PEDRO KASTEIN FARIA DA CUNHA BIANCHI

Fenotipagem das células indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO
positivas em cultura de células placentárias e embrionárias de
ratas Wistar sob influência do INF- γ e da progesterona

São Paulo

2013

PEDRO KASTEIN FARIA DA CUNHA BIANCHI

Fenotipagem das células indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO positivas em cultura de células placentárias e embrionárias de ratas Wistar sob influência do INF- γ e da progesterona

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

Departamento

Cirurgia

Área de concentração

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior

São Paulo
2013

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.2893
FMVZ

Bianchi, Pedro Kastein Faria da Cunha
Fenotipagem das células indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO positivas em cultura de células placentárias e embrionárias de ratas Wistar sob influência do INF- γ e da progesterona.
/ Pedro Kastein Faria da Cunha Bianchi. -- 2013.
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.

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. Indoleamina 2,3 dioxigenase. 2. Triptofano. 3. Tolerância materno fetal. 4. Sistema imunológico. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Fenotipagem das células indoleamina, 2,3 dioxigenase - IDO - positivas em cultura de células placentárias e embrionárias de ratas Wistar sob influência do INF- γ e da progesterona", protocolado sob o nº 2677/2012, utilizando 30 (trinta) ratos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research "Indoleamine 2,3 dyoxygenase - IDO positive cells phenotyping in placenta and embryo cell culture from Wistar rats under influence of IFN- γ and progesterone", protocol number 2677/2012, utilizing 30 (thirty) rats, under the responsibility Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 16 de agosto de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BIANCHI, Pedro Kastein Faria da Cunha

Título: Fenotipagem das células indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO positivas em cultura de células placentárias e embrionárias de ratas Wistar sob influência do INF- γ e da progesterona

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando em todas as horas da minha vida, não importando as consequências, sempre pensando em minha felicidade.

A minha Irmã, por sempre estar ao meu lado e, principalmente, pela paciência e dedicação a mim prestadas.

Aos meus avôs Carlos Bianchi e Nilde Bianchi, pela infância inesquecível, na qual pude realmente conhecer os valores da vida.

Ao meu avô Daelcio Faria da Cunha, pelas palavras e momentos inesquecíveis vividos quando menino, ensinando-me a nunca desistir do que realmente é importante na vida (in memoriam).

A Gabriela Bezerra Pucci, pela paciência, companheirismo, ajuda e, principalmente pelo amor que dedica a mim com tanto afinho.

A professora Dr. Patrícia Orlandini Gonzalez, a grande arquiteta da minha carreira, enxergando e, com muita sabedoria, aflorando em mim o verdadeiro interesse pela pesquisa.

Agradecimentos

A minha mãe, pelo amor incomparável e pelas sabias palavras nas horas complicadas. Em cada palavra, um aprendizado. Muito obrigado por se fazer sempre presente.

Ao meu pai, pelo apoio em todos os momentos, paciência e, principalmente, pela amizade. Além de um Pai incomparável, um grande companheiro. Obrigado por participar de todos os momentos da minha vida, sendo sempre o meu espelho.

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- FMVZ- USP, que me acolheu da melhor forma possível.

Ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais domésticos e Silvestres pela oportunidade.

Ao professor Dr. José Roberto Kfoury Junior, pela paciência, ensinamentos e confiança a mim dedicados. Porém, acima de tudo, agradeço pelo apoio e amizade nas horas necessárias.

A minha grande amiga Maria Baptista Leticia Salvadori, pela paciência durante os ensinamentos a mim prestados e pela amizade construída durante esses anos.

A Doutora Bernadete de Lourdes Liphaut agradeço pelos ensinamentos e dedicação prestados a mim.

RESUMO

BIANCHI, P. K. F. C. **Fenotipagem das células indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO positivas em cultura de células placentárias e embrionárias de ratas Wistar sob influência do INF- γ e da progesterona.** [Immunophenotyping of indoleamine 2,3 dioxigenase positive cells in culture of placental and embryonic cell from Wistar rats under influence of INF- γ and progesterone]. 2013. 65 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A gestação confere ao organismo materno uma série de mudanças e desafios, envolvendo especialmente seu sistema imunológico. O feto, do ponto de vista imunológico, é comparado a um enxerto semi-alogenêico, pois expressa moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) paterno, considerado não próprio ao organismo materno, capaz de desencadear uma resposta imunológica no ambiente intrauterino. Porém, durante todo o período gestacional, o organismo materno reconhece o embrião sem uma resposta imunológica contra sua permanência no útero, estabelecendo-se uma tolerância materno-fetal. Vários mecanismos contribuem para esse estado tolerogênico, como a atividade da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). A IDO promove o catabolismo do aminoácido triptofano, levando as células T à apoptose, devido à carência deste aminoácido e pela ação de seus catabólitos no micro ambiente placentário. Diversos tipos celulares estão presentes na interface materno fetal e vários deles podem potencialmente expressar a IDO. Em ratas Wistar, sabe-se que diversas proteínas, principalmente o interferon γ e, recentemente, a progesterona, podem aumentar a expressão desta enzima; contudo, ainda não são conhecidos quais tipos celulares são efetivamente influenciados por estas moléculas. Desta forma, este trabalho buscou suprir esta lacuna, por meio da identificação das células IDO positivas pela imunofenotipagem e citometria de fluxo. De acordo com as análises realizadas, os resultados deste trabalho mostraram que todos os tipos celulares fenotipados foram capazes de expressar a enzima. Contudo somente alguns grupos específicos de células presentes no ambiente uterino placentário sofrem influência das proteínas supracitadas, principalmente as células dendríticas, e os linfócitos CD4 que elevam a expressão de IDO na presença de progesterona e INF- γ . Tais achados sugerem que a ação da enzima em grupos celulares específicos poderiam constituir meios pelo qual o organismo regula o sistema imunológico no ambiente uterino-placentário, em que é capaz de impedir o desenvolvimento de células imunológicas potencialmente ativas, colaborando com a formação de um ambiente tolerogênico favorável para o desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: Indoleamina 2,3 dioxigenase. Triptofano. Tolerância materno-fetal. Sistema imunológico.

ABSTRACT

BIANCHI, P. K. F. C. **Immunophenotyping of indoleamine 2,3 dioxygenase positive cells in culture of placental and embryonic cell from Wistar rats under influence of IFN- γ and progesterone.** [Fenotipagem das células indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO positivas em cultura de células placentárias e embrionárias de ratas Wistar sob influência do INF- γ e da progesterona]. 2013. 65 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Pregnancy causes several changes and challenges to the maternal body, especially involving the immune system. The fetus, on the immunological point of view, is compared to a semiallogeneic graft, expressed as molecules of the paternal major histocompatibility complex (MHC) considered not self to the maternal organism, capable of triggering an immune response in the intrauterine environment. However, throughout the gestational period, maternal organism tolerates the embryo without an immune response against its permanence in the uterus, establishing maternal-fetal tolerance. Several mechanisms contribute to this tolerogenic state, as the activity of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). The IDO promotes the catabolism of tryptophan, inducing T cells apoptosis due to the deprivation of this amino acid and by the action of its catabolites in the placental microenvironment. Several cell types are present in the maternal-fetal interface and many of them can potentially express IDO. In Wistar rats, it is known that interferon γ and recently, progesterone, may increase the expression of this enzyme; however, which cell types are actually influenced by these molecules is still unknown. Thus, this study intends to fill this gap, by identifying IDO positive cells by immunophenotyping and flow cytometry. According to the analysis carried out, the results of this study showed that all phenotyped cell types were able to express the enzyme, however only some specific groups present in placental uterine environment are influenced by the factors above mentioned, especially dendritic cells and lymphocytes CD4 increase the IDO expression at the presence of progesterone and IFN- γ . These findings suggest that the action of the enzyme in specific cell groups may be one of the means by which the body regulates the immune system uterine-placental environment, which is able to prevent the development of potentially active immune cells, contributing to the formation tolerogenic environment favorable for embryonic development.

Keywords: Indoleamine 2,3 dioxygenase. Tryptophan. Maternal-fetal tolerance. Immune system

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	GESTAÇÃO E PLACENTAÇÃO	15
2.2	INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE E TRIPTOFANO	16
2.3	PROGESTERONA	19
2.4	LEUCÓCITOS NA INTERFACE MATERNO-FETAL	20
2.5	LINFÓCITOS	20
2.6	MACRÓFAGOS	22
2.7	CÉLULAS DENDRÍTICAS	23
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	MATERIAL	28
4.2	MÉTODOS	28
4.2.1	Cultivo celular	28
4.2.2	Citometria de fluxo	29
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
6	RESULTADOS	34
7	DISCUSSÃO	51
8	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	59

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Do ponto de vista imunológico, a gestação oferece ao organismo uma série de mudanças, exigindo adaptações do sistema imunológico. No momento da implantação embrionária, as células do trofoblasto invadem o tecido uterino, expondo o embrião ao sistema imunológico materno. Naturalmente, tal processo levaria a um combate efetivo do aloenxerto, devido ao material genético paterno presente no mesmo, porém, isso não ocorre graças a mecanismos vários, ainda não totalmente esclarecidos, desempenhados pelo sistema imunológico da mãe, garantindo a sobrevivência do conceito (RIJK et al., 2002; MOFFETT; LOKE, 2006).

