CD80 (B7.1) e anti-CD86 (B7.2) anti-human (R&D Systems, USA).

Os anticorpos B7 H1 e B7 H2 não mostraram marcações para esta técnica.

Figura 6 - Fotomicrografias originárias de placentônios de animais de primeiro (A e C), segundo (B) e terceiro trimestre gestacional (D) marcados com anticorpo primário anti-IDO mouse monoclonal IgG (Upstate, USA), em A e B, secundário Texas Red e contra corados com DAPI e anti-CTLA-4 (R&D Systems) em C e D, secundários FITC e contra corados com PI. Escala de barra: 50µm

Figura 7- Fotomicrografias originárias de placentônios de animais de primeiro (A e B), segundo (C e D) e terceiro trimestre gestacional (E e F) marcados com anticorpo primário anti-IDO sheep policlonal IgG (Chemicon, USA), secundário Texas Red e contra corado com DAPI. Nas imagens A, C e E observamos as células marcadas com o anticorpo primário conjugado ao secundário. Em B, D e F observamos a sobreposição da marcação do anticorpo com a contra coloração dos núcleos (azul) corados com DAPI. Apenas a amostra do animal de terceiro trimestre gestacional apresentou marcação para o anticorpo utilizado, marcação intracitoplasmática. Escala de barra: 50 μ m

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados das médias dos valores dos grupos controles e tratados foram comparados entre si e analisados pelo teste t de Student ou de variância de ANOVA. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os resultados previamente descritos anteriormente em cada um dos referentes capítulos serão discutidos neste capítulo junto da literatura consultada.

6.1 CITOMETRIA DE FLUXO

Estudamos o papel de hormônios e citocinas em células cultivadas da placenta bovina na expressão do receptor para a IDO determinada por citometria de fluxo.

A citometria de fluxo como ferramenta de estudo neste projeto teve como objetivo a contagem, a classificação e o isolamento de subpopulações de células que após serem especificamente marcadas com anticorpos conjugados a fluóforos são individualmente adquiridas por um sistema de detecção óptica em fluxo contínuo.

Em nossa pesquisa, a investigação da expressão do receptor para a IDO pelas células da placenta bovina mantidas em cultura, na presença ou ausência de fatores, demonstrou-se inconclusiva. Tal fato se deve a inespecificidade dos anticorpos humanos que reconheçam os receptores da espécie bovina com avidéz e especificidade. Técnicas de permeabilização de membrana celular com detergentes aniônicos ou solventes inorgânicos foram aplicadas com o intuito de aumentar a disponibilidade dos sítios receptores de ligação da IDO ao anticorpo, entretanto, os resultados obtidos foram insatisfatórios.

Não obstante, buscando certificarmo-nos quanto à eficácia dos anticorpos, os mesmos foram testados em amostras de placenta humana, sendo que neste caso foi possível a obtenção de resultados confiáveis. No caso da placenta humana usada como controle, os resultados demonstraram que a adição dos fatores (Estradiol, Progesterona, Interferon γ , Triptofano e 1MT) altera a porcentagem de células que expressam a IDO. Assim, a adição de todos os fatores, separadamente, no D0 aumenta a porcentagem de células que expressam IDO. No D1 o 1-Metil-Triptofano reduz a porcentagem de células que expressam IDO, sendo esta a sua função descrita na literatura (TERNESS et al., 2002; XIAO; LIU; LINK, 2004; LIANG et al., 2006;). Após 72 horas de cultivo (D3) a adição de Estradiol, Progesterona e Interferon γ aumentam a porcentagem de células que expressam IDO, a adição de Triptofano e 1-Metil-

Triptofano mantêm a mesma quantidade de células produtoras de IDO, quando comparados ao grupo controle.

O aumento no número de receptores da IDO expressos pelas células placentárias está relacionada ao papel de cada fator utilizado, desta forma, o Estradiol apresenta função imunomoduladora aumentando a expressão de IDO que, por sua vez suprime a ativação das células T (MUNN et al., 1999; STEFANO et al., 2000; VEGETO et al., 2001; PELTIER, 2003; PHAN; YANG; SHERRY, 2003; YANG; HU; HOU, 2006; LIANG et al., 2006), a Progesterona protege o conceito do ataque do sistema imune materno por inibição de células T (SIITERI et al., 1977; STECKEL et al., 2003; PELTIER, 2003; LIGAM et al., 2005), o Interferon γ é um mediador de inflamação e também age estimulando a IDO (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), o Triptofano é um aminoácido essencial encontrado na dieta que está relacionado à inibição da proliferação de células T, a atividade da IDO reduz a concentração de Triptofano, com a redução do Triptofano, as células do sistema imune ativadas são incapazes de proliferar (FRUMENTO et al., 2002; MUNN; SHARMA; LEE, 2002; TERNESS et al., 2002). O 1-Metil-Triptofano é o inibidor específico da IDO, seu efeito inibitório foi observado apenas no D1, desta forma, acreditamos que a concentração do inibidor pode estar em quantidades menores que a necessária para que ocorra seu efeito inibidor.

Com base nos resultados obtidos para a placenta humana, podemos concluir que os anticorpos IDO testados eram específicos para a espécie humana, mas não apresentaram, para esta técnica, reatividade cruzada para a IDO bovina. Foram testados dois diferentes anticorpos e nenhum deles mostrou especificidade para as células bovinas. Um deles é específico para a citometria (anti-IDO policlonal sheep anti human) e o outro não específico (anti-IDO monoclonal mouse anti human), conforme descrito pelo fabricante, entretanto, o anticorpo específico não apresentou marcação e o outro não específico apresentou pequena marcação nas células da placenta bovina e uma marcação considerável para as células de placenta humana, utilizada neste estudo como controle positivo.

A expressão da IDO por células sanguíneas e pelo tecido placentário tem sido reportada em estudos realizados na espécie humana e em camundongos (MUNN et al., 1998; FALLARINO et al., 2002; MUNN et al., 2004). Sendo que para estas espécies, no que tange ao tecido placentário, reporta-se que a concentração de IDO é crescente no primeiro terço de gestação, sendo menos expressiva quando o feto está a termo (MEISEL et al., 2004).

Vale a pena ressaltar que não se encontra dados na literatura quanto à expressão de IDO na placenta bovina. Sendo assim, acreditamos que aplicando-se única e exclusivamente a técnica de citometria de fluxo, não se pode afirmar que não há expressão da IDO na placenta bovina, uma vez que o fator limitante para esta técnica está relacionada aos anticorpos inespecíficos para a espécie.

6.2 IMUNOCITOQUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO CELULAR

Durante a gestação, o feto é prevenido da rejeição imune materna, vários mecanismos especializados estão envolvidos na proteção do feto contra o ataque do sistema imune materno. Estudos em camundongos sugerem que o feto é protegido da rejeição imune devido à ação da IDO que deprime o Triptofano inibindo a ativação de linfócitos T (MUNN et al., 1998).

Neste estudo, estimamos a quantidade de células que expressam IDO com o uso de Imunocitoquímica e quantificação celular das células positivas para IDO, aplicando-se métodos estereológicos. A quantidade de células que expressam IDO foram maiores nos Grupos onde adicionamos os fatores relacionados à estimulação da IDO (Estradiol, Progesterona, Interferon γ e Triptofano), sendo obtidos valores maiores para o terceiro trimestre gestacional. Deste modo, podemos sugerir que, em bovinos a atividade da IDO aumenta com o avanço do período gestacional, confirmando os dados obtidos por Oliveira (2005). No entanto, estes resultados não foram confirmados pela descrição para a placenta humana realizada por Meisel et al. (2004), que afirmam que na placenta humana a expressão da IDO é maior no primeiro trimestre gestacional.

Acreditamos que esta relação de maior susceptibilidade a IDO na placenta bovina com o avanço gestacional possa ser explicada pelo fato de no início da gestação a placenta bovina apresenta-se somente justaposta ao epitélio uterino e, com o avanço da idade gestacional a interação entre a porção materna e fetal torna-se mais íntima aumentando a exposição dos antígenos fetais ao sistema imune materno.

Por outro lado, quando analisamos o efeito dos hormônios e citocinas na expressão da IDO observamos uma expressão substancial da IDO nas células provenientes de placentônios bovinos quando analisamos as amostras em que foram adicionados Estradiol, Progesterona e

Interferon γ , conforme relatos descritos na literatura. Estes resultados são condizentes à fisiologia gestacional, pois para a manutenção da gestação faz-se necessária a presença de Progesterona, Estradiol e Prolactina (BAXTER; SMYTH, 2002). A adição de Triptofano também apresenta uma importante função no aumento da expressão de IDO, por se tratar do substrato para a IDO, que reduz os níveis deste aminoácido impedindo, desta forma a ativação de linfócito T humanos (FRUMENTO et al., 2002; MUNN; SHARMA; LEE, 2002; TERNESS et al., 2002).

A Progesterona é um importante fator na manutenção da gestação, pois inibe as células T, desta forma protege o conceito do sistema imune materno (SIITERI et al., 1977). A Progesterona também apresenta um papel regulatório na biologia dos linfócitos uterinos, inibindo a proliferação dos linfócitos direta ou indiretamente (LIGAM et al., 2005). O Estradiol também apresenta papel na manutenção da gestação por inibir a proliferação das células T (PHAN et al., 2003; YANG et al., 2006).

O Interferon γ estimula a enzima Indoleamina 2,3- dioxigenase que por sua vez vai inibir a ativação de linfócitos T protegendo o conceito da rejeição materna (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; BOASSO et al., 2005; SUGIMOTO et al., 2006).

A expressão da IDO no útero e na placenta, assim como em outros órgãos foi recentemente descrito em macacos rhesus e sagüi (DRENZEK et al., 2008) e em humanos (MEISEL et al., 2004), mas pouco se sabe sobre a expressão da IDO na placenta de outros animais.

Os bovinos apresentam placenta sinepiteliocorial cotiledonária, onde ocorrem pontos de adesão entre o cório alantóide e o endométrio, desta forma ocorre um limitado grau de invasão das células de origem fetal no tecido materno sugerindo a necessidade de tolerância imunológica materna para que não ocorra a rejeição fetal. A presença da IDO na interface materno fetal suporta a hipótese de que esta enzima apresenta uma função crítica na tolerância materno fetal por atuar diretamente catabolizando o Triptofano ou por vias metabólicas indiretas.

6.3 IMUNOBLOTTING

A proposta inicial do Imunoblotting foi a realização deste método com as células placentárias cultivadas nos mesmos tempos descritos para as outras técnicas (D0, D1 e D3). Os resultados obtidos com a realização deste método revelaram pelas descrições contidas na bula do anticorpo utilizado neste trabalho, que a indoleamina deveria apresentar massa molecular de 42kDa, em nossos resultados, apesar de ampla adequação da técnica para a melhora dos resultados, encontramos marcação fortemente da indoleamina em massas moleculares entre 90 e 119kDa, uma hipótese seria a presença de isoformas desta proteína na espécie bovina.

Desta forma, optou-se por testar o Imunoblotting com o tecido placentário a fresco (placentônios) e não mais as células cultivadas. No entanto, nesse caso obtivemos resultados da proteína com peso molecular médio de 35kDa. Convém salientar que em todas as corridas de gel efetuadas usamos também placenta humana como controle e, os resultados obtidos para a placenta bovina (células e tecido) foram os mesmos para a placenta humana (células e tecido). Fato este que nos leva a acreditar a possível existência de isoformas da proteína que ainda são desconhecidas também em humanos, conforme geramos a hipótese para bovinos.

6.4 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Neste estudo, o potencial antioxidante relacionado à adição de fatores (Estradiol, Progesterona, Interferon α , Triptofano e 1-Metil-Triptofano) e a adição ou não de anticorpo anti-IDO (anti-IDO mouse anti human monoclonal IgG - Upstate, USA) em ensaios de neutralização foi sistematicamente analisado no decorrer de gestações normais de bovinos. Realizou-se a determinação dos radicais livres pelo teste do TBA (ácido tiobarbitúrico) que quantifica o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, formado durante o processo oxidativo.

Devido à escassez da literatura no que confere a mensuração da atividade de lipoperoxidação relacionada à atividade da indoleamina na placenta bovina, discutiremos a

ação das concentrações dos fatores frente a esta atividade nas células de 1º, 2º e 3º trimestres gestacionais submetidas à cultura.

Em condições normais na gestação ocorre um aumento do estresse oxidativo devido à placenta ser um órgão extremamente vascularizado, portanto com maior número de mitocôndrias, maior consumo de oxigênio e conseqüentemente maior probabilidade na produção de espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo é compensado pelo aumento de anti-oxidantes endógenos, como a Glutathione Peroxidase, a Superóxido Dismutase e a Catalase.

A atividade lipoperoxidativa relacionada à atividade da Indoleamina na presença dos fatores foi observada pela adição do anticorpo anti-IDO juntamente com os fatores em comparação com os resultados obtidos com a adição apenas dos fatores. Deste modo, a adição dos fatores demonstra a ação do fator sobre as células e quando se acrescenta o anticorpo, observa-se a ação do fator sobre a atividade da indoleamina.

Nos experimentos realizados, os resultados obtidos demonstram que nos três trimestres gestacionais, a adição dos fatores hormonais e citocinas na ausência do anticorpo anti-IDO, nos ensaios de inibição, aumentou o potencial antioxidante em diferentes grupos estudados, principalmente quando as células placentárias foram tratadas com Estradiol, Progesterona e 1-Metil-Triptofano. Em placentas humanas o 1MT inibe expressivamente os receptores da IDO, após 24 horas de cultivo o que poderia induzir mecanismos inibitórios da capacidade proliferativa destas células. Por outro lado, o tratamento com Estradiol Progesterona e Interferon aumenta a expressão dos receptores de IDO após 72 horas de cultivo o que também poderia justificar a produção de radicais peroxidados nos ensaios de inibição das células da placenta bovina encontrados neste projeto.

No primeiro trimestre gestacional, a presença do anticorpo anti-IDO mostrou-se benéfica para as células aumentando o potencial antioxidante nos primeiros períodos de cultura e, conseqüentemente reduzindo a produção de radicais livres que, de acordo com a literatura causa danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (DRÖGE, 2002).

Os hormônios modularam diferencialmente a produção de radicais peroxidados nos três trimestres de gestação estudados, e possivelmente atuam como fatores indutores de proliferação no caso os Grupos Estradiol que responderam dependendo da concentração de tratamento e a Progesterona a qual o tratamento atua na maturação das células placentárias independente da concentração utilizada. Esses resultados mostraram supostamente a reversão dos efeitos imunossupressores ou antiproliferativos dos hormônios. Estes tratamentos

mostraram, *in vitro*, seus efeitos imunomodulatórios, proliferativos e antioxidantes inicialmente após o intervalo de 24 e 48 horas de cultivo, período que compreende a ligação destes hormônios aos seus receptores, e desencadeia a formação de complexos hormônio/receptor e translocam para os elementos de resposta nucleares, a inibição da IDO pelo anticorpo segue ao primeiro estímulo de uma via de sinalização. Nos períodos posteriores até 72 horas de cultivo estes mesmos efeitos supostamente geram segundos mensageiros de sinalização potencializados pela inibição ou neutralização da IDO, que se manteve ativa ou complexada ao seu receptor, que foram traduzidos na diminuição da produção dos radicais peroxidados (SUGINO, et al. 2007).

