Thaís Martins Chucri

Imunofenotipagem de leucócitos da placenta bovina

São Paulo

2009

THAÍS MARTINS CHUCRI

Imunofenotipagem de leucócitos da placenta bovina

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

Departamento:

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.2204
FMVZ

Chucrí, Thaís Martins
Imunofenotipagem de leucócitos da placenta bovina / Thaís
Martins Chucrí. – 2009.
84 f. : il.

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

1. Leucócitos. 2. Gestação. 3. Bovinos. 4. Placenta.
5. Tolerância materno-fetal. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização fenotípica de leucócitos da placenta bovina", protocolado sob o nº1691/2009, sendo realizadas avaliações em placentas bovinas provenientes de abatedouro, 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 17/06/09.

We certify that the Research "Phenotypic characterization of leukocytes in the bovine placenta", protocol number 1691/2009, under the Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/17/09.

São Paulo, 17 de junho de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Chucri, Thaís Martins

Título: Imunofenotipagem de leucócitos da placenta bovina

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

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico

Aos meus pais, António Jorge e Vera Lúcia pela confiança e incentivo, por sempre permanecerem ao meu lado e me darem forças para nunca desistir frente aos obstáculos, além de me proporcionarem a oportunidade de crescer cada vez mais em meus conhecimentos e na minha vida. Jamais serei suficientemente grata. Obrigada por fazerem parte desta história, amo muito vocês!

Agradecimientos

Agradeço à Deus

por sempre iluminar meus caminhos e pela proteção que me foi dada durante esse tempo longe de casa e da minha família.

Ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr

pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos e esmerada orientação.

Ao Frigorífico Mantiqueira

pela colaboração na obtenção do nosso material de estudo.

**Aos professores do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres
da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo**

por me acolherem de braços abertos.

À Prof^a. Dra. Paula Andrea de Santis Bastos

*principal educadora na qual me espelho, agradeço pelos ensinamentos,
pela referência e inspiração, pelo carinho e amizade, pela
oportunidade... e por despertar-me o grande amor pela Imunologia.*

À minha querida irmã, Christiane Martins Chucri
*pelo companheirismo, força, amizade e por sempre acreditar, muitas
vezes mais do que eu, que seria capaz... Amo-te muito Kís!!!*

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria
*pelos ensinamentos e por sua contribuição na elaboração da
dissertação.*

Ao Alex Antonio C. Fonseca
por permanecer ao meu lado em todos os momentos...

**Agradeço à equipe de técnicos e funcionários 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 aos meus colegas de pós-graduação
pelo companheirismo nas horas boas e ruins

Ao diretor e docente da Universidade Metropolitana de Santos, Prof. Me. Luiz

Roberto Biondi

*pelo apoio, compreensão e pela oportunidade de trabalho nesta
renomada Instituição.*

À equipe maravilhosa do laboratório (LTIAM): Ana Rita, Jana, Letícia, Rose,

Renata e Carlo

pela amizade construída, ajuda, companheirismo e pelas boas risadas!

À Prof^a. Dra. Ana Rita de Lima

*por me aconselhar nas horas difíceis, pela amizade e pela grande
ajuda, é claro! Jamais esquecerei a pessoa que primeiro me acolheu...
levarei você sempre no meu coração!!!!*

À grande amiga Janaína Munuera Monteiro

*minha coorientadora querida, nunca poderei retribuir seus
ensinamentos, você foi essencial na confecção deste trabalho. Agradeço
também pela paciência e amizade...*

À minha grande amiga Maria Letícia Baptista Salvadori

obrigada pela amizade e ajuda incondicional.

Ao colega Prof. Caio Biasi Mauro

*por fazer meu sonho se tornar realidade, pela indicação, confiança e
pela amizade.*

**Às minhas queridas amigas de república Juliana (Juliaaaaaaana), Renata e
Amanda**

*por me proporcionarem adoráveis momentos, pela alegria da
convivência e pelo incentivo. Vocês são muito especiais!*

À minha grande amiga Fernanda Rosa

*uma das pessoas mais meigas que conheci, obrigada pela amizade e
por nunca me deixar perder a fé.*

**Aos amigos de graduação Daniela Rondina, Vinícius Campregher e Juliana
Martins**

*por estarem sempre ao meu lado me apoiando, encorajando em muitos
momentos da minha vida, principalmente para que se tornasse
possível mais esta conquista!*

Aos animais

*que involuntariamente foram envolvidos nesta pesquisa, motivo de
orgulho de uma profissão bem escolhida!*

RESUMO

CHUCRI, T. M. **Imunofenotipagem de leucócitos da placenta bovina** [Immunophenotyping of leukocytes in the bovine placenta]. 2009. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Linfócitos e macrófagos são os principais tipos de leucócitos envolvidos no processo de tolerância materno-fetal. Os linfócitos são divididos em sub-populações de acordo com sua função e fenótipo, apesar de serem morfológicamente semelhantes. Seus tipos incluem os linfócitos T, linfócitos B e natural killers (NK). Macrófagos são células que derivam da migração dos monócitos sangüíneos para o tecido. Na placenta, os macrófagos desempenham um papel importante na regulação da apoptose, prejudicial para o desenvolvimento do embrião, e no processo de apresentação antigênica. Pouco se sabe sobre esses leucócitos na placenta bovina, como sua quantidade e onde estão presentes. Desta maneira, este trabalho tem por objetivo principal identificar as populações de linfócitos e macrófagos presentes na placenta bovina utilizando marcadores específicos e citometria de fluxo. Neste estudo, foram utilizados amostras de placentônios e região intercaruncular de vacas nos três diferentes trimestres da gestação (cinco animais de cada trimestre). As suspensões celulares obtidas foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD8, anti-(CD14), e anti-CD335 (uNK) e avaliados pela citometria de fluxo. No placentônio, no primeiro trimestre da gestação, a porcentagem média de células marcadas CD3⁺ foi de 2,37%, CD8⁺, 2,39%, CD14⁺, 1,16% e CD335⁺, 0,78%. Para a região intercaruncular, a porcentagem de células CD3⁺ foi 3,43%, 4,41% CD8⁺, CD14⁺ 3,91% e CD335⁺ 0,56%. No segundo trimestre gestacional, o placentônio apresentou 0,63% de células positivas para CD3⁺, 0,62% para CD8⁺, 0,34% para CD14⁺ e 0,55% para CD335⁺. Na região interplacentomal a porcentagem de células marcadas com CD3⁺ foi 1,59%, 1,25% para CD8⁺, 0,38% para CD14⁺ e 0,39% para CD335⁺. No terceiro trimestre gestacional, o placentônio apresentou 0,72% de células marcadas para CD3⁺, 0,75% para CD8⁺, 1,05% para CD14⁺ e 0,77% para CD335⁺. Na região interplacentomal a porcentagem de células marcadas para CD3⁺ foi 1,59%, 1,50% para CD8⁺, 0,60% para CD14⁺ e 0,48% para CD335⁺. Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que a população de leucócitos na

placenta bovina é menos numerosa quando comparada às outras espécies como camundongos e humanos, provavelmente pelo tipo de placenta sinepiteliocorial que constitui uma barreira significativa para o sistema imunológico materno, diminuindo drasticamente a exposição do conceito a ele .

Palavras-chave: Leucócitos. Gestação. Bovinos. Placenta. Tolerância materno-fetal.

ABSTRACT

CHUCRI, T. M. **Immunophenotyping of leukocytes in the bovine placenta** [Imunofenotipagem de leucócitos da placenta bovina]. 2009. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Lymphocytes and macrophages are the main types of leukocytes involved in the maternal-fetal process of tolerance. Lymphocytes may be divided in subpopulations according to their function and phenotype, although being morphologically similar. Its types include the T lymphocyte, B lymphocyte and natural killers (NK). Macrophages are cells that derive from the migration of blood monocytes to the tissue. In the placenta, macrophages play an important role in the regulation of apoptosis which is deleterious to the development of the embryo and in the process of antigen presentation. There are very few references regarding the presence and quantity of leukocytes in the bovine placenta, therefore this project aims to identify lymphocytes and macrophages populations in the bovine placenta by using specific markers and flow cytometry. In this study placentomes and interplacentomal regions of cows in the three trimesters of pregnancy (five animals of each trimester) were used. Cells were incubated with the following monoclonal antibodies: anti-CD3, anti-CD8, anti-CD14,) and anti-CD335 (uNK) and evaluated by flow cytometry. In the first trimester of pregnancy, for the placentome, the average percentage of cells marked CD3+ was 2.37%, CD8+ 2.39%, , CD14+ 1.16% and CD335+ 0.78%. For the interplacentomal region the percentage of CD3+ was 3.43%, CD8+ 4.41%, CD14+ 3.91%, and CD335+ 0.56%. In second trimester of pregnancy, the placentome presented 0.63% of cells marked with CD3+, 0.62% of CD8+, 0.34% of CD14+ and 0.55% of CD335+. In the interplacentomal region the percentage of cells marked with CD3+ was of 1.59%, 1.25% of CD8+, 0.38% of CD14% and 0.39% of CD335+. In the third trimester of pregnancy, the placentomes had presented 0.72% of cells marked with CD3+, 0.75% of CD8+, 1.05% of CD14+ and 0.77% of CD335+. In the interplacentomal region the percentage of cells marked with CD3+ was of 1.59%, 1.50% of CD8+, 0.60% of CD14+ and 0.48% of CD335+. Based on the presented results, we can conclude that the leukocytes population in the bovine placenta is less

numerous than those described for other species like mouse and human, probably because it is a sin epithelial type placenta that constitutes a significant barrier to the maternal immunological system, diminishing drastically the conceptus antigen exposition to it.

Keywords: Leukocytes. Pregnancy. Bovine. Placenta. Maternal-fetal tolerance.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
APCs	antigen presenting cells
BHV-1	herpesvírus bovino tipo 1
DCs	<i>dendritic cells</i>
EP	erro padrão
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
IDO	indoleamina 2,3-dioxegenase
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-13	interleucina 13
IL-15	interleucina 15
IL-18	interleucina 18
IFN- γ	interferon gamma
LPS	lipopolissacarídeo
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
NK	<i>natural killer</i>
PIBF	<i>progesterone induced blocking factor</i>

SMF	sistema monocítico fagocitário
Th1	linfócitos T helper tipo 1
Th2	linfócitos T helper tipo 2
TNF- α	fator de necrose tumoral alpha
TCR	<i>T cell receptor</i>
uNK	<i>natural killer</i> uterinas

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Valores em porcentagem de leucócitos (CD3, CD8, CD14 e CD335) positivos na região do placentônio. Foi observada uma maior quantidade de células marcadas no primeiro trimestre gestacional, seguidas do terceiro e segundo trimestre, onde observa-se uma baixa expressão de leucócitos positivos 50
- Figura 2- Valores em porcentagem de leucócitos (CD3, CD8, CD14 e CD335) positivos na região intercaruncular. Foi observada uma maior quantidade de células marcadas no primeiro trimestre gestacional, seguidas do terceiro e segundo trimestre, onde observa-se uma baixa expressão de leucócitos positivos 52
- Figura 3- *Density plot* com gate da região de linfócitos do sangue periférico bovino (A) e *density plot* com gate da região de monócitos do sangue periférico bovino (B) 54
- Figura 4- *Density plot* e histograma de suspensão celular de placentônio bovino em primeiro trimestre gestacional, com marcação para CD14. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do gate onde são encontrados os macrófagos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD14 54
- Figura 5- *Density plot* e histograma de suspensão celular de placentônio bovino em primeiro trimestre gestacional, com marcação para CD8. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do gate onde são encontrados os linfócitos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD8 55
- Figura 6- *Density plot* e histograma de suspensão celular de placentônio bovino em primeiro trimestre gestacional, com marcação para CD3. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do gate onde são encontrados os linfócitos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD3 55
- Figura 7- *Density plot* e histograma de suspensão celular de placentônio bovino em terceiro trimestre gestacional, com marcação para CD335. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do gate onde são encontrados os linfócitos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD335 56

Figura 8- *Density plot* e histograma de suspensão celular da região intercaruncular bovina em terceiro trimestre gestacional, com marcação para CD14. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do *gate* onde são encontrados os macrófagos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD14..... 56

Figura 9- *Density plot* e histograma de suspensão celular da região intercaruncular bovina em primeiro trimestre gestacional, com marcação para CD8. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do *gate* onde são encontrados os linfócitos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD8 57

Figura 10- *Density plot* e histograma de suspensão celular da região intercaruncular bovina em primeiro trimestre gestacional, com marcação para CD3. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do *gate* onde são encontrados os linfócitos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD3 57

Figura 11- *Density plot* e histograma de suspensão celular da região intercaruncular bovina em terceiro trimestre gestacional, com marcação para CD335. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do *gate* onde são encontrados os linfócitos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD335 58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 BOVINOCULTURA NO BRASIL	25
2.2 PLACENTA & PLACENTAÇÃO	26
2.2.1 Placenta bovina	27
2.3 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA E A GESTAÇÃO	28
2.4 LEUCÓCITOS	31
2.4.1 Linfócitos	32
2.4.2 Macrófagos	33
2.5 LEUCÓCITOS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA	33
2.6 LEUCÓCITOS UTERINOS	35
2.6.1 Linfócitos uterinos	36
2.6.2 Células natural killer uterinas	38
2.6.3 Macrófagos uterinos	40
3 MATERIAL E MÉTODO	43
3.1 ANIMAIS	43
3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	45
3.3 CITOMETRIA DE FLUXO	45
4 RESULTADOS	48
4.1 CITOMETRIA DE FLUXO	48
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5 DISCUSSÃO	60
5.1 CITOMETRIA DE FLUXO	60
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	81

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira possui uma posição de destaque no cenário internacional e têm registrado um crescimento significativo na produção de carne bovina (BRASIL, 2009).