Dentre esses mecanismos, a enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) desempenha um importante papel. Ela é produzida e expressa por alguns tipos celulares e apresenta capacidade de catabolizar o aminoácido triptofano, o que impede a proliferação das células T efectoras pela carência deste componente, como ocorre no micro ambiente placentário (MELLOR; MUNN et al., 2001). Ainda, o catabolismo do triptofano gera compostos tóxicos, como a quinurenina que, por sua vez, ocasiona uma imunossupressão em determinado local pela indução do perfil das células Tregs e também por levar as células T ativadas à apoptose (KUDO et al., 2004; KUDO; BOYD et al., 2004; JUHÁSZ et al., 2012).

Ao início da gestação e no decorrer dessa, no local da implantação e da futura placenta, células do sistema imunológico estão presentes, como os macrófagos, as células dendríticas, as células NK e as células T (RIJK et al., 2002). Sabe-se que em ratas Wistar, algumas dessas células podem potencialmente expressar a IDO. Na presença de algumas citocinas e hormônios, principalmente o $\text{INF-}\gamma$ e a progesterona, a expressão da IDO é elevada, contudo, desconhece-se em qual (is) tipo(s) celular (es) esses compostos provocam tal efeito (SALVADORI, 2010).

Nesse contexto, identificando-se os tipos celulares presentes no útero gravídico de ratas Wistar prenhes e verificando qual(is) tipo(s) celular(es) respondem positivamente à influência do $\text{INF-}\gamma$ e da progesterona na expressão da IDO, será possível a inferência de mecanismos envolvidos na expressão desta enzima, bem como sugestões da modulação da mesma para aplicações terapêuticas.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GESTAÇÃO E PLACENTAÇÃO

A gestação induz o organismo materno a um estado imunológico bastante complexo, devido à presença de antígenos paternos no embrião, considerados “não próprios” ao organismo materno, podendo desencadear reações imunológicas (BOUMA et al., 1996; HAFEZ, 2004).

O início da gestação é marcado por várias modificações fisiológicas no microambiente uterino, principalmente de caráter imunológico, buscando a proteção do embrião recém implantado, sendo necessário a existência de um equilíbrio entre ambas as partes: a placenta e o útero (ERLEBACHER, 2013). É preciso que haja uma completa sincronização dos fatores provenientes do organismo materno, principalmente entre as citocinas, as linfocinas e os fatores de crescimento, incluindo alguns hormônios esteroides, como o estrógeno e a progesterona, que são de extrema relevância para um processo gestacional bem sucedido, pois causam modificações no tecido endometrial, tornando-o receptivo ao embrião, dando uma maior assistência para o correto desenvolvimento do conceito (MANSOURI-ATTIA et al., 2012).

O mecanismo da implantação embrionária constitui um gradiente de citocinas e quimiocinas produzido pelas células endometriais que direcionam o blastocisto até o local onde ocorrerá a sua fixação na parede uterina, permitindo a interação do embrião com a mucosa do órgão. Após a fixação, as células embrionárias invadem o endométrio, atravessando a camada epitelial do útero e em seguida, o tecido uterino é reparado e remodelado pela placenta, que está em amplo desenvolvimento. Esse local é caracterizado por uma forte resposta das células inflamatórias (perfil Th1), sendo que elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8 e IFN- γ estão envolvidas. Tais citocinas recrutam células imunológicas para a decídua materna, onde, em humanos e camundongos, existe uma grande infiltração de leucócitos, em que 65% a 70% são representadas pelos linfócitos natural Killer (NK) e 10% a 20% são células apresentadoras de antígenos (APCs), como os macrófagos e as células dendríticas (GRANOT et al., 2012).

Nesse contexto, para que ocorra um desenvolvimento placentário e embrionário adequado, torna-se necessário, inicialmente, um processo inflamatório, em que ocorrerá o recrutamento de células imunológicas para a completa reorganização da mucosa uterina lesionada pelo mecanismo de implantação embrionária. Tais células secretam citocinas que induzem a remodelação do tecido lesado pela estimulação da proliferação e diferenciação celular. Por isso, além da proteção contra agentes invasores, o sistema imunológico parece ser crucial para uma gestação bem sucedida (GRANOT et al., 2012).

Resultados de estudos realizados com a depleção das populações celulares acima citadas, durante o primeiro trimestre gestacional, mostram efeitos deletérios para o processo de implantação embrionária e desenvolvimento placentário, em que uma em cada cinco gestações podem terminar em aborto (WILLIAMS, 2012).

Após a implantação embrionária, tem-se início uma nova fase, o desenvolvimento placentário. A placenta, estrutura localizada entre a mãe e o feto, é de fundamental importância para a sobrevivência do conceito. Caracterizada como um órgão transitório, formado pela interação entre tecidos fetais e maternos, apresenta funções, como: 1- intercâmbio de nutrientes e gases, 2- atividades endócrinas, produzindo hormônios que garantem a continuidade da prenhes, 3- funções imunológicas, como a transferência ativa de imunoglobulinas, a tolerância imunológica, a liberação de citocinas e atividades efectoras relacionadas aos linfócitos (SOARES et al., 1996; CHUCRI et al., 2010).

2.2 INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE E TRIPTOFANO

As oxigenases são enzimas que contêm metais e catalisam a incorporação de uma molécula de oxigênio (O_2), levando ao metabolismo e à síntese de muitas substâncias biológicas (MELLOR; MUNN, 2001; KUDO et al., 2004; THACKRAY et al., 2008; MUNIR et al., 2012).

A indoleamine 2,3 dioxigenase é uma enzima intracelular com peso molecular variando entre 40 e 45 KDa, composta por uma grande quantidade de aminoácidos (PALAFOX et al., 2010). Seus efeitos metabólicos iniciam-se por sinais locais, como a inflamação, processo que envolve a sinalização celular por citocinas, as quais são requeridas, também, para desencadear a produção de IDO (LINDSTRÖM et al., 2012). Apesar de a maioria das pesquisas indicarem a presença da IDO somente intracelular, alguns estudos

referem-se a mesma no meio extracelular, pois os seus efeitos favorecem imunologicamente o micro ambiente onde ela (IDO) é expressa (MEISEL et al., 2004).

Somente alguns tipos celulares são capazes de expressar a IDO, como as células do trofoblasto, fibroblasto, epiteliais e tumorais, macrófagos, células dendríticas e células da micróglia, porém, a via bioquímica ou funcional da enzima não é ativada em todas as células, principalmente em condições homeostáticas, a menos que as células IDO positivas sejam estimuladas a desencadear sua expressão em resposta a lesões, inflamações e infecções teciduais (HUANG et al., 2010; HUANG et al., 2012). Um fato de extrema relevância, considerando o mecanismo de ativação da IDO, é que todos os genes da molécula estudados em mamíferos, até o presente momento, possuem um ou mais elementos de resposta ao IFN- γ em suas regiões promotoras. Por isso, o IFN- γ produzido nos locais de inflamação, pode ser considerado um potente indutor da enzima em vários tipos celulares (células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, células epiteliais e endoteliais) (HUANG et al., 2010).

De acordo com Salvadori et al. (2010), as células presentes no ambiente uterino-placentário de ratas Wistar apresentam uma expressão de IDO significativa, que é elevada quando tais células foram expostas a suplementação com o IFN- γ .

Os efeitos da IDO estão relacionados com o catabolismo do aminoácido triptofano, a enzima quebra sua molécula por meio da inserção de moléculas de oxigênio (BALL et al., 2009; LINDSTRÖM et al., 2012), podendo ocasionar a supressão da proliferação celular, principalmente das células T efectoras, produzindo efeitos imunomodulatórios ou antimicrobianos em determinado local, devido à falta do triptofano e à presença dos catabólitos, gerados no seu catabolismo, considerados tóxicos para alguns grupos celulares (BALL et al., 2009).

O triptofano é considerado o aminoácido essencial menos abundante no organismo, desempenhando três funções principais, em que se relaciona com a síntese de proteínas, biossíntese de serotonina e em reações catabólicas por meio da via quinurenina (MELLOR; MUNN, 2004; BALL et al., 2009).

Para que ocorra o catabolismo do triptofano pela IDO, torna-se necessário que a sua expressão seja estimulada. O IFN- γ induz a atividade bioquímica e funcional da enzima, pois leva a expressão de genes que a produzem, fazendo com que haja uma estimulação à degradação do aminoácido (triptofano) em quinurenina (YOSHIDA et al., 1981; YASUI et al., 1986; KUDO et al., 2004; BOASO et al., 2005; LIANG, 2006), dependendo, segundo Mailankot e Nagaraj (2010) da via de sinalização JAK-STAT-1. O IFN- γ liga-se ao seu

receptor CD119, presente na membrana das células imunológicas, e, após essa ligação, ocorre a agregação e fosforilação de JAK1 e JAK2 com conseguinte fosforilação e ativação de STAT-1. Por sua vez, STAT1 se liga a IDO1 no núcleo celular, local onde ocorre a transcrição da proteína IDO (BASSAL et al., 2012).

Devido à diminuição do triptofano em determinado microambiente e à produção de quinurenina, os efeitos da enzima não são confinados somente às células que a expressam. Células vizinhas podem sentir e responder à falta do aminoácido e à presença de quinurenina. Com isso, as células apresentadoras de antígenos que expressam IDO podem afetar a si mesmas e as células vizinhas, como as células T, visto a existência de uma interação entre as APCs e as células T (MUNN; MELLOR, 2012), causando uma inibição da ativação, proliferação e sobrevivências das células T efectoras (BUBNOFF; BIEBER, 2012).

