JULIANA CATOIA

Fenotipagem das células indoleamina 2,3 dioxigenase - IDO
positivas em cultura de células de placenta bovina

São Paulo

2015

JULIANA CATOIA

**Fenotipagem das células indoleamina 2,3 dioxigenase - IDO
positivas em cultura de células de 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 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

2015

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.3081
FMVZ

Catoia, Juliana

Fenotipagem das células Indoleamina 2,3 dioxigenase – IDO positivas em cultura de células de placenta bovina / Juliana Catoia. -- 2015.
73 f. :il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

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. Placenta. 2. Bovinos. 3. Tolerância materno-fetal. 4. Indoleamina 2,3 dioxigenase. 5. Linfócitos. 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 de placenta bovina", protocolado sob o nº 2943/2013, utilizando 15 (quinze) vacas, 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 10/4/2013.

We certify that the Research "Phenotyping the cell indoleamine 2,3 dioxigenase (IDO) positive cell culture bovine placenta", protocol number 2943/2013, utilizing 15 (fifteen) cows, 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 3/13/2013.

São Paulo, 23 de setembro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CATOIA, Juliana

Título: Fenotipagem das células indoleamina 2,3 dioxigenase - IDO positivas em cultura de células de 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 obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Pedro Roberto Catoia e Sonia Aparecida Catoia

Dedico essa dissertação a vocês pela torcida e confiança no meu trabalho, sempre incentivando meus estudos concedendo forças para derrubar quaisquer obstáculos e me levantando nas horas de puro cansaço.

Obrigada por me ouvir e me dar o colo de vocês nos momentos de desespero.

Amarei vocês intensamente todos os dias da minha vida.

Ao meu afilhado

Pedro Camargo Silva Peccinini

O melhor presente que um dia recebi. A Dinha te ama muito...

AGRADECIMENTOS

Uma força maior

À Deus pelo dom da vida, pela saúde e força para sempre lutar e conquistar meus objetivos e sonhos. Estou apenas no início de uma longa jornada...

Quem acredita e corre atrás dos seus sonhos sempre será recompensado!

À minha família: Razão do meu viver.

Aos meus pais por me respeitarem principalmente nas situações de ansiedade e nervosismo.

Ao meu pai por me apoiar em todos os momentos, pelo companheirismo, pela preocupação sempre preservando minha felicidade.

A minha mãe pelos conselhos e ensinamentos. Suas palavras sábias nos momentos mais difíceis (DESESPERO) rsrs... Mãe!!! Vou tentar ser menos ansiosa e diminuir o ritmo sem querer fazer um milhão de coisas ao mesmo tempo.

Ao meu irmão Rodrigo Catoia pelo incentivo.

As minhas avós Maria Vila Vicente e Irani Barbosa Camargo por torcerem sempre pelo meu sucesso.

A minha Tia Solange Catoia Araújo pela sua participação efetiva em todas as fases da minha vida desde a infância.

Ao meu Tio Wagner de Matos Araújo pelo incentivo em todos os momentos.

As minhas primas Renata do Espírito Santo e Maria Isabel de Paula Coelho pela ajuda emocional, vocês foram essenciais nessa conquista.

A minha prima Maria Aparecida de Paula Coelho pelas palavras perfeitas nos momentos de total desespero.

Ao meu primo irmão Pedro Catoia Neto por controlar as nossas festas entendendo e incentivando a minha concentração.

A minha prima Eduarda Catoia Araújo pelas risadas, pelo seu carinho, seu abraço e claro pelas borrachas rsrsrs...

A todos os meus familiares que direto e indiretamente sempre estão me apoiando e me prestigiando.

Aos meus amores

A Jurema e o Fred pelo amor mais puro e verdadeiro primordial nesse momento.

Ao peludo Eterno

Ao Negão (in memorian) um anjo que me ensinou o quanto é importante viver intensamente cada segundo ao lado de quem se ama.

“A DESPEDIDA É UM MOMENTO DE TRISTEZA, EM QUE OS CORAÇÕES SE PREPARAM PARA VIVER UMA SAUDADE.”

Aos amigos

Ao meu amigo Jean Carlos Nakasato pela nossa amizade de uma década e que com certeza permanecerá por toda a vida, e claro obrigada por colaborar estatisticamente com meu projeto.

A minha amiga Sandra Regina Beleze pela amizade de 10 anos pelo incentivo e prestígio desde o ingresso na universidade até o presente. Pelas suas conversas, puxões de orelhas e conselhos.

Alguém Especial

Ao meu companheiro Caio Henrique de Oliveira Carniatto pela paciência, parceria, pelos nossos momentos bons e ruins sempre juntos. Com você aprendi ser ainda mais acelerada, falar mais bobagens que o normal... kkk. E os chicletes... kkk... que pedia pra você comprar... kkk Tudo para tentar aliviar o nervoso... Parece que nossa vida vai acabar de tanta ansiedade... Nosso comprometimento é sempre ajudar um ao outro. Que dure infinitamente.

“Quando estava preocupada você veio mostrar-me o lado bom da vida.
Quando estava triste você veio com seu sorriso
e alegrou meu interior restabelecendo-me a paz
Quando estava cansada, você veio trazer-me ânimo e carinho.
Quando me faltou calma você com sua compreensão
Mostrou-me serenidade de espírito.
Quando estava com problemas, você veio me mostrar a solução me
Dando nova expectativa e ânimo para solucioná-los.
Você mais do que ninguém sabe o quanto nós lutamos pelos
nossos ideais e você sempre ao meu lado dando-me confiança.”.
Preciso dizer mais nada né Cabeça, nosso caminho está apenas no início ...

Aos treinadores

Aos meus treinadores pela compreensão desse momento de intensa concentração que me obrigou a parar por um tempo. Já estou voltando e com o objetivo de estourar todos os meus tempos... rsrs... Vocês vão ter a missão de fazer treinos cada vez mais pesados agora... Mais garra do que antes...

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade.

Ao programa de pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pelo prestígio da pesquisa.

Ao Professor José Roberto Kfoury Junior pela oportunidade, confiança e paciência.
Sou muito grata.

À todos os funcionários da biblioteca da FMVZ-USP pelo atendimento perfeito, pela ajuda e claro pelo ambiente confortável para os estudos.

À Capes pela bolsa concedida durante o mestrado.

Ao Colega Pedro Kastein Faria da Cunha Bianchi do LTIAM por sempre estar disposto a ajudar, pela paciência ensinamentos e conversas quando tudo parecia perdido. Você foi fundamental na concretização desse projeto.

Aos funcionários da pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres sempre muito atenciosos e dispostos a ajudar.

Aos técnicos de todos os laboratórios, em especial Rose Eli Grassi Rici com seus conselhos e conversas.

Aos motoristas da Universidade de São Paulo, pelo transporte ao frigorífico sempre com muito respeito, pontualidade e extremamente prestativos me ajudando a carregar as caixas pesadas e os outros materiais.

Aos amigos do LTIAM: Carlos Eduardo Malavasi Bruno, Thierry Salmon, Fernanda Cardoso, Fernanda Bastianello Junior pelas conversas, conselhos, ajuda e risadas.

Aos colegas de todo o Departamento vocês são pessoas especiais.

Ao Frigorífico Fênix pela disponibilidade do material utilizado nessa pesquisa.

Aos animais que participaram dessa pesquisa.

“ANIMAIS SÃO ANJOS DISFARÇADOS MANDADOS A TERRA POR DEUS PARA MOSTRAR AO HOMEM O QUE É FIDELIDADE”.

RESUMO

CATOIA, J. **Fenotipagem das células indoleamina 2,3 dioxigenase - IDO positivas em cultura de células de placenta bovina.** [Phenotyping of the cells indoleamine - 2,3 dioxygenase (IDO) positive for bovine placental cell culture]. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A gestação é um estado fisiológico que exige adaptações imunológicas para que transcorra normalmente. Nesse período a mãe e o feto apresentam uma relação imunológica, ou seja, a interface materno-fetal. A enzima indoleamina-2,3 dioxigenase (IDO) desempenha um papel importante na tolerância materno fetal, por ser responsável pela metabolização do triptofano, impedindo por diversas vias a proliferação principalmente de linfócitos TCD8. Diversos tipos celulares estão presentes na interface materno fetal e vários deles podem expressar a IDO. Os leucócitos com perfil Th1 produzem uma citocina conhecida: o interferon γ que estimula a expressão da IDO em vários tipos celulares. Os linfócitos são divididos em subpopulações de acordo com sua função e fenótipo. Seus tipos incluem linfócitos T, Linfócitos B e as Células Natural Killer (uNK). Hormônios também atuam nesse processo a progesterona que exerce função determinante sobre a resposta imunológica materna podendo alterar o prognóstico gestacional e o estrógeno essencial para a tolerância materno fetal e manutenção da prenhez. Dessa maneira este trabalho tem por objetivo principal identificar os linfócitos presentes na placenta bovina em cultivo que expressam IDO (linfócitos T, linfócitos B e células NK), frente a estimulação por progesterona, estrógeno e interferon γ nas diversas fases gestacionais utilizando a citometria de fluxo. Segundo os resultados no período de 67,5 a 77, 5 dias com a adição de interferon γ a expressão da enzima IDO aumentou discretamente nos linfócitos TCD3, TCD4, e diferentemente dos linfócitos T CD8 apresentaram uma elevada expressão da enzima ($4,48 \pm 2,12 - 8,65 \pm 4,91$). No período de 92,5 a 172, 5 dias os linfócitos TCD4, TCD8 e TCD25 apresentaram uma diminuição significativa da IDO. No período final da gestação entre 195 a 222, 5 dias, os linfócitos TCD3, TCD4 e os BCD25 aumentaram a expressão da IDO quando submetidos ao interferon γ , no entanto, os linfócitos T CD8 e as células NK não apresentaram alterações significativas. Com base nos resultados apresentados podemos concluir que todos os tipos celulares foram capazes de expressar a IDO mediante a suplementação com interferon γ , sendo que o linfócito T CD8 apresentou