A gestação é caracterizada pelo aumento na produção de pró-oxidantes pelas células placentárias. O estresse oxidativo ocorre quando a produção de metabólitos reativos do oxigênio ou radicais livres excede a capacidade do sistema de anti-oxidação pelas células ou tecidos. A peroxidação lipídica resulta em produtos como hidroperóxidos lipídicos e malonaldeído. Os hidroperóxidos lipídicos são formados e se ligam as lipoproteínas e são carregados para locais distantes, onde ocorre a peroxidação lipídica resultando em estresse oxidativo sistêmico. O aumento na geração de espécies reativas de oxigênio leva ao aumento na peroxidação lipídica. O aumento na produção placentária de peróxidos lipídicos e tromboxana foram demonstrados por Waish e Wang em 1995 no trofoblasto e nos vilos de placentas de pacientes com pré-eclâmpsia (WANG, et al., 1991; WANG, WALSH, KAY, 1992; MIKHAIL, et al. 1994; VANDERLELIE, et al. 2005).

A liberação de peróxidos lipídicos na circulação materna e a síntese de citocinas pró-inflamatórias podem contribuir para a ativação endotelial, adesão de leucócitos e ativação de polimorfonucleares (RAIJMAKERS, DECHEND, POSTON, 2004).

Em humanos, gestações normais estão associadas com hiperlipidemia fisiológica, alterações fisiológicas são manifestadas pelo aumento nos níveis de triglicérides e colesterol, que reduz rapidamente após o parto (BELO et al., 2004). Em bovinos a prevalência e severidade de algumas afecções em vacas leiteiras como a retenção de placenta, edema de úbere e mastite podem estar associados à formação de radicais peroxidados.

O balanço entre os fatores antioxidantes e pró oxidantes produzidos pelas células placentárias e especificamente pelo trofoblasto contribuem para a formação de moléculas oxidativas por estes tipos celulares que aumentam significativamente na circulação e que reduzem simultaneamente seus reguladores negativos como a Glutathione S transferase (GHS) e Glutathione dissulfeto (GSS) (FIORI et al., 2005). Este sistema é composto por um grupo de enzimas que apresentam especificidade comuns a um substrato aceptor eletrofílico (TORRES

et al., 2004), estão também envolvidas no transporte intracelular, participação em processos digestivos, síntese de Prostaglandina e detoxicação.

A progesterona induz a produção de radicais superóxido no citosol nas células do estroma endometrial por diminuição da expressão da Óxido Dismutase dependente de Zinco e Cobre, estímulo para a produção de radicais peroxidados, estímulo na produção de ciclooxygenase-2, Prostaglandina-F2 α e conseqüentemente o aumento de fatores de transcrição como o NF- κ B. Por outro lado o aumento da apoptose pode ser resultante da exposição das células trofoblásticas à hipóxia e pelo estresse oxidativo (WANG; WALSH, 2001; MYATT; CUI, 2004; BURTON; JAUNIAUX, 2004; SOLEYMANLOU et al., 2005; JURISICOVA, CETMAR, CANNIGIA, 2005).

O aumento das espécies reativas do oxigênio aumenta o sistema pró apoptótico pela expressão da p53, porém não altera a expressão do anti-apoptótico Mdm2 nas células do sinciciotrofoblasto, entretanto, a exposição de explantes à hipóxia não afeta a expressão da p53, mas aumenta a expressão do Mdm2 por estas células (SUGINO et al., 2007). A expressão da proteína Mdm2 funciona como regulador negativo da expressão da p53. A diminuição da formação de complexos protéicos de p53 e Mdm2 aumenta a expressão induzida de p53 aumentando sua atividade transcricional e apoptose.

6.5 CICLO CELULAR

O ciclo celular é o conjunto de processos que se passam numa célula responsiva aos fatores mitogênicos entre duas divisões celulares. A fase em que as células estão temporariamente ou permanentemente fora do ciclo celular (latentes) é denominada G0. Para as células saírem desta fase é necessário que elas recebam estímulo mitogênico para entrar na fase G1 (quiescentes) e alcançar o ponto R (restrição ou de controle), onde ocorrem eventos que permitirão a progressão do ciclo celular. Uma vez ultrapassado o mesmo, a célula se torna independente de estímulos externos (mitogênicos). A célula estará, então, comprometida com a síntese do DNA (fase S), a fase G2, que é a fase preparatória para a mitose, e finalmente a mitose (fase M), que é a fase de divisão celular propriamente dita, dando origem a duas células filhas (MURRAY; HUNT, 1993).

Os resultados obtidos pela análise realizada por citometria de fluxo indicou variações na proporção da população de células com atividade proliferativa e apoptose nos diferentes

trimestres gestacionais tratadas e não tratadas com o anticorpo anti-IDO, além do mais, as células placentárias apresentaram padrões diferenciados de proliferação e apoptose ao longo da gestação e variando de acordo com os grupos estudados, principalmente os tratamentos com Estradiol e Progesterona diferencialmente marcantes nos trimestres gestacionais e nos períodos de cultivo analisados. Em todos os grupos uma grande proporção de células apresentavam-se em estado de quiescência (G1), foi observada uma maior taxa de apoptose nos animais de segundo trimestre gestacional sendo esta taxa acentuada nos grupos de tratamentos sem a presença de anticorpo anti-IDO. Por outro lado, no terceiro trimestre foi detectado um aumento no número de células em G2/M, indicando a parada da capacidade proliferativa ou de progressão no ciclo celular (“arrest”), sendo que a partir deste ponto a célula pode responder ao estímulo proliferativo tanto para a próxima fase de proliferação ou de morte celular. Estes resultados corroboram com as descrições de Hoffmann e Schuler, 2002; Boos et al., 2003; Facciotti et al., 2009, que correlacionam o aumento na proliferação celular no final da gestação à nutrição do feto, pois a medida que a gestação avança e a demanda fetal aumenta, as células entram em proliferação para serem capazes de produzir diversas substâncias requeridas pelo feto.

A expressão da p53 acumula diversas funções como a parada do ciclo celular, o estímulo ao reparo do DNA, retardando a progressão do ciclo celular no ponto de checagem da fase G1 ou indução de apoptose nas células. Este atraso pode prover tempo para o reparo do DNA e para reparo de lesões que seriam posteriormente amplificadas na fase S do ciclo. A interação entre os papéis funcionais da p53 e apoptose são múltiplos, porém a apoptose mediada pela p53 é dependente de sua função de trans-ativação como também para cada tipo celular. A superexpressão da proteína Mdm2 resulta na interação da p53 e a própria Mdm2 promovendo a sua fosforilação e a parada da capacidade proliferativa das células. Em placentas humanas no primeiro trimestre e a termo por técnicas imunohistoquímicas mostraram a expressão da p53 em núcleos de células placentárias basais e negativas no estroma e no endotélio (HAIDACHER et al., 1995). Martins, 1999 mostrou que as mudanças hormonais que ocorrem no parto estimulam a apoptose das células do trofoblasto e maternas. Em nosso estudo, observamos que a atividade proliferativa aumentou conforme o avanço do período gestacional nos Grupos Controle e a porcentagem de células em apoptose foram elevadas no segundo trimestre gestacional. De acordo com descrições anteriores, a apoptose reflete o início da regeneração do tecido placentário normal e continua com a nutrição histiotrófica do feto, que consiste na fagocitose das células epiteliais apoptóticas maternas (BOOS, JANSSEN, MÜLLING, 2003).

A análise de nossos resultados permite-nos encontrar certa semelhança de comportamento funcional das células da placenta bovina com os relatos da literatura que se seguem, sendo que esta é uma análise subjetiva pelo conjunto dos resultados quando comparados aos seguintes autores, uma vez que não se empregaram as mesmas técnicas de análise neste estudo.

Em bovinos a marcação do antígeno Ki-67 que localiza o antígeno nuclear expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto as fases de G0 e o início da fase de G1 (GERDES et al., 1984), foi localizado na maioria das células do epitélio materno da placenta, e sua expressão diminuiu ao término da gestação (BOOS et al., 2003). A expressão da proteína Ki-67 está estritamente relacionada com a proliferação celular. A imunorreatividade ao antígeno Ki-67 relatada por Boos et al., 2003 mostrou-se fortemente positivas para as células do epitélio materno e fetal da placenta o que indica que a proliferação celular é fundamental para a manutenção da gestação ou mesmo poderia estar relacionada a nutrição do feto (LAVEN; PETERS, 2001). Estudos realizados por Hoffmann e Schuler (2002) relatam diminuição da expressão desse antígeno por essas células aos 220 dias de gestação, seguido por intenso aumento até próximo ao parto.

Em culturas de citotrofoblastos do primeiro trimestre gestacional de bovinos o estresse oxidativo reduz a expressão de vias anti-apoptóticas como o Bcl-2 (BERTOJA et al. 2005; MEÇA, 2008), supostamente a expressão desta proteína pode ser um dos principais fatores de prevenção precoce de morte celular. A família do gene que codifica a proteína Bcl-2 regula a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria e podem ser anti-apoptóticos. O aumento da permeabilidade dos poros mitocondriais está envolvido na regulação da matriz de cálcio, pH e a carga da membrana mitocondrial. Esta família de proteínas promove a liberação do citocromo c para o citoplasma, ativação da caspase 9 e caspase 3 no processo apoptótico que apresenta um papel ativo na regulação do sistema imunológico (KINNALLY; ANTONSSON, 2007). O citocromo c é uma proteína solúvel associada a membrana interna da mitocôndria essencial da cadeia de transporte de elétrons capaz de realizar oxidações e reduções e de transferir elétrons pelo complexo enzimático coenzima citocromo c redutase e citocromo c oxidase.

O processo de apoptose é marcado por um padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com a programação normal de morte celular e também em diversas patologias. Estas alterações incluem a formação de vacúolos citoplasmáticos, diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear, condensação da cromatina (KERR, WYLLIE, DURRIE, 1972; MCCONKEY, 1998; MELO,

2000), despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do DNA e alterações na assimetria de fosfolipídeos de membrana plasmática (CURTIN, DONOVAN, COTTER, 2002). Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas da apoptose, mas foi induzida por um determinado composto ou estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às mudanças do microambiente, provavelmente induzidas pela injúria tecidual, processo de necrose (KERR, 1995). Ao contrário da necrose, a apoptose é um processo ativo, controlado geneticamente, dependente de energia, síntese de mRNA e de expressão e degradação de proteínas específicas (KERR, 1972; MEÇA, 2008), que podem depender de mecanismos dependentes da mitocôndria como a liberação de espécies reativas de oxigênio.

Uma grande variedade de estímulos pode induzir apoptose, dentre esses o estresse oxidativo provocado pela geração de intermediários oxidativos que regulam a sinalização apoptótica, proliferativa e inflamatória, este processo ocorre durante a gestação sendo encontrado mais freqüentemente em casos de pré-eclampsia (WANG, et al., 1991; WANG, WALSH, KAY, 1992; MIKHAIL, et al. 1994; VANDERLELIE, et al. 2005). Pesquisas realizadas recentemente correlacionam o estresse oxidativo com o desencadeamento da apoptose (MCCONKEY, 1998), estando as vias apoptóticas clássicas envolvidas com o acúmulo de espécies reativas do oxigênio.

6.6 PCR

Os métodos baseados na PCR em tempo real forneceram uma quantificação dinâmica superior aos métodos anteriores, aumentando a objetividade e a sensibilidade da interpretação dos resultados (KRENKE, 2005). Atualmente a melhor metodologia em relação à genotipagem de ácidos nucleicos é a técnica da PCR em tempo real que apresenta maior acurácia, alta sensibilidade e especificidade, além de fornecer resultados em menor tempo que a PCR semiquantitativa.

Os resultados da PCR em tempo real das amostras de RNA de placentas bovinas demonstraram que a expressão da IDO foi identificada nos três trimestres estudados, sendo diferencialmente expressa no segundo trimestre. Os valores foram estatisticamente significantes entre o primeiro e o segundo e o segundo e terceiro trimestres ($p < 0,001$).

A maior expressão deste gene no segundo trimestre sugere uma tendência na regulação dos mecanismos pró-apoptóticos ou inibidores da proliferação celular. Estes dados indicam que esta enzima está envolvida na via apoptótica ativada no desenvolvimento placentário, participando da maturação placentária e que atua com um padrão de expressão ao longo da gestação.

Durante a formação da placenta muitos fatores interagem de maneira precisa para que haja um desenvolvimento placentário normal. O desenvolvimento placentário é complexo e influenciado por diversos fatores, sendo dependente de um balanço adequado entre a proliferação e a morte celular. Assim sendo, o entendimento da atividade proliferativa e apoptótica são de grande importância para o desenvolvimento, especialmente se estiver relacionado a perdas embrionárias e anormalidades placentárias.

A expressão gênica da IDO está envolvida no equilíbrio fisiológico, sendo responsável pela degradação do Triptofano e conseqüentemente o aumento na quantidade de seus metabólitos que levam a ativação da morte celular por apoptose e parada no ciclo celular (“arrest”). Os metabólitos do Triptofano são imunossupressores, inibindo a proliferação *in vitro* ou causando a apoptose das células T, podendo também alterar a função das NK (TERNESS, et al. 2002; FRUMENTO, et al. 2002; FALLARINO, et al. 2002, DELLA CHIESA, et al. 2006). Grohmann et al, 2003 demonstraram que o aumento na expressão da IDO em células dendríticas aumenta as vias de transdução reguladas pelo aumento da expressão da proteína IDO e também a sua atividade enzimática funcional, outro achado em decorrência deste aumento é o aumento de moléculas co estimulatórias como B7-1 e B7-2. Como relatado anteriormente o processo inicial da degradação do triptofano é seguida pela via quinurenina.

Os receptores expressos pelos metabólitos do triptofano podem exercer efeitos biológicos distintos. O aumento do número de células em apoptose seria um reflexo do início da regeneração do tecido normal placentário. Esses achados necessitam, no entanto, ser mais explorados e confirmados em estudos futuros.

6.7 ANÁLISE FINAL

Devemos enfatizar que os tempos de exposição e os tratamentos das células placentárias bovinas com os diferentes anticorpos cuja especificidade e avidéz mostraram-se diferencialmente expressos variaram de acordo com a técnica utilizada, podendo levar a resultados distintos. Nos experimentos de citometria de fluxo os anticorpos utilizados foram incubados pelo período de 1 hora, a temperatura ambiente, enquanto que nas metodologias de formação de radicais oxidados da membrana lipídica e análise das fases do ciclo celular as células ficaram expostas ao anticorpo anti-IDO por 24, 48 e 72 horas, em condições de cultura com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

Com os dados obtidos podemos afirmar que os bovinos são modelos animais úteis para o estudo dos efeitos modulatórios da IDO no que se refere às modificações celulares e funcionais durante o período gestacional, já que estamos nos referindo a animais de interesse pecuário em um país com altos índices de produção de leite e carne bovina e, problemas reprodutivos como aborto podem estar relacionados à rejeição fetal; como também devemos salientar os animais manipulados ou clonados, que via de regra apresentam distúrbios de rejeição e interações materno-fetais. Por outro lado, recentes pesquisas revelaram que o genoma bovino tem pelo menos 22 mil genes e a maioria dos cromossomos corresponde na sua totalidade, ou em partes, aos cromossomos humanos (ELSIK et al., 2009). Aumentando desta forma o interesse por esta espécie, como modelo para a realização de pesquisas nas áreas de reprodução, descrição de mecanismos imunológicos existentes na placenta bovina e as suas inter-relações materno-fetais.