Um mecanismo de ação da quinurenina no meio extracelular tem início quando essa se liga a um fator de transcrição chamado receptor Aril-hidrocarboneto (aryl-hydrocarbon receptor - AHR), presente nas células T CD4, levando a alterações fenotípicas nas mesmas, resultando na mudança para um perfil regulador, explicando como o catabólito originado pela ação da IDO (quinurenina) pode direcionar uma imunossupressão em determinado microambiente (HARDEN; EGILMEZ, 2012).

Porém, a expressão da IDO não leva necessariamente à função que a enzima desempenha, devendo haver junto com as citocinas que levam à expressão da enzima, a presença de fatores co-estimulatórios, tais como: a ligação do CD80/86 e dos LPS (lipopolissacarídeo de membrana), às células IDO positivas (PALAFOX et al., 2010), bem como a ligação das moléculas de B7, receptor presente nas células dendríticas com o receptor CTLA-4, molécula co-inibitória expressa nas células T reguladoras. Tal interação, entre as DCs e as células Tregs, pela comunicação dos seus receptores, induz a expressão da IDO nas células dendríticas (HARDEN; EGILMEZ, 2012; CATANI et al., 2013).

Contudo, infere-se que a IDO reduza a concentração do triptofano, impedindo a proliferação das células T efectoras imunologicamente ativas, fazendo com que estas entrem em apoptose, devido ao estado de carência do triptofano, como ocorre no microambiente placentário e em alguns tumores (TAKIKAWA, 2005; KUDO et al., 2004). Ainda os catabólitos do triptofano podem induzir a apoptose das células T, B e NK mas não atingem as células dendríticas, explicando como as DCs permanecem no micro ambiente com altos níveis de IDO, podendo perpetuar e continuar a expressão da enzima (HARDEN; EGILMEZ, 2012).

2.3 PROGESTERONA

A progesterona é um hormônio esteroide participante de vários mecanismos fisiológicos no organismo dos mamíferos. É produzida pelas células da granulosa e do corpo lúteo no ovário. Além do seu papel essencial na manutenção da gestação, uma série de estudos tem demonstrado sua participação em atividades imunológicas supressivas/reguladoras (BARRERA; ÁVILA; DIAS, 2007; SU et al., 2009).

Contribui com a regulação dos linfócitos uterinos, possuindo efeitos inibitórios diretos ou indiretos sob a proliferação deste tipo celular. Estimula a produção de células dendríticas imaturas, as quais são responsáveis pela indução de células T reguladoras, diminuindo a ação das células T efectoras, colaborando, conseqüentemente, com a tolerância materno-fetal (LIANG, 2006).

Ainda, a progesterona participa de um mecanismo de inibição da produção de fatores pró-inflamatórios pelos linfócitos, que, atravessando a membrana celular dos mesmos, forma um complexo hormônio receptor. Tal complexo se une ao DNA, estimulando fatores de transcrição, produzindo a proteína PIBF. Esta proteína bloqueia a ação da fosfolipase A2, evitando a liberação de ácido araquidônico, impedindo a produção de prostaglandina e/ou leucotrienos e de fatores pró-inflamatórios, incluindo a citocina IL-12, que estimula a produção de IFN- γ pelas células NK (BARTHO; WEGMANN, 1996).

O ácido araquidônico, conhecido pelo papel crucial na inflamação e no câncer, pode inibir a atividade da IDO em monócitos. Esse efeito é dose dependente da via COX1 e COX2, pois são essas enzimas as responsáveis pela sua produção. A interrupção na produção deste ácido leva à interrupção da fosforilação de STAT-1, devido ao baixo nível de IFN- γ que é o maior responsável pela sua fosforização. A interrupção na fosforização de STAT-1 leva a uma diminuição na produção de IDO, visto a via JAK-STAT-1 ser o principal meio de ativação da transcrição da proteína (BASSAL et al., 2012).

O IFN- γ participa, também, da retroalimentação da via que o produz, ou seja, das células do grupo Th1, dando continuidade à ação das mesmas, podendo prejudicar o processo gestacional pela ação das citocinas pró-inflamatórias. Já a IL-4, uma citocina anti-inflamatória, retroalimenta a via Th2, produzindo citocinas favoráveis à implantação, como a IL-10, e, também, inibe a fosfolipase A2, colaborando na redução da produção de fatores pró-inflamatórios, favorecendo a implantação (BARTHO; WEGMANN, 1996; DRUCKMANN, 2005; BARRERA; ÁVILA; DIAS, 2007).

2.4 LEUCÓCITOS NA INTERFACE MATERNO-FETAL

São produzidos na medula óssea e armazenados nos órgãos linfoides, principalmente baço e timo, e são conhecidos como as células móveis do sistema imunológico, pois se encontram circulando no sangue ou aderidos ao revestimento endotelial (ABBAS, 2005).

Sua função é defender o organismo de agentes invasores. Esse processo ocorre por meio da migração dessas células para áreas de inflamação e infecção, como acontece durante a implantação embrionária, visto ser um processo invasivo aos tecidos uterinos (GYTON, 2006; TIZARD, 2009).

Após a implantação, durante o período gestacional, ocorrem significativas mudanças nos parâmetros leucocitários. Primeiramente, há uma diminuição no volume de células sanguíneas, devido a uma hemodiluição no sangue materno, visto que o organismo da mãe está nutrindo o feto e ocorre um aumento no número de células brancas, refletindo uma resposta da mãe contra o alo enxerto (RIJK et al., 2002). No primeiro trimestre gestacional, na decídua humana, cerca de 70% dos leucócitos presentes são células NK e 20% são macrófagos, o restante, como as células T, B, são mais variáveis, estando em torno de 10 a 20% (ERLEBACHER, 2013).

2.5 LINFÓCITOS

Os linfócitos apresentam-se, principalmente, na mucosa intestinal, uterina e respiratória, pois são as regiões mais suscetíveis à entrada de antígenos, por estarem em contato direto com o meio externo. Por isso, desempenham papel importante na imunidade do organismo, contra agentes invasores (GYTON, 2006; TIZARD, 2009).

Funcionalmente, há dois tipos de linfócitos, os T e os B. Os linfócitos B estão relacionados à imunidade humoral, produzindo anticorpos em resposta a estímulos antigênicos. Já os linfócitos T relacionam-se à imunidade mediada por células, produzindo citotoxinas na tentativa de combater os agentes invasores (TIZARD, 2009).

Os receptores antigênicos localizam-se na superfície das células T e B. A partir da união dos antígenos com os receptores das células B ocorre a produção de anticorpos

específicos após sua diferenciação em plasmócitos. Já a ação dos linfócitos T ocorre após a sua sensibilização pelos antígenos, onde as células T agem diretamente sob os invasores, na tentativa de impedir o seu desenvolvimento. Existem quatro tipos de células T, as células T citotóxicas, as auxiliares, as reguladoras e as de memória, todas essenciais na defesa do organismo contra patógenos, agindo para que esses não provoquem danos a qualquer sistema orgânico (REECEM, 2006; SMITH, 2006; TIZARD, 2009).

As células T reguladoras, em especial, compreendem uma família celular capaz de modular a resposta imunológica. Esta modulação é mediada pela liberação de citocinas imunossupressoras solúveis, como a IL-10 e TGF- β , podendo ocorrer à distância. Porém, para que as células Tregs consigam desempenhar o papel de imunomodulação, é preciso que haja o contato entre as células T, buscando a sinalização entre as mesmas (CLARK; CHAOUAT, 2012), bem como a presença de sinais co-estimulatórios, que envolvem inúmeras moléculas presentes, principalmente nas células apresentadoras de antígenos (APCs), as quais vão interagir com os seus receptores localizados nas células T, tornando possível o início de uma resposta a determinado agente invasor detectado pelas APCs.

Nos humanos, os linfócitos apresentam-se em bastante quantidade no primeiro trimestre de gestação. Na mucosa uterina, 70 a 80% dos linfócitos presentes são granulares grandes (large granular lymphocytes, LGL). Proliferam-se e ativam-se na mucosa uterina, sendo fonte de citocinas, como o fator estimulador de colônia de macrófagos, fator de necrose tumoral, IFN- γ e IL-10, as quais são importantes na implantação embrionária e no desenvolvimento placentário (PEREIRA et al., 2005).

Um tipo muito importante de linfócito são as células NK, conhecidas como as principais células efetoras do sistema imunológico, sendo reguladas por uma série de receptores de superfície, os quais podem transmitir sinais de ativação ou inibição para as mesmas (SPAGGIARI et al., 2008).

São encontradas em grande número no ambiente uterino-placentário, em que podem desempenhar várias atividades durante a gestação. Entre as suas funções no ambiente supracitado, são responsáveis por produzir citocinas capazes de ajudar na neovascularização e remodelação do tecido uterino durante o processo de placentação, ajudam na proteção do trofoblasto contra as células do sistema imunológico materno e, não permitem uma invasão excessiva do trofoblasto à parede uterina (ERICKSON et al., 2004).

No início do primeiro terço gestacional, em ratas, as células NK estão associadas ao trofoblasto. Tal interação sugere que as células NK possam desempenhar alguma função bastante relevante na tolerância materno fetal. Visto o feto apresentar baixos níveis de

moléculas de MHC paterno não próprio ao organismo materno, as células NK associadas ao trofoblasto poderiam ajudar no combate a tais moléculas (MHC), diminuindo a reação imunológica materna, podendo ainda ter um papel crucial no desenvolvimento placentário (LINDSTRON et al., 2003).