Para se garantir a alta qualidade desses animais, fazem-se necessárias pesquisas relacionadas à medicina veterinária, criação e reprodução destes, e os fatores que possam interferir nos produtos finais devem ser estudados e minimizados. Dentre os diversos aspectos da reprodução, a garantia da manutenção e sucesso da gestação possui importância ímpar e a tolerância materno-fetal é um fator essencial para que isso aconteça.

Dentro do aspecto reprodutivo dos bovinos destaca-se a placenta. A placenta é um órgão transitório presente somente durante a prenhez e possui funções de proteção, nutrição, respiração e controle endócrino (KING; ATKINSON; ROBERTSON, 1982; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Além disso, possui uma grande importância imunológica na transferência de imunoglobulinas e tolerância, regulação do desenvolvimento fetal, liberação de citocinas, como também, nas funções efetoras e citotóxicas apresentadas por linfócitos (GRUNERT, 1982; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; MICHELON et al., 2006).

Atualmente, a placenta tem sido muito utilizada como modelo no estudo da imunologia de transplantes, pois o feto é um tecido semi-alogênico, ou seja, possui parte da genética materna e paterna.

O sistema imunológico apresenta um importante papel, não apenas como órgão de defesa contra agressões externas, mas também como mediador do equilíbrio dinâmico do organismo. Apesar da reconhecida importância do sistema imunológico, ainda existem grandes lacunas no conhecimento da imunologia da gestação que necessitam ser preenchidas.

O reconhecimento materno da gestação compreende a detecção de antígenos fetais por células do sistema imune da mãe, e caso haja resposta imune materna, poderá haver, como consequência, a rejeição do embrião (HANSEN, 1997; SARAFANA et al., 2007).

Desde o momento da implantação até o momento do parto, o ambiente uterino encontra-se modificado. Células leucocitárias, hormônios, interleucinas,

fatores de crescimento e outras proteínas encontram-se presentes, favorecendo a tolerância imunológica materna (PICCINI, 2003).

Em particular, linfócitos e macrófagos são os leucócitos mais comumente envolvidos com o mecanismo de tolerância materno-fetal. Linfócitos são células responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e pela execução de respostas imunes (celular e humoral) (JANEWAY et al., 2008). Durante a gestação estas células sofrem alterações na sua atividade funcional, levando a um redirecionamento da resposta imune, que resulta em tolerância temporária para os antígenos fetais (HANSEN, 1997). Já os macrófagos desempenham um importante papel na regulação da apoptose que é deletéria para o desenvolvimento do embrião (ABRAHAMS et al, 2004) e no processo de apresentação antigênica (SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000). Possuem também várias funções bioquímicas que favorecem a tolerância imunológica do embrião (HEIKKINEN et al., 2003) como a produção de citocinas (SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000). Ressalta-se que a diminuição da atividade dessas células no final da gestação está associada à casos de retenção placentária (MYIOSHI; SAWAMUKAI, 2004).

Na placenta bovina, leucócitos são encontrados no início e ao final da gestação (OLIVEIRA; HANSEN, 2008). Nesse tecido, estas células estão localizadas em maior quantidade na região intercaruncular e em menor quantidade no placentônio (GOGOLIN-EWENS, 1989; OLIVEIRA; HANSEN, 2008).

Uma vez que leucócitos, em particular linfócitos e macrófagos participam ativamente do processo de tolerância materno-fetal, a fenotipagem dessas células se apresenta como uma informação importante para a compreensão deste processo.

Nesse sentido, faz-se necessária a caracterização fenotípica dos linfócitos T (CD3 e CD8), dos macrófagos (CD14) e das células *natural killers* (CD335) na região do placentônio e na região interplacentomal da placenta bovina no primeiro, segundo e terceiro terço da gestação, pela técnica de citometria de fluxo, que é o objetivo desse trabalho de pesquisa.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão procura descrever sucintamente, a participação dos leucócitos no processo de tolerância materno-fetal na gestação bovina.

2.1 BOVINOCULTURA NO BRASIL

O crescimento populacional humano aliado aos limites da ocupação territorial mundial determina a necessidade de maximizar a eficiência dos processos produtivos para que as demandas por alimento da sociedade moderna sejam supridas. A espécie bovina foi domesticada e selecionada, constituindo importante fonte alimentar para a população humana (MARQUES et al., 2007).

Atualmente, a pecuária possui posição de destaque na economia nacional. O alto padrão da sanidade e qualidade dos produtos de origem bovina elevou as exportações para US\$ 4,1 bilhões em 2003. Com isso, o Brasil hoje assume o primeiro lugar dentro da exportação mundial de carne bovina (BRASIL, 2009).

Tal sistema produtivo animal é altamente influenciado pelos índices reprodutivos das fêmeas, as quais devem apresentar um adequado intervalo entre partos, ao redor de 12 meses, garantindo a produção de um bezerro/vaca/ano. Contudo, estima-se que o intervalo médio observado entre partos nos rebanhos brasileiros seja de aproximadamente 18 meses (MARQUES et al., 2007).

Produzir animais de alto padrão é essencial para a manutenção dessa atividade no concorrido mercado internacional e, para isso, é necessário o desenvolvimento de tecnologias e pesquisas relacionadas principalmente a reprodução desses animais.

2.2 PLACENTA & PLACENTAÇÃO

Realdus Columbus (1516-1559) introduziu o termo “placenta” ao descrever as estruturas liberadas após o parto, em mulheres, como uma afusão de material residual em forma de bolo circular.

Atualmente, o termo placenta possui um significado mais amplo, não se referindo apenas às estruturas discoidais encontradas em mulheres, coelhos, ratos, camundongos e cobaias, mas a todas as estruturas, não importando a forma, que permitem uma aposição ou fusão entre as membranas fetais e a mucosa uterina, de maneira que ocorram as trocas fisiológicas (ATKINSON; KING; AMOROSO, 1984; ENDERS; BLANKENSHIP, 1999).

A placenta é um órgão endócrino e transitório, localizado no útero e essencial na manutenção da gestação. Como conceito clássico, é o estabelecimento de ligação entre a mãe e o feto, ou seja, a aposição ou fusão das membranas fetais com a mucosa uterina (LEISER; KAUFMANN, 1994; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

No processo de desenvolvimento placentário, existem quatro diferentes membranas fetais, sendo elas: a membrana coriônica; a membrana amniótica; a membrana alantóide e o saco vitelínico (LEISER; KAUFMANN, 1994).

A membrana amniótica, mais interna, reveste diretamente o feto e parte do cordão umbilical, apresenta um folheto duplo, de maneira a formar uma bolsa repleta de líquido. Caracteriza-se pela função de hidratação do feto, proteção mecânica, nutrição e lubrificação do canal do parto (SCHLAFER; FISHER; DAVIES, 2000).

A alantóide é a membrana intermediária situada entre o córion e o âmnio, apresenta dois folhetos, o primeiro formado com o córion, chamado alantocóron, e o segundo formado com o âmnio, denominado alantoâmnio. Como funções, o alantóide confere proteção mecânica ao feto, previne a desidratação, determina o equilíbrio uterino, evitando rotações, como também, participa da lubrificação do canal do parto (SCHLAFER; FISHER; DAVIES, 2000).

Já o córion, ou membrana coriônica, é a membrana mais externa, forma um saco completamente fechado e sem líquido que possui dois folhetos, um externo chamado córion, que modificado origina a placenta fetal, e outro interno chamado alantocóron ou córioalantóide, relacionado com a membrana alantóide, no qual os

vasos sanguíneos sustentam-se para a nutrição fetal. Dentre suas funções estão a proteção mecânica, a interação materno-fetal, a composição da parte fetal da placenta e a realização da troca de gases e nutrientes entre mãe e feto (SCHLAFER; FISHER; DAVIES, 2000).

De uma maneira geral, as funções placentárias envolvem a substituição do trato intestinal do feto, como também, dos pulmões, rins, fígado e glândulas endócrinas (KING; ATKINSON; ROBERTSON, 1982; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). Em fases mais adiantadas da gestação, ela assegura o desenvolvimento, a respiração e a alimentação do feto (WOODING; FLINT, 1994; ERLEBACHER, 2001).

A placenta ainda apresenta uma importante função já mencionada anteriormente, no que se refere à transferência de imunoglobulinas, à tolerância imunológica, à liberação de citocinas e às funções efetoras e citotóxicas dos linfócitos (HUNT; MCINTIRE; PETROFF, 2006).

Ressalta-se que, assim como o tipo de placenta, a transferência de imunoglobulinas maternas durante a gestação varia conforme a espécie animal (ENDERS; BLANKENSHIP, 1999).

2.2.1 Placenta bovina

Atualmente, a placenta de ruminantes artiodáctilos (i.e., bovinos, caprinos, ovinos, cervídeos) é classificada como zonária, cotiledonária e sinepiteliocorial (MARQUES et al., 2007).

Nos bovinos a placenta é classificada como policotiledonária, sendo composta pela carúncula materna e o cotilédone fetal, que juntos formam os placentônios - unidades morfofuncionais da placenta (LEISER et al., 1997, HAFEZ, 2001). Os placentônios são ricamente vascularizados por vasos maternos e fetais e constituem as principais áreas de trocas placentárias (CHIKASHI; STRAUSS, 1987; HOFFMAN; SCHULER, 2002; IGWEBUIKE, 2009).

Outra importante região da placenta bovina é a região intercaruncular, situada entre as carúnculas uterinas, esta se caracteriza por apresentar pregas, e microscopicamente possui um epitélio simples, rico em tecido glandular. Durante a gestação, a região intercaruncular libera um fluido albuminoso denominado "leite

uterino”, que é rico em proteínas. Quando esta secreção é absorvida pelo trofoblasto constitui-se em importante fonte de nutrição para o feto (ZELLER; KUHN, 1994; GRAY et al., 2001; DANTZER, 2002).

Com relação às camadas de tecidos que separam a mãe do feto e o remodelamento dos tecidos endometriais, a placenta bovina é classificada como sinepiteliocorial (WOODING, 1992; LEISER; KAUFFMAN, 1994; LEE; WOODING; MORGAN, 1997; DAVIES; FISHER; SCHLAFFER, 2000; IGWEBUIKE, 2006; HASHIZUME, 2007; MARQUES et al., 2007).

Durante a gestação, as células binucleadas coriônicas migram do epitélio coriônico para se fundir com as células epiteliais uterinas. Essa fusão origina as células multinucleadas. Com isso, forma-se um epitélio materno-fetal híbrido, explicando a classificação em placenta sinepiteliocorial (WOODING, 1992; LEISER; KAUFFMAN, 1994).

Assim, esta classificação sinepiteliocorial refere-se às camadas teciduais da barreira materno-fetal, um processo de implantação levemente invasivo, na qual seis camadas teciduais (endotélio materno, tecido conjuntivo materno, epitélio materno, trofoblasto, tecido conjuntivo embrionário e endotélio fetal) estabelecem os limites entre a circulação fetal e materna, constituindo uma barreira complexa (JOOSTEN; HENSEN, 1992; LEISER; KAUFFMAN, 1994; ENDERS; BLANKENSHIP, 1999).

No que se refere à transferência imunológica, a placentação sinepiteliocorial dos bovinos, impede a transferência de imunoglobulinas durante a gestação (GRUNERT, 1982; VAZ, 2004; TIZARD, 2009).

2.3 TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA E A GESTAÇÃO

A gestação constitui um fenômeno ímpar no organismo no que se refere ao comportamento do sistema imune. O feto é resultante da união entre dois indivíduos incompatíveis do ponto de vista imunológico, e tem sido comparado a um enxerto semi-alogenêico, pois expressa moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) tanto materno quanto paterno e, por isso, o sistema imune da mãe precisa “driblar” os antígenos fetais durante toda a gestação (THELLIN et al., 2000).

Sabe-se que, durante o período gestacional, o embrião é reconhecido pelo sistema imune materno, sem que seja disparada uma resposta imunológica contra sua permanência e desenvolvimento naquele ambiente, como ocorreria em qualquer outra circunstância de exposição à antígenos. Assim, o sistema imune materno garante um ambiente favorável para o desenvolvimento do concepto. Esse fenômeno pode então ser designado “tolerância imunológica” (MICHELON et al., 2006).

Diversos fatores estão envolvidos nesta complexa rede imunoregulatória que resulta na tolerância e regulação do desenvolvimento fetal, dentre eles destacam-se: o reconhecimento do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) paterno (expresso pelo embrião), o controle da citotoxicidade direta das células *natural killer* uterinas (uNK), atividade das células T regulatórias, a liberação de diferentes citocinas e a influência hormonal sobre o sistema imune materno (SARAFANA et al., 2007).

A enzima indoleamina 2,3-dioxigenase ou simplesmente IDO, que participa do metabolismo do triptofano, o qual é necessário para a ativação de células T é outro mecanismo com atividade imunossupressora descrito (MUNN et al., 1998; GULERIA; SAYEGH, 2007).