Ressaltamos que o fator limitante para a investigação da expressão do receptor da IDO na placenta bovina está relacionado à inespecificidade dos anticorpos disponíveis comercialmente.

A complexidade da ação da IDO gera um fascinante campo para pesquisas futuras principalmente para o entendimento da regulação da resposta imune que ocorre nas células da placenta, nos macrófagos, nas células dendríticas, nos fibroblastos em cultura e em muitas linhagens de células tumorais. Por outro lado, a IDO também foi detectada em outros tipos de células que apresentam um importante papel na resposta inflamatória, principalmente em processos alérgicos, incluindo os eosinófilos, as células endoteliais e as células epiteliais pulmonares.

A elaboração de condições em que a mediação da IDO na imunoregulação seja otimizada pela indução de tolerância a antígenos específicos pode abrir novas janelas de oportunidades terapêuticas.

Baseados nisso, podemos concluir que a IDO é suscetível ao controle pelos mecanismos testados, o que nos leva a formular hipóteses de implantação de possíveis mecanismos terapêuticos para a reprodução com a participação da IDO.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos métodos empregados e nos resultados obtidos podemos concluir que:

- Em bovinos a atividade da IDO aumenta com o avanço do período gestacional, fato confirmado pela imunofluorescência;
- A quantificação celular revelou que os fatores testados influenciam na quantidade de células que expressam a Indoleamina - 2,3 Dioxigenase;
- O Immunoblotting mostrou a presença de possíveis isoformas desta proteína na espécie bovina que ainda não foram identificadas nas amostras onde utilizamos células em cultura;
- Nos três trimestres gestacionais, a adição dos fatores na ausência do anticorpo anti-IDO nos ensaios de inibição aumentou o potencial antioxidante em diferentes grupos estudados, principalmente quando as células placentárias foram tratadas com Estradiol, Progesterona e 1-Metil-Triptofano;
- Os hormônios modularam diferencialmente a produção de radicais peroxidados nos três terços de gestação e, possivelmente atuam como fatores indutores de proliferação;
- As células placentárias apresentaram padrões diferenciados de proliferação e apoptose ao longo da gestação e variando de acordo com os grupos estudados, principalmente os tratamentos com Estradiol e Progesterona, diferencialmente marcantes nos trimestres gestacionais e nos períodos analisados;
- A Progesterona atua na maturação das células placentárias independente da concentração utilizada;

- Em todos os grupos uma grande proporção de células apresentavam-se em estado de quiescência (G1), sendo observada uma maior taxa de apoptose nos animais de segundo trimestre gestacional;
- No terceiro trimestre foi detectado um aumento no número de células em G2/M, indicando a parada da capacidade proliferativa ou de progressão no ciclo celular (“arrest”).

Referências

REFERÊNCIAS

- ALEGRE, M. L.; FRAUWIRTH, K. A.; THOMPSON, C. B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nature Reviews Immunology**, v. 1, p. 220-228, 2001.
- ANDERSEN, A. Die plazentome der wiederkauer. **Morphologisches Jahrbuch**, v. 57, p. 410-485, 1927.
- ANUALPEC: anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Finep Consultoria & Comércio, 2001. 359 p.
- 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.
- BAXTER, A. G.; SMYTH, M. J. The role of NK cells in autoimmune disease. **Autoimmunity**, v. 35, p. 1-14, 2002.
- BELO, L.; CASLAKE, M.; SANTOS-SILVA, A. LDL size, total antioxidant status and oxidised LDL in normal human pregnancy: a longitudinal study. **Atherosclerosis**, v. 177, p. 391-399, 2004.
- 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.
- BERTOJA, A. Z.; ZENCLUSSEN, M. L.; WOLLENBERG, I.; PAESCHKE, S.; SOLLWEDEL, A.; GERLOF, K.; WOICIECHOWSKY, C.; VOLK, H. D.; ZENCLUSSEN, A. C. Upregulation of Bcl-2 at the foetal-maternal interface from mice undergoing abortion. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 61, p. 492-502, 2005.
- 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.
- BOOS, A.; JANSSEN, V.; MÜLLING, C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. **Reproduction**, v. 126, p. 469-480, 2003.
- 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.

BOVINOCULTURA NO BRASIL. Disponível em: http://members.tripod.com/~netopedia/geogra/rebanhos_brasileiros.htm. Acesso em: 22 maio, 2006.

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

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. **Journal of Society of Gynecology Investigation**, v.11, p. 342-352, 2004.

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.

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.

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

COYLE, A. J.; GUTIERREZ-RAMOS, J. C. The expanding B7 superfamily: Increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. **Nature Immunology**, v. 2, p.203 – 209, 2001.

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.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunology Methods**, v. 265, p. 49-72, 2002.

DELLA CHIESA, M.; CARLOMAGNO, S.; FRUMENTO, G.; BALSAMO, M.; CANTONI, C.; CONTE, R. The tryptophan catabolite Lkynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. **Blood**, v. 108, n. 13, p. 4118-4125, 2006.

DRAKE, P. M.; GUNN, M. D.; CHARO, I. F. Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56 bright natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1α. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, p. 1199-1212, 2001.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

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.

ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L.; WORLEY, K. C.; GIBBS, R. A.; MUZNY, D. M.; WEINSTOCK, G. M.; ADELSON, D. L.; EICHLER, E. E.; ELNITSKI, L.; GUIGÓ, R.; HAMERNIK, D. L.; KAPPES, S. M.; LEWIN, H. A.; LYNN, D. J.; NICHOLAS, F. W.; REYMOND, A.; RIJNKELS, M.; SKOW, L. C.; ZDOBNOV, E. M.; SCHOOK, L.; WOMACK, J.; ALIOTO, T.; ANTONARAKIS, S. E.;

ASTASHYN, A.; CHAPPLE, C. E.; CHEN, H. C.; CHRAST, J.; CÂMARA, F.; ERMOLAEVA, O.; HENRICHSEN, C. N.; HLAVINA, W.; KAPUSTIN, Y.; KIRYUTIN, B.; KITTS, P.; KOKOCINSKI, F.; LANDRUM, M.; MAGLOTT, D.; PRUITT, K.; SAPOJNIKOV, V.; SEARLE, S. M.; SOLOVYEV, V.; SOUVOROV, A.; UCLA, C.; WYSS, C.; ANZOLA, J. M.; GERLACH, D.; ELHAIK, E.; GRAUR, D.; REESE, J. T.; EDGAR, R. C.; MCEWAN, J. C.; PAYNE, G. M.; RAISON, J. M.; JUNIER, T.; KRIVENTSEVA, E. V.; EYRAS, E.; PLASS, M.; DONTHU, R.; LARKIN, D. M.; REECY, J.; YANG, M. Q.; CHEN, L.; CHENG, Z.; CHITKO-MCKOWN, C. G.; LIU, G. E.; MATUKUMALLI, L. K.; SONG, J.; ZHU, B.; BRADLEY, D. G.; BRINKMAN, F. S.; LAU, L. P.; WHITESIDE, M. D.; WALKER, A.; WHEELER, T. T.; CASEY, T.; GERMAN, J. B.; LEMAY, D. G.; MAQBOOL, N. J.; MOLENAAR, A. J.; SEO, S.; STOTHARD, P.; BALDWIN, C. L.; BAXTER, R.; BRINKMEYER-LANGFORD, C. L.; BROWN, W. C.; CHILDERS, C. P.; CONNELLEY, T.; ELLIS, S. A.; FRITZ, K.; GLASS, E. J.; HERZIG, C. T.; IIVANAINEN, A.; LAHMERS, K. K.; BENNETT, A. K.; DICKENS, C. M.; GILBERT, J. G.; HAGEN, D. E.; SALIH, H.; AERTS, J.; CAETANO, A. R.; DALRYMPLE, B.; GARCIA, J. F.; GILL, C. A.; HIENDLEDER, S. G.; MEMILI, E.; SPURLOCK, D.; WILLIAMS, J. L.; ALEXANDER, L.; BROWNSTEIN, M. J.; GUAN, L.; HOLT, R. A.; JONES, S. J.; MARRA, M. A.; MOORE, R.; MOORE, S. S.; ROBERTS, A.; TANIGUCHI, M.; WATERMAN, R. C.; CHACKO, J.; CHANDRABOSE, M. M.; CREE, A.; DAO, M. D.; DINH, H. H.; GABISI, R. A.; HINES, S.; HUME, J.; JHANGIANI, S. N.; JOSHI, V.; KOVAR, C. L.; LEWIS, L. R.; LIU, Y. S.; LOPEZ, J.; MORGAN, M. B.; NGUYEN, N. B.; OKWUONU, G. O.; RUIZ, S. J.; SANTIBANEZ, J.; WRIGHT, R. A.; BUHAY, C.; DING, Y.; DUGAN-ROCHA, S.; HERDANDEZ, J.; HOLDER, M.; SABO, A.; EGAN, A.; GOODELL, J.; WILCZEK-BONEY, K.; FOWLER, G. R.; HITCHENS, M. E.; LOZADO, R. J.; MOEN, C.; STEFFEN, D.; WARREN, J. T.; ZHANG, J.; CHIU, R.; SCHEIN, J. E.; DURBIN, K. J.; HAVLAK, P.; JIANG, H.; LIU, Y.; QIN, X.; REN, Y.; SHEN, Y.; SONG, H.; BELL, S. N.; DAVIS, C.; JOHNSON, A. J.; LEE, S.; NAZARETH, L. V.; PATEL, B. M.; PU, L. L.; VATTATHIL, S.; WILLIAMS JR, R. L.; CURRY, S.; HAMILTON, C.; SODERGREN, E.; WHEELER, D. A.; BARRIS, W.; BENNETT, G. L.; EGGEN, A.; GREEN, R. D.; HARHAY, G. P.; HOBBS, M.; JANN, O.; KEELE, J. W.; KENT, M. P.; LIEN, S.; MCKAY, S. D.; MCWILLIAM, S.; RATNAKUMAR, A.; SCHNABEL, R. D.; SMITH, T.; SNELLING, W. M.; SONSTEGARD, T. S.; STONE, R. T.; SUGIMOTO, Y.; TAKASUGA, A.; TAYLOR, J. F.; VAN TASSELL, C. P.; MACNEIL, M. D.; ABATEPAULO, A. R.; ABBEY, C. A.; AHOLA, V.; ALMEIDA, I. G.; AMADIO, A. F.; ANATRIELLO, E.; BAHADUE, S. M.; BIASE, F. H.; BOLDT, C. R.; CARROLL, J. A.; CARVALHO, W. A.; CERVELATTI, E. P.; CHACKO, E.; CHAPIN, J. E.; CHENG, Y.; CHOI, J.; COLLEY, A. J.; DE CAMPOS, T. A.; DE DONATO, M.; SANTOS, I. K.; DE OLIVEIRA, C. J.; DEOBALD, H.; DEVINOY, E.; DONOHUE KEDOV, P.; EBERLEIN, A.; FITZSIMMONS, C. J.; FRANZIN, A. M.; GARCIA, G. R.; GENINI, S.; GLADNEY, C. J.; GRANT, J. R.; GREASER, M. L.; GREEN, J. A.; HADSELL, D. L.; HAKIMOV, H. A.; HALGREN, R.; HARROW, J. L.; HART, E. A.; HASTINGS, N.; HERNANDEZ, M.; HU, Z. L.; INGHAM, A.; ISO-TOURU, T.; JAMIS, C.; JENSEN, K.; KAPETIS, D.; KERR, T.; KHALIL, S. S.; KHATIB, H.; KOLBEHDARI, D.; KUMAR, C. G.; KUMAR, D.; LEACH, R.; LEE, J. C.; LI, C.; LOGAN, K. M.; MALINVERNI, R.; MARQUES, E.; MARTIN, W. F.; MARTINS, N. F.; MARUYAMA, S. R.; MAZZA, R.; MCLEAN, K. L.; MEDRANO, J. F.; MORENO, B. T.; MORÉ, D. D.; MUNTEAN, C. T.; NANDAKUMAR, H. P.; NOGUEIRA, M. F.; OLSAKER, I.; PANT, S. D.; PANZITTA, F.; PASTOR, R. C.; POLI, M. A.; POSLUSNY, N.; RACHAGANI, S.; RANGANATHAN, S.; RAZPET, A.; RIGGS, P. K.; RINCON, G.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; ROMERO, N. E.; ROSENWALD, A.; SANDO, L.; SCHMUTZ, S. M.; SHEN, L.; SHERMAN, L.; SOUTHEY, B. R.; LUTZOW, Y. S.; SWEEDLER, J. V.; TAMMEN, I.; TELUGU, B. P.; URBANSKI, J. M.; UTSUNOMIYA, Y. T.; VERSCHOOR, C. P.; WAARDENBERG, A. J.; WANG, Z.; WARD, R.; WEIKARD, R.; WELSH, T. H. JR.; WHITE, S. N.; WILMING, L. G.; WUNDERLICH KR YANG, J.; ZHAO, F. Q. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v. 324, p. 522- 528, 2009.

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.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4- hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FACCIOTTI, P. R.; RICCI, R. E. G.; MARIA, D. A.; BERTOLINI, M.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Patterns of cell proliferation and apoptosis by topographic region in normal Bos Taurus vs. Bos indicus crossbreeds bovine placentae during pregnancy. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v. 7, 2009.

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

FINGER, E. B.; BLUESTONE, J. A. When ligand becomes receptor—tolerance via B7 signaling on DCs. **Nature Immunology**, v.3, p.1056-1057, 2002.

IORE, G.; FLORIO, P.; MICHELI, L.; NENCINI, C.; ROSSI, M.; CERRETANI, D.; AMBROSINI, G.; GIORGI, G.; PETRAGLIA, F. Endothelin-1 Triggers Placental Oxidative Stress Pathways: Putative Role in Preeclampsia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, p.4205–4210, 2005.

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

FLORIANI, C. G. Os novos caminhos da cadeia produtiva da bovinocultura. **AGROTEC, Caderno Técnico – IMA**, Belo Horizonte, v. 1, n. 2, p. 16-25, 2001.

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 γ -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.I. Immune activation and decreased tryptophan in patients with HIV-1 infection. **Journal of Interferon Research**, v.10, p. 599, 1990.

- GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H. Cell cycle analyses of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **Journal of Immunology**, v. 133, p. 1710-1715, 1984.
- GILLER, G., SINGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 131-152, 1995.
- GREEN, J. M. The B7/CD28/CTLA4 T-cell activation pathway: implications for inflammatory lung disease. **American Journal of Respiration Cell and Molecular Biology**, v. 22, p. 261- 264, 2000.
- 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.; PUC CETTI, P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. **Trends of Immunology**, v. 24, p. 242-248, 2003.
- GROHMANN, U.; ORABONA, C.; FALLARINO, F.; VACCA, C.; CALCINARO, F.; FALORNI, A.; CANDELORO, P.; BELLADONA, M. L.; BIANCHI, R.; FIORETTI, M. C.; PUC CETTI, P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. **Nature Immunology**, v.3, p. 1097-1101, 2002.
- 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 Biolology**, v. 467, p. 125, 1999.
- HAIDACHER, S.; BLASCHITZ, A.; DESOYE, G.; DOHR, G. Immunohistochemical evidence of p53 protein in human placenta and choriocarcinoma cell lines. **Human Reproduction**, v. 10, p.983–988, 1995.
- 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.
- HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward ? **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 410-418, 2000.
- 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.
- HOCHREIN, H., SHORTMAN, K., VREMEC, D., SCOTT, B., HERTZOG, P., O'KEEFFE, M. Differential production of IL-12, IFN-alpha and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 9, 5448–5455, 2001.
- 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.
- ITO, A.; BUENAFE, A. C.; MATEJUK, A.; ZAMORA, A.; SILVERMAN, M.; DWYER, J. Estrogen inhibits systemic T cell expression of TNF-alpha and recruitment of TNF-alpha (+)

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.