A regulação das células NK no ambiente uterino placentário depende da sua interação com os receptores presentes no trofoblasto, o HLA-C, o HLA-E e o HLA-G. No entanto, as células NK são capazes de expressar o CD 94/NKG2A, capaz de interagir e reconhecer o HLA-E presente no trofoblasto, causando uma inibição do amadurecimento e ativação das células NK, desenvolvendo um ambiente tolerogênico (SAITO et al., 1993).

2.6 MACRÓFAGOS

Participam ativamente da defesa do organismo contra agentes invasores, responsáveis por fagocitar, processar e apresentar antígenos as células efectoras do sistema imunológico. Originam-se na medula óssea como monócitos que se transformam em macrófagos quando migram para o tecido (TIZARD, 2009; DUKES, 2006).

Para que os macrófagos alcancem determinado local onde ocorre um processo danoso ao organismo, é necessário, primeiramente, a presença dos neutrófilos, que liberam elastase e colagenase, gerando fatores quimiotáticos e atraindo os monócitos solúveis no sangue (REECEM, 2006; SMITH, 2006; TIZARD, 2009).

Após a ativação do macrófago por um antígeno, ocorre a captura e o processamento do mesmo. Dependendo da natureza do agente invasor, o macrófago utilizará o MHC de classe I ou II para apresentação antigênica. No caso de um antígeno endógeno, ou seja, aquele que é produzido no próprio organismo do portador, como os vírus e as células tumorais, o macrófago utilizará o MHC-I, mas caso o antígeno seja exógeno, como as bactérias, será via MHC-II. O MHC-I estimulará uma resposta via linfócitos $CD8^+$, produzindo citocinas pró-inflamatórias, já o MHC-II irá ativar os linfócitos $CD4^+$, com a secreção de citocinas anti-inflamatórias (JÚNIOR et al., 2010).

No estudo feito por Abumare et al. (2012), observou-se que no período gestacional, ocorre a fagocitose dos debris trofoblásticos (células trofoblásticas mortas por apoptose, presentes na circulação materna a partir da sexta semana de gestação) pelos macrófagos, tornando-os ativos. Esse processo induz a secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-6,

IL-10) e o aumento da expressão de IDO pelos macrófagos, porém, diminui as citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8, IL-12, INF- γ). Apesar de ocorrer uma regulação negativa para a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, estes, quando ativos, liberam IL-15, que induz a ativação das células NK (JÚNIOR et al., 2010). Por sua vez, este grupo celular libera INF- γ , que é considerado um forte indutor da IDO (KUDO et al., 2004).

2.7 CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas são classificadas como uma população profissional e muito efetiva na apresentação de antígenos, sendo de 100 a 1000 vezes mais efetivas do que os macrófagos (HARDEN; EGILMEZ, 2012), e se originam de, pelo menos, três fontes. Uma população surge dos mesmos precursores dos macrófagos e neutrófilos na medula óssea, denominadas de células dendríticas mielóides. Uma segunda população é desenvolvida a partir dos monócitos e a terceira população provém de precursores linfóides, provavelmente células T, somente observadas em camundongos (TIZARD, 2009).

Residem principalmente nas mucosas, região frequentemente bombardeada por agentes invasores, participando efetivamente na resposta imunológica primária. Normalmente, a vida das células dendríticas pode ser dividida em duas principais fases: primeiro, encontram-se em um estágio imaturo, associado com a alta expressão de moléculas que envolvem a apresentação antigênica, como o CD80, o CD86 e o MHC-II. A segunda forma encontrada corresponde ao estado maduro, visto como pré-requisito para a indução de respostas das células T (LIU et al., 2013).

No início de um processo inflamatório, as células dendríticas podem ser recrutadas rapidamente para o local lesionado, onde vão capturar e processar o antígeno, quebrando-o em pequenos peptídeos. Após a clivagem do agente invasor, pequenas partes vão se encaixar no complexo de histocompatibilidade maior (MHC-II) na superfície da célula, permanecendo neste (MHC-II) até a migração da célula dendrítica imatura para o linfonodo mais próximo. No linfonodo, as DCs terminam seu processo de amadurecimento e apresentam os antígenos para as células T presentes no órgão (linfonodo), induzindo a diferenciação dos linfócitos Th₀ em Th₁ ou Th₂, dependendo da necessidade do estímulo, ou seja, pró-inflamatório ou anti-inflamatório (SPAGGIARI et al., 2009).

As células dendríticas produzem citocinas supressoras, como a IL-10, IL-13 e TGF- β , podendo exercer efeitos imunomodulatórios em diversas células do sistema imune, sendo capazes de expressar moléculas inibitórias, incluindo a IDO. São um grupo celular altamente heterogêneo, em que algumas subpopulações permitem a distribuição de algumas funções. Porém, a habilidade de produzir IDO ocorre igualmente em todas as subpopulações de DCs (HARDEN; EGILMEZ, 2012).

A expressão da enzima (IDO) nas células dendríticas é bastante relevante, pois são células apresentadoras de antígenos profissionais, capazes de integrar vários sinais estimulatórios para as células T, porém, com a presença da IDO, tais sinais são diminuídos (HUANG et al., 2010).

Estruturalmente, as células dendríticas imaturas expressam moléculas MHC classe I e II, no entanto, quando amadurecem, expressam muitas outras moléculas relacionadas à ligação e à coestimulação das células T. Quando maduras, formam uma rede interdigital nos órgãos linfoides, objetivando capturar, processar e apresentar os antígenos às células T, atraindo as células T e B por meio da secreção de quimiocinas, consideradas as únicas que podem desencadear resposta primária das células T (ABBAS, 2005; REECEN, 2006; TIZARD, 2007).

É sabido que as células dendríticas são reguladoras chave da imunidade, capazes de suprimir ou promover a ativação das células T (MELLOR; MUNN, 2004). Uma função muito importante realizada pelo organismo através das células dendríticas é a seleção de qual população celular empregar para realizar determinada ação, usando, para isso, subpopulações de células dendríticas. Células dendríticas derivadas de monócitos secretam grande quantidade de IL-12, favorecendo uma resposta imune Th₁, já as células dendríticas linfoides não produzem IL-12, mas provavelmente outras citocinas que favorecem a resposta celular Th₂, podendo contribuir com a tolerância materno fetal (DUKES, 2006; TIZARD, 2009; RUTELLA; LOCATELLI, 2011; MEGGI et al., 2012).

Para alguns autores, as DCs são conhecidas como reguladoras negativas das células T, levando a uma parada na ativação desse grupo celular quando ocorre a ligação do receptor CD80/86 presente nas células dendríticas com o CTLA4, receptor presente nas células T. Quando tal ligação acontece, existe um aumento na expressão da IDO pelas células dendríticas, onde a enzima sai da célula, agindo no meio extra celular. O mesmo mecanismo ocorre quando as células dendríticas são estimuladas pela família dos interferons (PALAFOX et al., 2010).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os potenciais tipos celulares existentes no útero gravídico de ratas Wistar (Linfócitos, Macrófagos, células dendríticas, células NK, células trofoblásticas e células embrionárias) que expressam a IDO.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Verificar a expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase nos tipos celulares identificados quando estimulados pelo INF- γ e progesterona.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

As amostras utilizadas foram oriundas de gestações de fetos normais coletados de animais de biotério (ratas Wistar com 85 dias de idade). Foram utilizados 15 conjuntos de placentas e embriões de ratas, em que os animais foram divididos em três pools de cinco animais cada (pool 1, 2 e 3). A coleta dos conjuntos de placenta e embriões foi realizada no 6º dia de gestação, pois é a fase de maior expressão de IDO nesses animais (SUZUKI et al., 2001). Devido ao tamanho reduzido do embrião e da placenta, foram analisados em conjunto, pois não foi possível separá-los.

Para a obtenção dos embriões, especificamente no sexto dia gestacional, as ratas foram submetidas a um acompanhamento rigoroso do seu ciclo estral, sendo acasaladas diariamente durante 5 dias, visto o ciclo estral desses animais apresentar duração de 4 dias. Para o acasalamento, os machos eram colocados nas gaiolas das fêmeas no período da tarde e retirados na manhã seguinte.

Para verificar se os animais haviam cruzado durante o período noturno, logo após a retirada dos machos das gaiolas das fêmeas, foi realizado um lavado vaginal. As fêmeas foram contidas e, com o auxílio de uma pipeta (EPPENDORF 0-20 µL), foram colocados 20 µL de solução salina (0,9%) intravaginal e, imediatamente puxadas pela pipeta. Em seguida, esse material foi colocado em uma lâmina de vidro, utilizada para microscopia, com posterior análise em microscópio eletrônico (NIKON), buscando visualizar os espermatozoides. Quando os espermatozoides eram identificados, essa fêmea era considerada prenhe.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cultivo celular

O tecido uterino, as placentas e os embriões foram seccionados e submetidos à separação mecânica, utilizando uma malha de aço de 150 mesh de diâmetro e as células ressuspensas em D-MEM (Sigma Aldrich-USA).

As células foram submetidas à centrifugação (1600 rpm, por 5 minutos à 4°C) e novamente suspensas em D-MEM (Sigma Aldrich-USA) e em seguida foi adicionado à suspensão celular, uma solução de NACL a 1,6 % e/ou solução da NACL a 0,2 % visando, a lise das hemácias. Após 10 minutos, a suspensão celular foi novamente centrifugada, o sobrenadante foi descartado e novamente foi adicionado meio de cultura D-MEM (Sigma Aldrich-USA).