O MHC de classe I é fundamental na apresentação antigênica para as células T citotóxicas e células natural killer (NK), estando presente em quase todas as células nucleadas do corpo, mas não é expresso pelas células trofoblásticas fetais. Este mecanismo é fundamental para a proteção placentária e do feto contra a agressão pelo sistema imune materno (DAVIES; FISHER; SCHLAFFER, 2000; HUDDLESTON; SCHUST, 2004).

Entretanto, Davies (2006/2007) relataram que as células trofoblásticas bovinas não apresentam MHC classe I até os 120 dias de gestação; contudo, no terço final da prenhez, as células trofoblásticas nas regiões intercarunculares e nas regiões da arcada da placenta passam a expressá-las, podendo, desta maneira, induzir ao parto.

As células imunes maternas que medeiam respostas imunológicas sofrem, durante a gestação, uma alteração quanto ao número e função, garantindo, assim, que a mesma progrida (KOLB; CHAOUAT; CHASSOUX, 1984; HANSEN, 2007). Os linfócitos T estão, diretamente, envolvidos neste mecanismo (HANSEN, 2007).

Segundo Hansen (1997), os linfócitos T maternos alteram sua função, ocorrendo um redirecionamento da resposta imune, a uma tolerância temporária dos antígenos fetais, como também há ativação de uma população imunossupressora específica deles.

Macrófagos também desempenham um importante papel na tolerância materno-fetal. Eles atuam na regulação da apoptose que é deletéria ao desenvolvimento do embrião (ABRAHAMS et al., 2004), além de possuírem várias funções bioquímicas que favorecem a não rejeição ao tecido fetal (HEIKKINEN et al., 2003).

Conforme descrito acima, durante todo o período gestacional existe uma modulação da resposta imune na interface materno-fetal. Além das células imunológicas especializadas também estão presentes as citocinas que podem ser oriundas da ativação de linfócitos T *helper*, como também, da atividade de macrófagos e células NK na resposta imune inata e no epitélio decidual e estroma placentário, locais de indução parcial de tolerância materna (WILCZYNSKI, 2005).

Na interface materno-fetal existem moduladores responsáveis pelo equilíbrio imunológico entre a mãe e o feto que incluem as citocinas do tipo Th1 (IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ e TNF- α) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) (HANSEN, 1995; MELLOR; MUNN, 2000; COSTEAS et al., 2004). Essas citocinas respectivamente são pró e antiinflamatórias, as quais contribuem para a manutenção entre a imunidade celular (Th1) para o feto, e imunidade humoral Th2 favorecendo a prenhez (COSTEAS et al., 2004).

Segundo Sargent, Borzychowsky e Redman (2006), as citocinas do tipo Th2, em particular as citocinas IL-4 e IL-10 parecem ser essenciais na manutenção e sucesso da gestação. Ambas são responsáveis pela inibição da ativação das células NK uterinas (BUBANOVIC, 2003). O predomínio de citocinas de perfil Th1 sobre citocinas do tipo Th2 resultaria na interrupção da gestação (CHAOUAT et al., 1990).

É importante considerar que a relação entre o sistema hormonal e imune. A progesterona é o hormônio feminino com atividade mais peculiar sobre o sistema imune materno na interface materno-fetal (LIGAM et al., 2005). Este hormônio, por si só, é capaz de suprimir a função efetora das células T, exercendo um efeito direto na modulação de canais de potássio, na membrana celular, como também, sobre os íons-cálcio, influenciando diretamente a expressão gênica dessas células (EHRING et al., 1998).

A progesterona pode modular a diferenciação, maturação e função das células dendríticas para mudar a função do sistema imune materno (LIGAM et al., 2005). Este hormônio 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 pelas células T (PELTIER, 2003).

Outro importante fator imunorregulatório ligado à progesterona está relacionado com sua ação sobre os linfócitos T gama delta ($\gamma\delta$). Este tipo de linfócito T, sob o estímulo alogênico, passa a expressar também receptores para a progesterona. A partir disso, sob altas concentrações desse hormônio, tais linfócitos passam a sintetizar uma proteína imunomodulatória chamada PIBF (SZEKERES-BARTHO et al., 1996).

Atualmente, tem-se proposto que o líquido seminal e outros componentes do esperma contribuem para um efeito imunossupressor sobre a superfície da mucosa do trato reprodutivo da fêmea. Esta exposição resulta em mecanismos que induzem mudanças no número de leucócitos endometriais, proporcionando um meio ambiente favorável para a apresentação de alo-antígenos paternos às células imunocompetentes da mãe, preparando esse tecido para a implantação do embrião (KAYISLI; MAHUTTE; ARICI, 2002).

2.4 LEUCÓCITOS

Os leucócitos são células nucleadas do sangue com formato esférico, produzidas na medula óssea e especializadas na defesa do organismo (HUNT, 1994; JANEWAY et al., 2008; TIZARD, 2009). Estes podem ser classificados de acordo com a granulosidade do citoplasma e a quantidade de lóbulos nucleares em cinco tipos distintos de células: neutrófilos; eosinófilos; basófilos; linfócitos e monócitos (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

Estas células podem ser encontradas no sangue e na circulação linfática, desempenhando a função de defesa contra microrganismos em tecidos e órgãos. Quando localizados em tecidos, estes adquirem funções adicionais, que estão

relacionadas com o crescimento, desenvolvimento e regulação celular (HUNT PETROFF; BURNETT, 2000).

2.4.1 Linfócitos

Os linfócitos constituem um grupo heterogêneo de células do sistema imune, encontrados em 20 a 30 % no sangue. Suas características morfológicas se distinguem dos outros leucócitos. Como função, são responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e pela execução de respostas imunes (celular e humoral). Três grupos de células compartilham essa morfologia, as células T, as células B e as células NK (JANEWAY et al., 2008).

Morfologicamente, estes se apresentam como células redondas ou ovais, geralmente pequenas, sendo encontradas no sangue e nos órgãos linfóides. Seu tamanho varia entre 6 a 10 μm de diâmetro e seu núcleo ocupa a maior parte da célula possuindo apenas uma pequena e fina borda de citoplasma (RICH, 1996; ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

Entretanto, a terceira população de linfócitos, ou seja, as células NK, apresentam uma morfologia distinta. Estas são células grandes, possuindo grânulos em seu citoplasma. Como função, as células NK apresentam citotoxicidade celular além de secretarem citocinas (BULMER; JOHNSON; BULMER, 1987; GUMPERS; PARHAM, 1995; TIZARD, 2009).

Dentre as três populações de linfócitos, estes podem ser subdivididos de acordo com suas moléculas de superfície e sua função biológica. Os linfócitos T possuem receptores antigênicos específicos TCR (JANEWAY et al., 2008).

A produção de citocinas é uma importante função dos linfócitos; elas são moléculas proteicas solúveis biologicamente ativas que medeiam interações entre as células do sistema imune (SARGENT; BORZYCHOWSKY; REDMAN, 2006). Segundo Goldsby, Kindy e Osborne (2000), as citocinas possuem um papel fundamental na ativação de células B, células T e macrófagos.

Diferentes subpopulações de linfócitos induzem a produção de um grupo distinto de citocinas (NAIMAN et al., 2002; SARGENT; BORZYCHOWSKY; REDMAN, 2006). Dessa forma, linfócitos Th1 produzem IL-2, IFN- γ e TNF α que

induzem a imunidade celular e o abortamento. Linfócitos Th2 produzem a IL-3, IL-4 e IL-10, que promovem a inibição da atividade citotóxica, mantendo as uNK inibidas, além de apresentarem potencial antiinflamatório (NAIMAN et al., 2002).

2.4.2 Macrófagos

Os macrófagos são células que derivam da migração dos monócitos sangüíneos para o tecido, constituindo 5% dos leucócitos circulantes. Morfologicamente, são células grandes, redondas e com citoplasma abundante, cujo centro encontra-se um núcleo único, geralmente arredondado (JANEWAY et al., 2008).

Estas células compõem o SMF, cuja principal função é a fagocitose. Entretanto, os macrófagos também secretam moléculas que amplificam a resposta imune específica, além de estarem envolvidos com o processo de inflamação (JANEWAY et al., 2008). A IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 e TNF α são as principais citocinas secretadas pelos macrófagos, envolvidas na modulação da resposta imunológica (TIZARD, 2009).

2.5 LEUCÓCITOS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Os microrganismos aos quais um indivíduo saudável se depara apenas ocasionalmente causam enfermidades perceptíveis. A maior parte deles é detectada e destruída por mecanismos de defesa (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A defesa primária contra patógenos envolve mecanismos físicos e imunológicos. Transpassadas as barreiras físicas naturais e iniciada a replicação do microrganismo nos tecidos do hospedeiro, mecanismos imunológicos inatos iniciam sua atuação (ALBERTS et al., 2002).

A resposta imune inata é caracterizada pela inespecificidade antigênica em suas ações e por não gerar células de memória. Participam desta resposta vários tipos celulares (macrófagos, monócitos, mastócitos, basófilos, eosinófilos, NKs, DCs

e neutrófilos) e moléculas como proteínas do complemento, citocinas entre outras (TIZARD, 2009).

Paralelamente a esta primeira tentativa de eliminação do patógeno é desencadeada uma resposta imunológica adaptativa mediada por células B e T que resulta na geração de células efectoras antígeno-específicas e de células de memória que podem prevenir uma reinfecção pelo mesmo microrganismo (ABBAS, LICHTMAN, 2005).

Em infecções tissulares, caso um microrganismo consiga driblar as linhas de defesa iniciais, ele é imediatamente reconhecido por macrófagos residentes, iniciando uma resposta inflamatória, caracterizada por dor, rubor, calor e edema no local da infecção, causadas por alterações na circulação sanguínea local (JANEWAY et al., 2008).

A resposta inflamatória gerada é mediada por uma grande variedade de moléculas sinalizadoras, tais como prostaglandinas e citocinas, algumas das quais com funções quimiotáticas (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003). Parte delas atraem neutrófilos, o segundo maior grupo de fagócitos do organismo. Abundantes na circulação, mas não presentes em tecidos saudáveis, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas em grande número para o local da nova infecção. Mais tarde serão atraídas outras células como células dendríticas e mais monócitos, que darão origem a novos macrófagos (ALBERTS et al., 2002; SINGH et al., 2007).

Os fagócitos reconhecem os patógenos através de seus receptores de superfície, que discriminam as moléculas de superfície de células estranhas daquelas apresentadas por células do hospedeiro, ou que reconhecem patógenos opsonizados por moléculas do sistema complemento, que também é rapidamente ativado assim que ocorre a invasão dos tecidos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

A interação bidirecional entre a resposta imunológica inata e adaptativa é fundamental para sua função normal. A imunidade inata participa no desencadeamento e na regulação da imunidade específica, por meio da apresentação de antígenos aos linfócitos T e da liberação de moléculas sinalizadoras. Por outro lado, as respostas específicas potencializam os mecanismos de defesa utilizados pelas células que compõem a imunidade inata, por meio da liberação de citocinas (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Linfócitos T apenas reconhecem e respondem a peptídeos antigênicos estranhos quando estes estão ligados à superfície de outras células. Nestas células

ocorre o processamento de proteínas antigênicas em fragmentos de peptídeos, que são apresentadas aos linfócitos em associação ao MHC de classe II, proteínas integrantes da membrana plasmática de APCs. Segundo Abbas, Lichtman e Pober (1997), a maior parte das células dos mamíferos parece ser capaz de fagocitar e digerir antígenos protéicos, entretanto, apenas células dendríticas, fagócitos mononucleares e linfócitos B normalmente expressam o MHC de classe II.

Nos bovinos, a quantidade de leucócitos circulante considerada normal varia entre vários relatos. Tal alteração é devida, principalmente, diferentes técnicas empregadas e a variações fisiológicas e ambientais, tais como estresse, atividade muscular, higidez, temperatura ambiente, altitude, qualidade nutricional, idade média e possivelmente, raça e sexo (JAIN, 1986; KRAMER, 2000).

2.6 LEUCÓCITOS UTERINOS

No útero gestante, os leucócitos podem ser responsáveis direta ou indiretamente pela expressão de receptores que potencialmente medeiam o reconhecimento do trofoblasto fetal, a invasão trofoblástica e a produção de citocinas que regulam e modulam a resposta imune materna (MOFFETT-KING, 2002; RANGO, 2008), além de estarem relacionados com a angiogênese endometrial (OH; CROY, 2008).

No trabalho realizado por Rango (2008) ficou demonstrado que no início da gestação ocorre um aumento do número de leucócitos sugerindo que o influxo e/ou a proliferação de leucócitos decíduais estão sobre influência endócrina, ou seja, existe uma interação entre os leucócitos maternos e as células fetais.

O útero humano contém uma quantidade significativa de leucócitos, aproximadamente 8-30% do total existente no organismo, que estão distribuídos no endométrio uterino. Durante a gestação são observadas células NK, linfócitos T e macrófagos em grande quantidade e linfócitos B, que também estão presentes, porém, em pequena quantidade (PICCINNI, 2002; TRUNDLEY; MOFFETT, 2004).

2.6.1 Linfócitos uterinos

Mecanismos imunológicos induzidos por linfócitos T têm demonstrado uma importante função no processo de implantação e desenvolvimento do embrião e no fenômeno da tolerância fetal (MUMM et al., 1998; PICCINNI, 2003).

Em humanos, o número de células T e NK aumentam na decídua basalis (sítio de implantação), sugerindo que as células T se acumulam na interface materno-fetal e tem papel essencial na manutenção da implantação durante a gestação (SAITO, 2007).