JURISICOVA, A.; DETMAR, J.; CANNIGIA, I. Molecular mechanisms of trophoblast survival: from implantation to birth. **Birth Defects Research Embryo Today**, v.75, p. 262 - 280, 2005.

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.

KANNEKENS, E. M.; MURRAY, R. D.; HOWARD, C. V.; CURRIE, J. A stereological method for estimating the feto-maternal exchange surface area in the bovine placentome at 135 days gestation. **Research in Veterinary Science**, v. 81, p. 127–133, 2006.

KERR, J. F. R. Neglected opportunities in apoptosis research. **Trends Cell Biology**, v. 5, p. 55-57, 1995.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; DURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Brasilian Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KINNALLY, K. W.; ANTONSSON, B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. **Apoptosis**, v.12, n. 5, p.857-868, 2007.

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, p. 2305, 1984.

KRENKE, B.E. Development of a novel, fluorescent, two primers approach to quantitative PCR. **Profiles in DNA**, v. 8, n.1, p.3-5, 2005.

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.

LAVEN, R. A.; PETERS, A. R. Gross morphometry of the bovine placentome during gestation. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 36, p. 289-296, 2001.

LEAÑOS-MIRANDA, A.; PASCOE-LIRA, D.; CHÁVEZ-RUEDA, K. A.; BLANCO-FAVELA, F. Persistence of macroprolactinemia due to antiprolactin autoantibody before, during, and after pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, p. 2619-24, 2001.

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.

LEE, K. M.; CHUANG, E.; GRIFFIN, M. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. **Science**, v. 282, p. 2263-2266, 1998.

LENSCHOW, D. J. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA-4 Ig. **Science**, v. 257, p. 789-792, 1992.

LI, W. Costimulation blockade promotes the apoptotic death of graft- infiltrating T cells and prolongs survival of hepatic allografts from FLT3L- treated donors. **Transplantation**, v. 78, p. 1423-1432, 2001.

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.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LORRAIN-SMITH, J. The pathological effects due to increase of oxygen tension in the air breathed. **Journal of Physiology**, v. 24, p. 19-25, 1899.

MARTINS, V.M.V. Maturação e expulsão placentária em *Bos taurus taurus* e *Bos indicus indicus*. 1999.110 f. Tese (Doutorado em Reprodução) – Curso de Pós Graduação em ciência Animal, Universidade Federal da Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, v. 99, p. 157-168, 1998.

MEÇA, K. K. O. L. ; MARTINS, A. S.; DEL PUERTO, H. L. ; VASCONCELOS, A.C.; VERÇOSA, B. L. A. Apoptose e a expressão de bcl-2, das caspases 3 e 8 em placenta bovina com diferentes idades gestacionais. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 35º Encontro de Saúde Veterinária do Conesul, 1º Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 17º Congresso Estadual da Anclivepa, 3º Congresso de Médicos Veterinários do Conesul, 5º Expovet. Feira de Produtos e Serviços em Medicina Veterinária, 11º, 2008, Gramado [Anais...], 2008. RES. 01.655-2.

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.; 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. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 762, 2004.
- MELLOR, A.L.; MUNN, D.H. Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. **Journal of Immunology**, v. 170, 2003, p.5809–5813.
- MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? **Immunology Today**, v. 20, p. 469–473, 1999.
- 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, 2001.
- MELO, P. S. violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In vitro Cell Development Biology**, v. 36, p. 539-543, 2000.
- MIKHAIL, M. S.; ANYAEGBUNAM, A.; GARFINKEL, D. Preeclampsia and antioxidant nutrients: decreased plasma levels of reduced ascorbic acid, alpha-tocopherol, and beta-carotene in women with preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 171, p. 150–157, 1994.
- 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.; 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. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. **Current Opinion Immunology**, v. 18, p. 220, 2006.
- 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.; 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.

MURRAY, A. W.; HUNT, T.: **The Cell Cicle: An Introduction**. New York, Freeman, 1993.

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

MYATT, L.; CUI, X. Oxidative stress in the placenta. *Histochemistry Cell Biology*, v. 122, p. 369-382, 2004.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxyde in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351 - 358, 1979.

OLIVEIRA, L. J. **Degradação de Triptofano na placenta bovina em gestações normais e de clones: evidência da atividade da Indoleamina 2,3-dioxigenase?** 2005, p.91 Dissertação de mestrado (mestrado em ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

OOSTERWEGEL, M. A.; GREENWALD, R. J.; MANDELBROT, D. A.; LORSBACH, R. B.; SHARPE, A. H. CTLA-4 and T cell activation. **Current Opinion in Immunology**, v. 11, p. 294-300, 1999.

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

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.

PETTERSSON, A.; CIUMAS, C.; CHIRSKY, V.; LINK, H.; HUANG, YU-MIN; BAO-GUO XIAO. Dendritic cells exposed to estrogen in vitro exhibit therapeutic effects in ongoing experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, n. 156, p. 58– 65, 2004.

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 Natl Academical Science USA.**, v. 100, p. 8372-8377, 2003.

RAIJMAKERS, M. T. M.; DECHEND, R.; POSTON, L. Oxidative Stress and Preeclampsia: Rationale for Antioxidant Clinical Trials. **Hypertension**, v. 44, p. 374-380, 2004.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 13, n. 339, p. 62-66, 2003.

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

ROMERO, F. J., BOSCH-MORELL, F., ROMERO, M. J.; ROMERO, B.; MARIN, N.; ROMA, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. **Environment Health Perspectives**, v. 106, p. 1229-1234, 1998.

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

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

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.

SALOMON, B.; BLUESTONE, J. A. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. **Annual Reviews of Immunology**, v. 19, p. 225-252, 2001.

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.

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. The B7–CD28 superfamily. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 116-126, 2002.

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.

SOLEYMANLOU, N.; WU, Y.; WANG, X.; JURISICOVA, A.; POST, M.; CANIGGIA, I. A novel pro-apoptotic splice isoform of Mtd and its role in the pathogenesis of preeclampsia. **Cell Death Differentiation**, v. 12, p. 441 – 452, 2005

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 intracellular calcium transients: evidence of a cell surface estrogen receptor. **Blood**, v. 95, n.12, p. 3951–3958, 2000.

STOBER, D., SCHIRMBECK, R., REINMAN, J. IL-12/IL-18-dependent IFN release by murine dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 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 γ 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.

SUGINO, N.; TAKIGUCHI, S.; UMEKAWA, T.; HEAZELL, A.; CANIGGIA, I. Oxidative Stress and Pregnancy Outcome: A Workshop Report. **Placenta, Supplement A, Trophoblast Research**, v. 21, p. 48-50, 2007.

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 Interferon γ -inducible tryptophanyl-tRNA synthetase includes alternative splicing. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 270, p. 397-403, 1995.

TORRES, M. C. L.; SOARES, N. F.F.; MAIA, J. F. Parâmetros Cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n.2, p. 243-248, 2004.

TURKA, L. A. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection *in vivo*. **Procedures Natl Academical Science USA**, v. 89, p. 11102-11105, 1992.

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.

VANDERLELIE, J.; VENARDOS, K.; CLIFTON, V. L. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in pre-eclamptic placentae. **Placenta**, v. 26, p. 53-58, 2005.

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. 21, n. 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.

WALSH, S. W.; WANG, Y. Trophoblast and placental villous core production of lipid peroxides, thromboxane, and prostacyclin in preeclampsia. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, p. 1888–1893, 1995.

WANG, Y.; WALSH, S. W. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. **Placenta**, v. 22, p. 206-212, 2001.

WANG, Y.; WALSH, S. W.; KAY, H. H. Placental lipid peroxides and thromboxane are increased and prostacyclin is decreased in women with preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 167, p. 946–949, 1992.

WANG, Y. P.; WALSH, S. W.; GUO, J. D. The imbalance between thromboxane and prostacyclin in preeclampsia is associated with an imbalance between lipid peroxides and vitamin E in maternal blood. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 165, p. 1695–1700, 1991.

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

WIRLEITNER, B.; NEURAUTER, G.; SCHRÖCKSNADL, 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 Immunology**, v. 113, p. 47–55, 2004.

XIAO, BAO-GUO; LIU, XUAN; LINK, HANS. Antigen-specific T cell functions are suppressed over the estrogen-dendritic cell-indoleamine 2,3-dioxygenase axis, **Steroids**, v. 69, p. 653–659, 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 α enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients. **Procedures Natl Acadical Science U S A.**, v. 83, p. 622-626, 1986.

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

YOSHIDA, R.; OKU, T.; IMANISHI, J.; KISHIDA, T.; HAYAISHI, O. Interferon α : 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.

Anexos

Apêndice A - Tabela 7- Determinação da concentração do reativo de TBARS (expressos em nmol/mL) em sobrenadante de cultura de células placentárias dos três trimestres gestacionais após adição dos fatores descritos na Tabela 1, analisados com 24, 48 e 72 horas de cultivo.

24h	Terço	Grupo	Controle	Estradiol 1µl/ml	Estradiol 10µl/ml	Progesterona 0,04µl/ml	Progesterona 0,4µl/ml	Progesterona 4µl/ml	Interferon	Triptofano	1 MT
IDO +	1 T	Média	49,519	16,250	4,519	18,462	29,038	12,788	23,269	19,327	8,654
		Desv Pad	0,100	0,044	0,009	0,033	0,061	0,049	0,016	0,012	0,027
	2 T	Média	7,404	73,558	103,750	96,442	33,558	39,712	7,788	150,481	6,923
		Desv Pad	0,020	0,115	0,161	0,382	0,048	0,084	0,010	0,411	0,012
	3T	Média	4,327	2,692	8,462	9,615	23,942	2,212	5,288	1,154	2,500
		Desv Pad	0,039	0,025	0,093	0,028	0,016	0,022	0,006	0,011	0,010
IDO -	1 T	Média	9,303	4,543	10,334	20,986	15,361	16,370	17,019	66,707	14,639
		Desv Pad	0,017	0,014	0,010	0,059	0,018	0,021	0,015	0,404	0,026
	2 T	Média	41,755	18,606	18,966	19,663	24,014	42,115	25,433	13,630	23,822
		Desv Pad	0,105	0,053	0,067	0,043	0,037	0,066	0,111	0,052	0,057
	3 T	Média	69,062	23,338	2,149	20,358	19,317	10,534	18,699	21,756	23,145
		Desv Pad	0,343	0,037	0,033	0,014	0,009	0,013	0,018	0,016	0,030
48h	Terço	Grupo	Controle	Estradiol 1µl/ml	Estradiol 10µl/ml	Progesterona 0,04µl/ml	Progesterona 0,4µl/ml	Progesterona 4µl/ml	Interferon	Triptofano	1 MT
IDO +	1 T	Média	9,231	15,000	40,288	48,942	46,346	44,712	9,615	21,827	40,673
		Desv Pad	0,017	0,076	0,071	0,171	0,138	0,077	0,034	0,052	0,070
	2 T	Média	14,135	15,769	6,058	74,904	6,731	5,481	42,212	21,250	3,846
		Desv Pad	0,070	0,029	0,011	0,201	0,049	0,015	0,186	0,073	0,013
	3T	Média	16,250	9,712	4,231	3,942	6,731	26,923	16,538	7,981	2,788
		Desv Pad	0,089	0,022	0,009	0,016	0,009	0,073	0,045	0,012	0,022
IDO -	1 T	Média	17,019	2,452	14,063	2,740	3,173	36,418	25,385	37,500	6,779
		Desv Pad	0,058	0,034	0,062	0,020	0,027	0,248	0,119	0,211	0,020
	2 T	Média	3,606	10,240	32,813	13,558	41,538	42,188	48,389	12,981	0,865
		Desv Pad	0,037	0,020	0,237	0,073	0,174	0,242	0,338	0,067	0,026
	3 T	Média	11,611	6,274	10,962	3,750	5,120	4,038	5,409	12,404	8,798
		Desv Pad	0,020	0,031	0,033	0,023	0,015	0,014	0,019	0,022	0,025
72h	Terço	Grupo	Controle	Estradiol 1µl/ml	Estradiol 10µl/ml	Progesterona 0,04µl/ml	Progesterona 0,4µl/ml	Progesterona 4µl/ml	Interferon	Triptofano	1 MT
IDO +	1 T	Média	6,635	1,250	3,365	2,500	6,731	0,577	2,500	4,231	3,173
		Desv Pad	0,015	0,014	0,010	0,015	0,014	0,026	0,023	0,011	0,014
	2 T	Média	0,481	14,135	0,385	1,538	4,135	1,538	2,500	6,827	1,827
		Desv Pad	0,016	0,017	0,017	0,021	0,016	0,019	0,017	0,055	0,019
	3T	Média	5,481	8,846	3,654	0,769	2,788	6,058	5,000	3,558	3,269
		Desv Pad	0,012	0,008	0,002	0,020	0,012	0,012	0,016	0,015	0,013
IDO -	1 T	Média	2,452	2,813	1,731	0,433	2,596	2,524	1,226	1,298	3,245
		Desv Pad	0,012	0,013	0,011	0,022	0,012	0,010	0,017	0,016	0,018
	2 T	Média	10,024	10,673	5,986	1,442	2,524	3,317	12,981	0,072	3,966
		Desv Pad	0,060	0,030	0,040	0,015	0,024	0,016	0,084	0,013	0,014
	3 T	Média	0,505	0,288	3,606	2,524	3,173	3,678	2,091	0,216	1,442
		Desv Pad	0,012	0,024	0,014	0,011	0,019	0,014	0,017	0,019	0,037

Apêndice B

Tabela 8 - Valores em porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular e células em Necrose e Apoptose, para o os três trimestres gestacionais, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e após 24 horas de cultivo.