Procedeu-se a contagem e a estimativa de viabilidade das células pelo método de exclusão por azul de trypan, e as células foram postas em placas de 48 poços numa concentração de 1×10^6 células/250µl, sendo incubadas à 37°C e 5% de CO₂ até o início das análises.

Os fatores foram adicionados ao início do cultivo e os tratamentos foram assim constituídos: grupo ST- sem tratamento, somente meio de cultura (D-MEM-Sigma Aldrich-USA); grupo P - D-MEM + progesterona (acetato de medroxiprogesterona Promone-E (Pfizer- Brasil)® - 0,05mg/250µl) e grupo I - D-MEM+ interferon γ (Millipore-USA) (0,01mg/250µl).

4.2.2 Citometria de fluxo

Com a utilização da citometria de fluxo, foi feita a imunofenotipagem das células conjunta com a verificação da expressão de IDO. A viabilidade celular foi novamente verificada utilizando o Kit Live/Dead cells (Fixable Violet Dead Cell Stain Kit – Invitrogen – USA), para identificar as células vivas.

As células em cultura foram desprendidas das placas e a suspensão celular foi lavada em um ciclo de 2000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado, as células ressuspensas em PBS (0,1M) e permeabilizadas com Triton-X (Inlab – Brasil) 0,1% por 30 minutos e, então, as células foram novamente lavadas e ressuspensas em PBS (0,1M). Posteriormente, os anticorpos primários: CD4[NB 100-6388] (Novus Biologicals-USA), CD8 [MCA 938] (ABD Serotec-USA), Monocytes/Macrophages [CD68 –AT 2068] (Millipore-USA) usado para marcar macrófagos, B-Cell Specific Antigen Antibody (68-IB3) (Thermo Scientific-USA), marcador para células dendríticas (1F119): SC- 52661 (Santa Cruz Biotechnology-USA), Cytokeratin 7 (H50): SC- 25721 (Santa Cruz Biotechnology-USA) para

marcar células placentárias, Nanog (M-149): SC- 33760 (Santa Cruz Biotechnology-USA) para marcar células embrionárias, marcador para células NK (ANK61): SC- 59340 (Santa Cruz Biotechnology-USA), foram incubados individualmente com as células em cultura, recebendo também a adição do anticorpo primário Anti-IDO (indoleamine 2,3- dioxygenase), clone 10.1 (Millipore-USA) e anti IDO M-80: SC-25809 (Santa Cruz Biotechnology-USA) . Após 30 minutos foi feita uma lavagem a 2.000 rpm, a 4°C por 5 m e as amostras foram incubadas individualmente com os respectivos anticorpos secundários Goat Anti-mouse IgG-PE (Santa Cruz Biotechnology-USA) específicos para cada isotipo dos anticorpos primários acima descritos (Goat anti Mouse IgG- FITC (Santa Cruz Biotechnology-USA); Goat anti Rabbit IgG- FITC (Santa Cruz Biotechnology-USA); Goat antiMouse IgM- FITC (Santa Cruz Biotechnology-USA), por 40 m. Em seguida, as células foram lavadas (2.000 rpm, a 4°C por 5 m) e ressuspensas em PBS 0,1M para serem analisadas em citômetro de fluxo (BD FACScalibur). Controles para autofluorescência e marcação cruzada pelo anticorpo secundário foram realizados com grupos contendo somente células e grupos contendo células e o anticorpo secundário, respectivamente.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização das análises estatísticas, utilizou-se o teste ANOVA (one-way) seguido pelo teste de TUKEY- KRAMER, ambos desenvolvidos com a utilização do software INSTAT 3 (Graph Pad - San Diego- USA).

O delineamento experimental foi traçado a partir da divisão dos animais em três pools de cinco. Para a obtenção dos dados estatísticos, foi utilizado a análise de variância (ANOVA), sendo que a hipótese a ser testada seguiu o seguinte padrão:

$$X0: M1=M2=M3$$

$$X1: M1 \neq M2 \neq M3$$

Em que,

X: hipótese 0

X1: hipótese 1

M1: média do grupo 1

M2: média do grupo 2

M3: média do grupo 3

Os resultados foram considerados positivos, quando $p < 0,05$. No caso de X0, as médias dos resultados obtidos após a suplementação com os devidos fatores, nos três diferentes pools não obtiveram uma variação significativa, mostrando que os diferentes tratamentos não tiveram efeito.

Já, no caso de X1, as médias dos resultados obtidos nos três pools, devem apresentar uma diferença significativa; o valor de p deve ser $< 0,05$.

Quando os resultados da análise de variância enquadrar-se na hipótese X1, torna-se necessário analisar, qual das médias, dentro dos subgrupos, apresenta maior diferença das demais, mostrando qual tratamento foi mais significativo diante do grupo controle. Para tal análise, utilizou-se o teste de Tukey-Kramer, do programa acima citado, indicado quando o tamanho das amostras são diferentes (dados não balanceados).

RESULTADOS

6 RESULTADOS

As amostras obtidas do processamento dos conjuntos contendo células uterinas, células placentárias e células embrionárias de ratas Wistar, em torno do sexto dia de gestação, foram imunofenotipadas, sendo possível verificar os diversos tipos celulares presentes no ambiente uterino-placentário, considerando principalmente a presença de células imunológicas. Concomitante ao processo de fenotipagem foi realizada a marcação específica para IDO, mostrando os níveis de expressão da enzima nas respectivas células.

Os valores da viabilidade celular encontrada no pool 1, 2 e 3 foi de aproximadamente 75% no período de 2 horas após a adição dos fatores e de 70% após 24 horas, (Gráfico 1).

Os valores médios e o respectivo desvio padrão da expressão de IDO das células analisadas pela citometria de fluxo nos períodos de 2 e 24 após a adição dos fatores estão expostos no gráfico 2.

Exemplos das aquisições em Dot-Plot das células uterinas, placentárias, embrionárias e imunológicas de ratas com e sem a adição dos respectivos fatores nos períodos de 2 e 24 horas são mostrados na (FiguraS 2, 3, 4 e 5).

Gráfico 1 - Valores da viabilidade celular dos pools 1, 2 e 3 das células presentes no ambiente uterino-placentário de ratas Wistar em cultura, nos períodos de 2 e 24 horas, após a adição de hormônios e citocinas

Considerando os períodos em que a viabilidade celular foi analisada, constatou-se que não houve uma diferença significativa entre a média dos três pools no períodos de 2 e 24 horas após a adição dos fatores (interferon γ e progesterona).

Com as análises realizadas no período de 2 e 24 horas após a adição dos fatores, algumas células apresentaram resultados expressivos quanto à expressão da IDO (apêndice A):

Nos linfócitos CD4⁺ analisados quanto à expressão de IDO, após a adição do IFN- γ , o valor de p apresentou-se abaixo de 0,05, indicando a existência de uma significância entre as variações das médias, em que a maior variação encontrada está presente entre os grupos ST (13,55%) x I (25,33%), notando-se um aumento na produção da enzima quando os linfócitos CD4⁺ foram estimulados com IFN- γ . Já no período de 24 horas, os mesmos não elevaram a expressão de IDO mediante a suplementação com IFN- γ .

Nas células dendríticas, nos dois períodos (2 e 24 horas), o valor de p foi $< 0,05$, indicando uma alta variação entre as médias dos grupos. Quando submetidas à suplementação com IFN- γ , tais células, elevaram consideravelmente a expressão de IDO, aumento visto nos dois períodos, em que se notou uma variação entre os grupos ST (0,2%) x I (59,9%), indicando que o IFN- γ estimula a produção de IDO nesse grupo celular.

As células embrionárias mostraram uma expressão de IDO relevante quando estimuladas com IFN- γ embora o valor de $p > 0,05$ esteja fora da hipótese X_0 . Já as células placentárias, apesar de expressarem IDO, o grupo controle (ST) (7,98%) obteve uma expressão mais elevada da enzima quando comparado aos outros dois grupos I (6,01%) e P (1,47%).

Mediante a suplementação com progesterona, os resultados mostraram que as DCs foram as células com maior expressão de IDO, elevação que ocorreu em ambos os períodos.

Outro tipo celular que se mostrou sensível à progesterona foram às células embrionárias. No período de 2 e 24 horas, tais células foram influenciadas pela adição do hormônio, em que foi verificado uma diminuição na expressão de IDO por este grupo celular (células embrionárias).

As demais células analisadas (CD8/ Macrófago/ Célula B/ Células NK e células placentárias), em ambos os períodos, apesar de apresentarem um índice de expressão de IDO significativo, não foram influenciadas a elevar ou diminuir a expressão da enzima frente à adição dos fatores (IFN- γ e progesterona), conforme verificado com as análises estatísticas

realizadas, que mostram um valor de $p > 0,05$, não existindo significância entre a variação das médias.