Segundo Sarafana et al. (2007), os linfócitos presentes na placenta desempenham funções efetoras/citotóxicas, exercidas na resposta imune, além de estarem envolvidos com a tolerância imunológica materna.

Na gestação, as mudanças no sistema imune materno são verificadas pelo aumento na circulação de células T regulatórias, as quais têm função de suprimir a função de linfócitos T (ALUVIHARE; KALLIKOUDIS; BETZ, 2004), pela anergia temporária dos linfócitos maternos (TAFURI et al., 1995) e pela síntese de proteínas imunossupressivas na interface materno-fetal incluindo a IL-10 (MURPHY et al., 2005).

A população de linfócitos T no útero humano constitui pouco menos que 20%, mas sua presença em infiltrações deciduais aumenta com o decorrer da gestação (WILCZYNSKI et al., 2002). Estas células são comumente encontradas de forma difusa na região do estroma uterino (TRUNDLEY; MOFFETT, 2004).

Entretanto Sargent, Borzychowsky e Redman (2006) relatou que na placenta humana, os linfócitos, em particular as células T, foram observados até as 12 primeiras semanas de gestação e não ocorreram mudanças na sua quantidade até o terceiro trimestre da gestação.

Estudos comparando as sub-populações linfocitárias em útero de mulheres com gestações normais e mulheres com pré-eclampsia, verificaram que essas últimas possuíam um aumento na porcentagem de células NK e linfócitos T citotóxicos, e uma diminuição de linfócitos B e linfócitos T supressor quando comparadas às gestações normais. Também foi dosada a secreção de citocinas e verificou-se que as de perfil Th1 foram favorecidas (com níveis extremante altos de

IFN- γ e baixos de IL-6 e IL-10) e em pacientes com pré-eclâmpsia a secreção de IL-12 estava diminuída quando comparada aos controles (WILCZYNSKI et al., 2002).

Conforme trabalho realizado por Elami-Suzin e Mankuta (2007), as células NK são o tipo celular mais predominante encontrado na placenta humana no início da gestação. Estas constituem 60 a 70% dos linfócitos totais presentes na placenta e localizam-se no epitélio glandular do endométrio e ao redor de pequenas artérias (ASHKAR; CROY, 2001). A função destas células neste período ainda não está estabelecida, porém, supõe-se que elas sejam essenciais no desenvolvimento placentário e na interface materno-fetal (ELAMI-SUZIN; MANKUTA, 2007).

A maioria das hipóteses quanto as funções potenciais dessas células, derivam de investigações mais detalhadas que foram conduzidas em camundongos e humanos, que apresentam placenta hemocorial. Nessas espécies, as células NK foram encontradas durante o processo de decidualização placentária, além de participarem da angiogênese endometrial (TAYADE et al., 2007; OH; CROY, 2008).

Em bovinos, estudos revelaram que a distribuição de linfócitos foi menor na região caruncular e intercaruncular de vacas prenhes, quando comparadas a vacas não prenhes. Nesse mesmo estudo foi relatado ainda que há uma significativa redução no número de linfócitos no epitélio uterino bovino entre 19 e 27 dias após a fertilização (GOGOLIN-EWENS, 1989).

Durante o início e o meio da gestação, o número de linfócitos e macrófagos no epitélio uterino bovino é reduzido com o intuito de se evitar a rejeição imunológica contra o feto. Essas células costumam tornarem-se mais evidente no meio e final da gestação, e são encontradas na região intercaruncular (VAN DER WIELEN; KING, 1984, HANSEN, 1997). Entretanto, Leung et al. (2000) estudando a distribuição de subpopulações de células T uterinas e a expressão de interleucinas no 16^o dia de gestação em bovinos, verificaram que essas células estavam presentes em altas concentrações no estroma sub-epitelial.

Apesar do enorme crescimento subsequente da placenta durante a gestação, os linfócitos não foram encontrados no epitélio caruncular uterino bovino aos 28 dias de gestação, período esse que corresponde ao início do desenvolvimento dessa região (LEE; WOODING; MORGAN, 1997). Em contrapartida, Oliveira e Hansen (2008) em estudo feito em vacas gestantes, observaram um aumento na quantidade linfócitos no dia 33-34 e no final de gestação.

No final da gestação bovina, linfócitos foram encontrados em pequena quantidade em placentas de gestações normais e em casos de retenção de placenta. Isto sugere que a presença de linfócitos na placenta, não possui uma função significativa no período que antecede o parto (MIYOSHI; SAWAMUKAI; IWANAGA, 2002). Contudo, Cobb e Watson (1995) relataram que um significativo número de linfócitos CD8⁺ foram encontrados na região glandular do endométrio bovino, principalmente no período que antecede o parto.

2.6.2 Células uNK

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

O mecanismo utilizado para eliminar microrganismos é o mesmo utilizado pelas células T citotóxicas gerados na resposta adaptativa. Os grânulos citotóxicos (perforina e granzima-A) são liberados sobre a superfície da célula-alvo e estes penetram pela membrana celular e induzem a morte celular programada. As NK são ativadas em resposta a interferons ou citocinas secretadas por macrófagos (JANEWAY, 2008).

As células NK expressam diversos receptores de superfície responsáveis pelo reconhecimento de células alvo e sinalização para produção de citocinas (MORETTA; MORETTA, 2004; LANIER, 2005). Estes receptores podem ainda cooperar ou antagonizar entre eles (VIVER; NUNES; VELY, 2004).

Uma subclasse de linfócitos NK, denominada uNK (KING; ALLAN; BOWEN, 2000; MOFFET-KING, 2002), predomina durante a gestação no útero de diversos animais, inclusive em humanos (CROY et al., 1997; LOKE; KING, 2000).

Estudos de imunofenotipagem das uNK em humanos revelaram que estas células se assemelham às células NK do sangue circulante (cNK), porém apresentam algumas diferenças na expressão de receptores permitindo distinguir essas duas sub-populações. Em humanos, 90% das cNK expressam baixos níveis de CD56 e são positivos para CD16 (CD56^{dim} CD16^{brigh}) e o restante expressa altos

níveis de CD56 e são CD16 (CD56^{bright} CD16^{dim}) (COOPER et al., 2001; TRUNDLEY; MOFFETT, 2004).

Já as células uNK apresentam fenótipo para os receptores CD56^{bright} CD16^{dim} e constituem cerca de 90% da população leucocitária com características especiais como secreção de citocinas e citólise além de possuírem grande quantidade de grânulos em seus conteúdos (PARHAM, 2004).

Estudos sobre a fisiologia das células uNK demonstram que, ao lado de outras células presentes no útero gravídico, estas células têm a capacidade de produzir inúmeras citocinas, que atuam como moduladoras da resposta imune. Durante a gestação esta população celular apresenta um comportamento peculiar, não sendo observado ação citotóxica no período gestacional (SCHAFER-SOMI, 2003).

Exemplos de algumas citocinas produzidas pelas uNK com comprovada atuação na gestação seriam: IL1, LIF, TNF- α e INF γ (CROY et al., 2003).

Segundo revisão feita por Bulmer e Lash (2005) as células uNK estão localizadas na decídua no início da gestação, freqüentemente formando um agregado celular envolvendo a arteria espiral e glândulas, também estão presentes antes da implantação e no endométrio de mulheres não gestantes alterando seu número durante o ciclo menstrual (TRUNDLEY; MOFFETT, 2004).

Hanna et al. (2006) inferem que as células uNK participam do controle da invasão trofoblástica em humanos no início da gestação, na produção de citocinas e também possuem seu número aumentado na decídua depois do tratamento com progesterona. Segundo Hunt (1994), macrófagos e células NK uterinas protegem o embrião de infecções virais e bacterianas.

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

Em animais a primeira observação do efeito citotóxico das células NK foi realizada em cães. No entanto, contrariamente a muitos aspectos da imunologia, estas células não foram bem caracterizadas e descritas em demais espécies (GOVAERTS, 1960; ENGERLHARDT; KING, 1997; TEKIN; HANSEN, 2002).

Nos bovinos, a quantidade de células NK presentes no sangue é pequena, podendo variar entre 2 a 10% (KAMPEM et al., 2006). Níveis elevados de NK no sangue bovino podem ser encontrados em casos de infecções, principalmente por *Neospora caninum* (KLEVAR et al., 2007).

O fenótipo das células NK na espécie bovina sugere uma heterogênea população celular, não podendo ser correlacionada aos marcadores humanos (BOYSEN; STORSET, 2009).

2.6.3 Macrófagos uterinos

O número de macrófagos na decídua humana é de aproximadamente 10-15% do total de células imunes permanecendo, assim, durante toda a gestação (HUNT; PETROFF; BURNETT, 2000; KING; ALLAN; BOWEN, 2000; REPNIK et al., 2008).

Repnik et al. (2008) mensuraram a expressão de macrófagos CD14+ nos diferentes trimestres da gestação, e perceberam que nos dois primeiros trimestres a quantidade de macrófagos se manteve estável, ocorrendo uma diminuição dessas células no período que antecede o parto.

No sítio de implantação há um aumento no número dessas células, contudo, durante a invasão trofoblástica elas são escassas (TRUNDLEY; MOFFETT, 2004). Estas células estão distribuídas na decídua e concentradas na porção da decídua abaixo do trofoblasto (AAGAARD-TILLERY; SILVER; DALTON, 2006).

De acordo com Piccini (2003) podem ser distribuídas na decídua parietal onde possuem íntimo contato com o citotrofoblasto coriônico. São abundantes no estroma endometrial e tecidos conectivos do útero nos estágios iniciais e finais da gestação.

A função dos macrófagos deciduais ainda não é conhecida, mas pode-se incluir a apresentação de antígenos às células T residentes e a fagocitose de bactérias e/ou complexos imunes (AAGAARD-TILLERY; SILVER; DALTON, 2006).

Durante a implantação, os macrófagos uterinos desempenham um importante papel na regulação da apoptose a qual é deletéria para o desenvolvimento do embrião (ABRAHAMS et al., 2004) e também possui varias funções bioquímicas que favorecem a tolerância imunológica contra o tecido fetal (HEIKKINEN et al., 2003).

Os macrófagos uterinos ligam-se às bactérias levando ao processo de fagocitose. Estes também produzem radicais superóxido e citocinas pró-inflamatórias quando desafiadas com LPS, sugerindo um importante papel para essas células no reconhecimento de infecções bacterianas durante a gestação (SINGH et al., 2007).

A placenta também é rica em macrófagos de origem fetal (células de Hofbauer) que participam da manutenção da gestação e a sobrevivência fetal. A termo, alguns macrófagos na parte basal da placenta são de origem fetal. Suas funções não estão claras, mas acredita-se que possam atuar como células fagocíticas na remoção de debris celulares na interface materno-fetal, e sua capacidade de apresentação de antígenos é reduzida quando comparada aos monócitos sistêmicos (AAGAARD-TILLERY; SILVER; DALTON, 2006).

Macrófagos estimulados também são capazes de produzirem citocinas pró-inflamatórias assim como $\text{TNF-}\alpha$, que é capaz de induzir as células NK a liberarem $\text{IFN-}\gamma$ na interface materno-fetal, fortalecendo o ambiente citotóxico (NAIMAN et al., 2002).

Em bovinos, células CD14^+ e CD68^+ foram localizadas em pequena quantidade na região do estroma endometrial no início da gestação, enquanto que, no final da gestação, estas células também estavam presentes, porém em quantidade superior. Essas células foram localizadas em maior quantidade na região intercaruncular, quando comparadas com a região do placentônio (OLIVEIRA; HANSEN, 2008).

Em um estudo realizado por Miyoshi e Sawamukai (2004) macrófagos CD14^+ também foram encontrados na placenta bovina, localizados no parênquima e regiões periféricas das carúnculas logo após o parto. Estes macrófagos aumentaram em quantidade com o progresso da gestação, podendo ser encontrados até no momento que antecede o parto, em contraste com os linfócitos, que diminuem.

Nesta espécie, os macrófagos uterinos mostraram forte atividade de fosfatase ácida em gestações normais, ao passo que nos casos de retenção de placenta a atividade enzimática teve sua intensidade diminuída (MIYOSHI; SAWAMUKAI; IWANAGA, 2002).

Material e Método

3 MATERIAL E MÉTODO

Os animais e a metodologia utilizados neste trabalho estão descritos a seguir.

3.1 ANIMAIS

As amostras foram coletadas no matadouro “Mantiqueira” situado na cidade de São José dos Campos (SP). Para tal, foram utilizados placentônios e a região interplacentomal de vacas prenhes nos diferentes trimestres da gestação, totalizando 15 animais.

O projeto foi desenvolvido com aprovação da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo nº 1691/2009)

O período de gestação foi estimado conforme as medidas estabelecidas apresentadas na tabela 1.

Tabela 1- Estimativa da idade gestacional segundo Noden e Lahunta (1990)

<u>Idade (dias)</u>	<u>Crow-rump (cm)</u>
40-60	1-5
60-80	6-10
80-100	11-15
100-110	16-20
110-125	21-25
125-140	26-30
140-150	31-35
150-160	36-40
160-170	41-45
170-180	46-50
180-190	51-55
190-200	56-60
200-210	61-65
210-225	66-70
225-230	71-75
230-240	76-80
240-260	81-85
260-270	86-90
270-280	91-95

3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os placentônios e a região intercaruncular foram coletadas de forma sistemática e aleatória em acordo com o princípio estereológico (STERIO, 1984). Deste modo, após a retirada do útero da cavidade abdominal, o mesmo foi incisado na porção avascular e disposto sobre a bancada. Um sistema-teste composto por linhas ortogonais foi disposto aleatoriamente sobre o corno gravídico. Um número aleatório entre 1 e 8 foi sorteado ao acaso e a amostragem realizada em uma fração (f_1) de 1/8.