Fase do Ciclo	Grupo	Terço	Controle	Estradiol 1µl/ml	Estradiol 10µl/ml	Progesterona 0,04µl/ml	Progesterona 0,4µl/ml	Progesterona 4µl/ml	Interferon	Triptofano	1 MT
G2/M	IDO -	1 T	5,42	3,87	4,58	10,81	12,62	12,08	12,84	12,04	12,99
		2 T	8,91	4,09	6,77	9,35	8,17	2,42	12,09	9,70	12,04
		3 T	13,28	13,99	14,15	12,67	11,26	13,25	9,99	12,84	12,13
S	IDO -	1 T	5,17	1,86	1,99	3,68	4,68	4,05	3,80	3,80	5,39
		2 T	2,58	1,63	2,22	3,21	4,08	1,15	4,43	3,80	4,67
		3 T	6,85	7,73	9,21	6,95	5,66	6,49	5,59	6,39	6,50
G0/G1	IDO -	1 T	44,66	54,83	34,07	62,38	66,08	59,80	55,85	62,73	61,19
		2 T	36,57	27,42	32,14	44,23	47,02	24,43	49,77	46,68	49,33
		3 T	56,86	56,47	45,69	54,63	54,27	58,66	52,73	57,16	52,94
Apoptose	IDO +	1 T	8,53	11,37	16,37	9,64	10,46	11,19	12,67	11,97	13,39
		2 T	22,66	23,39	20,19	29,19	19,62	25,83	19,51	31,91	27,39
		3 T	9,94	13,92	18,20	12,96	11,35	10,36	14,51	14,21	11,92
	IDO -	1 T	13,46	28,87	25,85	17,28	12,21	16,79	19,75	15,63	15,00
		2 T	34,82	42,74	38,83	29,02	28,38	45,73	24,51	26,10	24,47
		3 T	15,60	14,66	17,87	17,25	18,34	15,14	19,88	16,05	18,04
Necrose	IDO +	1 T	2,70	3,87	17,23	2,32	2,78	4,05	3,84	4,31	4,52
		2 T	6,97	8,64	5,02	11,45	6,15	11,84	6,64	15,49	10,17
		3 T	4,13	5,65	11,46	5,27	4,62	3,58	6,33	7,06	4,64
	IDO -	1 T	20,91	8,93	24,35	5,17	3,78	6,04	6,58	4,88	4,83
		2 T	14,31	19,81	16,75	11,64	10,33	21,49	7,66	11,46	8,21
		3 T	5,99	5,89	10,04	6,98	8,00	5,55	9,39	6,47	8,62

Apêndice C

Tabela 9 - Valores em porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular e células em Necrose e Apoptose, para os três trimestres gestacionais, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e após 48 horas de cultivo.

Fase do Ciclo	Grupo	Terço	Controle	Estradiol 1µl/ml	Estradiol 10µl/ml	Progesterona 0,04µl/ml	Progesterona 0,4µl/ml	Progesterona 4µl/ml	Interferon	Triptofano	1 MT
G2/M	IDO -	1 T	11,69	28,08	31,65	21,81	24,27	28,95	46,80	42,81	49,57
		2 T	16,68	30,88	18,02	10,24	29,62	9,53	19,63	6,13	4,68
		3 T	16,91	16,27	7,49	20,17	34,23	11,56	22,83	14,25	11,19
S	IDO -	1 T	4,86	3,89	5,12	3,62	3,71	3,99	5,81	6,94	5,37
		2 T	5,43	8,44	5,98	4,85	6,31	4,88	6,91	4,07	3,50
		3 T	7,66	6,69	4,99	7,67	8,15	5,70	7,82	7,44	6,84
G0/G1	IDO -	1 T	31,68	21,80	34,99	20,56	27,07	25,81	25,64	26,61	25,60
		2 T	48,53	35,88	46,45	49,99	39,21	53,70	46,59	51,16	43,49
		3 T	47,58	48,33	50,34	46,65	34,89	48,27	44,58	50,98	53,51
Apoptose	IDO +	1 T	25,35	28,80	27,98	21,34	26,71	26,10	20,22	24,61	15,41
		2 T	22,64	31,83	26,57	30,01	28,04	27,03	24,26	26,30	26,71
		3 T	20,17	23,27	23,61	14,90	16,81	16,86	17,24	15,19	15,89
	IDO -	1 T	27,64	24,32	16,04	24,78	21,57	20,40	13,71	14,05	13,17
		2 T	21,87	18,57	21,70	24,94	18,37	23,30	19,14	26,90	29,80
		3 T	16,18	16,82	21,94	15,73	13,45	19,66	14,13	16,24	18,65
Necrose	IDO +	1 T	15,85	18,32	13,51	7,46	14,45	20,42	6,80	15,77	5,16
		2 T	7,83	10,81	10,75	9,95	9,73	8,26	7,09	10,67	8,13
		3 T	7,95	12,67	11,56	7,17	8,21	7,33	8,14	7,46	6,71
	IDO -	1 T	18,41	16,70	8,75	22,02	17,38	15,59	6,46	7,62	5,47
		2 T	6,79	5,86	7,11	8,68	5,99	7,67	6,86	10,00	15,50
		3 T	9,51	9,42	12,04	8,43	7,68	11,70	8,60	9,16	8,47

Apêndice D

Tabela 10 - Valores em porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular e células em Necrose e Apoptose, para os três trimestres gestacionais, com e sem adição do anticorpo anti-IDO e após 72 horas de cultivo.

Fase do Ciclo	Grupo	Terço	Controle	Estradiol 1µl/ml	Estradiol 10µl/ml	Progesterona 0,04µl/ml	Progesterona 0,4µl/ml	Progesterona 4µl/ml	Interferon	Triptofano	1 MT
G2/M	IDO -	1 T	32,41	41,15	41,23	46,15	54,86	31,22	41,32	40,75	31,77
		2 T	32,43	2,90	2,91	2,34	4,95	2,28	2,54	2,57	1,47
		3 T	48,15	47,48	43,13	46,88	45,22	48,36	47,69	41,37	35,75
S	IDO -	1 T	8,86	10,25	10,14	9,38	11,1	7,29	9,64	9,82	10,56
		2 T	5,88	4,32	3,01	4,19	4,55	3,79	3,9	4,34	3,4
		3 T	9,7	15,07	13,57	13,89	14,26	14,54	14,11	14,33	14,93
G0/G1	IDO -	1 T	38,83	29,81	27,85	26,04	20,35	32,95	29,97	31,21	39,39
		2 T	36,29	55,97	47,47	56,62	55,08	54	47,81	55,64	52,51
		3 T	27,91	26,02	28,24	26,18	27,44	23,01	24,98	29,18	32,86
Apoptose	IDO +	1 T	10,26	8,44	10,71	9,42	14,53	10,3	10,92	9,75	6,68
		2 T	18,82	20,84	21,62	22,52	23,28	26,27	24,86	20,69	21,14
		3 T	9,91	10,35	12,88	11,3	10,05	14,02	11,89	11,82	14,04
	IDO -	1 T	9,77	12,83	12,82	12,38	8,77	15,21	13,54	12,77	13,87
		2 T	14,74	28,21	30,35	27,58	26,72	29,75	29,03	27,71	31,68
		3 T	9,66	7,06	9,98	8,31	8,07	8,4	8,17	9,86	10,9
Necrose	IDO +	1 T	3,71	3,78	4,5	2,88	4,28	3,58	3,24	4,13	3,05
		2 T	6,86	6	6,66	6,93	6,44	12,51	9,12	5,86	6,29
		3 T	3,59	5,15	4,74	4,47	5,09	6,96	5,09	4,74	6,13
	IDO -	1 T	3,91	5,4	6,88	5,65	4,69	10,74	5,2	4,9	4,34
		2 T	4,44	8,02	13,92	8,45	7,91	9,38	14,42	8,54	9,83
		3 T	4,35	4,18	4,67	4,27	4,61	5	4,62	4,86	5,29

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Quantificação Controle X Estradiol				1T Estradiol D0 vs 1T Controle D1	-0.9700	0.5705	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 1T Estradiol D1	-1.770	1.041	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 1T Controle D3	4.660	2.741	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 1T Estradiol D3	2.230	1.312	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 2T Controle D0	8.650	5.087	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 2T Estradiol D0	9.580	5.634	*	P<0.05
				1T Estradiol D0 vs 2T Controle D1	10.030	5.899	*	P<0.05
				1T Estradiol D0 vs 2T Estradiol D1	7.800	4.588	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 2T Controle D3	5.480	3.223	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 2T Estradiol D3	6.780	3.988	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 3T Controle D0	6.250	3.676	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 3T Estradiol D0	6.750	3.970	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 3T Controle D1	6.380	3.752	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 3T Estradiol D1	0.1000	0.05881	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 3T Controle D3	2.530	1.488	ns	P>0.05
				1T Estradiol D0 vs 3T Estradiol D3	5.380	3.164	ns	P>0.05
				1T Controle D1 vs 1T Estradiol D1	-0.8000	0.4705	ns	P>0.05
				1T Controle D1 vs 1T Controle D3	5.630	3.311	ns	P>0.05
				1T Controle D1 vs 1T Estradiol D3	3.200	1.882	ns	P>0.05
				1T Controle D1 vs 2T Controle D0	9.620	5.658	*	P<0.05
				1T Controle D1 vs 2T Estradiol D0	10.550	6.205	**	P<0.01
				1T Controle D1 vs 2T Controle D1	11.000	6.470	**	P<0.01
				1T Controle D1 vs 2T Estradiol D1	8.770	5.158	ns	P>0.05
				1T Controle D1 vs 2T Controle D3	6.450	3.794	ns	P>0.05
				1T Controle D1 vs 2T Estradiol D3	7.750	4.558	ns	P>0.05
				1T Controle D1 vs 3T Controle D0	7.220	4.246	ns	P>0.05
				1T Controle D1 vs 3T Estradiol D0	7.720	4.540	ns	P>0.05
				1T Controle D1 vs 3T Controle D1	7.350	4.323	ns	P>0.05
				1T Controle D1 vs 3T Estradiol D1	1.070	0.6293	ns	P>0.05
				1T Controle D1 vs 3T Controle D3	3.500	2.059	ns	P>0.05
				1T Controle D1 vs 3T Estradiol D3	6.350	3.735	ns	P>0.05
				1T Estradiol D1 vs 1T Controle D3	6.430	3.782	ns	P>0.05
				1T Estradiol D1 vs 1T Estradiol D3	4.000	2.353	ns	P>0.05
				1T Estradiol D1 vs 2T Controle D0	10.420	6.128	**	P<0.01
				1T Estradiol D1 vs 2T Estradiol D0	11.350	6.675	**	P<0.01

One-way Analysis of Variance (ANOVA)			
The P value is < 0.0001, considered extremely significant.			
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.			
Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test			
If the value of q is greater than 5.188 then the P value is less than 0.05.			
Comparison	Mean Difference	q	P value
1T Controle D0 vs 1T Estradiol D0	-0.6600	0.3882	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Controle D1	-1.630	0.9587	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Estradiol D1	-2.430	1.429	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Controle D3	4.000	2.353	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Estradiol D3	1.570	0.9234	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Controle D0	7.990	4.699	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Estradiol D0	8.920	5.246	* P<0.05
1T Controle D0 vs 2T Controle D1	9.370	5.511	* P<0.05
1T Controle D0 vs 2T Estradiol D1	7.140	4.199	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Controle D3	4.820	2.835	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Estradiol D3	6.120	3.599	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D0	5.590	3.288	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Estradiol D0	6.090	3.582	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D1	5.720	3.364	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Estradiol D1	-0.5600	0.3294	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D3	1.870	1.100	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Estradiol D3	4.720	2.776	ns P>0.05

1T Estradiol D1 vs 2T Controle D1	11.800	6.940	**	P<0.01	2T Controle D0 vs 2T Controle D1	1.380	0.8116	ns	P>0.05
1T Estradiol D1 vs 2T Estradiol D1	9.570	5.629	*	P<0.05	2T Controle D0 vs 2T Estradiol D1	-0.8500	0.4999	ns	P>0.05
1T Estradiol D1 vs 2T Controle D3	7.250	4.264	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 2T Controle D3	-3.170	1.864	ns	P>0.05
1T Estradiol D1 vs 2T Estradiol D3	8.550	5.029	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 2T Estradiol D3	-1.870	1.100	ns	P>0.05
1T Estradiol D1 vs 3T Controle D0	8.020	4.717	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Controle D0	-2.400	1.412	ns	P>0.05
1T Estradiol D1 vs 3T Estradiol D0	8.520	5.011	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Estradiol D0	-1.900	1.117	ns	P>0.05
1T Estradiol D1 vs 3T Controle D1	8.150	4.793	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Controle D1	-2.270	1.335	ns	P>0.05
1T Estradiol D1 vs 3T Estradiol D1	1.870	1.100	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Estradiol D1	-8.550	5.029	ns	P>0.05
1T Estradiol D1 vs 3T Controle D3	4.300	2.529	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Controle D3	-6.120	3.599	ns	P>0.05
1T Estradiol D1 vs 3T Estradiol D3	7.150	4.205	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Estradiol D3	-3.270	1.923	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 1T Estradiol D3	-2.430	1.429	ns	P>0.05	2T Estradiol D0 vs 2T Controle D1	0.4500	0.2647	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Controle D0	3.990	2.347	ns	P>0.05	2T Estradiol D0 vs 2T Estradiol D1	-1.780	1.047	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Estradiol D0	4.920	2.894	ns	P>0.05	2T Estradiol D0 vs 2T Controle D3	-4.100	2.411	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Controle D1	5.370	3.158	ns	P>0.05	2T Estradiol D0 vs 2T Estradiol D3	-2.800	1.647	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Estradiol D1	3.140	1.847	ns	P>0.05	2T Estradiol D0 vs 3T Controle D0	-3.330	1.959	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Controle D3	0.8200	0.4823	ns	P>0.05	2T Estradiol D0 vs 3T Estradiol D0	-2.830	1.664	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Estradiol D3	2.120	1.247	ns	P>0.05	2T Estradiol D0 vs 3T Controle D1	-3.200	1.882	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Controle D0	1.590	0.9351	ns	P>0.05	2T Estradiol D0 vs 3T Estradiol D1	-9.480	5.576	*	P<0.05
1T Controle D3 vs 3T Estradiol D0	2.090	1.229	ns	P>0.05	2T Estradiol D0 vs 3T Controle D3	-7.050	4.146	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Controle D1	1.720	1.012	ns	P>0.05	2T Estradiol D0 vs 3T Estradiol D3	-4.200	2.470	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Estradiol D1	-4.560	2.682	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 2T Estradiol D1	-2.230	1.312	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Controle D3	-2.130	1.253	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 2T Controle D3	-4.550	2.676	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Estradiol D3	0.7200	0.4235	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 2T Estradiol D3	-3.250	1.911	ns	P>0.05
1T Estradiol D3 vs 2T Controle D0	6.420	3.776	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Controle D0	-3.780	2.223	ns	P>0.05
1T Estradiol D3 vs 2T Estradiol D0	7.350	4.323	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Estradiol D0	-3.280	1.929	ns	P>0.05
1T Estradiol D3 vs 2T Controle D1	7.800	4.588	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Controle D1	-3.650	2.147	ns	P>0.05
1T Estradiol D3 vs 2T Estradiol D1	5.570	3.276	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Estradiol D1	-9.930	5.840	*	P<0.05
1T Estradiol D3 vs 2T Controle D3	3.250	1.911	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Controle D3	-7.500	4.411	ns	P>0.05
1T Estradiol D3 vs 2T Estradiol D3	4.550	2.676	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Estradiol D3	-4.650	2.735	ns	P>0.05
1T Estradiol D3 vs 3T Controle D0	4.020	2.364	ns	P>0.05	2T Estradiol D1 vs 2T Controle D3	-2.320	1.364	ns	P>0.05
1T Estradiol D3 vs 3T Estradiol D0	4.520	2.658	ns	P>0.05	2T Estradiol D1 vs 2T Estradiol D3	-1.020	0.5999	ns	P>0.05
1T Estradiol D3 vs 3T Controle D1	4.150	2.441	ns	P>0.05	2T Estradiol D1 vs 3T Controle D0	-1.550	0.9116	ns	P>0.05
1T Estradiol D3 vs 3T Estradiol D1	-2.130	1.253	ns	P>0.05	2T Estradiol D1 vs 3T Estradiol D0	-1.050	0.6176	ns	P>0.05
1T Estradiol D3 vs 3T Controle D3	0.3000	0.1764	ns	P>0.05	2T Estradiol D1 vs 3T Controle D1	-1.420	0.8352	ns	P>0.05
1T Estradiol D3 vs 3T Estradiol D3	3.150	1.853	ns	P>0.05	2T Estradiol D1 vs 3T Estradiol D1	-7.700	4.529	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 2T Estradiol D0	0.9300	0.5470	ns	P>0.05					