uma diferença bastante significativa quanto ao aumento da IDO, já o estrógeno elevou a expressão da IDO somente nos linfócitos B (CD25) e a progesterona diminuiu a expressão da enzima nos linfócitos T (CD3 e CD4) e nas células NK.

Palavras-Chave: Placenta. Bovinos. Tolerância materno-fetal. Indoleamina 2,3 dioxigenase. Linfócitos.

ABSTRACT

CATOIA, J. **Phenotyping of positive indoleamine - 2,3 dioxygenase (IDO) cells bovine placental cell culture.** [Fenotipagem das células indoleamina 2,3 dioxigenase - IDO positivas em cultura de células de placenta bovina]. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Pregnancy is a physiological state that requires immune adaptations in order to be successfully carried on. During this period the mother and the fetus establish an immuno tolerance status at the maternal fetal interface. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) plays an important role in maternal-fetal tolerance by metabolizing tryptophan, impairs by several pathways, mainly T CD8 cells proliferation. Several cell types present in the maternal fetal interface and several of them can express IDO. Leukocytes with Th1 produce a cytokine known: interferon γ that stimulates the expression of IDO in several cell types. Lymphocytes are divided into sub-populations according to their function and phenotype: T lymphocytes, B lymphocytes and natural killer cells (uNK). Hormones also involved in this process where progesterone exerts decisive role on maternal immune response that may change gestational outcomes and estrogen is essential for fetal maternal tolerance and maintenance of pregnancy. Therefore this work main objective was to identify lymphocytes present in the bovine placental cells culture that were sensitive to progesterone, estrogen and interferon γ stimulation regarding their IDO expression in various gestational stages using flow cytometry. According to the results in the gestation period from 67,5 to 77,5 days, with the addition of interferon γ . IDO expression was slightly increased in TCD3 lymphocytes, CD4, and differently from the other T cells CD8 displayed a higher expression of the enzyme (4.48 ± 2.12 to 8.65 ± 4.91). In the period from 92.5 to 172, 5 days CD4 lymphocytes, CD8 and TCD25 showed a significant decrease of IDO expression ($p < 0,05$). At the final gestacional stages between 195-222 5 days, TCD3 lymphocytes, CD4 and BCD25 increased expression when subjected to interferon γ supplementation, however, CD8 T cells and NK cells showed no significant changes. Based on the results presented we can conclude that all cell types were able to express IDO by supplementation with interferon γ , and that T CD8 lymphocyte showed a highly significant increasing of IDO expression, whereas estrogen increased the expression of IDO only in B

lymphocytes (CD25) and progesterone decreased the enzyme expression in T lymphocytes (CD3 and CD4) and in NK cells.

Keywords: Placenta. Cattle. Maternal-fetal tolerance. Indoleamine 2,3 dioxygenase. Lymphocytes.

LISTA DE ABREVIATURA

IL - Interleucina

IL-4 - Polariza a reação para padrão Th2, fator de proliferação de células B e Th2 e induz IgE

IL-10 - Anti -inflamatória e imunorreguladora; inibe a ativação das células apresentadoras de antígeno (APCs)

IL-15 - Induz a proliferação de células NK, NKT e T de memória

IFN- Pró-inflamatória e citocina que define padrão Th1, inibe padrão Th2 e induz a ativação de macrófagos, de linfócitos B, apresentação de antígenos para os linfócitos T CD4

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Animais no período de 67, 5 dias a 77, 5 dias, em relação a expressão da enzima IDO.....39

Tabela 2 - Animais no período de 92, 5 dias a 172, 5 dias, em relação a expressão da enzima IDO.....40

Tabela 3 - Animais no período de 195,5 dias a 222, 5 dias, em relação a expressão da enzima IDO.....40

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Exemplos de aquisições realizadas no período de 24 horas para as células controle nas diferentes fases gestacionais42
- Figura 2 - Exemplos de aquisições realizadas no período de 24 horas com adição de progesterona (P) nas diferentes fases gestacionais43
- Figura 3 - Exemplos de aquisições realizadas no período de 24 horas com adição de estrógeno (E) nas diferentes fases gestacionais48
- Figura 4 - Exemplos de aquisições realizadas no período de 24 horas com adição de interferon (I) nas diferentes fases gestacionais53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	BOVINOCULTURA DO BRASIL	21
2.2	PLACENTA	21
2.3	PLACENTA BOVINA	23
2.4	LEUCÓCITOS	24
2.5	LINFÓCITOS	25
2.5.1	Linfócitos T	26
2.5.2	Linfócitos B	26
2.5.3	Células Natural Killer - NK	27
2.6	HORMÔNIOS GESTACIONAIS	28
2.6.1	Progesterona	29
2.6.2	Estrógeno	30
2.7	TOLERÂNCIA MATERNO FETAL	31
2.8	INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE	32
3	OBJETIVO	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	MATERIAL	35
4.2	MÉTODOS	35
4.2.1	Cultivo Celular	35
4.2.2	Citometria de Fluxo	36
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38

6	RESULTADOS	39
7	DISCUSSÃO.....	58
8	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Dentre as principais atividades do agronegócio brasileiro a bovinocultura se destaca no cenário mundial. Desde o ano de 2004, o Brasil assumiu a liderança nas exportações com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas para mais de 180 países (BRASIL, 2014).

Para manter o excelente nível de produção desses animais, os cuidados com seus aspectos reprodutivos são de extrema importância incluindo o melhor entendimento do desenvolvimento intrauterino do embrião e a relação existente junto à interface materno fetal (MARQUES et al., 2007).

A placenta é uma estrutura de grande importância para o desenvolvimento adequado do conceito, um órgão efêmero materno fetal que permite a transferência restrita de metabólitos e drogas por meio de áreas de permutas especializadas. Além da implantação do embrião, estabelece a interface para nutrição e trocas gasosas entre a circulação materna e fetal e inicia o reconhecimento materno da gestação, alterando o envolvimento imunológico local e as funções cardiovasculares e metabólicas maternas pela produção de hormônios (BROLIO et al., 2010).

Diversas populações celulares estão presentes no tecido placentário e uterino, dentre elas os leucócitos, células especializadas na defesa do organismo e, que no útero gestante tem o papel da expressão de receptores que medeiam o reconhecimento do conceito principalmente no momento da invasão trofoblástica e, a produção de citocinas que regulam e medulam a resposta imune materna (HUNT, 1994; MOFFETT-KING, 2002; JANEWAY et al., 2008; RANGO, 2008; TIZARD, 2009).

Seria de se esperar no momento da implantação embrionária uma reação imunológica contra o conceito, que carrega moléculas paternas que não são “próprias” ao organismo materno. No entanto, o embrião é reconhecido pelo sistema imune materno, sem que seja disparada uma resposta imunológica contra sua permanência e desenvolvimento naquele ambiente. Assim, o sistema imune materno garante um ambiente favorável para o desenvolvimento embrionário e fetal. Esse fenômeno pode ser designado “Tolerância Imunológica” (MICHELON et al., 2006).

Dentre os diversos mecanismos da tolerância materno fetal destaca-se a indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), enzima presente em alguns tecidos nos

mamíferos, que cataboliza o triptofano, levando as células T efetoras à apoptose, seja devido ao estado de carência deste componente no microambiente placentário, seja pelos catabólitos tóxicos produzidos durante seu catabolismo, principalmente a quinurenina (LIANG, 2006).