Cabe ressaltar que para animais de primeiro terço cuja média do tempo gestacional foi de 40 dias, devido a não formação do placentônio que acontece por volta dos 60 dias de gestação em vacas, foram utilizadas a região intercaruncular representando a porção materna e o córioalantóide representando a porção fetal.

Os tecidos foram lavados com solução de PBS 0,1 M acondicionados em sacos plásticos estéreis com PBS 0,1 M e transportados sob refrigeração.

3.3 CITOMETRIA DE FLUXO

Com a utilização da citometria de fluxo mensuramos a porcentagem de células positivas, ou seja, que expressam $CD3^+$, $CD8^+$, $CD14^+$ e $CD335^+$. Para isso, após a coleta, os placentônios e a região intercaruncular foram lavados em PBS 0,1 M e passaram pelo processo de separação mecânica e enzimática respectivamente. Na separação mecânica, os fragmentos de placentônios foram colocados sobre uma malha de aço com 150 *mesh* de diâmetro e com o auxílio de uma seringa de 1ml e meio de cultura (D-MEM) com 10% de soro fetal bovino e antibiótico, os fragmentos foram pressionados contra a malha para a separação celular. Na separação enzimática a região intercaruncular, foi fragmentada e imersa em 20ml de tripsina 0,25% (LGC Biotecnologia), durante 30 minutos em banho-maria a 37°C, com agitador. Após essa etapa, os fragmentos foram pressionados de maneira mais branda contra a malha de aço com 150 *mesh* de diâmetro para a separação celular.

As suspensões celulares obtidas de ambas as regiões foram ressuspensas em volume conhecido de D-MEM com 10% de soro fetal bovino, e submetidas à centrifugação (400 G por 8 minutos a 4°C). Após a centrifugação, o meio foi removido e as células foram suspensas em 30 ml de meio de cultura. Nesta fase, as suspensões celulares obtidas da região intercaruncular foram lisadas com NaCl 0,2% e após 20 segundos foram acrescentadas de NaCl 1,6%. 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.

A seguir, suspensões celulares foram lavadas por mais uma vez em centrífuga a 200 G, durante 5 minutos a 4°C e a sua concentração ajustada para cerca de 2×10^6 células. Após este processo, as células foram colocadas em tubo *FACS* e incubadas com 1µl de anticorpo monoclonal primário mouse anti-bovino; anti-CD3, anti-CD8, anti-CD14 (VRMD® Pullman, USA) e anti-CD335 (uNK) (Serotec®) por 30 minutos.

Após esse período, as células foram lavadas por 2 duas vezes com PBS 0,1M e novamente incubadas com 1µl anticorpo secundário de cabra anti-camundongo marcado com FITC (diluição de 1:100 em PBS 0,1M, pH 7,4) por 30 minutos protegido da luz. As células foram lavadas por duas vezes em PBS 0,1M e analisadas com o auxílio do citômetro de fluxo (BD FACScalibur).

Para cada experimento foram realizados controles negativos, onde a mesma concentração de 2×10^6 células foram transferidas para dois tubos *FACS* chamados “somente células” e “células + Ac secundário” e avaliados quanto a possível autofluorescência e ligações inespecíficas do Ac secundário e *background*, respectivamente.

Os controles positivos dos anticorpos seguiram o mesmo protocolo utilizado para a suspensão de células placentárias e foram realizados no sangue periférico bovino (figura3).

Cem mil eventos de cada amostra foram adquiridos por meio do programa Cell Quest Pro® (Becton Dickinson Immunocytometry Sistem, San Diego, CA™). Os dois tipos celulares (linfócitos e macrófagos) foram identificados quanto as suas características de FSC E SSC, que avaliam respectivamente tamanho e complexidade interna de cada célula.

Resultados

4 RESULTADOS

Os resultados encontrados nesta pesquisa serão descritos abaixo.

4.1 CITOMETRIA DE FLUXO

As células isoladas dos placentônios e da região intercaruncular da placenta bovina foram analisadas quanto à marcação específica dos leucócitos CD3, CD8, CD14 e CD335 (uNK).

A viabilidade celular encontrada foi de aproximadamente 50% para o placentônio e de 95% para a região intercaruncular.

No sangue periférico bovino onde foram realizados os controles positivos para os anticorpos, a média de células positivas para CD3+ foi de 5,09%, para CD8+, 4,81%, CD14+, 3,38%, CD335+, 1,03%, e a viabilidade celular encontrada foi de aproximadamente 85%.

No placentônio bovino, durante o primeiro trimestre gestacional, foi observada uma maior marcação de leucócitos quando comparada com demais trimestres. Os leucócitos mais expressos neste terço gestacional foram os linfócitos CD8 e CD3, que obtiveram resultados muito semelhantes. A média de células positivas neste trimestre para CD3+ foi de 2,37% (EP=1,11), 2,40% de CD8+ (1,56), 1,17% de CD14+ (EP=0,54) e 0,78% de CD335+ (EP=0,32). No segundo trimestre gestacional na mesma região, a porcentagem de células marcadas diminuiu significativamente em relação ao primeiro trimestre. Entretanto, o resultado se manteve parcialmente semelhante ao primeiro trimestre, onde linfócitos CD3 e CD8 foram expressos em maior quantidade que os demais leucócitos. A média de células positivas obtida foi 0,63% CD3+ e CD8+ (EP=0,20/0,17, respectivamente), 0,48% CD14+ (EP=0,17) e 0,55% CD335+ (EP=0,30). No terceiro trimestre gestacional, a marcação dos leucócitos fenotipados foi maior quando comparado com o segundo trimestre, contudo, ainda sim, se manteve menor do que encontrado no primeiro trimestre. Diferentemente do que se observou nos dois primeiros trimestres, as células CD14+ (macrófagos) foram expressas em maior quantidade, seguidas de células CD335+,

CD8+ e CD3+, na qual obteve a menor marcação no trimestre analisado. Neste trimestre a média de células positivas foi 0,73% de CD3+ (EP=0,12), 0,76% de CD8+ (EP=0,24), 1,06% de CD14+ (EP=0,28) e 0,77% de CD335+ (0,12).

A figura 1 representa os valores em porcentagem de leucócitos (CD3, CD8, CD14 e CD335) positivos na região do placentônio.

As figuras de 4 e 6 representam *density plot* e histograma de células placentárias do placentônio no primeiro trimestre gestacional, com marcação específica para CD14, CD8 e CD3 respectivamente. A figura de 7 representa *density plot* e histograma de células placentárias do no terceiro trimestre gestacional, com marcação específica para CD335.

Analisando os placentônios nos três trimestres gestacionais, foi observado que células CD335 obtiveram uma menor variação em sua expressão nos diferentes trimestres, quando comparadas com os demais leucócitos. Contudo, todos os leucócitos analisados nos três trimestres gestacionais, na região do placentônio, não apresentaram resultados estatisticamente significantes ($P > 0,05$) (anexos A, B, C e D).

Figura 1 - Valores em porcentagem de leucócitos (CD3, CD8, CD14 e CD335) positivos na região do placentônio. Foi observada uma maior quantidade de células marcadas no primeiro trimestre gestacional, seguidas do terceiro e segundo trimestre, onde observa-se uma baixa expressão de leucócitos positivos

Na região intercaruncular observa-se também uma maior marcação das células fenotipadas no primeiro trimestre gestacional. Neste período, células CD14+ foram expressas maior quantidade, seguidas de CD3+, CD8+ e CD335+. A média de células positivas foi de 3,44% de CD3+ (EP=2,61), 3,41% CD8+ (EP=2,27), 4,09% de CD14+ (EP=0,60) e 0,57% de CD335+ (EP=10,23). No segundo trimestre gestacional, foi observado uma diminuição significativa na expressão de todos os leucócitos, todavia, células CD14+ mantiveram maior expressão que as demais. A média de células positivas foi de 1,59% de CD3+, (EP=1,09) 1,25% de CD8+ (EP=0,90), 1,85% de CD14+ (EP=0,77), e 0,39% de CD335+ (EP=0,21). No último trimestre gestacional observamos um aumento na expressão dos leucócitos em relação ao segundo trimestre, exceto células CD3+, que obteve a mesma expressão do trimestre anterior. No entanto, todos os leucócitos obtiveram resultados inferiores quando comparados com o primeiro trimestre gestacional. A média de células positivas no final da gestação na região intercaruncular foi de 1,59% de CD3+ (EP=1,36), 1,51% de CD8+ (EP=1,27), 2,0% de CD14+ (EP=0,93) e 0,49% de CD335+ (EP=0,30).

A figura 2 representa os valores em porcentagem de leucócitos (CD3, CD8, CD14 e CD335) positivos na região intercaruncular.

As figuras de 9 e 10 representam *density plot* e histograma de células placentárias da região intercaruncular no primeiro trimestre gestacional, com marcação específica para CD8 e CD3 respectivamente. As figuras de 8 e 11 representam *density plot* e histograma de células placentárias da região intercaruncular no terceiro trimestre gestacional, com marcação específica para CD14 e CD335 respectivamente.

Analisando a região intercaruncular nos três diferentes trimestres gestacionais, podemos observar que da mesma forma que na região de placentônio, células CD335+ obtiveram uma menor variação em sua expressão ao longo do período gestacional, não apresentando diferenças estatisticamente diferentes assim como os demais leucócitos ($P > 0,05$) (anexo D). Exceto células CD14+, que no primeiro trimestre gestacional apresentaram resultados estatisticamente significantes quando comparadas ao segundo e terceiro trimestre da gestação ($P < 0,001$) (anexo B).

Figura 2 - Valores em porcentagem de leucócitos (CD3, CD8, CD14 e CD335) positivos na região intercaruncular. Foi observada uma maior quantidade de células marcadas no primeiro trimestre gestacional, seguidas do terceiro e segundo trimestre, onde observa-se uma baixa expressão de leucócitos positivos

Quando comparamos as duas regiões estudadas (placentônio e intercaruncular) observamos, que em ambas as regiões o primeiro trimestre gestacional possui uma maior quantidade de células positivas no geral. Podemos observar também que o segundo trimestre gestacional apresentou uma menor quantidade de células positivas nas duas diferentes regiões.

Durante toda a gestação, observamos na região intercaruncular uma quantidade elevada de leucócitos quando comparada com os placentônios.

Comparando estatisticamente as duas regiões, células CD3+ e CD8+ do primeiro terço gestacional na região interplacentomal apresentaram resultados estatisticamente significantes quando comparados com o segundo e terceiro trimestre no placentônio ($P < 0,05$) (anexos A e C). Do mesmo modo, células CD14+ do primeiro trimestre gestacional na região interplacentomal apresentaram resultados estatisticamente significantes quando comparados com o primeiro, segundo e terceiro trimestre no placentônio ($P < 0,001$). Células CD14+ do segundo trimestre gestacional na região interplacentomal apresentaram resultados estatisticamente significantes quando comparados com o segundo trimestre no placentônio ($P < 0,05$). Células CD14+ do terceiro trimestre gestacional na região interplacentomal apresentaram resultados estatisticamente significantes quando comparados com o segundo trimestre no placentônio ($P < 0,01$) (anexo B).

A região intercaruncular quando comparada estatisticamente apresentou resultados significantes entre células CD14+ do primeiro trimestre e células CD14+ do segundo e terceiro trimestre gestacional ($P < 0,001$) (anexo B).

Figura 3 - *Density plot* com *gate* da região de linfócitos do sangue periférico bovino (A) e *density plot* com *gate* da região de monócitos do sangue periférico bovino (B)

Figura 4 - *Density plot* e histograma de suspensão celular de placentônio bovino em primeiro trimestre gestacional, com marcação para CD14. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do *gate* onde são encontrados os macrófagos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD14

Figura 5 - *Density plot* e histograma de suspensão celular de placentônio bovino em primeiro trimestre gestacional, com marcação para CD8. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do *gate* onde são encontrados os linfócitos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD8

Figura 6 - *Density plot* e histograma de suspensão celular de placentônio bovino em primeiro trimestre gestacional, com marcação para CD3. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do *gate* onde são encontrados os linfócitos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD3

Figura 7 - *Density plot* e histograma de suspensão celular de placentônio bovino em terceiro trimestre gestacional, com marcação para CD335. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do *gate* onde são encontrados os linfócitos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD335

Figura 8 - *Density plot* e histograma de suspensão celular da região intercaruncular bovina em terceiro trimestre gestacional, com marcação para CD14. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do *gate* onde são encontrados os macrófagos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD14

Figura 9 - *Density plot* e histograma de suspensão celular da região intercaruncular bovina em primeiro trimestre gestacional, com marcação para CD8. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do *gate* onde são encontrados os linfócitos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD8

Figura 10 - *Density plot* e histograma de suspensão celular da região intercaruncular bovina em primeiro trimestre gestacional, com marcação para CD3. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do *gate* onde são encontrados os linfócitos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD3

Figura 11 - *Density plot* e histograma de suspensão celular da região intercaruncular bovina em terceiro trimestre gestacional, com marcação para CD335. O *density plot* (A) representa as populações celulares e a região do *gate* onde são encontrados os linfócitos, enquanto que o histograma (B) demonstra a porcentagem de células positivas para CD335

4.2 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 $P < 0,05$ (ver anexos).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Os resultados previamente descritos serão discutidos neste capítulo conjuntamente a literatura consultada.