2T Estradiol D1 vs 3T Controle D3	-5.270	3.100	ns	P>0.05
2T Estradiol D1 vs 3T Estradiol D3	-2.420	1.423	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 2T Estradiol D3	1.300	0.7646	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Controle D0	0.7700	0.4529	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Estradiol D0	1.270	0.7469	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Controle D1	0.9000	0.5293	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Estradiol D1	-5.380	3.164	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Controle D3	-2.950	1.735	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Estradiol D3	-0.10000	0.05881	ns	P>0.05
2T Estradiol D3 vs 3T Controle D0	-0.5300	0.3117	ns	P>0.05
2T Estradiol D3 vs 3T Estradiol D0	-0.03000	0.01764	ns	P>0.05
2T Estradiol D3 vs 3T Controle D1	-0.4000	0.2353	ns	P>0.05
2T Estradiol D3 vs 3T Estradiol D1	-6.680	3.929	ns	P>0.05
2T Estradiol D3 vs 3T Controle D3	-4.250	2.500	ns	P>0.05
2T Estradiol D3 vs 3T Estradiol D3	-1.400	0.8234	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T Estradiol D0	0.5000	0.2941	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T Controle D1	0.1300	0.07646	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T Estradiol D1	-6.150	3.617	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T Controle D3	-3.720	2.188	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T Estradiol D3	-0.8700	0.5117	ns	P>0.05
3T Estradiol D0 vs 3T Controle D1	-0.3700	0.2176	ns	P>0.05
3T Estradiol D0 vs 3T Estradiol D1	-6.650	3.911	ns	P>0.05
3T Estradiol D0 vs 3T Controle D3	-4.220	2.482	ns	P>0.05
3T Estradiol D0 vs 3T Estradiol D3	-1.370	0.8058	ns	P>0.05
3T Controle D1 vs 3T Estradiol D1	-6.280	3.694	ns	P>0.05
3T Controle D1 vs 3T Controle D3	-3.850	2.264	ns	P>0.05
3T Controle D1 vs 3T Estradiol D3	-1.000	0.5881	ns	P>0.05
3T Estradiol D1 vs 3T Controle D3	2.430	1.429	ns	P>0.05
3T Estradiol D1 vs 3T Estradiol D3	5.280	3.105	ns	P>0.05
3T Controle D3 vs 3T Estradiol D3	2.850	1.676	ns	P>0.05

Quantificação Controle X Progesterona

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.188 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
1T Controle D0 vs 1T Prog D0	-2.230	1.408	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Controle D1	-1.630	1.029	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Prog D1	-4.360	2.753	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Controle D3	4.000	2.526	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Prog D3	3.940	2.488	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Controle D0	7.990	5.045	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Prog D0	7.520	4.748	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Controle D1	9.370	5.916	* P<0.05
1T Controle D0 vs 2T Prog D1	8.240	5.203	* P<0.05
1T Controle D0 vs 2T Controle D3	4.820	3.043	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Prog D3	6.870	4.338	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D0	5.590	3.529	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Prog D0	6.370	4.022	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D1	5.720	3.611	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Prog D1	1.970	1.244	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D3	1.870	1.181	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Prog D3	-0.4600	0.2904	ns P>0.05
1T Prog D0 vs 1T Controle D1	0.6000	0.3788	ns P>0.05

1T Prog D0 vs 1T Prog D1	-2.130	1.345	ns	P>0.05	1T Prog D1 vs 2T Prog D1	12.600	7.955	***	P<0.001
1T Prog D0 vs 1T Controle D3	6.230	3.933	ns	P>0.05	1T Prog D1 vs 2T Controle D3	9.180	5.796	*	P<0.05
1T Prog D0 vs 1T Prog D3	6.170	3.896	ns	P>0.05	1T Prog D1 vs 2T Prog D3	11.230	7.090	***	P<0.001
1T Prog D0 vs 2T Controle D0	10.220	6.453	**	P<0.01	1T Prog D1 vs 3T Controle D0	9.950	6.282	**	P<0.01
1T Prog D0 vs 2T Prog D0	9.750	6.156	**	P<0.01	1T Prog D1 vs 3T Prog D0	10.730	6.775	**	P<0.01
1T Prog D0 vs 2T Controle D1	11.600	7.324	***	P<0.001	1T Prog D1 vs 3T Controle D1	10.080	6.364	**	P<0.01
1T Prog D0 vs 2T Prog D1	10.470	6.611	**	P<0.01	1T Prog D1 vs 3T Prog D1	6.330	3.997	ns	P>0.05
1T Prog D0 vs 2T Controle D3	7.050	4.451	ns	P>0.05	1T Prog D1 vs 3T Controle D3	6.230	3.933	ns	P>0.05
1T Prog D0 vs 2T Prog D3	9.100	5.746	*	P<0.05	1T Prog D1 vs 3T Prog D3	3.900	2.462	ns	P>0.05
1T Prog D0 vs 3T Controle D0	7.820	4.937	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 1T Prog D3	-0.06000	0.03788	ns	P>0.05
1T Prog D0 vs 3T Prog D0	8.600	5.430	*	P<0.05	1T Controle D3 vs 2T Controle D0	3.990	2.519	ns	P>0.05
1T Prog D0 vs 3T Controle D1	7.950	5.019	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 2T Prog D0	3.520	2.222	ns	P>0.05
1T Prog D0 vs 3T Prog D1	4.200	2.652	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 2T Controle D1	5.370	3.390	ns	P>0.05
1T Prog D0 vs 3T Controle D3	4.100	2.589	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 2T Prog D1	4.240	2.677	ns	P>0.05
1T Prog D0 vs 3T Prog D3	1.770	1.118	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 2T Controle D3	0.8200	0.5177	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 1T Prog D1	-2.730	1.724	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 2T Prog D3	2.870	1.812	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 1T Controle D3	5.630	3.555	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 3T Controle D0	1.590	1.004	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 1T Prog D3	5.570	3.517	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 3T Prog D0	2.370	1.496	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Controle D0	9.620	6.074	**	P<0.01	1T Controle D3 vs 3T Controle D1	1.720	1.086	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Prog D0	9.150	5.777	*	P<0.05	1T Controle D3 vs 3T Prog D1	-2.030	1.282	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Controle D1	11.000	6.945	**	P<0.01	1T Controle D3 vs 3T Controle D3	-2.130	1.345	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Prog D1	9.870	6.232	**	P<0.01	1T Controle D3 vs 3T Prog D3	-4.460	2.816	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Controle D3	6.450	4.072	ns	P>0.05	1T Prog D3 vs 2T Controle D0	4.050	2.557	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Prog D3	8.500	5.367	*	P<0.05	1T Prog D3 vs 2T Prog D0	3.580	2.260	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Controle D0	7.220	4.559	ns	P>0.05	1T Prog D3 vs 2T Controle D1	5.430	3.428	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Prog D0	8.000	5.051	ns	P>0.05	1T Prog D3 vs 2T Prog D1	4.300	2.715	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Controle D1	7.350	4.641	ns	P>0.05	1T Prog D3 vs 2T Controle D3	0.8800	0.5556	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Prog D1	3.600	2.273	ns	P>0.05	1T Prog D3 vs 2T Prog D3	2.930	1.850	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Controle D3	3.500	2.210	ns	P>0.05	1T Prog D3 vs 3T Controle D0	1.650	1.042	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Prog D3	1.170	0.7387	ns	P>0.05	1T Prog D3 vs 3T Prog D0	2.430	1.534	ns	P>0.05
1T Prog D1 vs 1T Controle D3	8.360	5.278	*	P<0.05	1T Prog D3 vs 3T Controle D1	1.780	1.124	ns	P>0.05
1T Prog D1 vs 1T Prog D3	8.300	5.240	*	P<0.05	1T Prog D3 vs 3T Prog D1	-1.970	1.244	ns	P>0.05
1T Prog D1 vs 2T Controle D0	12.350	7.798	***	P<0.001	1T Prog D3 vs 3T Controle D3	-2.070	1.307	ns	P>0.05
1T Prog D1 vs 2T Prog D0	11.880	7.501	***	P<0.001	1T Prog D3 vs 3T Prog D3	-4.400	2.778	ns	P>0.05
1T Prog D1 vs 2T Controle D1	13.730	8.669	***	P<0.001	2T Controle D0 vs 2T Prog D0	-0.4700	0.2967	ns	P>0.05

2T Controle D0 vs 2T Controle D1	1.380	0.8713	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 2T Prog D1	0.2500	0.1578	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 2T Controle D3	-3.170	2.001	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 2T Prog D3	-1.120	0.7071	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 3T Controle D0	-2.400	1.515	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 3T Prog D0	-1.620	1.023	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 3T Controle D1	-2.270	1.433	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 3T Prog D1	-6.020	3.801	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 3T Controle D3	-6.120	3.864	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 3T Prog D3	-8.450	5.335	*	P<0.05
2T Prog D0 vs 2T Controle D1	1.850	1.168	ns	P>0.05
2T Prog D0 vs 2T Prog D1	0.7200	0.4546	ns	P>0.05
2T Prog D0 vs 2T Controle D3	-2.700	1.705	ns	P>0.05
2T Prog D0 vs 2T Prog D3	-0.6500	0.4104	ns	P>0.05
2T Prog D0 vs 3T Controle D0	-1.930	1.219	ns	P>0.05
2T Prog D0 vs 3T Prog D0	-1.150	0.7261	ns	P>0.05
2T Prog D0 vs 3T Controle D1	-1.800	1.136	ns	P>0.05
2T Prog D0 vs 3T Prog D1	-5.550	3.504	ns	P>0.05
2T Prog D0 vs 3T Controle D3	-5.650	3.567	ns	P>0.05
2T Prog D0 vs 3T Prog D3	-7.980	5.038	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 2T Prog D1	-1.130	0.7135	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 2T Controle D3	-4.550	2.873	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 2T Prog D3	-2.500	1.578	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 3T Controle D0	-3.780	2.387	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 3T Prog D0	-3.000	1.894	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 3T Controle D1	-3.650	2.305	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 3T Prog D1	-7.400	4.672	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 3T Controle D3	-7.500	4.735	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 3T Prog D3	-9.830	6.206	**	P<0.01
2T Prog D1 vs 2T Controle D3	-3.420	2.159	ns	P>0.05
2T Prog D1 vs 2T Prog D3	-1.370	0.8650	ns	P>0.05
2T Prog D1 vs 3T Controle D0	-2.650	1.673	ns	P>0.05
2T Prog D1 vs 3T Prog D0	-1.870	1.181	ns	P>0.05
2T Prog D1 vs 3T Controle D1	-2.520	1.591	ns	P>0.05
2T Prog D1 vs 3T Prog D1	-6.270	3.959	ns	P>0.05

2T Prog D1 vs 3T Prog D1	-6.270	3.959	ns	P>0.05
2T Prog D1 vs 3T Controle D3	-6.370	4.022	ns	P>0.05
2T Prog D1 vs 3T Prog D3	-8.700	5.493	*	P<0.05
2T Controle D3 vs 2T Prog D3	2.050	1.294	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Controle D0	0.7700	0.4862	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Prog D0	1.550	0.9786	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Controle D1	0.9000	0.5682	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Prog D1	-2.850	1.799	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Controle D3	-2.950	1.863	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Prog D3	-5.280	3.334	ns	P>0.05
2T Prog D3 vs 3T Controle D0	-1.280	0.8082	ns	P>0.05
2T Prog D3 vs 3T Prog D0	-0.5000	0.3157	ns	P>0.05
2T Prog D3 vs 3T Controle D1	-1.150	0.7261	ns	P>0.05
2T Prog D3 vs 3T Prog D1	-4.900	3.094	ns	P>0.05
2T Prog D3 vs 3T Controle D3	-5.000	3.157	ns	P>0.05
2T Prog D3 vs 3T Prog D3	-7.330	4.628	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T Prog D0	0.7800	0.4925	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T Controle D1	0.1300	0.08208	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T Prog D1	-3.620	2.286	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T Controle D3	-3.720	2.349	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T Prog D3	-6.050	3.820	ns	P>0.05
3T Prog D0 vs 3T Controle D1	-0.6500	0.4104	ns	P>0.05
3T Prog D0 vs 3T Prog D1	-4.400	2.778	ns	P>0.05
3T Prog D0 vs 3T Controle D3	-4.500	2.841	ns	P>0.05
3T Prog D0 vs 3T Prog D3	-6.830	4.312	ns	P>0.05
3T Controle D1 vs 3T Prog D1	-3.750	2.368	ns	P>0.05
3T Controle D1 vs 3T Controle D3	-3.850	2.431	ns	P>0.05
3T Controle D1 vs 3T Prog D3	-6.180	3.902	ns	P>0.05
3T Prog D1 vs 3T Controle D3	-0.1000	0.06314	ns	P>0.05
3T Prog D1 vs 3T Prog D3	-2.430	1.534	ns	P>0.05
3T Controle D3 vs 3T Prog D3	-2.330	1.471	ns	P>0.05

Quantificação Controle X Interferon

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.188 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
1T Controle D0 vs 1T Interf D0	3.170	2.197	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Controle D1	-1.630	1.129	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Interf D1	-0.9000	0.6236	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Controle D3	4.000	2.772	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Interf D3	2.200	1.524	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Controle D0	7.990	5.537	* P<0.05
1T Controle D0 vs 2T Interf D0	2.490	1.725	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Controle D1	9.370	6.493	** P<0.01
1T Controle D0 vs 2T Interf D1	8.770	6.077	** P<0.01
1T Controle D0 vs 2T Controle D3	4.820	3.340	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Interf D3	4.190	2.903	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D0	5.590	3.874	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Interf D0	2.970	2.058	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D1	5.720	3.964	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Interf D1	1.890	1.310	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D3	1.870	1.296	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Interf D3	1.340	0.9285	ns P>0.05
1T Interf D0 vs 1T Controle D1	-4.800	3.326	ns P>0.05

1T Interf D0 vs 1T Controle D1	-4.800	3.326	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 1T Interf D1	-4.070	2.820	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 1T Controle D3	0.8300	0.5751	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 1T Interf D3	-0.9700	0.6722	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 2T Controle D0	4.820	3.340	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 2T Interf D0	-0.6800	0.4712	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 2T Controle D1	6.200	4.296	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 2T Interf D1	5.600	3.880	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 2T Controle D3	1.650	1.143	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 2T Interf D3	1.020	0.7068	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 3T Controle D0	2.420	1.677	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 3T Interf D0	-0.2000	0.1386	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 3T Controle D1	2.550	1.767	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 3T Interf D1	-1.280	0.8870	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 3T Controle D3	-1.300	0.9008	ns	P>0.05
1T Interf D0 vs 3T Interf D3	-1.830	1.268	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 1T Interf D1	0.7300	0.5058	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 1T Controle D3	5.630	3.901	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 1T Interf D3	3.830	2.654	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Controle D0	9.620	6.666	**	P<0.01
1T Controle D1 vs 2T Interf D0	4.120	2.855	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Controle D1	11.000	7.622	***	P<0.001
1T Controle D1 vs 2T Interf D1	10.400	7.207	***	P<0.001
1T Controle D1 vs 2T Controle D3	6.450	4.469	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Interf D3	5.820	4.033	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Controle D0	7.220	5.003	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Interf D0	4.600	3.188	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Controle D1	7.350	5.093	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Interf D1	3.520	2.439	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Controle D3	3.500	2.425	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Interf D3	2.970	2.058	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 1T Controle D3	4.900	3.395	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 1T Interf D3	3.100	2.148	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 2T Controle D0	8.890	6.160	**	P<0.01
1T Interf D1 vs 2T Interf D0	3.390	2.349	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 2T Controle D1	10.270	7.117	***	P<0.001