A gestação é um estado fisiológico que exige adaptações imunológicas para que transcorra normalmente (FELICIANO et al., 2012). Esse período é caracterizado por altas concentrações de progesterona, hormônio essencial para a manutenção da gestação, por promover o desenvolvimento endometrial, manter a integridade placentária, reduzir a atividade miometrial e a sensibilidade a ocitocina (CONCANNON, 1986). Com o decorrer da gestação, a produção de estrógeno ocorre em vários tecidos, contribuindo para o crescimento uterino necessário para o desenvolvimento embrionário e fetal bem sucedido (DOBSON et al., 1993; WOOD, 1999; KINDAHL, 2002).

Apesar de já ser conhecida capacidade de expressão da IDO por diversas células presentes na placenta, inclusive por alguns leucócitos, e que esta expressão pode ser influenciada pelo estradiol e pela progesterona, ainda permanece desconhecida quais destas células efetivamente são influenciadas por esses hormônios e quais efeitos estes causam nessas. Nesse contexto, e pela importância que essas células desempenham, buscou-se a identificação dos linfócitos presentes no útero gravídico de vacas que expressam IDO (linfócitos T, linfócitos B e células NK), perante a estimulação por progesterona, estrógeno e interferon γ .

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BOVINOCULTURA NO BRASIL

O Brasil detém o maior rebanho comercial de bovinos (197 milhões de animais), e a segunda maior produção de carne do mundo (9,3 milhões de toneladas métricas de equivalente carcaça (USDA, 2013).

O Brasil está entre os países mais competitivos do mundo na produção de carne bovina e suas perspectivas são bastante promissoras para o mercado externo, tanto que no ano de 2013, o aumento das exportações foi um dos principais contribuintes para o aumento dos índices de produção de carne bovina no Brasil (NOGUEIRA; MUSTEFAGA, 2004; IBGE, 2014).

Ao longo do ano de 2014 a indústria de carne bovina brasileira vem mantendo o ritmo de crescimento e já registra alta de 10,87% em faturamento com vendas externas e 7,09% em volume exportado entre janeiro e setembro, comparado com o mesmo período do ano anterior. No acumulado do ano, o país exportou 1,164 milhão de toneladas ante 1,08 milhão de toneladas em 2013 (ABIEC, 2014).

As vendas no ano de 2014 alcançaram R\$ 5,3 bilhões contra R\$ 4,7 bilhões registrados no ano passado. Os principais importadores da carne bovina brasileira ainda são Hong Kong e Rússia (ABIEC, 2014).

Para obtenção de padrões ideais de eficiência reprodutiva, ou seja, para positiva produção é necessário que ocorra perfeita interação dos parâmetros genéticos, sanitários, nutricionais e reprodutivos (HAFEZ, 2004), incluindo neste último, uma melhor compreensão do desenvolvimento intrauterino do embrião e a relação existente junto à interface materno fetal (MARQUES et al., 2007).

2.2 PLACENTA

É um órgão transitório formado por tecidos maternos e fetais, tendo como ofício transportar substâncias nutritivas do organismo materno para o feto, além de

promover “trocas metabólicas” e desempenhar funções endócrinas quanto à produção de hormônios na gestação (MOSSMAN, 1987; LEISER; KAUFMANN, 1994).

No desenvolvimento placentário dos mamíferos estão envolvidas quatro membranas fetais: âmnio, córion, alantoide e saco vitelino, podendo haver ausência de algumas delas ou ainda junções entre uma ou mais membranas durante a gestação, ou desde seu início (BROLIO et al., 2010).

O primeiro anexo a ser formado nos mamíferos domésticos é o saco vitelino, que persiste como uma estrutura rudimentar, precocemente um órgão vasculogênico. O âmnio é um envoltório sacular do embrião e do feto, composto de líquido amniótico, que impede desidratação do embrião, permite a motilidade e proteção contra choques e atritos. O alantoide é uma membrana extra embrionária que se desenvolve como uma evaginação do intestino caudal se une ao córion formando a membrana córion- alantoide, que tem como funções: a proteção mecânica ao feto, a prevenção contra a desidratação e determinação do equilíbrio uterino. O córion é uma camada epitelial derivada do exterior do trofoectoderma, e que na maioria das espécies representa a barreira de troca decisiva entre os organismos materno e fetal (SCHWARZE; SCHRÖDER, 1970; ALMEIDA, 1999; SCHLAFFER; FISHER; DAVIES, 2000; MOORE; PERSAND, 2008; POUGH; JANIS; HEISER, 2008; RIQUELME, 2009).

A placenta das inúmeras espécies apresenta uma grande diversidade, em estruturas que incluem diferentes organizações, quanto ao tipo celular, forma e modelo de distribuição sobre o endométrio (KAUFMAN, 1983).

Segundo Leiser e Kaufmann (1994) estabeleceu-se uma classificação placentária mais complexa, seguindo alguns aspectos: tipo e número de membranas envolvidas; forma externa do órgão; padrão geométrico da interdigitação das superfícies materno e fetal; tipo e número de camadas teciduais separando o sangue materno e fetal; arranjo geométrico dos vasos materno e fetal para troca de substâncias.

2.3 PLACENTA BOVINA

Os ruminantes animais de grande importância econômica para o homem (bovinos, caprinos, ovinos) a placenta é classificada como zonária, cotiledonária e sinepteliocorial (LEISER; KAUFMANN, 1994; MARQUES et al., 2007).

Nos bovinos é classificada como cotiledonária ou múltipla, em que as interdigitações concentram-se em regiões placentárias (placentomas ou placentônios) (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Segundo Miglino (1991), o placentônio é a união do cotilédone fetal e a carúncula materna, com variedade em número nas diferentes espécies de ruminantes, é o único ponto de trocas materno fetais.

A membrana intercaruncular, localizada entre as carúnculas uterinas, apresenta pregas e possui um epitélio simples microscopicamente, rico em tecido glandular. Essa região libera um fluido albuminoso chamado “leite uterino” que é rico em proteínas, e quando é absorvido pelo trofoblasto constitui em importante fonte de nutrição para o feto (ZELLER; KUHN, 1994; GRAY et al., 2001; DANTZER, 2002).

A membrana intercotiledonar é composta por uma simples camada de células trofoblásticas uninucleadas, mantidas por um tecido conjuntivo e ocupa aproximadamente 80% da superfície endometrial. Os placentônios tem em seu interior células fetais binucleadas, que migram para formar células tri e multinucleadas junto com células epiteliais endometriais, as quais são susceptíveis à apoptose no interior do placentônio (HOFFMAN; SCHULER, 2002).

Com o intuito de acomodar o feto durante a gestação, o útero sofre muitas alterações. A placenta sofre intenso e rigoroso processo de proliferação celular ao longo da gestação. Sua regulação exige balanço entre fatores promotores ou inibidores do ciclo celular (BAMBERGER et al., 1999; CORREIA DA SILVA et al., 2004; PFARRER et al., 2006).

Nesse período qualquer comprometimento na formação placentária prejudica o desenvolvimento fetal e o sucesso da gestação (REDMER et al., 2004), o que justifica a necessidade da realização de pesquisas que possam avaliar alterações histológicas e fisiológicas que ocorrem na placenta ao longo da gestação.

2.4 LEUCÓCITOS

São células nucleadas, produzidos na medula óssea, armazenados nos órgãos linfoides, e podem ser encontrados no sangue e na circulação linfática, desempenhando um papel de defesa contra agentes invasores que possam atingir os tecidos e órgãos (HUNT, 1994; HUNT et al., 2000; JANEWAY et al., 2008; TIZARD, 2009).

Fatores físicos e imunológicos estão comprometidos na defesa primária contra patógenos. Com o início da replicação do microrganismo nos tecidos do hospedeiro e ultrapassadas as barreiras físicas, os mecanismos imunológicos inatos iniciam sua atuação (ALBERTS et al., 2002).

A inespecificidade antigênica em suas ações e a não geração de células de memória é denominada a resposta imune inata, tendo a participação de diversos tipos celulares como os: basófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos, células natural killers (NK), células dendríticas (DCs) e neutrófilos, além das citocinas (TIZARD, 2009).

Junto a essa resposta imune inata surge uma resposta imunológica adaptativa, que é mediada por linfócitos B e T que resulta na geração de células efectoras antígeno- específicas e de células de memória que podem prevenir uma outra infecção pelo mesmo microrganismo (ABBAS; LICHTMAN, 2012).

Em humanos o número de leucócitos tende a aumentar no início da gestação, sugerindo que essa proliferação sofra influência endócrina, ou seja, interação entre os leucócitos maternos e fetais (RANGO, 2008). Nesse período gestacional no útero estão presentes células NK, linfócitos T macrófagos em grande quantidade e linfócitos B em pequenas quantidades (PICCINNI, 2002; TRUNDLEY; MONFFETT, 2004).

As células dos mamíferos em sua grande parte parecem ter a capacidade de fagocitar e dirigir antígenos proteicos, no entanto, somente células dendríticas, fagócitos mononucleares e linfócitos B normalmente expressam o MHC de classe II (ABBAS; LICHTMAN, POBER, 1997).