5.1 CITOMETRIA DE FLUXO

Em bovinos, a expressão dos leucócitos fenotipados mostrou-se pequena, quando comparada a outras espécies como camundongos e humana. A principal justificativa para tal fato deve-se ao tipo distinto de placentação que ocorre entre as espécies. A placentação humana é decídua, ou seja, altamente invasiva e a pequena quantidade de camadas entre a mãe e o feto, permite a constante passagem de antígenos fetais para a circulação da mãe (LEISER, KAUFFMANN, 1994; TRUNDLEY; MOFFETT, 2004), levando o sistema imune materno a ser muito mais desafiado, quando comparado às outras espécies. Na placentação bovina, diferentemente do que ocorre na placentação decídua, sucede-se um processo de implantação levemente invasivo (MARQUES et al., 2007). Neste tipo de placentação, existem seis camadas teciduais se interpondo entre a circulação materna e fetal (LEISER, KAUFFMANN, 1994; ENDERS; BLANKENSHIP, 1999), o que dificulta muito a exposição dos antígenos fetais ao sistema imune materno. Assim, nossa hipótese para a espécie bovina, seria de um processo de tolerância materno-fetal menos eficiente, e, por isso ocorre um menor envolvimento de células imunes nesse tecido.

Outra justificativa para a baixa expressão de leucócitos na placenta bovina encontrada neste estudo baseia-se na procedência dos animais utilizados. Os tecidos placentários foram coletados em abatedouro, sem que tivéssemos acesso ao histórico clínico e estado sanitário do animal. Está descrito na literatura que condições fisiológicas como estresse, atividade muscular, estado de hígidez, temperatura ambiente, altitude, qualidade nutricional, idade média, raça (JAIN, 1986; KRAMER, 2000) e período gestacional (JAIN, 1993) influenciam diretamente na

quantidade de leucócitos podendo ser, então, a causa da pequena presença de células do sistema imune na placenta das vacas avaliadas.

Doenças que acometem especificamente o sistema reprodutivo, como por exemplo, a Brucelose, onde as membranas fetais, especialmente os cotilédones albergam uma significativa quantidade de microrganismos (POESTER; SAMARTINO; LAGE, 2005), poderiam influenciar diretamente a defesa imunológica local. Cabe ressaltar, que a Brucelose bovina é uma doença endêmica e a estimativa de animais soropositivos no Brasil pode chegar a 7,5%, dependendo da região (POESTER; GOLÇALVES; PEREIRA, 2002). Da mesma maneira, infecções por BHV-1 também são freqüentes nos rebanhos brasileiros, podendo causar diferentes distúrbios reprodutivos, incluindo o aborto (TAKIUCHI; ALFIERI; ALFIERI, 2001). Nesse sentido, como tais doenças não foram monitoradas nos animais desse trabalho de pesquisa, não se pode descartar a possibilidade da interferência da presença delas como fator interferente no número de leucócitos placentários.

Neste estudo foi observada uma maior expressão de todos os leucócitos fenotipados (CD3, CD8, CD14 e CD335) no primeiro trimestre gestacional, ou seja, no início da gestação, independente da região placentária estudada. Dados esses que concordam com aqueles verificados por Oliveira e Hansen (2008) que observam um aumento na proporção linfócitos nos estágios iniciais da gestação bovina.

O aumento de linfócitos (CD3, CD8 e CD335) no início da gestação pode estar relacionado direta ou indiretamente à expressão de receptores que medeiam o reconhecimento e invasão trofoblástica (MOFFETT-KING, 2002; CHAOUAT et al., 2002; HANNA et al., 2006; RANGO, 2008), bem como, a produção de citocinas que regulam e modulam a resposta imune materna e angiogênese (MOFFETT-KING, 2002; CHAOUAT et al., 2002; OH; CROY, 2008).

Na espécie humana durante o processo de implantação e decidualização a população de linfócitos constitui cerca de 20% (WILCZYNSKI et al., 2002), sendo que células CD335⁺ são o tipo celular mais predominante encontrado na placenta humana e de roedores no início da gestação (ASHKAR, CROY, 2001; ELAMI-SUZIN, MANKUTA, 2007). A maioria das hipóteses quanto às funções potenciais dessas células, derivam de investigações mais detalhadas que foram conduzidas em camundongos e humanos, que apresentam placenta hemocorial (TAYADE et al., 2007). Em nosso estudo, a espécie bovina apresentou uma maior expressão de células CD335⁺ no início e ao final da gestação. Entretanto, a expressão destas

células durante toda a gestação foi, extremamente, baixa. Acreditamos que isso tenha ocorrido devido ao fato da quantidade de células NK, em torno de 2 a 10% presentes no sangue bovino ser menor que na espécie humana, (KAMPEM et al., 2006) sendo que níveis elevados de NK no sangue bovino somente são encontrados em casos de infecções, principalmente por *Neospora caninum* (KLEVAR et al., 2007).

Em nossa pesquisa, macrófagos (CD14+) também foram expressos em maior quantidade no primeiro trimestre gestacional. Em bovinos, a função destas células ainda não está estabelecida, entretanto, sabe-se que na espécie humana, no início da gestação, os macrófagos uterinos desempenham um importante papel na regulação da apoptose a qual é deletéria para o desenvolvimento do embrião (ABRAHAMS et al, 2004) além de favorecerem a tolerância imunológica contra o tecido fetal (HEIKKINEN, et al. 2003), através da liberação de citocinas (SCHLAFER; FISHER; DAVIES, 2000). Sua quantidade no útero humano é de aproximadamente 10-15% do total das células imunes (HUNT; PETROFF; BURNETT, 2000; KING; ALLAN; BOWEN, 2000; REPNIK et al., 2008).

Cabe ressaltar que uma maior expressão de células CD14+ poderia ser alcançada com a utilização de anticorpos anti-CD68, uma vez que, confirmado pela citometria de fluxo, macrófagos CD14, podem expressar CD68 (OLIVEIRA, HANSEN, 2008).

No segundo trimestre gestacional em relação ao primeiro trimestre, nas duas regiões fenotipadas, este estudo demonstrou uma diminuição significativa na quantidade de todos os leucócitos. Na espécie humana, no segundo trimestre gestacional, o sangue materno começa a perfundir os espaços intervilosos, permitindo que as células imunes maternas fiquem em contato com os imunógenos fetais (RILLEY, 2008). Isto acontece provavelmente pelo tipo de placentação hemocorial, característica da espécie humana entre outras. Em bovinos, a placentação sinepiteliocorial não permite um contato íntimo entre as circulações materna e fetal. Acreditamos que a diminuição dos leucócitos estudados no segundo trimestre gestacional pode estar associada a um predomínio de linfócitos gama-delta ($\gamma\delta$). Esta informação corrobora com estudo realizado por Hansen (1997), onde linfócitos $\gamma\delta$ foram encontrados em maior quantidade no meio e final da gestação bovina. Em ruminantes 60% da população de linfócitos T representam TCR gama delta, no entanto estas células também expressam CD3 em sua superfície de

membrana (PESSA-MORIKAWA et al., 2004). Em nosso estudo estas células não foram fenotipadas com anticorpos específicos, uma vez que, células T $\gamma\delta$ não estão usualmente envolvidas com o processo de rejeição fetal (HAAS; PEREIRA; TONEQAWA, 1993).

No terceiro trimestre gestacional, a expressão de todos os leucócitos na placenta bovina, em ambas as regiões, foi maior que no segundo trimestre, mas ainda se manteve, significativamente, menor que no início da gestação. Os macrófagos CD14+ foram as células mais expressas neste período na região intercaruncular e no placentônio, fato parcialmente observado em estudo conduzido por Oliveira e Hansen (2008), onde células CD14+ foram mais evidentes na região intercaruncular, quando comparada aos placentônios.

A função dos macrófagos uterinos ainda não é conhecida, mas pode-se incluir a apresentação de antígenos às células T residentes, fagocitose de bactérias e/ou complexos imunes (AAGAARD-TILLERY; SILVER; DALTON, 2006).

Na gestação bovina, os macrófagos são encontrados no início da gestação e aumentam em quantidade ao longo do período gestacional (MIYOSHI; SAWAMUKAI, 2004; OLIVEIRA; HANSEN, 2008) Este resultado não foi repetido em nosso experimento, onde macrófagos CD14+ foram encontrados em maior quantidade no início da gestação. Um fator importante a ser considerado seria o padrão racial. Em ambos os trabalhos citados acima, os pesquisadores utilizaram a animais da raça Holandesa, diferentemente dos nossos animais, oriundos de raças zebuínas (*Bos indicus*).

Para Birgel Jr (1991), fatores ambientais exercem influência significativa sobre o quadro hematológico dos animais, que podem apresentar evidentes variações dos constituintes sanguíneos. Assim, valores obtidos para animais criados em determinadas regiões, ou países não podem ser considerados como padrão de referência para animais de outra região.

No Brasil são criadas duas espécies distintas de bovinos: os taurinos (*Bos taurus*) e os zebuínos (*Bos indicus*) (COSTA, 1994). Fagliari et al. (1998), analisando amostras de sangue de bovinos em diferentes faixas etárias, das espécies *Bos taurus* e *Bos indicus*, concluíram que a contagem de leucócitos dos bovinos *Bos taurus* foi superior à da espécie *Bos indicus*, demonstrando então a influência racial sobre o número de leucócitos, corroborando com nossa justificativa.

Miyoshi, Sawamukai e Iwanaga (2002) afirmam que na espécie bovina, os macrófagos uterinos mostraram forte atividade de fosfatase ácida em gestações normais, ao passo que nos casos de retenção de placenta a atividade enzimática teve sua intensidade diminuída. Com isso, podemos sugerir que uma diminuição na quantidade e/ou atividade de células CD14+ no final da gestação pode estar associada à episódios de retenção placentária, uma vez que, a coleta em abatedouro restringe o monitoramento do animal.

Neste trabalho, os linfócitos também tiveram sua expressão diminuída quando comparados ao início da gestação. Segundo Miyoshi, Sawamukai e Iwanaga (2002) linfócitos foram encontrados em pequena quantidade em placentas de gestações normais e, em casos de retenção de placenta em bovinos ao final da gestação. Isto sugere que a presença de linfócitos na placenta não possui uma função importante no período pré-parto.

Durante toda a gestação, a região intercaruncular apresentou uma maior expressão de leucócitos quando comparada ao placentônio, corroborando com os dados descritos por Oliveira e Hansen (2008) quando estudaram a expressão de células CD14+ e CD68+ em bovinos. Tal fato se deve a imunogenicidade da placenta ser distinta entre a região intercaruncular e o placentônio, uma vez que, o tecido coriônico do placentônio não expressa MHC de classe I durante a gestação, enquanto que a região intercaruncular expressa o MHC de classe I a partir do terceiro trimestre da gestação (DAVIES, 2004). Além disso, a região intercaruncular possui uma composição histológica diferente do placentônio. Estruturalmente, as áreas intercarunculares são compostas por tecido glandular presente no endométrio, tecido muscular, ou seja, miométrio e numerosos vasos sangüíneos. Ainda, na região intercaruncular, foi encontrado um aglomerado de células linfóides próximo às glândulas endometriais, (MARQUES et al., 2007). A reação da enzima fosfatase ácida foi positiva na superfície do epitélio e nas glândulas endometriais da região intercaruncular de vacas, demonstrando a possível ação fagocítica dessas estruturas (PEREIRA, 2004; MARQUES et al., 2007). À partir das considerações expostas sugere-se que a região intercaruncular por apresentar um tecido diferenciado, contenha então, uma maior quantidade de células imunes, especialmente macrófagos (CD14+), uma vez que foram encontrados infiltrados de células fagocíticas próximo às glândulas endometriais na região intercaruncular (MARQUES et al., 2007).

Uma vez que foi encontrada uma maior quantidade de todos os leucócitos fenotipados no tecido intercarucular de bovinos, em particular, células CD14+ podemos sugerir, que esta região possua funções relacionadas à proteção do concepto frente a uma resposta imune materna, como também, auxilia na remoção de restos celulares e microrganismos do útero após o parto.

O conhecimento acerca dos mecanismos imunes e função de cada tipo celular na placenta de bovinos, mas também de outras espécies em geral, ainda não é claro. Revisando-se a literatura, dados discordantes entre autores e espécies animais são apresentados. Os resultados desse trabalho de pesquisa também vem de encontro ao verificados entre tantos outros pesquisadores. Tal situação nos faz inferir que a função do sistema imune nos tecidos placentários é complexa, existindo a necessidade de novas informações acerca do processo imunológico durante a gestação, uma vez que, ainda persistem muitas incógnitas em relação aos mecanismos de adaptação imunológica presentes na gestação.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos podemos concluir que:

- A dinâmica populacional de leucócitos na placenta bovina é menos numerosa quando comparada a outras espécies como camundongos e humana, provavelmente pela placenta bovina ser classificada como sinepiteliocorial e constituir uma complexa barreira entre o sistema imunológico materno e o feto.
- Em bovinos, a região intercaruncular apresenta uma maior imunomarcagem de leucócitos quando comparada com o placentônio.
- Em ambas as regiões (intercaruncular e placentônio), leucócitos são expressos em maior quantidade no primeiro trimestre gestacional.
- Dentre os leucócitos fenotipados, macrófagos são as células imunes encontradas em maior quantidade na placenta bovina.