Gráfico 2 - Média das células imunológicas que expressam IDO, nos pools 1, 2 e 3, presentes no ambiente uterino-placentário de ratas Wistar em cultura, nos períodos de 2 e 24 horas, após a adição dos fatores (hormônios e citocinas)

$p = 0.1149$ (NS)

$p = 0.1014$ (NS)

$p = 0.0020$

$p = 0.0001$

$p = 0.0037$

$p = 0.0016$

$p = 0.0094$

$p = 0.0172$

$p = 0.1666$ (NS)

$p = 0.1845$ (NS)

Figura 1 - Exemplos de aquisições em histograma da viabilidade das células presentes no ambiente uterino-placentário de ratas Wistar prenhes, nos períodos de 2 e 24 horas, após a adição dos fatores

VIABILIDADE

2h

24h

Figura 2 - Exemplos de aquisições em histograma realizadas para o controle da fluorescência dos anticorpos secundários utilizados

CONTROLES

Figura 3 - Exemplo das aquisições em Dot Plot (pool 1) realizadas nos períodos de 2 e 24 horas sem a adição dos fatores (IFN- γ e progesterona). Blue FL1: correspondente à marcação da IDO; Blue FL2: correspondente à marcação específica de cada grupo celular

SEM TRATAMENTO

2h

24h

MACRÓFAGO

MACRÓFAGO

CD8

CD8

CÉLULA DENDRÍTICA

CÉLULA DENDRÍTICA

CÉLULA B

CÉLULA B

CÉLULAS EMBRIONÁRIAS

CÉLULAS EMBRIONÁRIAS

CÉLULAS PLACENTÁRIAS

CÉLULAS PLACENTÁRIAS

CÉLULAS NK

CÉLULAS NK

Figura 4 - Exemplo das aquisições em Dot Plot (pool 1) realizadas nos períodos de 2 e 24 horas após a adição do IFN- γ . Blue FL1: correspondente à marcação da IDO; Blue FL2: correspondente à marcação específica de cada grupo celular

INTERFERON γ

2h

24h

CD8

CD8

CÉLULA DENDRÍTICA

CÉLULA DENDRÍTICA

CÉLULA B

CÉLULA B

CÉLULAS EMBRIONÁRIAS

CÉLULA EMBRIONÁRIAS

CÉLULAS PLACENTÁRIAS

CÉLULA PLACENTÁRIAS

CÉLULAS NK

CÉLULA NK

Figura 5 - Exemplo das aquisições em Dot Plot (pool 1) realizadas nos períodos de 2 e 24 horas após a adição da progesterona. Blue FL1: correspondente à marcação da IDO; Blue FL2: correspondente à marcação específica de cada grupo celular

PROGESTERONA

2h

24h

CD8

CD8

CÉLULA DENDRÍTICA

CÉLULAS DENDRÍTICAS

CÉLULA B

CÉLULAS B

CÉLULAS EMBRIONÁRIAS

CÉLULAS EMBRIONÁRIAS

CÉLULAS PLACENTÁRIAS

CÉLULAS PLACENTÁRIAS

CÉLULAS NK

CÉLULAS NK

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigado o efeito do IFN- γ e da progesterona sobre a expressão de IDO nos diversos tipos celulares presentes na interface materno fetal. Os resultados mostraram que os linfócitos CD4 e as células dendríticas aumentaram significativamente a expressão de IDO, quando submetidas à suplementação com os respectivos fatores utilizados nesta pesquisa, enquanto as células embrionárias tiveram a expressão de IDO diminuída no período de 24 horas mediante a suplementação com progesterona.

Em contrapartida, a maioria das células fenotipadas (linfócitos CD8, células B, células NK, macrófago, células placentárias e trofoblásticas), apesar de apresentarem expressão de IDO, não sofreram alterações quando submetidas à suplementação com os fatores supracitados.

O IFN- γ , uma citocina produzida principalmente pelos linfócitos com perfil Th₁, é conhecido por participar, efetivamente, dos processos inflamatórios (HUNAG et al., 2010; LINDSTRON et al., 2012). Sabe-se que esta citocina estimula a atividade bioquímica e funcional da IDO, pois leva a expressão de genes que a produzem, (YOSHIDA et al., 1981; YASUI et al., 1986; LIANG et al., 2006). Este efeito foi verificado por Salvadori (2010) em ratas Wistar, que avaliou a expressão de IDO nas células presentes no ambiente uterino placentário, onde verificou que esta encontra-se elevada quando tais células são submetidas à suplementação com o IFN- γ . Porém, até o momento não eram conhecidas quais células sofriam influência desta citocina, dado esclarecido com os nossos resultados, mostrando que os linfócitos CD4 e as células dendríticas são os tipos celulares que mais elevam a expressão de IDO na presença do IFN- γ .

Foi verificado que os linfócitos CD4⁺, presentes na interface materno fetal, foram susceptíveis à estimulação pelo IFN- γ adicionado artificialmente às culturas celulares, elevando a expressão de IDO quando comparados ao grupo controle (sem tratamento- ST). Sugere-se que tal efeito possa ter ocorrido devido, a estimulação direta do IFN- γ sobre as células dendríticas, que possuem receptor para o mesmo (TENBROCK, 2011).

As DCs são capazes de estimular os linfócitos, entre eles os CD4⁺ (*T helper*), responsáveis por colaborar com o desenvolvimento de uma resposta imunológica contra determinado antígeno (TIZARD, 2009).

Visto isso, a presença de IDO neste grupo celular (linfócitos CD4⁺), pode ser responsável por diminuir a resposta imunológica na interface materno fetal, colaborando com a tolerância ao alo enxerto, pois devido à ação da enzima, os linfócitos CD4⁺ irão entrar em um estado apoptótico pela falta de triptofano (MELLOR; MUNN 2001).

Ainda, considerando os linfócitos CD4, sabe-se que possuem um receptor, o aril hidrocarboneto (AHR), específico para a quinurenina (BALL et al., 2009), composto proveniente da quebra do triptofano realizada pela IDO (KUDO et al., 2004). Mediante a ligação da quinurenina com o seu receptor presente na membrana dos linfócitos CD4, estes são estimulados a uma mudança fenotípica, transformando-se em células T regs (HARDEN; EGILMENEZ, 2012). Devido a este fato, pode-se sugerir que a ação da IDO, quebrando o triptofano e produzindo altos níveis de quinurenina (KUDO et al., 2004; BALL et al., 2009), possa induzir um controle dos linfócitos CD4, que transformam-se em células T reguladoras, capazes de contribuir com a diminuição de uma resposta inflamatória, (MESQUITA et al., 2011), colaborando para a formação de um ambiente tolerogênico.

Mediante à ação do IFN- γ , as células dendríticas responderam com uma alta expressão de IDO. No início de um processo inflamatório, como ocorre na implantação embrionária, às células dendríticas são atraídas para determinado local, onde dariam início ao processo de captura e apresentação antigênica (SPAGGIARI et al., 2009), desencadeando uma resposta das células T. Sugere-se que tal processo não ocorra devido à presença de IDO nas células dendríticas ativas, que, pelo catabolismo do triptofano, induz as DCs à apoptose (BUBNOFF; BIEBER, 2012), colaborando com a tolerância materno fetal por causar uma inibição das células consideradas as arquitetas da resposta imunológica primária, não deixando que a mesma se desenvolva.

Recentemente, foi demonstrado que a progesterona também seria capaz de induzir a expressão de IDO nas células presentes no ambiente uterino, além do IFN- γ . Caracterizada como um hormônio esteroide que participa de vários mecanismos imunológicos (BARRERA; ÁVILA; DIAS, 2007), alterou a expressão da enzima em algumas células presentes no ambiente uterino-placentário, como verificado por esta pesquisa, principalmente pelas DCs.

A progesterona induz a prevalência das células com perfil Th2, com consequente predominância das citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 (BARRERA; ÁVILA; DIAS, 2007), que não exercem efeito sob a expressão de IDO, e inibi a produção de fatores pró-inflamatórios pelos linfócitos quando atravessa a membrana desse grupo celular formando um complexo hormônio-receptor, que se liga ao DNA, estimulando a produção da proteína

PIBF, a qual bloqueia a ação da fosfolipase A2, impedindo, assim, a proliferação das citocinas pró-inflamatórias, (BARTHO; WEGMANN, 1996).

Dessa forma estaríamos diante de uma possível contradição quando observamos o aumento da expressão da IDO induzido pela progesterona que, por favorecer a produção de citocinas anti-inflamatórias, não estimularia a expressão da enzima.

Cabe ressaltar que a progesterona estimula as DCs imaturas (LIANG, 2006) que não são capazes de apresentar os antígenos capturados para as células T, porém, conseguem fagocitá-los, migrando para um linfonodo regional, onde terminam o seu amadurecimento. Quando maduras, estimulam, via MHC-II, os antígenos para as células T, induzindo a diferenciação dos linfócitos Th₀ em Th₁ ou Th₂, dependendo da necessidade do estímulo que, nesse caso, considerando o processo de implantação embrionária, pode ser um estímulo pró-inflamatório com a produção de citocinas também pró-inflamatórias, principalmente o IFN- γ (SPAGGIARI et al., 2009). Com isso, sugere-se que indiretamente a progesterona estimularia a produção de IFN- γ , por meio da excitação dos linfócitos com perfil Th₁ pelas células dendríticas, favorecendo, conseqüentemente a expressão de IDO, buscando o controle do processo inflamatório (HUANG et al., 2010; HARDEN; EGILMENEZ, 2012).

Ainda, a expressão de IDO nas células dendríticas pode ser estimulada quando o CD80/CD86 presente nas DCs interage com o CTLA4 presente nas células T, ocorrendo um aumento na expressão de IDO pelas DCs (PALAFOX et al., 2010), cujo aumento corrobora com os dados encontrados nessa pesquisa.