Variações fisiológicas e ambientais, tais como: temperatura ambiente, qualidade nutricional, estresse, higidez e atividade muscular, raça e sexo podem estar

relacionadas com a quantidade de leucócitos circulante (JAIN, 1986; KRAMER, 2000).

2.5 LINFÓCITOS

São pequenas células arredondadas com 7 a 15 μm de diâmetro com um grande e redondo núcleo desempenhando um papel importante no reconhecimento de antígenos e execução de resposta imunes (celular e humoral). Podem ser encontradas nos órgãos linfóides do organismo, no sangue e espalhados sob as superfícies mucosas (JANEWAY et al., 2008; TIZARD, 2009).

Importante ressaltar que os linfócitos também apresentam como função a produção de citocinas, diversidade de proteínas que regulam as respostas imunes através de uma sinalização entre as várias células (SARGENT; BORZYCHOWSKY; REDMAN, 2006), e com um papel essencial na ativação de células T e B e macrófagos (GOLDSBY; KINDY; OSBORNE.; 2000).

Há dois tipos de linfócitos subdivididos em T e B, sendo os linfócitos B ligados à imunidade humoral produzindo e liberando anticorpos em resposta a receptores antigênicos específicos (TCR), e os linfócitos T relacionam-se a imunidade mediada por células, produzindo citotoxinas na busca de combater agentes invasores (JANEWAY et al., 2008; TIZARD, 2009).

No entanto, existe outro tipo de linfócitos, as células NK, que apresentam uma morfologia diferente e são tidas como as principais células do sistema imunológico, tendo como função a citotoxicidade celular além de secretarem citocinas, estas que ajudam na vascularização e remodelação do tecido uterino durante o processo de placentação, beneficiando o trofoblasto contra as células do sistema imunológico materno e, não permitindo uma invasão excessiva do trofoblasto a parede uterina (BULMER; JOHNSON; BULMER, 1987; GUMPERS; PARHAM, 1995; ERICKSON et al., 2004; SPAGGIARI et al., 2008; TIZARD, 2009).

2.5.1 Linfócitos T

São células especializadas do sistema imunológico que após receberem o estímulo das células apresentadoras de antígeno e serem ativadas, iniciam uma resposta a novos antígenos por meio da produção ou da expressão, em sua membrana celular, de citocinas que amplificam e regulam os múltiplos aspectos da resposta imunológica (ABBAS; LICHTMAN, 2012).

São subdivididos em vários subtipos segundo seus marcadores de superfície e sua produção de citocinas (SOMPAYRAC, 1999).

Na imunidade específica as mais importantes subpopulações de linfócitos T são: linfócitos CD4+, com função de ativar macrófagos e de estimular os linfócitos do tipo B a produzirem anticorpos e os linfócitos CD8+, sendo que a população de células CD8+ junto com às células NK, medeiam a maioria das atividades citotóxicas contra as células infectadas com vírus ou células tumorais (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005).

Duas funções dos linfócitos T são conhecidas: apresentam atividades efetoras/citotóxicas, eliminando antígenos nocivos de bactérias e vírus, e a regulação das células T define as propriedades fundamentais da tolerância imunológica, com isso no interior do útero, as células T podem contribuir para o ambiente imunossupressivo local permitindo a sobrevivência do feto (SARAFANA et al., 2007). Em humanos, no início do período gestacional no endométrio o número de linfócitos T diminui, porém aumenta na decídua à medida que a gravidez avança (SARAFANA et al., 2007).

2.5.2 Linfócitos B

Estas células são inicialmente produzidas no saco vitelino, posteriormente, durante a vida fetal, no fígado e finalmente na medula óssea. Durante sua maturação as células que se diferenciarão em linfócitos B permanecem na medula óssea, já os linfócitos B maduros deixam a medula e entram na circulação, migrando

para os órgãos linfoides secundários (RUDIN; THOMPSON, 1998; JANEWAY et al., 2002; ABBAS; LITCHTMAN; PILLA, 2007).

A finalidade principal desta célula consiste na produção de diversos espectros de moléculas de imunoglobulinas que constituem o componente humoral da resposta imune específica. No adulto, essas células são capazes de sintetizar milhares de moléculas por segundo; e são ativadas pela interação com o linfócito T e o antígeno (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005).

Assim como os linfócitos T, cada linfócito B apresenta um grande número de receptores de antígenos idênticos em sua superfície, ou seja, cada linfócito B, pode se ligar e responder a um único antígeno (TIZARD, 2009).

Durante uma resposta imunológica, os receptores de linfócitos são modificados aleatoriamente por mutações somáticas ou conversão gênica. Apenas os linfócitos B apresentam receptores que podem se ligar a um antígeno com alta afinidade sobreviverão para se transformar em células de memória (TIZARD, 2009).

No início e no meio da gestação dos bovinos o número de linfócitos é reduzido tendo como objetivo evitar a rejeição imunológica do feto. Essas células são encontradas mais no final da gestação na região intercaruncular (VAN DER WIELEN; KING, 1984, HANSEN, 1997).

2.5.3 Células Natural Killer - NK

São linfócitos grandes e granulares, morfologicamente distintas dos linfócitos B e T, em virtude de uma densidade granular aumentada. Participam da imunorregulação, hematopoiese, reprodução e interação neuroendócrina (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005; PEREIRA et al., 2009).

Localizam-se fundamentalmente no epitélio glandular do endométrio e em torno das pequenas artérias (SARAFANA et al., 2007).

Desempenham função de citotoxicidade, na qual podem lisar células infectadas diretamente ou aquelas sensibilizadas por anticorpos, atuando principalmente contra células tumorais e células infectadas por vírus, e também são capazes de lisar bactérias, parasitas, fungos e algumas células normais na ausência de sensibilização prévia (MUSSI-PINHATA; REGO, 2005).

Conhecidas como principais células efetoras do sistema imunológico, sendo reguladas por uma série de receptores da superfície, os quais podem transmitir sinais de ativação ou inibição para as mesmas (SPAGGIARI et al., 2008).

Diversos estudos demonstraram que as células NK são reguladores importantes da autoimunidade e da tolerância imune, sendo capazes de segregar uma grande variedade de citocinas, o que isso explica a sua capacidade de exercer múltiplos efeitos num vasto espectro imunológico, estando particularmente implicadas na viabilidade dos transplantes (KAWANO, et al., 1998; DOSIOU; GIUDICE, 2005).

Tem capacidade de produzir citocinas, pró e anti-inflamatórias e levar à morte da célula alvo por apoptose. Fazem parte da regulação da produção de anticorpos dependentes das células T nas doenças autoimunes (PEREIRA et al., 2009).

Os tipos celulares presentes no local da implantação do óvulo mostram que as células T e B, típicas do sistema imune adaptativo, são raras, enquanto o predomínio populacional consiste de células NK (MOFFET, 2002).

Estas células NK de origem materna aumentam em número e precedem a implantação durante a fase lútea, diferenciam-se durante a gravidez e diminuem substancialmente em número, quase desaparecendo no final da gravidez (KING; BIRKBY; LOKE, 1989).

Nos humanos sob influência dos esteroides sexuais, ocorre um aumento da população de células uNK (uterine Natural Killer) no início da gestação. As alterações das células uNK quanto ao fenótipo, número e atividade sugerem que essas células são reguladas por hormônios. Os estrógenos, progesterona e prolactina são hormônios candidatos a esta regulação (NEVES et al., 2007).

2.6 HORMÔNIOS GESTACIONAIS

A gestação é uma condição fisiológica em que ocorrem várias mudanças de sistemas que interatuam como o sistema endócrino e imunológico (MULDER, 1998).

Sob o ponto de vista hormonal, o ciclo estral é controlado pela integração entre os seguintes hormônios: folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), estrógeno e progesterona (P4), estes que são hormônios comuns para todas as espécies, porém

sua secreção e seus efeitos variam entre elas de modo a ocasionar variações e diferenças no ciclo (McCRACKEN et al., 1999).

No ciclo reprodutivo a primeira fase é denominada foliar, devido ao desenvolvimento do folículo, estrutura do ovário que contém o óvulo e culmina com sua liberação. A segunda fase é a luteínica, caracterizada pelo desenvolvimento do corpo lúteo, estrutura produtora de progesterona, hormônio que mantém a gestação (McCRACKEN et al., 1999).

Com o decorrer do ciclo estral esses hormônios são responsáveis pelas alterações que ocorrem no endométrio, vagina e cérvix, e também pela regulação por “feedback” da secreção de FSH e LH pela hipófise anterior (CONSTANZO, 1999).

2.6.1 Progesterona

Sintetizada a partir do colesterol, é um hormônio esteroide (KRISANS, 1996), produzido no corpo lúteo e fundamental na manutenção da gestação de mamíferos (FERNANDES et al., 2012).