1T Interf D1 vs 2T Controle D1	10.270	7.117	***	P<0.001	2T Controle D0 vs 2T Interf D0	-5.500	3.811	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 2T Interf D1	9.670	6.701	**	P<0.01	2T Controle D0 vs 2T Controle D1	1.380	0.9563	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 2T Controle D3	5.720	3.964	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 2T Interf D1	0.7800	0.5405	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 2T Interf D3	5.090	3.527	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 2T Controle D3	-3.170	2.197	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 3T Controle D0	6.490	4.497	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 2T Interf D3	-3.800	2.633	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 3T Interf D0	3.870	2.682	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Controle D0	-2.400	1.663	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 3T Controle D1	6.620	4.587	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Interf D0	-5.020	3.479	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 3T Interf D1	2.790	1.933	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Controle D1	-2.270	1.573	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 3T Controle D3	2.770	1.919	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Interf D1	-6.100	4.227	ns	P>0.05
1T Interf D1 vs 3T Interf D3	2.240	1.552	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Controle D3	-6.120	4.241	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 1T Interf D3	-1.800	1.247	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Interf D3	-6.650	4.608	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Controle D0	3.990	2.765	ns	P>0.05	2T Interf D0 vs 2T Controle D1	6.880	4.767	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Interf D0	-1.510	1.046	ns	P>0.05	2T Interf D0 vs 2T Interf D1	6.280	4.352	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Controle D1	5.370	3.721	ns	P>0.05	2T Interf D0 vs 2T Controle D3	2.330	1.615	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Interf D1	4.770	3.305	ns	P>0.05	2T Interf D0 vs 2T Interf D3	1.700	1.178	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Controle D3	0.8200	0.5682	ns	P>0.05	2T Interf D0 vs 3T Controle D0	3.100	2.148	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Interf D3	0.1900	0.1317	ns	P>0.05	2T Interf D0 vs 3T Interf D0	0.4800	0.3326	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Controle D0	1.590	1.102	ns	P>0.05	2T Interf D0 vs 3T Controle D1	3.230	2.238	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Interf D0	-1.030	0.7137	ns	P>0.05	2T Interf D0 vs 3T Interf D1	-0.6000	0.4158	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Controle D1	1.720	1.192	ns	P>0.05	2T Interf D0 vs 3T Controle D3	-0.6200	0.4296	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Interf D1	-2.110	1.462	ns	P>0.05	2T Interf D0 vs 3T Interf D3	-1.150	0.7969	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Controle D3	-2.130	1.476	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 2T Interf D1	-0.6000	0.4158	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Interf D3	-2.660	1.843	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 2T Controle D3	-4.550	3.153	ns	P>0.05
1T Interf D3 vs 2T Controle D0	5.790	4.012	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 2T Interf D3	-5.180	3.589	ns	P>0.05
1T Interf D3 vs 2T Interf D0	0.2900	0.2010	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Controle D0	-3.780	2.619	ns	P>0.05
1T Interf D3 vs 2T Controle D1	7.170	4.968	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Interf D0	-6.400	4.435	ns	P>0.05
1T Interf D3 vs 2T Interf D1	6.570	4.553	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Controle D1	-3.650	2.529	ns	P>0.05
1T Interf D3 vs 2T Controle D3	2.620	1.816	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Interf D1	-7.480	5.183	ns	P>0.05
1T Interf D3 vs 2T Interf D3	1.990	1.379	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Controle D3	-7.500	5.197	*	P<0.05
1T Interf D3 vs 3T Controle D0	3.390	2.349	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Interf D3	-8.030	5.564	*	P<0.05
1T Interf D3 vs 3T Interf D0	0.7700	0.5336	ns	P>0.05	2T Interf D1 vs 2T Controle D3	-3.950	2.737	ns	P>0.05
1T Interf D3 vs 3T Controle D1	3.520	2.439	ns	P>0.05	2T Interf D1 vs 2T Interf D3	-4.580	3.174	ns	P>0.05
1T Interf D3 vs 3T Interf D1	-0.3100	0.2148	ns	P>0.05	2T Interf D1 vs 3T Controle D0	-3.180	2.204	ns	P>0.05
1T Interf D3 vs 3T Controle D3	-0.3300	0.2287	ns	P>0.05	2T Interf D1 vs 3T Interf D0	-5.800	4.019	ns	P>0.05
1T Interf D3 vs 3T Interf D3	-0.8600	0.5959	ns	P>0.05	2T Interf D1 vs 3T Controle D1	-3.050	2.113	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 2T Interf D0	-5.500	3.811	ns	P>0.05	2T Interf D1 vs 3T Interf D1	-6.880	4.767	ns	P>0.05

2T Interf D1 vs 3T Interf D1	-6.880	4.767	ns	P>0.05	Quantificação Controle X Triptofano
2T Interf D1 vs 3T Controle D3	-6.900	4.781	ns	P>0.05	
2T Interf D1 vs 3T Interf D3	-7.430	5.149	ns	P>0.05	One-way Analysis of Variance (ANOVA)
2T Controle D3 vs 2T Interf D3	-0.6300	0.4366	ns	P>0.05	
2T Controle D3 vs 3T Controle D0	0.7700	0.5336	ns	P>0.05	The P value is < 0.0001, considered extremely significant. Variation among column means is significantly greater than expected by chance.
2T Controle D3 vs 3T Interf D0	-1.850	1.282	ns	P>0.05	
2T Controle D3 vs 3T Controle D1	0.9000	0.6236	ns	P>0.05	Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test If the value of q is greater than 5.188 then the P value is less than 0.05.
2T Controle D3 vs 3T Interf D1	-2.930	2.030	ns	P>0.05	
2T Controle D3 vs 3T Controle D3	-2.950	2.044	ns	P>0.05	
2T Controle D3 vs 3T Interf D3	-3.480	2.411	ns	P>0.05	
2T Interf D3 vs 3T Controle D0	1.400	0.9701	ns	P>0.05	
2T Interf D3 vs 3T Interf D0	-1.220	0.8454	ns	P>0.05	
2T Interf D3 vs 3T Controle D1	1.530	1.060	ns	P>0.05	
2T Interf D3 vs 3T Interf D1	-2.300	1.594	ns	P>0.05	
2T Interf D3 vs 3T Controle D3	-2.320	1.608	ns	P>0.05	
2T Interf D3 vs 3T Interf D3	-2.850	1.975	ns	P>0.05	
3T Controle D0 vs 3T Interf D0	-2.620	1.816	ns	P>0.05	
3T Controle D0 vs 3T Controle D1	0.1300	0.09008	ns	P>0.05	
3T Controle D0 vs 3T Interf D1	-3.700	2.564	ns	P>0.05	
3T Controle D0 vs 3T Controle D3	-3.720	2.578	ns	P>0.05	
3T Controle D0 vs 3T Interf D3	-4.250	2.945	ns	P>0.05	
3T Interf D0 vs 3T Controle D1	2.750	1.906	ns	P>0.05	
3T Interf D0 vs 3T Interf D1	-1.080	0.7484	ns	P>0.05	
3T Interf D0 vs 3T Controle D3	-1.100	0.7622	ns	P>0.05	
3T Interf D0 vs 3T Interf D3	-1.630	1.129	ns	P>0.05	
3T Controle D1 vs 3T Interf D1	-3.830	2.654	ns	P>0.05	
3T Controle D1 vs 3T Controle D3	-3.850	2.668	ns	P>0.05	
3T Controle D1 vs 3T Interf D3	-4.380	3.035	ns	P>0.05	
3T Interf D1 vs 3T Controle D3	-0.02000	0.01386	ns	P>0.05	
3T Interf D1 vs 3T Interf D3	-0.5500	0.3811	ns	P>0.05	
3T Controle D3 vs 3T Interf D3	-0.5300	0.3673	ns	P>0.05	

Comparison	Mean Difference	q	P value
1T Controle D0 vs 1T Tript D0	2.640	1.965	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Controle D1	-1.630	1.213	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Tript D1	1.800	1.340	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Controle D3	4.000	2.977	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Tript D3	1.970	1.466	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Controle D0	7.990	5.947	* P<0.05
1T Controle D0 vs 2T Tript D0	6.090	4.533	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Controle D1	9.370	6.975	** P<0.01
1T Controle D0 vs 2T Tript D1	7.740	5.761	* P<0.05
1T Controle D0 vs 2T Controle D3	4.820	3.588	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Tript D3	2.420	1.801	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D0	5.590	4.161	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Tript D0	6.870	5.114	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D1	5.720	4.258	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Tript D1	4.670	3.476	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D3	1.870	1.392	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Tript D3	2.590	1.928	ns P>0.05
1T Tript D0 vs 1T Controle D1	-4.270	3.178	ns P>0.05

1T Tript D0 vs 1T Controle D1	-4.270	3.178	ns	P>0.05	1T Tript D1 vs 2T Controle D1	7.570	5.635	*	P<0.05
1T Tript D0 vs 1T Tript D1	-0.8400	0.6253	ns	P>0.05	1T Tript D1 vs 2T Tript D1	5.940	4.421	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 1T Controle D3	1.360	1.012	ns	P>0.05	1T Tript D1 vs 2T Controle D3	3.020	2.248	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 1T Tript D3	-0.6700	0.4987	ns	P>0.05	1T Tript D1 vs 2T Tript D3	0.6200	0.4615	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 2T Controle D0	5.350	3.982	ns	P>0.05	1T Tript D1 vs 3T Controle D0	3.790	2.821	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 2T Tript D0	3.450	2.568	ns	P>0.05	1T Tript D1 vs 3T Tript D0	5.070	3.774	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 2T Controle D1	6.730	5.009	ns	P>0.05	1T Tript D1 vs 3T Controle D1	3.920	2.918	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 2T Tript D1	5.100	3.796	ns	P>0.05	1T Tript D1 vs 3T Tript D1	2.870	2.136	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 2T Controle D3	2.180	1.623	ns	P>0.05	1T Tript D1 vs 3T Controle D3	0.07000	0.05210	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 2T Tript D3	-0.2200	0.1638	ns	P>0.05	1T Tript D1 vs 3T Tript D3	0.7900	0.5880	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 3T Controle D0	2.950	2.196	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 1T Tript D3	-2.030	1.511	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 3T Tript D0	4.230	3.149	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 2T Controle D0	3.990	2.970	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 3T Controle D1	3.080	2.293	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 2T Tript D0	2.090	1.556	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 3T Tript D1	2.030	1.511	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 2T Controle D1	5.370	3.997	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 3T Controle D3	-0.7700	0.5731	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 2T Tript D1	3.740	2.784	ns	P>0.05
1T Tript D0 vs 3T Tript D3	-0.05000	0.03722	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 2T Controle D3	0.8200	0.6104	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 1T Tript D1	3.430	2.553	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 2T Tript D3	-1.580	1.176	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 1T Controle D3	5.630	4.191	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 3T Controle D0	1.590	1.184	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 1T Tript D3	3.600	2.680	ns	P>0.05	1T Controle D3 vs 3T Tript D0	2.870	2.136	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Controle D0	9.620	7.161	***	P<0.001	1T Controle D3 vs 3T Controle D1	1.720	1.280	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Tript D0	7.720	5.746	*	P<0.05	1T Controle D3 vs 3T Tript D1	0.6700	0.4987	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Controle D1	11.000	8.188	***	P<0.001	1T Controle D3 vs 3T Controle D3	-2.130	1.585	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Tript D1	9.370	6.975	**	P<0.01	1T Controle D3 vs 3T Tript D3	-1.410	1.050	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Controle D3	6.450	4.801	ns	P>0.05	1T Tript D3 vs 2T Controle D0	6.020	4.481	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Tript D3	4.050	3.015	ns	P>0.05	1T Tript D3 vs 2T Tript D0	4.120	3.067	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Controle D0	7.220	5.374	*	P<0.05	1T Tript D3 vs 2T Controle D1	7.400	5.508	*	P<0.05
1T Controle D1 vs 3T Tript D0	8.500	6.327	**	P<0.01	1T Tript D3 vs 2T Tript D1	5.770	4.295	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Controle D1	7.350	5.471	*	P<0.05	1T Tript D3 vs 2T Controle D3	2.850	2.121	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Tript D1	6.300	4.689	ns	P>0.05	1T Tript D3 vs 2T Tript D3	0.4500	0.3350	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Controle D3	3.500	2.605	ns	P>0.05	1T Tript D3 vs 3T Controle D0	3.620	2.695	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T Tript D3	4.220	3.141	ns	P>0.05	1T Tript D3 vs 3T Tript D0	4.900	3.647	ns	P>0.05
1T Tript D1 vs 1T Controle D3	2.200	1.638	ns	P>0.05	1T Tript D3 vs 3T Controle D1	3.750	2.791	ns	P>0.05
1T Tript D1 vs 1T Tript D3	0.1700	0.1265	ns	P>0.05	1T Tript D3 vs 3T Tript D1	2.700	2.010	ns	P>0.05
1T Tript D1 vs 2T Controle D0	6.190	4.608	ns	P>0.05	1T Tript D3 vs 3T Controle D3	-0.1000	0.07443	ns	P>0.05
1T Tript D1 vs 2T Tript D0	4.290	3.193	ns	P>0.05	1T Tript D3 vs 3T Tript D3	0.6200	0.4615	ns	P>0.05
1T Tript D1 vs 2T Controle D1	7.570	5.635	*	P<0.05	2T Controle D0 vs 2T Tript D0	-1.900	1.414	ns	P>0.05