Em relação às células embrionárias, apesar de apresentarem uma expressão de IDO significativa no grupo sem tratamento-ST, notou-se uma alteração, apesar de muito pequena, quando as mesmas foram expostas ao IFN- γ e a progesterona. Tal fato pode ser justificado, devido aos receptores de IFN- γ (VALENTE et al., 1992) e de progesterona presentes nas células embrionárias (VALENTE et al., 1992; PAPAMITSOU et al., 2011) já estarem possivelmente ocupados pelos seus devidos ligantes, presentes naturalmente no ambiente uterino placentário, não permitindo que os fatores adicionados artificialmente às culturas fossem capazes de desencadear uma elevação na expressão enzimática.

Por outro lado, poderia se dever à presença conhecida dos receptores de IFN- γ e de progesterona nas células embrionárias (VALENTE et al., 1992; PAPAMITSOU et al., 2011), onde estes compostos se ligariam, desencadeando uma alta expressão de IDO, responsável por levar tais células à apoptose (KUDO et al., 2004). Com isso, perante as análises, haveria uma diminuição na expressão de IDO devido a uma diminuição no número de células capazes de expressarem a enzima.

Todos os outros grupos celulares fenotipados (linfócitos CD8, células B, células NK, macrófago, células placentárias) não sofreram influência dos fatores adicionados artificialmente às culturas, porém foram capazes de expressar a enzima.

Os linfócitos CD8, os linfócitos B, as células NK e os macrófagos, estão presentes na interface materno fetal, como mostra a literatura e nossos achados desta pesquisa. Cada uma dessas células é conhecida por desempenhar uma função imunológica específica, todas fazendo parte de uma intrincada rede, responsável pela defesa do organismo contra agentes invasores (TIZARD, 2009).

As células placentárias analisadas não elevaram a expressão enzimática perante os fatores adicionados. Sabe-se que as células placentárias são responsáveis por produzir progesterona durante a gestação (PAPAMITSOU et al., 2011; LEE et al., 2013), o que nos leva a crer que os seus receptores para progesterona estivessem sobrecarregados quando a progesterona exógena foi adicionada às culturas, podendo justificar a não elevação da expressão enzimática perante a adição do hormônio às culturas.

Visto a importância destas células para o desenvolvimento e manutenção de uma resposta imunológica (TIZARD, 2009), e que todas foram capazes de expressar IDO, conforme os resultados desta pesquisa, sugere-se que a presença da enzima nas células do sistema imunológico (BURLEA A. JOHSON, 2010; HUANG et al., 2012) poderia fazer parte de um mecanismo regulador local do sistema imunológico, funcionando como um feedback negativo do mesmo (sistema imunológico materno), agindo em situações em que o excesso de atividade dessas células imunológicas poderia ser prejudicial, como em um processo gestacional.

É importante ter em mente que somente a IDO não conseguiria realizar um controle tão efetivo do sistema imunológico, havendo a necessidade da existência de outros mecanismos de tolerância que possam colaborar com o controle do sistema imunológico, como a interação das células (NK) com o HLA-E presente no trofoblasto, (SAITO et al., 1993), bem como a presença do gene HLA-G nos humanos e o seu correspondente PED nos camundongos (YINGPING et al., 2011) além de diversos outros mecanismos.

Em uma gestação normal, o sistema imune materno é direcionado para criar um ambiente tolerogênico pela supressão do sistema imunológico, prevenindo a rejeição do alo enxerto. No entanto o entendimento dos mecanismos relacionados com o estabelecimento e a manutenção da gestação são bastante complexos, necessitando de futuras pesquisas para alcançar um melhor entendimento.

Considerando a ação da IDO e sua presença na interface materno-fetal, principalmente nas células imunológicas, torna-se importante o desenvolvimento de mais estudos relacionadas ao esclarecimento dos mecanismos de ação da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase, investigando as suas possíveis vias de ativação e inibição para, futuramente, ser possível o desenvolvimento de formulações terapêuticas envolvendo a modulação desta enzima.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Considerando as análises realizadas neste trabalho, pode-se concluir que no modelo de cultivo utilizado todas as células fenotipadas expressaram IDO. Porém, somente alguns tipos celulares responderam positivamente aos fatores adicionados as culturas.

Em relação a progesterona podemos concluir que esta eleva a expressão da enzima, principalmente nas células dendríticas.

Voltando a atenção para a expressão de IDO, pode-se verificar que as principais células que expressam a enzima, na interface materno-fetal, pertencem ao sistema imunológico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Cytokines. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. 5. ed. Philadelphia: Elsevier, 2005. p. 243-274.
- ABUMARE, M. H.; CHMLEY, L.W.; BANDRI, M.; EL-MUZAINI, M. F. Trophoblast debris modulates the expression of immune proteins in macrophages: a key to maternal tolerance of the fetal allograft?. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 94, p. 131-141, 2012.
- BALL, H. J.; YUASA, H. J.; AUSTIN, C. J. D.; WEISER, S.; HUNT, N. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 3, p. 467-471, 2009.
- BARRERA, D.; AVILA, E.; DÍAS, L. Papel Inmunológico de La Progesterone em El Mantenimiento Del Embarazo. **Revista de Investigación Clínica**, v. 59, p. 139-145, 2007.
- BASSAL, N. K.; HUGHES, B. P.; COSTABILE, M. Arachidonic acid and its COX1/2 metabolites inhibit interferon- γ mediated induction of indoleamine-2,3 dioxygenase in THP-1 cells and human monocytes. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v. 87, n. 4-5, p. 119-126, 2012.
- BARTHO, J. S.; WEGMANN, T. G. A Progesterone-Dependent immunomodulatory Protein Alters the Th1/Th2 balance. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 31, p. 81-95, 1996.
- BOASSO, A.; HERBEUVAL, J. P.; HARDY, A. W.; WINKLER, C.; SHEARER, G. M. Regulation of indoleamina 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4⁺ T cells. **Blood**, v. 105, p. 1574-1581, 2005.
- BOUMA, G. S.; VAN CAUBER, G. H. P.; VAN BREE, S. P.; CASTELLI-VISSER, R. M.; WITVLIET, M. D.; VAN DER MEER-PRINS, E. M.; VAN ROOD, J. J.; CLAS, F. H. Pregnancy can induce priming of cytotoxic T lymphocytes specific for paternal HLA antigens that is associated with antibody formation. **Transplantation**, v. 62, p. 672-678, 1996.
- BRADFORD, P. S. **Medicina interna de grandes animais**. 3. ed. Barueri: Manole, 2006. 1784 p.
- BUBNOFF, D. VON; BIEBER, T. The indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) pathway controls allergy. **Allergy**, v. 67, n. 6, p. 718-725, 2012.
- CATANI, L.; SOLLAZZO, D.; TRABANELLI, S.; CURTI, A.; EVANGELISTI, C.; POLVERELLI, N.; PALANDRI, F.; BACCARANI, M.; VIANELLI, N.; LEMOLI, R. M.

Decreased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in dendritic cells contributes to impaired regulatory T cell development in immune thrombocytopenia. **Annals of hematology**, v. 92, n. 1, p. 67-78, 2013.

CHUCRI, T. M.; MONTEIRO, J. M.; LIMA, A. R.; SALVADORI, M. L. B.; KFOURY JR, J. R.; MIGLINO, M. A. A review of immune transfer by the placenta. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 87, p. 14-20, 2010.

CLARK, D. A.; CHAOUAT, G. Regulatory T cells and reproduction: how do they do it? **Journal of reproductive immunology**, v. 96, n. 1-2, p. 1-7, 2012.

REECEM, W. O. (Ed.). **Dukes**. Fisiologia dos animais domésticos. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006. p. 926.

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

ERIKSSON, M.; MEADOWS, S. K.; WIRA, C. R. Unique phenotype of human uterine NK cells and their regulation by endogenous TGF-beta. **Journal Leukocyte Biology**, v. 76, n. 3, p. 667-675, 2004.

ERLEBACHER, A. Immunology of the Maternal-Fetal Interface. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 387-411, 2013.

GRANOT, I.; GNAINSKY, Y.; DEKEL, N. Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. **Reproduction** (Cambridge, England), v. 144, n. 6, p. 661-668, 2012.

GYTON, A. C.; HALL, E. J. **Tratado de fisiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 1115.

HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 513.

HARDEN, J. L.; EGILMEZ, N. K. Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity. **Immunological Investigations**, v. 41, n. 6-7, p. 738-764, 2012.

HUANG, L.; BABAN, B.; JOHNSON, B. A.; MELLOR, A. L. Dendritic cells, indoleamine 2,3 dioxygenase and acquired immune privilege. **International Reviews Immunology**, v. 2, p. 133-155, 2010

HUANG, G.; ZENG, Y.; LIANG, P.; ZHOU, C.; ZHAO, S.; HUNAG, X.; WU, L.; HE, X. Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Downregulates the Cell Surface Expression of the CD4 Molecule. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, p. 10863-10879, 2012.

JUHÁSZ, C.; NAHLEH, Z.; ZITRON, I.; CHUGANI, D.C.; JANABI, M.Z.; BANDYOPADHYAY, S.; ALI-FEHMI, R.; MANGNER, T.J.; CHAKRABORTY, P.K.; MITTAL, S.; MUZIK, O. Tryptophan metabolism in breast cancers: molecular imaging and immunohistochemistry studies. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 39, n. 7, p. 926-932, 2012.

JÚNIOR, D. M.; ANTÔNIO, J.; ARAÚJO, P.; TIEKO, T.; CATELAN, T. Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 11, p. 552-580, 2010.