É conhecida como “hormônio da gravidez” devido seu papel na implantação e desenvolvimento do endométrio. Além disso, exerce uma função determinante sobre a resposta imunológica materna podendo alterar o prognóstico gestacional (SZEKERES-BARTHO et al., 2005).

O ambiente uterino devidamente sensibilizado pela progesterona propicia condições favoráveis para o desenvolvimento e habilidade do conceito, sendo que a secreção do interferon está relacionada a concentração de progesterona (MANN et al., 1999).

Acredita-se que o efeito imunorregulatório mais importante da progesterona seja a sua ação sobre os linfócitos T (MICHELON et al., 2006).

A progesterona influencia a resposta imunológica induzindo a ativação preferencial das células Th2. Na presença desse hormônio, os linfócitos periféricos produzem uma proteína mediadora denominada fator bloqueador induzido pela progesterona (PIBF), e este exerce funções imunomodulatórias favorecendo a

secreção de citocinas tipo Th2, como IL-3, IL-4 e IL-10, enquanto inibe as citocinas Th1, como interferon (IFN) (SZEKERES-BARTHO et al., 2005).

Por influência da progesterona, as células do endométrio produzem IL-15 e prolactina que regulam a proliferação de células NK, a diferenciação e produção de citocinas e outras moléculas que suportam o desenvolvimento da placenta e do trofoblasto, promovendo a modulação local (NEVES et al., 2007).

2.6.2 Estrógeno

São hormônios esteroides que apresentam a mais ampla extensão fisiológica de todos os hormônios esteroides, sendo necessário para a manifestação do estro (HAFEZ et al., 2000).

Dentre os estrógenos o β - estradiol é o de maior importância na reprodução (HANUKOGLU, 1992; RICHARDS, 1994; CONLEY, 2001; ROSENFELD et al., 2001).

Tem como ofício estimular a secreção de prolactina, que é um hormônio polipeptídico que aumenta durante a gestação e no período de lactação (ØSTENSEN, 1999).

Em relação aos aspectos imunológicos tem efeitos específicos sobre as células T e B, envolvida na proliferação e diferenciação celular (LEANÕS-MIRANDA et al., 2001), podendo atuar como estímulo pró-inflamatório e anti-inflamatório de acordo com o ambiente (BRUCE-KELLER et al., 2000; VEGETO et al., 2001).

O estrogênio tem efeito similar a progesterona ao final do período gestacional no balanço Th1/Th2 (DEALTRY et al., 2000; SZYPER-KRAVITZ et al., 2005).

Durante o período gestacional ocorre um predomínio de estradiol essencial para a tolerância materno fetal e manutenção da prenhez (PELTIER, 2003). Tanto que na espécie bovina à segunda metade da gestação, a produção de estrógeno é essencialmente placentária e, portanto, a dosagem estrogênica nesta fase pode refletir a viabilidade fetal (DOBSON et al., 1993; KINDAHL, 2002).

2.7 TOLERÂNCIA MATERNO FETAL

No período gestacional, o embrião é reconhecido pelo sistema imune materno, sem que seja lançada uma resposta imunológica contra sua permanência e desenvolvimento naquele ambiente, como ocorreria em qualquer outra situação perante aos antígenos. Assim, o sistema imune materno proporciona para o desenvolvimento do conceito um ambiente favorável. Esse fenômeno é designado “Tolerância Imunológica” (MICHELON et al., 2006).

A mãe e o feto apresentam uma relação imunológica, ou seja, a interface materno fetal, uma comunicação bidirecional em que se observa a apresentação de antígenos pelo feto e reconhecimento destes pelo sistema imune materno. Essa interação é uma fase importante na manutenção da gestação e falhas nesse processo podem causar abortos espontâneos (SZEKERES-BARTHO, 2002).

O feto porta-se como um enxerto semi- alogênico por possuir um material genético com metade de origem materna e outra paterna (MICHELON et al., 2006).

Nos primórdios de seu desenvolvimento, o embrião se divide em dois grupos de células, sendo um externo: o trofoblasto que dará origem a placenta, e um interno originando o próprio embrião (MOR, 2006).

O fenômeno de tolerância, o desenvolvimento fetal e a formação placentária sofrem a influência da ação hormonal sobre o sistema imune materno, as citocinas liberadas no meio, o controle da citotoxicidade direta das células natural killer uterinas, atividades das células regulatórias e o recolhimento do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) paterno (MICHELON et al., 2006).

O complexo de histocompatibilidade principal classe I (MHCI), também descrito como HLA, é constituído por importantes moléculas de reconhecimento, são subdivididas em dois grupos Ia (A, B e C conhecidas como clássicas, a qual suas moléculas são expressas no tecido somático com funções imunológicas bem estabelecidas, como modular a resposta antiviral e antitumoral por meio da sua interação com receptores de células NK e T) e o Ib tem moléculas restritas ao tecido (ALVES et al., 2007).

O HLA-G por estar expresso nas células do endotélio endovascular fetal, nas células citotrofoblásticas extravilosas invasivas e do tecido e líquido amniótico que

entram em contato com o sistema imune materno, é descrito como mediador da tolerância materno fetal (ALVES et al., 2007).

Um outro mecanismo com atividade imunossupressora é a enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), que participa do metabolismo do triptofano o qual é necessária para a ativação das células T (MUNN et al., 1998; GULERIA; SAYEGH, 2007).

As células trofoblásticas responsáveis pela produção da IDO constituem em um pré-requisito para a tolerância do feto semi-alogênico, pois as células fetais não sendo idênticas às maternas podem estar sensíveis a reações imune (MUNN et al., 1998).

Há tempos acredita-se que a gestação estava associada à supressão da imunidade, no entanto, os animais podem ficar susceptíveis e o organismo deve ter a capacidade de alertar a possíveis perigos para proteger a mãe e o feto. A modulação da resposta imune materna também é um fator relevante entre a mãe e o concepto (MOR et al., 2011).

2.8 INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE

É uma enzima intracelular, monomérica, com peso entre 40 a 45 KDa, constituída por uma grande quantidade de aminoácidos (PALAFOX et al., 2010).

Células do trofoblasto, fibroblasto, epiteliais, macrófagos, micróglia e tumorais são alguns tipos celulares capazes de expressar a IDO, no entanto a via bioquímica ou funcional da enzima não é ativada em todas as células principalmente em condições homeostáticas, a não ser 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).

A IDO é responsável por metabolizar o triptofano, aminoácido essencial menos abundante no organismo, e que caracteriza-se unicamente por relacionar seu metabolismo à processos imunológicos. Seu catabolismo ocorre em sítios de inflamação, e a expressão de IDO pode vincular-se à resposta anti-inflamatória por reduzir danos nos tecidos (MELLOR; MUNN, 2001; LIANG et al., 2006).

Para que ocorra o catabolismo do triptofano pela IDO é inevitável que sua expressão seja estimulada. A atividade bioquímica e funcional da enzima é induzida pelo IFN- γ , 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, BOASSO et al., 2005; LIANG, 2006).

O triptofano desencadeia três funções principais: síntese de proteínas, biossíntese de serotonina e reações catabólicas por meio de quinurenina (MELLOR; MUNN, 2004; BALL et al., 2009).

No micro ambiente placentário a IDO inibe as células T efectoras impedindo a proliferação das células T imunologicamente ativas, isso ocorre devido a carência de triptofano e aos catabólitos tóxicos gerados pelo seu catabolismo realizado pela IDO, principalmente a quinurenina que induzem as células T ativadas a apoptose (LIANG, 2006; TAKIKAWA, 2005; KUDO et al., 2004).

Em bovinos o progresso da atividade da IDO está relacionada diretamente ao comportamento placentário da gestação, ou seja, no início gestacional a placenta apresenta-se justaposta ao epitélio uterino, mas com o avanço da idade gestacional, nota-se maior interação materno-fetal devido ao maior desenvolvimento dos capilares uterinos levando um aumento da exposição dos antígenos fetais ao sistema imune materno (OLIVEIRA, 2005).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os linfócitos presentes na placenta bovina em cultivo que expressam IDO (Linfócitos T, Linfócitos B e Células NK), frente a estímulos hormonais e citocinas, em diversas fases gestacionais.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Imunofenotipar utilizando anticorpos específicos, linfócitos presentes na placenta bovina que expressam IDO frente à estimulação por: progesterona, estrógeno e interferon γ , utilizando a citometria de fluxo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

O material utilizado foi obtido de placentas de gestações de fetos normais coletados em abatedouro localizado em São José dos Campos (Frigorífico- Frigo Fênix Comércio Distribuidora de Carnes Ltda.). Foram utilizadas um total de 15 amostras, sendo cinco animais representativos de cada um dos três terços gestacionais principais, sendo: terço 1- (67,5 a 77,5 dias), terço 2- (92,5 a 172,5 dias) e terço 3- (195 a 222,5 dias).