Referências

REFERÊNCIAS

- AAGAARD-TILLERY, K.; SILVER, R.; DALTON, J. Immunology of normal Pregnancy. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine** v. 11, p. 279-295, 2006.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 3. ed. Elsevier, Rio de Janeiro: 2005. 580 p.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 5. ed. W.B. Saunders, Philadelphia,: 1997. 494 p.
- ABRAHAM, V. M.; KIM, Y. M.; STRASZEWSKI, S. L.; ROMERO, R.; MOR, G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. **American Journal of Reproduction Immunology**, v. 51, p. 275-282, 2004.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, S.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York: Garland, 2002. 1616 p.
- ALUVIHARE, V. R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. **Nature immunology**, v. 5, p. 266-271, 2004.
- ASHKAR, A. A.; CROY, B. A. Functions of uterine natural killers cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy. **Seminars in Immunology**, v. 13, p. 235-241, 2001.
- ASHKAR, A. A.; BLACK, J. P. WEI, Q.; HE, H.; LIANG, L.; HEAD, J. R.; CROY, B. A. Assessment of requirements for IL15 and INF regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 2937-2944, 2003.
- ATKINSON, B. A.; KING, G. J.; AMOROSO, E. C. Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. **Biological Reproduction**, v. 30, p. 763-774, 1984.
- BIRGEL JR., E. H. **O hemograma de bovinos (*Bos taurus*, Linnaeus 1758), da raça Jersey, criados no estado de São Paulo**. 1991. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil, 172p.
- BOYSEN, P.; STORSET, A. K. Bovine natural killer cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 15, p. 163-177, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Agronegócio Brasileiro: uma oportunidade de investimentos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 11 jun. 2009.
- BUBANOVIC, I. Crossroads of extrathymic lymphocyte maturation pathways. **Medicinal Hypotheses**, v. 61, p. 235-239, 2003.

BULMER, J. N.; JOHNSON, P. M.; BULMER, D. Leukocyte populations in human decidua and endometrium. In: GILL, T. J.; WEGMANN, T. G.; NISBET-BROWN, E. **Immunoregulation and fetal survival**. New York: Oxford University Press, 1987. p. 223-247.

BULMER, J. N.; LASH, G. E. Human uterine natural killer cells: a reappraisal. **Molecular Immunology**, v. 42, p. 511-521, 2005.

CHAOUAT, G.; MENU, E.; KINSKY, R.; BRESIN, C. Immunologically mediated abortions: one or several pathways? **Research in Immunology**, v. 141, p. 188-195, 1990.

CHAOUAT, G.; ZOURBAS, S.; OSTOJIC, S.; LAPPREE-DELAGE, G.; DUBANCHET, S.; LEDEE, N.; MARTAL, J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 53, p. 241-256, 2002.

CHIKASHI, T.; STRAUSS, J. F. Placenta In: _____ MATSUMOTO, A. **Atlas of endocrine organs vertebrates ad invertebrates**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1987. 307 p.

COBB, S. P.; WATSON, E. D. Immunohistochemical etudy of cells in the bovine endometrium at different stages of the oestrus cycle. **Research in Veterinary Science**, v. 59, p. 238-241, 1995.

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

COSTA, J.N. **Leucograma de Zebuínos (*Bos indicus*, *linnaeus* 1758) sadios da raça Nelore criados no estado de São Paulo. Influência dos fatores etários e sexuais 1994**. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil, 124p.

COSTEAS, P. A.; KOUMOULI, A.; GIANTSIOU-KYRIAKOU, A.; PAPALOIZOU, A.; KOUMAS, L. Th2/Th3 Cytokine Genotypes Are Associated With Pregnancy Loss. **Human Immunology**, v. 65, p. 135-141, 2004.

CROY, B. A.; ASHKAR, A. A.; FOSTER, R. A.; DISANTO, J. P. ; MAGRAN, J. ; CARSON, D.; GENDLER, S. J.; GRUSBY, M. J.; WARGNER, M.; MULLER, W.; GUIMOND, M. J. Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy. **Journal of Reproduction and Immunology**, v. 59, p. 175-91, 1997.

CROY, B.A.; ESADEG, S.; CHANTAKRU, S.; VAN DEN HEUVEL, M.; PAFFARO, V. A.; HE, H.; BLACK, G. P.; ASHKAR, A. A.; KISO, Y.; ZANG, J. Update on pathways regulating the activation of uterine natural killer cells, their interactions with decidual

spiral arteries and homing their precursors to the uterus (a review). **Journal of Reproduction and Immunology**, v. 59, p. 1003-1014, 2003.

DANTZER, V. Endometrium of epitheliochorial and endotheliochorial placentae. In: GLASSER, S. R.; APLIN, J. D.; GIUDICE, L. C.; TABIBZADEH, S. (Ed). **The endometrium**. London, UK: Taylor & Francis, 2002. p. 352-368.

DAVIES, C. J.; FISHER, P. J.; SCHAFER, D. H. Temporal and regional of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. **Placenta**, v. 21, p. 194-202, 2000.

DAVIES, C. J.; HILL, J. R.; EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; FISHER, P. J.; ELDRIDGE, J. A.; SCHLAFFER, D. H. Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 267-280, 2004.

DAVIES, C. J.; ELDRIDGE, J. A.; FISHER, P. J.; SCHLAFFER, D. H. Evidence for Expression of Both Classical and Non-Classical Major Histocompatibility Complex Class I Genes in Bovine Trophoblast Cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 55, p. 188-200, 2006.

DAVIES, C. J. Why is the fetal allograft not rejected? **American Society of Animal Science**, v. 85, p. 32-35, 2007.

EHRING, G. R.; KERSCHBAUM, H. H.; EDER, C.; NEBEN, A. L.; FANGER, C. M.; KHOURY, R. M.; NEGULESCU, P. A.; CAHALAN, M. D. A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K⁺ channels, Ca²⁺ signaling, and gene expression in T lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 1593-1601, 1998.

ELAMI-SUZIN, M.; MANKUTA, D. Role of Natural Killer cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. **Harefuah**, v. 146, p. 140-144, 2007.

ENDERS, A. C.; BLANKENSHIP, T. N. Comparative placental structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.38, p.3-15, 1999.

ENGELHARDT, H.; KING, G. J. Uterine natural killer cells in species with epitheliochorial placentation. **Natural Immunology**, v. 15, p. 53-69, 1996-1997.

ERLEBACHER, A. Why isn't the fetus rejected? **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 590-593, 2001.

FAGLIARI, J. J.; SANTANA, A. E.; LUCAS, F. A.; CAMPOS-FILHO, E.; CURI, P. R. R. **Constituintes sanguíneos de bovinos lactentes, desmamados e adultos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 33, p. 263-271, 1998.

GOGOLIN-EWENS, J. K.; LEE, C. S.; MERCER, W. R.; BRANDON, M. R. Site-directed differences in the immune response to the fetus. **Immunology**, v. 66, p. 312-317, 1989.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OBORNE, B. S. T-cell maturation, activation and differentiation In: FREEMAN, W. H. **Kuby immunology**. 4.ed. New York: Company, 2000. 670 p.

GOVAERTS, A. Cellular antibodies in kidney homotransplantation. **Journal of Immunology**, v. 85, p. 516–522, 1960.

GRAY, C. A.; TAYLOR, K. M.; RAMSEY, W. S.; HILL, J. R.; BAZER, F. W.; BARTOL, F. F.; SPENCER, T. E. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1608-1613, 2001.

GRUNERT, E. **Obstetrícia veterinária**. Porto Alegre: Sulina. 1982. 323 p.

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

GULERIA, I.; SAYEGH, M. H. Maternal Acceptance of the fetus: True human tolerance. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 3345-3351, 2007.

GUMPERZ, J. E.; PARHAM, P. The enigma of natural killer cell. **Nature**. v.378, p. 245-248, 1995.

HAAS, W.; PEREIRA, P.; TONEQAWA, S. Gama/delta cells. **Annual Reviews of Immunology**, v. 11, p. 637-685, 1993.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 2001, 7. ed 582 p.

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

HANSEN, P. J. Interactions between the immune system and ruminant conceptus. **Journal of Reproduction and Fertility: Supplement**, v. 49, p. 68-82, 1995.

HANSEN, P. J. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. **Theriogenology**, v. 47, p. 121-130, 1997.

HANSEN, P. J. Regulation of immune cells in the uterus during pregnancy in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 30–31, 2007.

HASHIZUME, K. Analysis of uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the Bovine. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 1-11, 2007.

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

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

HUDDLESTON, H.; SCHUST, D. J. Immune interactions at the maternal-fetal interface: a focus on antigen presentation. **American Journal of Reproduction Immunology**, v. 51, p. 283-289, 2004.

HUNT, J. S. Immunologically relevant cells in the uterus. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 461-466, 1994.

HUNT, J. S.; PETROFF, M. G.; BURNETT, T. G. Uterine leukocytes: key players in pregnancy. **Cell & Developmental Biology**, v. 1, p. 127-137, 2000.

HUNT, J. S.; MCINTIRE, R. H.; PETROFF, M. G. **Immunobiology of human pregnancy**. In: _____ **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. Boston: Elsevier, 2006. 3230 p.

IGWEBUIKE, U. M. Trophoblast cells of ruminant placentas – A minireview. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 185-198, 2006.

IGWEBUIKE, U. M. A Review of uterine structural modifications that influence conceptus implantation and development in sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 1-7, 2009.

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febinger, 1986. 1221 p.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993. 989p.

JANEWAY, C.; MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Jeneway's Immunobiology: The immune system in health and disease**. 7. ed. New York: Abingdon, 2008. p. 835.

JOOSTEN, I.; HENSEN, E. J. Retained placenta: and immunological approach. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 451-461, 1992.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino, cap. 22 In: **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 512 p.

KAYISLI, U. A.; MAHUTTE, N. G.; ARICI, A. Uterine chemokines in reproductive physiology and pathology, **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 47, p. 213-221, 2002.

KAMPEN, A. H.; OLSEN, I.; TOLLERSRUD, T.; STORSET, A. K.; LUND, A. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, p. 53-63, 2006.

KLEVAR, S.; KULBERG, S.; BOYSEN, P.; STORSET, A.K.; MODAL, T.; BJORKMAN, C.; OLSEN, I. Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. **Journal of Parasitology**, v. 37, p. 329-339, 2007.

KING, G. J.; ATKINSON, B. A.; ROBERTSON, H. A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 31, p.17-30, 1982.

KING, A.; ALLAN, D. S.; BOWEN, M. HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKG2 receptors on decidual NK cells. **European Journal of Immunology**, v. 30, p. 1623-1631, 2000.

KOLB, J. P.; CHAOUAT, G.; CHASSOUX, D. Immunoactive products of placenta. Suppression of natural killing activity. **Journal of Immunology**, v. 132, p. 2305-2310, 1984.

KRAMER, J. W. **Normal hematology of cattle, sheep and goats**. In: _____ FELDMAN, B. F; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 1075-1084.

LANIER, L. L. NK cell recognition. **Annual. Reviews of Immunology**, v. 25, p. 225-274, 2005.

LEE, C. S.; WOODING, F. B. P.; MORGAN, G. Quantitative Analysis Throughout Pregnancy of Intraepithelial Large Granular and Non-granular Lymphocyte Distributions in the Synepitheliochorial Placenta of the Cow. **Placenta**, v. 18, p. 675-681, 1997.

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

LEISER, R.; KREBS, C.; KLISCH, K.; EBERT, B.; DANTZER, V.; SCHULER, G.; HOFFMANN, B. Fetal vilosity and microvasculature of the bovine placentome in the second half of gestation. **Journal of Anatomy**, v. 191, p. 517-527, 1997.

LEUNG, S. T.; DERECKA, K.; MANN, G. E.; FLINT, A. P. F.; WATHES, D. C. Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 119, p. 25-33, 2000.

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.

LOKE, Y. W.; KING, A. Immunology of implantation. Baillieres Best Pract Res **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 14, p. 827-837, 2000.

MARQUES, R. S.; VULCANO, M.; CAZERTA, S. M. M.; MIGLINO, M. A.; NETO, A. C. A.; PEREIRA, F. T. V. Caracterização morfológica da região intercaruncular de vacas e búfalas gestantes. **Biotemas**, v. 20, p. 103-114, 2007.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for t cell tolerance and supression. **Annual Reviews of Immunology**, v. 18, p. 367-391, 2000.

MICHELON, T.; SILVEIRA, J. G.; GRAUDENS, M.; NEUMANN, J. Imunologia da Gestação. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 50, p. 145-151, 2006.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y.; IWANAGA, T. Reduced Phagocytotic Activity of Macrophages in the Bovine Retained Placenta. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 37, p. 53-56, 2002.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y. Specific localization of macrophages in pregnant bovine caruncles. **Reproduction of Domestic Animals**. v.39, p.125-128, 2004.

MOFFETT-KING, A. Natural Killer cells and pregnancy. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 656-663, 2002.

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

MURPHY, S. P.; FAST, L. D.; HANNA, N. N.; SHARMA, S. Uterine, NK Cells Mediate Inflammation-Induced Fetal Demise in IL-10-Null Mice. **The journal of Immunology**, v. 175, p. 4084-4090, 2005.