2T Controle D0 vs 2T Tript D0	-1.900	1.414	ns	P>0.05	2T Tript D1 vs 3T Tript D1	-3.070	2.285	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 2T Controle D1	1.380	1.027	ns	P>0.05	2T Tript D1 vs 3T Controle D3	-5.870	4.369	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 2T Tript D1	-0.2500	0.1861	ns	P>0.05	2T Tript D1 vs 3T Tript D3	-5.150	3.833	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 2T Controle D3	-3.170	2.360	ns	P>0.05	2T Controle D3 vs 2T Tript D3	-2.400	1.786	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 2T Tript D3	-5.570	4.146	ns	P>0.05	2T Controle D3 vs 3T Controle D0	0.7700	0.5731	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 3T Controle D0	-2.400	1.786	ns	P>0.05	2T Controle D3 vs 3T Tript D0	2.050	1.526	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 3T Tript D0	-1.120	0.8337	ns	P>0.05	2T Controle D3 vs 3T Controle D1	0.9000	0.6699	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 3T Controle D1	-2.270	1.690	ns	P>0.05	2T Controle D3 vs 3T Tript D1	-0.1500	0.1117	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 3T Tript D1	-3.320	2.471	ns	P>0.05	2T Controle D3 vs 3T Controle D3	-2.950	2.196	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 3T Controle D3	-6.120	4.555	ns	P>0.05	2T Controle D3 vs 3T Tript D3	-2.230	1.660	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 3T Tript D3	-5.400	4.019	ns	P>0.05	2T Tript D3 vs 3T Controle D0	3.170	2.360	ns	P>0.05
2T Tript D0 vs 2T Controle D1	3.280	2.441	ns	P>0.05	2T Tript D3 vs 3T Tript D0	4.450	3.312	ns	P>0.05
2T Tript D0 vs 2T Tript D1	1.650	1.228	ns	P>0.05	2T Tript D3 vs 3T Controle D1	3.300	2.456	ns	P>0.05
2T Tript D0 vs 2T Controle D3	-1.270	0.9453	ns	P>0.05	2T Tript D3 vs 3T Tript D1	2.250	1.675	ns	P>0.05
2T Tript D0 vs 2T Tript D3	-3.670	2.732	ns	P>0.05	2T Tript D3 vs 3T Controle D3	-0.5500	0.4094	ns	P>0.05
2T Tript D0 vs 3T Controle D0	-0.5000	0.3722	ns	P>0.05	2T Tript D3 vs 3T Tript D3	0.1700	0.1265	ns	P>0.05
2T Tript D0 vs 3T Tript D0	0.7800	0.5806	ns	P>0.05	3T Controle D0 vs 3T Tript D0	1.280	0.9528	ns	P>0.05
2T Tript D0 vs 3T Controle D1	-0.3700	0.2754	ns	P>0.05	3T Controle D0 vs 3T Controle D1	0.1300	0.09676	ns	P>0.05
2T Tript D0 vs 3T Tript D1	-1.420	1.057	ns	P>0.05	3T Controle D0 vs 3T Tript D1	-0.9200	0.6848	ns	P>0.05
2T Tript D0 vs 3T Controle D3	-4.220	3.141	ns	P>0.05	3T Controle D0 vs 3T Controle D3	-3.720	2.769	ns	P>0.05
2T Tript D0 vs 3T Tript D3	-3.500	2.605	ns	P>0.05	3T Controle D0 vs 3T Tript D3	-3.000	2.233	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 2T Tript D1	-1.630	1.213	ns	P>0.05	3T Tript D0 vs 3T Controle D1	-1.150	0.8560	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 2T Controle D3	-4.550	3.387	ns	P>0.05	3T Tript D0 vs 3T Tript D1	-2.200	1.638	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 2T Tript D3	-6.950	5.173	ns	P>0.05	3T Tript D0 vs 3T Controle D3	-5.000	3.722	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 3T Controle D0	-3.780	2.814	ns	P>0.05	3T Tript D0 vs 3T Tript D3	-4.280	3.186	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 3T Tript D0	-2.500	1.861	ns	P>0.05	3T Controle D1 vs 3T Tript D1	-1.050	0.7816	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 3T Controle D1	-3.650	2.717	ns	P>0.05	3T Controle D1 vs 3T Controle D3	-3.850	2.866	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 3T Tript D1	-4.700	3.498	ns	P>0.05	3T Controle D1 vs 3T Tript D3	-3.130	2.330	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 3T Controle D3	-7.500	5.583	*	P<0.05	3T Tript D1 vs 3T Controle D3	-2.800	2.084	ns	P>0.05
2T Controle D1 vs 3T Tript D3	-6.780	5.047	ns	P>0.05	3T Tript D1 vs 3T Tript D3	-2.080	1.548	ns	P>0.05
2T Tript D1 vs 2T Controle D3	-2.920	2.173	ns	P>0.05	3T Controle D3 vs 3T Tript D3	0.7200	0.5359	ns	P>0.05
2T Tript D1 vs 2T Tript D3	-5.320	3.960	ns	P>0.05					
2T Tript D1 vs 3T Controle D0	-2.150	1.600	ns	P>0.05					
2T Tript D1 vs 3T Tript D0	-0.8700	0.6476	ns	P>0.05					
2T Tript D1 vs 3T Controle D1	-2.020	1.504	ns	P>0.05					
2T Tript D1 vs 3T Tript D1	-3.070	2.285	ns	P>0.05					

Quantificação Controle X 1MT

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.188 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
1T Controle D0 vs 1T 1MT D0	2.870	2.215	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Controle D1	-1.630	1.258	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T 1MT D1	2.470	1.906	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T Controle D3	4.000	3.087	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 1T 1MT D3	3.870	2.986	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T Controle D0	7.990	6.166	** P<0.01
1T Controle D0 vs 2T 1MT D0	9.570	7.385	*** P<0.001
1T Controle D0 vs 2T Controle D1	9.370	7.231	*** P<0.001
1T Controle D0 vs 2T 1MT D1	9.440	7.285	*** P<0.001
1T Controle D0 vs 2T Controle D3	4.820	3.720	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 2T 1MT D3	5.270	4.067	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D0	5.590	4.314	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T 1MT D0	7.420	5.726	* P<0.05
1T Controle D0 vs 3T Controle D1	5.720	4.414	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T 1MT D1	8.740	6.745	** P<0.01
1T Controle D0 vs 3T Controle D3	1.870	1.443	ns P>0.05
1T Controle D0 vs 3T 1MT D3	5.270	4.067	ns P>0.05
1T 1MT D0 vs 1T Controle D1	-4.500	3.473	ns P>0.05

1T 1MT D0 vs 1T Controle D1	-4.500	3.473	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 1T 1MT D1	-0.4000	0.3087	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 1T Controle D3	1.130	0.8720	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 1T 1MT D3	1.000	0.7717	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 2T Controle D0	5.120	3.951	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 2T 1MT D0	6.700	5.170	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 2T Controle D1	6.500	5.016	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 2T 1MT D1	6.570	5.070	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 2T Controle D3	1.950	1.505	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 2T 1MT D3	2.400	1.852	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 3T Controle D0	2.720	2.099	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 3T 1MT D0	4.550	3.511	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 3T Controle D1	2.850	2.199	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 3T 1MT D1	5.870	4.530	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 3T Controle D3	-1.000	0.7717	ns	P>0.05
1T 1MT D0 vs 3T 1MT D3	2.400	1.852	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 1T 1MT D1	4.100	3.164	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 1T Controle D3	5.630	4.345	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 1T 1MT D3	5.500	4.244	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T Controle D0	9.620	7.424	***	P<0.001
1T Controle D1 vs 2T 1MT D0	11.200	8.643	***	P<0.001
1T Controle D1 vs 2T Controle D1	11.000	8.489	***	P<0.001
1T Controle D1 vs 2T 1MT D1	11.070	8.543	***	P<0.001
1T Controle D1 vs 2T Controle D3	6.450	4.977	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 2T 1MT D3	6.900	5.325	*	P<0.05
1T Controle D1 vs 3T Controle D0	7.220	5.572	*	P<0.05
1T Controle D1 vs 3T 1MT D0	9.050	6.984	**	P<0.01
1T Controle D1 vs 3T Controle D1	7.350	5.672	*	P<0.05
1T Controle D1 vs 3T 1MT D1	10.370	8.002	***	P<0.001
1T Controle D1 vs 3T Controle D3	3.500	2.701	ns	P>0.05
1T Controle D1 vs 3T 1MT D3	6.900	5.325	*	P<0.05
1T 1MT D1 vs 1T Controle D3	1.530	1.181	ns	P>0.05
1T 1MT D1 vs 1T 1MT D3	1.400	1.080	ns	P>0.05
1T 1MT D1 vs 2T Controle D0	5.520	4.260	ns	P>0.05
1T 1MT D1 vs 2T 1MT D0	7.100	5.479	*	P<0.05
1T 1MT D1 vs 2T Controle D1	6.900	5.325	*	P<0.05

1T 1MT D1 vs 2T Controle D1	6.900	5.325	*	P<0.05	2T Controle D0 vs 2T 1MT D0	1.580	1.219	ns	P>0.05
1T 1MT D1 vs 2T 1MT D1	6.970	5.379	*	P<0.05	2T Controle D0 vs 2T Controle D1	1.380	1.065	ns	P>0.05
1T 1MT D1 vs 2T Controle D3	2.350	1.813	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 2T 1MT D1	1.450	1.119	ns	P>0.05
1T 1MT D1 vs 2T 1MT D3	2.800	2.161	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 2T Controle D3	-3.170	2.446	ns	P>0.05
1T 1MT D1 vs 3T Controle D0	3.120	2.408	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 2T 1MT D3	-2.720	2.099	ns	P>0.05
1T 1MT D1 vs 3T 1MT D0	4.950	3.820	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Controle D0	-2.400	1.852	ns	P>0.05
1T 1MT D1 vs 3T Controle D1	3.250	2.508	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T 1MT D0	-0.5700	0.4399	ns	P>0.05
1T 1MT D1 vs 3T 1MT D1	6.270	4.839	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Controle D1	-2.270	1.752	ns	P>0.05
1T 1MT D1 vs 3T Controle D3	-0.6000	0.4630	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T 1MT D1	0.7500	0.5788	ns	P>0.05
1T 1MT D1 vs 3T 1MT D3	2.800	2.161	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T Controle D3	-6.120	4.723	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 1T 1MT D3	-0.1300	0.1003	ns	P>0.05	2T Controle D0 vs 3T 1MT D3	-2.720	2.099	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Controle D0	3.990	3.079	ns	P>0.05	2T 1MT D0 vs 2T Controle D1	-0.2000	0.1543	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T 1MT D0	5.570	4.298	ns	P>0.05	2T 1MT D0 vs 2T 1MT D1	-0.1300	0.1003	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Controle D1	5.370	4.144	ns	P>0.05	2T 1MT D0 vs 2T Controle D3	-4.750	3.666	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T 1MT D1	5.440	4.198	ns	P>0.05	2T 1MT D0 vs 2T 1MT D3	-4.300	3.318	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T Controle D3	0.8200	0.6328	ns	P>0.05	2T 1MT D0 vs 3T Controle D0	-3.980	3.071	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 2T 1MT D3	1.270	0.9801	ns	P>0.05	2T 1MT D0 vs 3T 1MT D0	-2.150	1.659	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Controle D0	1.590	1.227	ns	P>0.05	2T 1MT D0 vs 3T Controle D1	-3.850	2.971	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T 1MT D0	3.420	2.639	ns	P>0.05	2T 1MT D0 vs 3T 1MT D1	-0.8300	0.6405	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Controle D1	1.720	1.327	ns	P>0.05	2T 1MT D0 vs 3T Controle D3	-7.700	5.942	*	P<0.05
1T Controle D3 vs 3T 1MT D1	4.740	3.658	ns	P>0.05	2T 1MT D0 vs 3T 1MT D3	-4.300	3.318	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T Controle D3	-2.130	1.644	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 2T 1MT D1	0.07000	0.05402	ns	P>0.05
1T Controle D3 vs 3T 1MT D3	1.270	0.9801	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 2T Controle D3	-4.550	3.511	ns	P>0.05
1T 1MT D3 vs 2T Controle D0	4.120	3.179	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 2T 1MT D3	-4.100	3.164	ns	P>0.05
1T 1MT D3 vs 2T 1MT D0	5.700	4.399	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Controle D0	-3.780	2.917	ns	P>0.05
1T 1MT D3 vs 2T Controle D1	5.500	4.244	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T 1MT D0	-1.950	1.505	ns	P>0.05
1T 1MT D3 vs 2T 1MT D1	5.570	4.298	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Controle D1	-3.650	2.817	ns	P>0.05
1T 1MT D3 vs 2T Controle D3	0.9500	0.7331	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T 1MT D1	-0.6300	0.4862	ns	P>0.05
1T 1MT D3 vs 2T 1MT D3	1.400	1.080	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T Controle D3	-7.500	5.788	*	P<0.05
1T 1MT D3 vs 3T Controle D0	1.720	1.327	ns	P>0.05	2T Controle D1 vs 3T 1MT D3	-4.100	3.164	ns	P>0.05
1T 1MT D3 vs 3T 1MT D0	3.550	2.740	ns	P>0.05	2T 1MT D1 vs 2T Controle D3	-4.620	3.565	ns	P>0.05
1T 1MT D3 vs 3T Controle D1	1.850	1.428	ns	P>0.05	2T 1MT D1 vs 2T 1MT D3	-4.170	3.218	ns	P>0.05
1T 1MT D3 vs 3T 1MT D1	4.870	3.758	ns	P>0.05	2T 1MT D1 vs 3T Controle D0	-3.850	2.971	ns	P>0.05
1T 1MT D3 vs 3T Controle D3	-2.000	1.543	ns	P>0.05	2T 1MT D1 vs 3T 1MT D0	-2.020	1.559	ns	P>0.05
1T 1MT D3 vs 3T 1MT D3	1.400	1.080	ns	P>0.05	2T 1MT D1 vs 3T Controle D1	-3.720	2.871	ns	P>0.05
2T Controle D0 vs 2T 1MT D0	1.580	1.219	ns	P>0.05	2T 1MT D1 vs 3T 1MT D1	-0.7000	0.5402	ns	P>0.05

2T 1MT D1 vs 3T 1MT D1	-0.7000	0.5402	ns	P>0.05
2T 1MT D1 vs 3T Controle D3	-7.570	5.842	*	P<0.05
2T 1MT D1 vs 3T 1MT D3	-4.170	3.218	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 2T 1MT D3	0.4500	0.3473	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Controle D0	0.7700	0.5942	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T 1MT D0	2.600	2.006	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Controle D1	0.9000	0.6945	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T 1MT D1	3.920	3.025	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T Controle D3	-2.950	2.277	ns	P>0.05
2T Controle D3 vs 3T 1MT D3	0.4500	0.3473	ns	P>0.05
2T 1MT D3 vs 3T Controle D0	0.3200	0.2469	ns	P>0.05
2T 1MT D3 vs 3T 1MT D0	2.150	1.659	ns	P>0.05
2T 1MT D3 vs 3T Controle D1	0.4500	0.3473	ns	P>0.05
2T 1MT D3 vs 3T 1MT D1	3.470	2.678	ns	P>0.05
2T 1MT D3 vs 3T Controle D3	-3.400	2.624	ns	P>0.05
2T 1MT D3 vs 3T 1MT D3	0.000	0.000	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T 1MT D0	1.830	1.412	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T Controle D1	0.1300	0.1003	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T 1MT D1	3.150	2.431	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T Controle D3	-3.720	2.871	ns	P>0.05
3T Controle D0 vs 3T 1MT D3	-0.3200	0.2469	ns	P>0.05
3T 1MT D0 vs 3T Controle D1	-1.700	1.312	ns	P>0.05
3T 1MT D0 vs 3T 1MT D1	1.320	1.019	ns	P>0.05
3T 1MT D0 vs 3T Controle D3	-5.550	4.283	ns	P>0.05
3T 1MT D0 vs 3T 1MT D3	-2.150	1.659	ns	P>0.05
3T Controle D1 vs 3T 1MT D1	3.020	2.331	ns	P>0.05
3T Controle D1 vs 3T Controle D3	-3.850	2.971	ns	P>0.05
3T Controle D1 vs 3T 1MT D3	-0.4500	0.3473	ns	P>0.05
3T 1MT D1 vs 3T Controle D3	-6.870	5.302	*	P<0.05
3T 1MT D1 vs 3T 1MT D3	-3.470	2.678	ns	P>0.05
3T Controle D3 vs 3T 1MT D3	3.400	2.624	ns	P>0.05

PCR

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.460 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
1T vs 2T	-2716.9	6.960	***	P<0.001
1T vs 3T	-352.06	0.9019	ns	P>0.05
2T vs 3T	2364.9	6.058	***	P<0.001