O projeto foi desenvolvido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, FMVZ-USP mediante a aprovação da Comissão de Bioética da mesma Universidade (protocolo nº 2943/2013).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cultivo Celular

Os placentônios coletados foram lavados em tampão fosfato (PBS), armazenados em sacos plásticos (Pratsy Zip 18 cm x 23 cm) e mantidos sob refrigeração até o processamento. Com o uso de pinça e tesoura estéreis o material coletado foi colocado sobre uma placa de Petri para a retirada do excesso alantoidiano. Os placentônios foram seccionados e fragmentados da região da interface materno fetal (entre a carúncula uterina e o cotilédone fetal) foram coletados. Seguindo a aplicação da técnica de separação mecânica os fragmentos foram coletados sobre uma malha de aço 150 mesh de diâmetro e com auxílio de uma seringa de 10 ml e meio de cultura D-MEM (Sigma Aldrich- USA) com 10% de soro fetal bovino e antibiótico, os fragmentos foram pressionados contra a malha para a separação celular.

As células separadas foram colocadas em tubos de 50 ml e submetidas à centrifugação (1800 x g, por 5 min à 20°C) e após a centrifugação o meio foi removido e as células foram suspensas em 30 ml de meio de cultura.

Após esse processo realizou-se a contagem de células e a estimativa da viabilidade das células através do método de exclusão por azul de trypan, onde as células foram postas em placas de 48 poços em uma concentração de 1×10^6 células/ 250 μ l, sendo incubadas à 37°C e 5% de CO₂ até o início das análises.

No início do tratamento os fatores foram adicionados e os tratamentos assim estabelecidos:

- a) Grupo ST – Sem tratamento, somente meio de cultura (D-MEM-Sigma Aldrich-USA) - 200 μ l
- b) Grupo P- D-MEM + Progesterona (acetato de medroxiprogesterona Promone-E) – (Pfizer- Brasil)® – 1 μ l/200 μ l
- c) Grupo E – D-MEM + Estrógeno (ECP – cipionato de estradiol) – (Pfizer-Brasil)® – 2,5 μ l/200 μ l
- d) Grupo I – D-MEM + Interferon γ (Millipore –USA) – 1 μ l/200 μ l

4.2.2 Citometria de Fluxo

A imunofenotipagem das células conjunta com a verificação da expressão da IDO foi realizada com a utilização da citometria de fluxo.

As células em cultura foram soltas das placas e a suspensão celular foi lavada em dois ciclos de 1800 g, durante 5 min a 20°C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado, as células ressuspensas em PBS (0,1 M) e permeabilizadas com triton-X (Inlab-Brasil) 0,1% por 20 minutos e, então as células foram novamente lavadas e ressuspensas em PBS (0,1M).

Posteriormente foram incubados individualmente as células em cultura os anticorpos primários: anti-CD3 bovino (VMRD USA), anti-CD4 bovino (VMRD USA), anti-CD8 bovino (VMRD USA), anti-CD25 (VMRD USA) e anti-CD335 (VMRD USA), recebendo também a adição do anticorpo primário Anti-IDO (indoleamina 2,3 dioxygenase (EB 09548 – Goat Anti-INDOL1- EVEREST BIOTECH USA).

Após 30 minutos foram realizadas mais duas lavagens em PBS a 1800 g, durante 5 minutos a 20°C, em seguida as amostras foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários Donkey anti goat PE (LSBio-USA) e o Rabbit anti mouse FITC (LSBio –USA) e por mais 30 min na geladeira. Após esse procedimento as células foram lavadas em PBS as duas últimas vezes (1800 xg, durante 5 minutos a 20°C) e por fim, ressuspendidas em Tampão FACS para serem analisadas em citometria de fluxo (BDFACScalibur). 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.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste utilizado para a realização das análises estatísticas foi o teste ANOVA.

O delineamento experimental foi conduzido com 15 animais, sendo cinco animais representativos de cada fase gestacional.

Quando o valor for $p < 0,05$ pode-se considerar um valor positivo, pois apresenta diferenças significativas. Já se o valor for $p > 0,05$ afirma-se que os resultados não apresentaram diferenças significativas e para isso é necessária uma avaliação das médias, detectando a maior diferença entre elas, sendo assim analisar qual tratamento foi mais significativo.

6 RESULTADOS

As células bovinas das várias fases gestacionais foram analisadas no período de 24 horas, perante os tipos celulares linfócitos T, linfócitos B e células NK após a adição de fatores: progesterona, estrógeno e interferon γ , verificando os níveis de expressão da enzima IDO nas respectivas células.

Nas tabelas (1, 2, 3) estão os valores médio e o respectivo desvio padrão da expressão da IDO das células bovinas analisadas por citometria de fluxo.

Os exemplos de aquisições das células controle, linfócitos T, linfócitos B e células NK, com adição dos fatores progesterona, estrógeno e interferon são mostrados nas figuras (1, 2, 3 e 4).

Tabela 1 – Valores médio e o respectivo desvio padrão da expressão da IDO dos animais no período de 67,5 a 77, 5 dias

Tipo Celular	Linfócitos T (CD3)	Linfócitos T (CD4)	Linfócitos T (CD8)	Linfócitos B (CD25)	Células NK (CD335)
Controle	4,83 $\pm$ 3,56	5,67 $\pm$ 2,50	4,48 $\pm$ 2,12	3,15 $\pm$ 2,72	3,65 $\pm$ 2,79
Progesterona	3,67 $\pm$ 2,75	3,57 $\pm$ 1,41	4,80 $\pm$ 2,94	4,28 $\pm$ 2,27	3,52 $\pm$ 2,27
Estrógeno	2,33 $\pm$ 1,35	2,67 $\pm$ 1,79	3,12 $\pm$ 1,69	2,15 $\pm$ 0,56	2,34 $\pm$ 0,66
Interferon	5,37 $\pm$ 2,63	5,95$\pm$2,01 p= 0,03 *	8,65$\pm$4,91 p=0,04 *	6,0 $\pm$ 2,97	8,9 $\pm$ 7,03

Tabela 2 - Valores médio e o respectivo desvio padrão da expressão da IDO dos animais no período de 92,5 a 172, 5 dias

Tipo Celular	Linfócitos T (CD3)	Linfócitos T (CD4)	Linfócitos T (CD8)	Linfócitos B (CD25)	Células NK (CD335)
Controle	1,9±0,7	2,51±0,69	1,68±0,82	1,67±0,82	1,31±0,22 p= 0,04 *
Progesterona	1,43±0,34	0,99±0,21 p=0,02 *	2,5±1,34	1,44±0,63	2,9±2,35
Estrógeno	2,81±4,52	0,89±0,6 p= 0,023 *	0,87±0,44 p= 0,02 *	1,10±0,32 p= 0,03 *	1,34±0,57
Interferon	0,62±0,84 p= 0,018 *	1,28±0,54	1,20±0,61 p= 0,04 *	1,31±0,71	1,17±0,86

Tabela 3 - Valores médio e o respectivo desvio padrão da expressão da IDO dos animais no período de 195 a 222,5 dias.

Tipo Celular	Linfócitos T (CD3)	Linfócitos T (CD4)	Linfócitos T (CD8)	Linfócitos B (CD25)	Células NK (CD335)
Controle	2,97±1,59	2,40±1,50	3,91±2,76	2,72±1,85	3,96±3,17
Progesterona	3,71±2,02	3,55±1,74	3,67±2,76	3,47±1,82	2,63±1,65
Estrógeno	2,93±2,14	3,52±2,23	2,56±1,87	5,32±2,32	4,24±3,44
Interferon	2,77±2,44	2,98±1,96	3,23±2,40	3,44±2,98	3,00±1,31

No início da gestação (67,5 a 77,5 dias), todos os tipos celulares analisados (linfócitos T, B e Células NK), quando submetidos à suplementação com estrógeno, apresentaram uma diminuição na expressão de IDO. Já, após a adição do interferon γ a expressão da enzima foi levemente elevada nos linfócitos TCD3, TCD4, no entanto, o linfócito TCD8, diferente das demais células, apresentou uma diferença

bastante significativa, caracterizando uma elevada expressão da enzima ($4,48 \pm 2,12$ - $8,65 \pm 4,91$) no primeiro terço gestacional.

Os animais com idade gestacional entre 92,5 a 172,5 dias mostraram que apenas os linfócitos TCD8, quando suplementados com progesterona, elevaram a expressão de IDO ($1,68 \pm 0,82$ - $2,5 \pm 1,34$), enquanto as outras células TCD3, TCD4, BCD25 e NK apresentaram uma diminuição na expressão da enzima, sendo um valor significativo apenas para as células TCD4. A suplementação com estrógeno, nesse período, exibiu um aumento da IDO somente nos linfócitos TCD3 e nas células NK. Os linfócitos TCD4, TCD8 e linfócitos B (CD25) apresentaram uma diminuição da IDO, em que, todos, tiveram um valor de p menor que 0,05, caracterizando a existência de uma diferença significativa entre o grupo controle e os linfócitos.