NAIMAN, B. M.; BLUMERMAN, S.; ATL, D.; BOLIN, C. A.; BROWN, R.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. Evaluation of type 1 immune response in naïve and vaccinated animals following challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo: involvement of WC1 (+) gamadelta and CD4 T cells. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 6147-6157, 2002.

OH, M. J.; CROY, B. A. A Map of relationships between uterine natural killer cells and progesterone receptor expressing cells during mouse pregnancy. **Placenta**, v. 29, p. 317-323, 2008.

OLIVEIRA, L.; HANSEN, P. J. Deviations in populations of peripheral blood mononuclear cells and endometrial macrophages in the cow during pregnancy. **Reproduction Advance**, v. 136, p. 481-490, 2008.

PARHAM, P. NK Cells and Trophoblasts: Partners in Pregnancy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 8, p. 951-955, 2004.

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

PEREIRA, F. T. V. **Eritrofagocitose placentária em búfalas (*Bubalus bubalis* *bubalis*-Simpson, 1945)**. 2004. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil, 120 p.

PESSA-MORIKAWA, T.; NIKU, M.; IIVANAINEN, A. Persistent differences in the level of chimerism in B versus T cells of freemartin cattle. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 77-87, 2004.

PICCINNI, M. P. Role of immune cells in pregnancy. **Autoimmunity**, v. 36, p. 1-4, 2003.

PICCINNI, M. P. T-cell Cytokines in Pregnancy. **American Journal of Reproductive immunology**, v. 47, p. 289-294, 2002.

POESTER, F. P.; GOLÇALVES, V. S. P.; PEREIRA L. A. Brucellosis in Brasil. **Veterinary Microbiology**, v. 90, p. 55-62, 2002.

POESTER, F. P.; SAMARTINO, L. E.; LAGE, A. P. Diagnóstico da brucelose bovina. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, n.47, p.13-29, 2005.

RANGO, U. V. Effects of trophoblast invasion on the distribution of leukocytes in uterine and tubal implantation sites **Fertility and Sterility**, v. 76, p. 116-124, 2008.

REPINIK, U.; TILBURGS, T.; ROELEN, D. L.; VAN DER MAST, B. J.; KANHAI, H. H. H.; SCHERJON, S.; CLAAS, F. H. J. Comparison of macrophage phenotypic between deciduas basalis and deciduas parietalis by flow cytometry. **Placenta**, v. 28, p. 405-412, 2008.

RICH, R. R.; THOMAS, A. F.; BENJAMIN, D. S.; WILLIAN, T. S.; WARREN, S. The Human immune response In:_____RICH, R. R. **Clinical Immunology: Principles and Practice**. St. Louis: Mosby, 1996, v. 2, p.1- 4.

RILLEY, J. K. Trophoblast immune receptors in Maternal-fetal tolerance. **Immunological Investigation**, v. 37, p. 395-426, 2008.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, B.; MALE, D. K. Immunology:_____ Sistema Imune. 6th ed. Edinburgh : Mosby, 2003, 552p.

SAFARANA, S.; COELHO, R.; NEVES, A.; TRINDADE, J. C. Aspectos da Imunologia da Gravidez. **Acta Médica Portuguesa**, v. 20, p. 355-358, 2007.

SARGENT, I. L.; BORZYCHOWSKY, A. M.; REDMAN, W. G. NK cells and human pregnancy – an inflammatory view. **Trends in Immunology**, v. 27, p. 309-404, 2006.

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.

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

SCHFLER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health disease. **Animal of Reproduction Science**, v. 60, p. 145-160, 2000.

SINGH, J.; MURRAY, R. D.; MSHELIA, G.; WOLDEHIWET, Z. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. **The Veterinary Journal**, v. 10, p. 1-9, 2007.

STERIO, D. C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the dissector. **Journal of Microscopy**, v. 134, p. 127-136, 1984

SZEKERES-BARTHO, J.; FAST, Z. S.; VARGA, P.; SZEREDAY, L.; KELEMEN, K. The immunological pregnancy protective effect of progesterone is manifested via controlling cytokine production. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 35, p. 348-351, 1996.

TAFURI, A.; ALFERINK, J.; MOLER, P.; HAMMERING, G.J.; ARNOLD, B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. **Science**, v. 270, p. 630-633, 1995.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Herpesvírus bovino tipo 1: Tópicos sobre a infecção e métodos de diagnóstico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 203-209, 2001.

TAYADE, C.; FANG, Y.; CROY, B. A. A Review of Gene Expression in Porcine Endometrial Lymphocytes, Endothelium and Trophoblast During Pregnancy Success and Failure. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 455-463, 2007.

TEKIN, S.; HANSEN, P. J. Natural Killer-Like Cells in the Sheep: Functional Characterization and Regulation by Pregnancy-Associated Proteins. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, p. 803-811, 2002.

TIZARD, I. R. Imunidade no feto e no recém-nascido, In: (ed.), **Imunologia veterinária: uma introdução**. São Paulo: Elsevier, 2009. p. 233-246.

THELLIN, O.; COUMAS, 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.

TRINCHIERI, G. Biology of natural killer cells. **Advances in Immunology**, v.47, p.187–376, 1989.

TRUNDLEY, A.; MONFFETT, A. Human uterine and pregnancy. **Tissue Antigens**, v. 36, p. 1-12, 2004.

VAN DER WIELEN, A. L.; KING, G. J. Intraepithelial lymphocytes in the bovine uterus during the oestrus cycle and early gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 457-462, 1984.

VAZ, A. K.; FURTADO, A. C.; MARCA, A.; PATERNO, M. R. Qualidade do colostro bovino e transferência de imunidade aos recém-nascidos na região de Lages, SC. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 3, p. 116-120, 2004.

VIVIER, E.; NUNES, J. A.; VELY, F. Natural Killer cell signaling pathways. **Science**, v. 306, p. 1516-1519, 2004.

WILCZYNSKI, J. R. Th1/Th2 cytokines balance-yin and yang of reproductive immunology. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 122, p. 136-143, 2005.

WILCZYNSKI, J. R.; TCHORZEWSKI, H.; BANASIK, M.; GLOWACKA, E.; WIECZOREK, A.; LEWKOWICZ, P.; MALINOWSKI, A.; SZPAKOWSKI, M.; WILCZYNSKI, J. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on the surface of peripheral blood and decidual lymphocytes of women with pregnancy-induced

hypertension **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 10, p. 15-20, 2002.

WOODING, F. B. P. Current topic: The syneptheliochorial palcenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**, v. 13, p. 101-113, 1992.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. Placentation. In: _____ MARSHALL, F. H. A. **Marsshall's physiology of reproduction**. 4. ed. Chapmam and Hall, London: 1994, p. 230-446.

ZELLER, U.; KUHN, H. J. Postpartum erythrophagocytosis, iron storage and iron secretion in the endometrium of the tree shrew (Tupaia) during pregnancy. **Journal of Anatomy**, v. 184, p. 597-606, 1994.

Anexos

ANEXO A

CD3 diferenças entre trimestres e regiões

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0307, considered 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 4.373 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean	q	P value	
	Difference			
CD3 Plac 1T vs CD3 Plac 2T	1.738	2.851	ns	P>0.05
CD3 Plac 1T vs CD3 Plac 3T	1.640	2.691	ns	P>0.05
CD3 Plac 1T vs CD3 Inter 1T	-1.066	1.749	ns	P>0.05
CD3 Plac 1T vs CD3 Inter 2T	0.7800	1.280	ns	P>0.05
CD3 Plac 1T vs CD3 Inter 3T	0.7760	1.273	ns	P>0.05
CD3 Plac 2T vs CD3 Plac 3T	-0.09800	0.1608	ns	P>0.05
CD3 Plac 2T vs CD3 Inter 1T	-2.804	4.600	*	P<0.05
CD3 Plac 2T vs CD3 Inter 2T	-0.9580	1.572	ns	P>0.05
CD3 Plac 2T vs CD3 Inter 3T	-0.9620	1.578	ns	P>0.05
CD3 Plac 3T vs CD3 Inter 1T	-2.706	4.439	*	P<0.05
CD3 Plac 3T vs CD3 Inter 2T	-0.8600	1.411	ns	P>0.05
CD3 Plac 3T vs CD3 Inter 3T	-0.8640	1.417	ns	P>0.05
CD3 Inter 1T vs CD3 Inter 2T	1.846	3.028	ns	P>0.05
CD3 Inter 1T vs CD3 Inter 3T	1.842	3.022	ns	P>0.05
CD3 Inter 2T vs CD3 Inter 3T	-0.004000	0.006562	ns	P>0.05

ANEXO B

 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 4.373 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean			
	Difference	q	P value	
CD14 Plac 1T vs CD14 Plac 2T	0.6920	2.544	ns	$P > 0.05$
CD14 Plac 1T vs CD14 Plac 3T	0.1100	0.4044	ns	$P > 0.05$
CD14 Plac 1T vs CD14 Inter 1T	-2.924	10.749	***	$P < 0.001$
CD14 Plac 1T vs CD14 Inter 2T	-0.6820	2.507	ns	$P > 0.05$
CD14 Plac 1T vs CD14 Inter 3T	-0.8260	3.036	ns	$P > 0.05$
CD14 Plac 2T vs CD14 Plac 3T	-0.5820	2.139	ns	$P > 0.05$
CD14 Plac 2T vs CD14 Inter 1T	-3.616	13.293	***	$P < 0.001$
CD14 Plac 2T vs CD14 Inter 2T	-1.374	5.051	*	$P < 0.05$
CD14 Plac 2T vs CD14 Inter 3T	-1.518	5.580	**	$P < 0.01$
CD14 Plac 3T vs CD14 Inter 1T	-3.034	11.153	***	$P < 0.001$
CD14 Plac 3T vs CD14 Inter 2T	-0.7920	2.911	ns	$P > 0.05$
CD14 Plac 3T vs CD14 Inter 3T	-0.9360	3.441	ns	$P > 0.05$
CD14 Inter 1T vs CD14 Inter 2T	2.242	8.242	***	$P < 0.001$
CD14 Inter 1T vs CD14 Inter 3T	2.098	7.712	***	$P < 0.001$
CD14 Inter 2T vs CD14 Inter 3T	-0.1440	0.5293	ns	$P > 0.05$

ANEXO C

CD8 diferenças entre trimestres e regiões

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0187, considered 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 4.373 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean		P value	
	Difference	q		
CD8 Plac 1T vs CD8 Plac 2T	1.774	3.059	ns	P>0.05
CD8 Plac 1T vs CD8 Plac 3T	1.640	2.828	ns	P>0.05
CD8 Plac 1T vs CD8 Inter 1T	-1.014	1.748	ns	P>0.05
CD8 Plac 1T vs CD8 Inter 2T	1.150	1.983	ns	P>0.05
CD8 Plac 1T vs CD8 Inter 3T	0.8920	1.538	ns	P>0.05
CD8 Plac 2T vs CD8 Plac 3T	-0.1340	0.2310	ns	P>0.05
CD8 Plac 2T vs CD8 Inter 1T	-2.788	4.807	*	P<0.05
CD8 Plac 2T vs CD8 Inter 2T	-0.6240	1.076	ns	P>0.05
CD8 Plac 2T vs CD8 Inter 3T	-0.8820	1.521	ns	P>0.05
CD8 Plac 3T vs CD8 Inter 1T	-2.654	4.576	*	P<0.05
CD8 Plac 3T vs CD8 Inter 2T	-0.4900	0.8449	ns	P>0.05
CD8 Plac 3T vs CD8 Inter 3T	-0.7480	1.290	ns	P>0.05
CD8 Inter 1T vs CD8 Inter 2T	2.164	3.731	ns	P>0.05
CD8 Inter 1T vs CD8 Inter 3T	1.906	3.286	ns	P>0.05
CD8 Inter 2T vs CD8 Inter 3T	-0.2580	0.4449	ns	P>0.05

ANEXO D

uNK diferenças entre trimestres e regiões

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.1397, considered not significant.

Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.373 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean		P value	
	Difference	q		
uNK Plac 1T vs uNK Plac 2T	0.2260	1.989	ns	P>0.05
uNK Plac 1T vs uNK Plac 3T	0.010000	0.08801	ns	P>0.05
uNK Plac 1T vs uNK Inter 1T	0.2120	1.866	ns	P>0.05
uNK Plac 1T vs uNK Inter 2T	0.3880	3.415	ns	P>0.05
uNK Plac 1T vs uNK Inter 3T	0.2920	2.570	ns	P>0.05
uNK Plac 2T vs uNK Plac 3T	-0.2160	1.901	ns	P>0.05
uNK Plac 2T vs uNK Inter 1T	-0.01400	0.1232	ns	P>0.05
uNK Plac 2T vs uNK Inter 2T	0.1620	1.426	ns	P>0.05
uNK Plac 2T vs uNK Inter 3T	0.06600	0.5809	ns	P>0.05
uNK Plac 3T vs uNK Inter 1T	0.2020	1.778	ns	P>0.05
uNK Plac 3T vs uNK Inter 2T	0.3780	3.327	ns	P>0.05
uNK Plac 3T vs uNK Inter 3T	0.2820	2.482	ns	P>0.05
uNK Inter 1T vs uNK Inter 2T	0.1760	1.549	ns	P>0.05
uNK Inter 1T vs uNK Inter 3T	0.08000	0.7041	ns	P>0.05
uNK Inter 2T vs uNK Inter 3T	-0.09600	0.8449	ns	P>0.05