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

KUDO, Y.; HARA, T.; KATSUKI, T.; TOYOFUKU, A.; KATSURA, Y.; TAKIKAWA, O.; FUJII, T.; OHAMA, K. Mechanisms regulating the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase during decidualization of human endometrium. **Human Reproduction** (Oxford, England), v. 19, n. 5, p. 1222-30, 2004.

LEE, V. C. Y.; GAO, J.; LEE, K. F.; NG, E. H.; YEUNG, W. S. B.; HO, P. C. The effect of letrozole with misoprostol for medical termination of pregnancy on the expression of steroid receptors in the placenta. **Human Reproduction**, v. 28, n. 11, p. 2912-2919, 2013.

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

LIDSTROM, C.; MATTHIESEN, L.; BERG, G. Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: Implications for suppressor macrophages in decidua. **American Journal Reproductive Immunology**, v. 50, p. 444-452, 2003.

LINDSTRÖM, V.; AITTONIEMI, J.; JYLHÄVÄ, J.; EKLUND, C.; HURME, M.; PAAVONEN, T.; OJA, S.S.; ITÄLÄ-REMES, M.; SINISALO, M. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity and expression in patients with chronic lymphocytic leukemia. **Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia**, v. 12, n. 5, p. 363-5, 2012.

LIU, W.-H.; LIU, J.-J.; WU, J.; ZHANG, L.L.; LIU, F.; YIN, L.; ZHANG MM, Y.U.B. Novel Mechanism of Inhibition of Dendritic Cells Maturation by Mesenchymal Stem Cells via Interleukin-10 and the JAK1/STAT3 Signaling Pathway. **PloS One**, v. 8, n. 1, p. 554-587, 2013.

MANEESH, M.; NAGARAJ, R. H. Induction of indoleamine 2,3 dioxygenase by interferon-gamma in human lens epithelial cells: apoptosis through the formation of 3-hydroxykynurenine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 1446-1454, 2010.

MANSOURI-ATTIA, N.; OLIVEIRA, L. J.; FORDE, N.; FAHEY, A.G.; BROWNE JA ROCHE, J.F.; SANDRA, O.; REINAUD, P.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Pivotal role for monocytes/macrophages and dendritic cells in maternal immune response to the developing embryo in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 5, p. 123, 2012.

MEGGI, E.; VULTAGGIO, A.; MATUCCI, A. T-cells responses during allergen- specific immunotherapy. **Allergy & Clinical Immunology**, v. 12, p. 1-6, 2012.

MEISEL, R.; ZIBERT, A.; LARYEA, M.; GÖBEL, U.; DÄUBENER, W.; DILLOO, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. **Blood**, v. 103, n. 12, p. 4619-421, 2004.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal antifetal immune responses. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p. 5-13, 2001.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 762– 769, 2004.

MESQUITA, D.; DE MELO CRUVINEL, W.; ARAUJO, J.; PUCCI, F.; SALMAZI, K.; KALLAS, E.; ANDRADE, L. Systemic lupus erythematosus exhibits a dynamic and continuum spectrum of effector/regulatory T cells. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 40, n. 1, p. 41-50, 2011.

MOFFETT, A.; LOKE, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 8, p. 584-594, 2006.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2, 3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 3, p. 1-7, 2012.

MUNIR, S.; LARSEN, S. K.; IVERSEN, T. Z.; DONIA, M.; KLAUSEN, T. W.; SVANE, I. M.; STRATEN, P. T.; ANDERSEN, M. H. Natural CD4+ T-cell responses against indoleamine 2,3- dioxygenase. **Plos One**, v. 7, p.1-12, 2012.

PALAFOX, D.; LLORENTE, L.; ALBERÚ, J.; TORRES-MACHORRO, A.; CAMORLINGA, N.; RODRÍGUEZ, C.; GRANADOS, J. The role of indoleamine 2,3 dioxygenase in the induction of immune tolerance in organ transplantation. **Transplantation reviews (Orlando, Fla.)**, v. 24, p. 160-165, 2010.

PAPAMITSOU, T.; CHATZISTMATIOU, M.; GRAMMATIKOPOULOU, D.; PAPADOPOULOU, K.; LAKIS, S.; ECONOMOU, Z.; PAPASOPOULOU, C.; SIOGA, A. Low expression of progesterone receptor A in intermediate trophoblastos miscarriages. **Histol Histopathology**, v.26, p. 609-614, 2011.

PEREIRA, A. C.; JESÚS, N. R. D.; LAGE, L. V.; LEVY, R. A. Imunidade na Gestação Normal e na Paciente com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (*) Immunity in the Normal Pregnancy and in the Patient with Systemic Lupus Erythematosus. **Journal Immunology (SLE)**, v. 55, p. 45-53, 2005.

RIJK, E.; ESCH, E. V.; FLIK, G. Pregnancy Dating in the Rat: Placental Morphology and Maternal Blood Parameters. **Toxicologic Pathology**, v. 30, p. 271-282, 2002.

RUTELLA, S.; LOCATELLI, F. Intestinal dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, p. 3761-75, 2011.

SAITO, S.; NISHIKAWA, K.; MORII, T.; ENOMOTO, M.; NARITA, N.; MOTOYOSHI, K.; ICHIJO, M. Cytokine production by CD16-CD56 bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. **International Immunology**, v. 5, p. 559-563, 1993.

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

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

SPAGGIARI, G. M.; ABDELRAZIK, H.; BECCHETTI, F.; MORETTA, L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. **Blood**, v. 113, p. 6576-6583, 2009.

SPAGGIARI, G. M.; CAPOBIANCO, A.; ABDELRAZIK, H.; BECCHETTI, F.; MINGARI, M.C.; MORETTA, L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. **Blood**, v. 111, p. 1327-1333, 2008.

SU, L.; SUN, Y.; MA, F.; LU, P.; HUANG, H.; ZHOU, J. Progesterone Inhibits Toll-like Receptor 4-Mediated Innate Immune response in Macrophages by Suppressing NF-KappaB Activation Enhancing SOCS1 Expressing. **Immunology Letters**, v. 125, p. 151-155, 2009.

SUZUKI, S.; TONÉ, S.; TAKIKAWA, O.; KUBOS, T.; KOHNO, I.; MINATOGAWA, Y. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase in early concepti. **The Biochemical Journal**, v. 355, p. 425-429, 2001.

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

THACKRAY, S. J.; MOWAT, C.G.; CHAPMAN, S. K. Exploring the Mechanism of Tryptophan 2,3- Dioxygenase. **Biochemical Society Transaction**, v. 36, p. 1120-1123, 2008.

TENBROCK, K. O.; TENBROCK, K. Inflammatory cytokines in systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 14, 2011.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2009. p. 523.

VALENTE, G.; OZMEN, L.; NOVELLI, F.; GEUNA, M.; PALESTRO, G.; FORNI, G.; GAROTTA, G. Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 2403-2412, 1992.

WILLIAMS, Z. Clinical implications of basic research Inducing Tolerance to Pregnancy. **The New England Journal**, v. 367, p. 1159-1161, 2012.

YASUI, H.; TAKAI, K.; YOSHIDA, R.; HAYAISHI, O. Interferon γ enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: it's possible occurrence in cancer patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, p. 622-626, 1986.

YOSHIDA, R.; IMANISHI, J.; OKU, T.; KISHIDA, T.; HAYAISHI, O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by Interferon γ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 129-132, 1981.

YINGPING, X.; HAO, H.; CHUANWEI, L.; YUNZHI, S.; QIAN, W.; WEI, L.; WENGANG, S. Immunosuppressive effect of progesterone on dendritic cells in mice. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 91, p. 17-23, 2011.

Apêndice A

Valores (%) da expressão de IDO, nos grupos ST (sem tratamento), I (IFN- γ) e P (progesterona), nas células presentes no ambiente uterino-placentário de ratas Wistar em cultura, nos períodos de 2 e 24 horas, após a adição dos fatores (hormônios e citocinas)

2h	ST	I	P
CD4	13,55 + 1,46	25,33 + 6,84	1,73 + 1,64
CD8	7,07 + 5,96	8,02 + 4,53	3,38 + 1
MACRÓFAGO	11,46 + 3,88	11,79 + 4,40	4,12 + 5,87
CÉLULA B	2,92 + 3,92	7,92 + 2,72	2,25 + 2,09
CÉLULA DENDRÍTICA	0,2 + 0,25	59,9 + 19,3	48,96 + 7,37
CÉLULAS PLACENTÁRIAS	9,54 + 2,93	2,02 + 0,71	2,65 + 0,66
CELULAS EMBRIONÁRIAS	5,2 + 3,07	8,29 + 0,64	1,08 + 0,77
CÉLULAS NATURAL KILLER	6,78 + 5,27	10,06 + 2,62	3,73 + 1,41

24h	ST	I	P
CD4	10,73 + 6,55	7,29 + 2,51	1,95 + 1,24
CD8	3,5 + 2,21	3,24 + 1,93	1,31 + 0,51
MACRÓFAGO	7,19 + 5,18	0,714 + 0,49	0,92 + 0,57
CÉLULA B	7,49 + 7,85	17,57 + 7,32	3,89 + 4,04
CÉLULA DENDRÍTICA	8,5 + 0,97	78,06 + 3,68	61,5 + 8,93
CÉLULAS PLACENTÁRIAS	12,44 + 3,14	3,99 + 1,48	2,02 + 0,21
CELULAS EMBRIONÁRIAS	7,98 + 2,80	6,01 + 1,92	1,47 + 0,11
CÉLULAS NATURAL KILLER	10,47 + 8,80	4,6 + 2,04	1,52 + 0,43