Para os animais concentrados no período de 195 a 222,5 dias de gestação, as células NK e os linfócitos TCD8 elevaram a expressão da enzima perante a suplementação com progesterona, porém, as demais células apresentaram uma diminuição da enzima quando submetidas à suplementação com a mesma (progesterona).

Neste período (195 a 222,5 dias), com a adição do estrógeno á cultura, houve um aumento na expressão de IDO em todas as células, exceto nos linfócitos TCD8.

Os Linfócitos TCD3, TCD4 e os linfócitos B (CD25) aumentaram a expressão da IDO quando submetidos ao interferon γ , no entanto, os linfócitos TCD8 e as células NK não apresentaram alterações significativas na expressão da enzima após a suplementação com a citocina (interferon γ).

Figura 1 - Exemplos de aquisições realizadas no período de 24 horas para as células controle nas diferentes fases gestacionais.

Figura 2 - Exemplos de aquisições realizadas no período de 24 horas com adição de progesterona (P) nas diferentes fases gestacionais

90 dias Linfócitos T
(CD3)

150 dias Linfócitos T
(CD3)

222,5 dias Linfócitos T
(CD3)

90 dias Linfócitos T
(CD4)

150 dias Linfócitos T
(CD4)

222,5 dias Linfócitos T
(CD4)

90 dias Linfócitos T
(CD8)

150 dias Linfócitos T
(CD8)

222,5 dias Linfócitos T
(CD8)

90 dias Linfócitos B
(CD25)

150 dias Linfócitos B
(CD25)

222,5 dias Linfócitos B
(CD25)

90 dias Células NK
(CD335)

150 dias Células NK
(CD335)

222,5 dias Células NK
(CD335)

Figura 3 - Exemplos de aquisições realizadas no período de 24 horas com adição de estrógeno (E) nas diferentes fases gestacionais

90 dias Linfócitos T
(CD4)

150 dias Linfócitos T
(CD4)

222,5 dias Linfócitos T
(CD4)

90 dias Linfócitos T
(CD8)

150 dias Linfócitos T
(CD8)

222,5 dias Linfócitos T
(CD8)

90 dias Linfócitos B
(CD25)

150 dias Linfócitos B
(CD25)

222,5 dias Linfócitos B
(CD25)

90 dias Células NK
(CD335)

150 dias Células NK
(CD335)

222,5 dias Células NK
(CD335)

Figura 4 - Exemplos de aquisições realizadas no período de 24 horas com adição de interferon (I) nas diferentes fases gestacionais

87,5 dias Linfócitos T
(CD4)

157,5 dias Linfócitos T
(CD4)

222,5 dias Linfócitos T
(CD4)

87,5 dias Linfócitos T
(CD8)

157,5 dias Linfócitos T
(CD8)

222,5 dias Linfócitos T
(CD8)

87,5 dias Linfócitos B
(CD25)

157,5 dias Linfócitos B
(CD25)

222,5 dias Linfócitos B
(CD25)

87,5 dias Células NK
(CD335)

157,5 dias Células NK
(CD335)

222,5 dias Células NK
(CD335)

7 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que a expressão de IDO é influenciada pelos fatores adicionados experimentalmente às culturas. Verificou-se que tais hormônios (progesterona e estrogênio) e o interferon- γ , alteram a expressão de IDO nas diferentes idades gestacionais, sugerindo a participação destes compostos em mecanismos de imunorregulação são, ainda não totalmente esclarecido, nas células da região uteroplacentária.

O interferon- γ , uma citocina produzida por leucócitos com perfil Th1, grupo celular responsável por favorecerem uma resposta pró-inflamatória, é conhecida por estimular a expressão de IDO em vários tipos celulares, incluindo os leucócitos, em que se liga especificamente à região do gene que promove a transcrição da proteína (YOSHIDA et al., 1981; YASUI et al., 1986; LIANG et al., 2006).

O efeito mais interessante relacionado ao interferon- γ foi a elevação da expressão de IDO nos linfócitos TCD8 no período inicial da gestação (67, 5 à 77,5 dias). Sabe-se que os linfócitos TCD8 são altamente agressivos em sua resposta a um agente não próprio (TIZARD, 2009), que é o caso do embrião ao se implantar na parede uterina, pois o mesmo possui moléculas de MHC paternas que são, potencialmente, reconhecidas pelo organismo materno como um agente não próprio, podendo desencadear uma resposta imunológica materna contra o embrião, em que os linfócitos TCD8 podem causar sérias lesões ao alo enxerto.

A presença da IDO neste tipo celular, logo nos estágios iniciais da gestação, no período em que o embrião entra em contato com o sistema imunológico materno torna-se muito interessante para a sobrevivência do conceito, pois a IDO pode levar os linfócitos T CD8 à apoptose, bem como as células imunológicas que estão ao seu redor, sugerindo um controle da resposta imunológica desencadeado pela citocina pró-inflamatória, o interferon- γ .

Nas células provenientes da gestação com idade avançada (195 à 222,5 dias) o interferon- γ elevou a expressão de IDO nos linfócitos TCD3, TCD4 e linfócitos B, não causando alterações significativas nos linfócitos TCD8. Nesse período gestacional o conceito já está bastante desenvolvido e, já entrou em contato com o sistema imunológico materno a um certo tempo, em que a resposta imunológica materna aguda contra o alo enxerto pode ser branda devido a diminuição dos

linfócitos TCD8 nos períodos anteriores a este, causada pela expressão da IDO neste grupo celular. Além disso, a espécie bovina apresenta uma placenta sinepiteliocorial cotiledonária, onde se encontra pontos de adesão entre o cório alantoide e o endométrio, sendo assim, ocorre um pequeno grau de invasão de células de fetais no tecido materno propondo a necessidade de tolerância imunológica materna para que não aconteça a rejeição fetal.

O aumento da IDO nos linfócitos TCD3 e TCD4 pode ser causado indiretamente pelas células apresentadoras de antígenos, pois sabe-se que estão presentes nessa região durante todo processo gestacional. (VALENTE et al, 1992.; TENBROCK; TENBROCK, 2011). Quando estimuladas pelo interferon- γ principalmente as células dendríticas, irão estimular os linfócitos TCD4 pela ligação das moléculas de B7, presentes nas DCs, com as moléculas de CTLA4, presente nos LTCD4 (PALAFOX et al., 2010; HARDEN; EGILMEZ, 2012). Dessa maneira, com a presença da IDO nos linfócitos TCD4, as células ao redor entrariam em apoptose devido à falta de triptofano e aos catabólitos tóxicos gerados pela sua quebra, atenuando a reposta imunológica na região da interface materno fetal.

O estrógeno, um hormônio em altas concentrações durante a gestação (ØSTENSEN, 1999), possui efeitos específicos sobre as células T e B, participando da proliferação e da diferenciação destas células (LEANÕS- MIRANDA et al., 2001). Nos animais com gestação mais adiantada a concentração estrogênica é bastante elevada, por isso, o seu efeito nas células imunológicas, estudadas neste trabalho, é mais elevado nos animais com idade gestacional avançada. Após a adição do estrógeno às culturas de células de animais com idade gestacional entre 195 à 222,5 dias a expressão de IDO foi alterada, em que o estrógeno elevou a expressão da enzima em todos os tipos celulares analisados, exceto no linfócito TCD8, que pode ter entrado em apoptose devido à ação da IDO nas outras células, privando, como consequência, o linfócito TCD8 do triptofano, fazendo com que os mesmos não apresentassem alteração perante a expressão da enzima.

Conforme visto com as análises deste trabalho, o estrógeno, no início da gestação, diminui a expressão da enzima em todos os tipos celulares. Este fato torna-se bastante relevante quando voltamos à atenção para a ação do estrógeno nas células imunológicas, em que é responsável por causar alterações na produção de citocinas (BARRERA; AVILA; DIAS, 2007), podendo desencadear respostas imunológicas diferenciadas, de acordo com a necessidade do momento. Levando

em conta o início da gestação e a alta resposta inflamatória devido à implantação embrionária, tal hormônio pode agir como um regulador na expressão desta enzima, pois apesar da diminuição da sua expressão, conforme visto neste trabalho, a mesma não para de ser produzida totalmente, podendo ser estimulada por algumas citocinas anti-inflamatórias produzidas por células imunológicas estimuladas pelo estrogênio, no entanto, tais citocinas, não causam uma alta expressão da enzima se comparadas a ação de citocinas pro-inflamatórias, como o interferon- γ .

Durante a gestação, especificamente nos períodos finais, o estrogênio está em altas concentrações no organismo materno. Um fato importante, considerando as células precursoras da resposta imunológica primária é que a alta concentração de estrogênio faz com que as células dendríticas imaturas tornem-se maduras com grande rapidez, principalmente pelo estímulo aos receptores CD86, presente nas DCs (SPAGGIARI et al., 2009). Com uma alta concentração de células dendríticas, na região uteroplacentária, poderia haver o desenvolvimento de uma resposta imunológica bastante severa contra o alo enxerto, no entanto, apesar de o estrogênio estimular o amadurecimento das DCs, o mesmo age para contrabalancear esta reação inflamatória que as DCs poderiam causar, estimulando, também, a expressão de IDO nas DCs, controlando o mecanismo inflamatório nessa região.

Nas células NK de animais com 92 à 172 dias de gestação, sofreram uma elevação na expressão de IDO quando submetidas ao tratamento com o estrogênio. Sabe-se que na presença deste hormônio, as células NK têm a sua ação diminuída, ou seja, elas perdem a capacidade de cito toxicidade (MELLOR; MUNN, 2001). Sugere-se que haja a existência de uma relação entre a presença de IDO e a perda da função das células NK, ou seja, pode ser que a expressão de IDO seja estimulada pelo estrogênio nessas células, com isso, a enzima vai quebrar o triptofano, impedindo a proliferação e a ação das células NK, bem como das células que estão presente neste micro ambiente.

A progesterona um hormônio de atuação na manutenção da gestação em humanos e animais (STECKEL et al., 2003), também é capaz de induzir a expressão da IDO nas células presentes no ambiente uterino-placentário (BARREIRA; ÁVILA; DIAS, 2007). Uma das suas funções é a proteção do concepto contra o ataque do sistema imune materno por inibição de células T (SIITERI et al., 1977; PELTIER, 2003; STECKEL et al., 2003; LIGAM et al., 2005), também inibe

diretamente a estimulação da resposta imuno-endócrina através da sua interação com receptores de membrana (PELTIER, 2003).

Conforme visto neste trabalho, a ação da progesterona não causa elevações significativas sob a expressão de IDO nas células das diferentes idades gestacionais analisadas. Porém, um fato bastante relevante é a manutenção da expressão da IDO em todas as células analisadas, ou seja, a progesterona pode não elevar a expressão de IDO mas pode ser responsável por manter sempre em níveis controlados, necessários para a manutenção da gestação.

A ação da progesterona nas células imunológicas é bastante conhecida, como nas células dendríticas, em que estimula o amadurecimento das DCs imaturas (LIANG; SUN; WANG; HOU, 2006). Tais células não são capazes de estimular os linfócitos T diretamente, no entanto terminam o seu amadurecimento em um linfonodo regional, fagocitando um antígeno, que pode ser proveniente do embrião, e apresentam, via MHC, para as células T, induzindo a diferenciação dos linfócitos Th0 em Th1 ou Th2, dependendo do estímulo, que no início da gestação, pode ser um estímulo pró-inflamatório, devido a implantação embrionária. Com isso, citocinas pró-inflamatórias serão produzidas, podendo estimular a expressão de IDO nas células presentes neste microambiente.

Ainda, se o estímulo for anti-inflamatório, a progesterona estimula a produção da citocina TGF- β que também é capaz de estimular a produção de IDO pela via não canônica (NFkB), perpetuando a expressão da enzima (BARRERA; AVILA; DIAS, 2007).

Contudo, a expressão da enzima foi verificada em todos os períodos gestacionais, em maior ou em menor quantidade. Os fatores adicionados às culturas podem alterar a expressão da enzima, nos mostrando que fazem parte de uma rede intrincada de mecanismos que controlam a reação imunológica na região da interface materno-fetal, colaborando com a tolerância ao feto semi-alógeno. A presença da IDO em todos os períodos gestacionais mostra a sua importância nos mecanismos de tolerância, no entanto, sabe-se que existem inúmeros outros mecanismos que colaboram com a tolerância materno-fetal e que todos esses mecanismos devem agir em conjunto para levar uma gestação a termo.

Por fim, para compreender como ocorre a modulação da expressão da IDO nas células imunológicas são necessários mais estudos relacionados à mecanismos de

ativação e inibição desta enzima, em regiões que é altamente expressa, como na interface materno fetal e na maioria dos tumores.

No caso dos bovinos, estes que são animais essenciais e extremamente úteis para o estudo dos efeitos modulatórios da IDO no que se refere às modificações celulares e funcionais no período gestacional, pois são animais de grande interesse e importância na pecuária do país com altos índices de produção de carne e leite, e também os problemas reprodutivos, como o aborto que podem estar relacionados à rejeição fetal.

8 CONCLUSÃO

A IDO foi enunciada em todos os tipos celulares, contudo só algumas células responderam de maneira positiva aos fatores empregados.

Os linfócitos B (CD25) foram os mais sensíveis em relação a estrógeno, ou seja, foi o tipo celular que mais elevou a expressão da IDO.

A progesterona foi o fator que diminuiu a expressão da IDO nos linfócitos T (CD3, CD4) e as células NK.

Dentre os fatores utilizados o interferon- γ foi o fator que aumentou a expressão da IDO em todos os tipos celulares analisados, mesmo que em algumas células este aumento tenha sido discreto.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LITCHTMAN, A. H.; PILAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6. ed. Philadelphia: Editora Saunders, 2007.

ABBAS, A. K.; LITCHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 560 p.

ABBAS, A. K.; LITCHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **General properties of immune response: cellular and molecular immunology**. 3rd ed. Philadelphia: Abbas, AK; 1997. p. 4-33.

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.

ALMEIDA, J. M. **Embriologia veterinária comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 176 p.

ALVES, C.; VEIGA, S.; TORALLES, M. P. B.; LOPES, A. C. V. O papel do complexo principal de histocompatibilidade na fisiologia da gravidez e na patogênese de complicações obstétricas. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 7, p. 357-363, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES – ABIEC. **Rebanho bovino brasileiro**. 2014. Disponível em: <http://www.abiec.com.br>. Acesso em: 23 out 2014.

BALL, H. J.; YUSA, 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.

BAMBERGER, A. M.; SUDAHL, S.; BAMBERGER, C. M.; SCHULTE, H. M.; LONING, T. Expression Patterns of the cell- cycle inhibitor p27 and the Cell-cycle promoter Cyclin E in the human placenta throughout gestation: Implication for the control of proliferation. **Placenta**, n. 20, p. 401-406, 1999.

BARRERA, D.; AVILA, E.; DIAS, L. Papel imunológico de la progesterone em el mantenimiento del embarazo. **Revista de Investigación Clínica**, v. 59, p. 139-145, 2007.

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.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Bovinos e bubalinos**. 2011. Disponível em: [http:< www.agricultura.gov.br>](http://www.agricultura.gov.br) . Acesso em: 20 mar. 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Bovinos e bubalinos**. 2014. Disponível em: [http:< www.agricultura.gov.br>](http://www.agricultura.gov.br) . Acesso em: 30 nov. 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Exportação de bovinos**. 2013. Disponível em: [http:<www.agricultura.gov.br>](http://www.agricultura.gov.br) . Acesso em: 23 out. 2014.

BROLIO, M. P.; AMBRÓSIO, C. E.; FRANCIOLLI, A. R.; MORINI, A. C.; GUERRA, R. R.; MIGLINO, M. A. A barreira placentária e sua função de transparência nutricional. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 222-232, out/dez. 2010.

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

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.

CONCANNON, P. W. Canine pregnancy and parturition. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 16, n. 3, p. 453-475, 1986.

CONLEY, A.; HINSHELWOOD, M. Mammalian aromatases. **Reproduction**, v. 21, p. 685- 695, 2001.

CORREIA- DA- SILVA, G.; BELL, S. C.; PRINGLE, J. H.; TEIXEIRA, N. A. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. **Placenta** , n. 25, p. 538-547, 2004.

COSTANZO, L. S. **Fisiologia da reprodução. Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 361-378.

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.

DEALTRY, G. B.. O'FARRELL, M. K.; FERNANDEZ, N. The Th2 cytokine environment of the placenta. **International Archives Allergy Immunology**, v. 123, p. 107-119, 2000.

DOBSON, H.; ROWAN, T. G.; KIPPAX, I. S.; HUMBLLOT, P. Assessment of fetal, number, and fetal and placental viability throughout pregnancy in cattle. **Theriogenology**, v. 40, p. 411- 425, 1993.

DOSIOU, C.; GIUDICE, L. C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. **Endocrine, Reviews**, n. 26, p. 44-62, 2005.

ERICKSSON, 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.

FELICIANO, M. A. R.; AQUINO, A. A.; COUTINHO, L. N.; VICENTE, W. R. R. Imunologia na gestação de cadelas: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 3, p. 158-162, 2012.

FERNANDES, V. M.; ALOIA, T. P. A.; WILL, S. E. A. L.; AMBRÓSIO, C. E.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MIGLINO, M. A.; RICI, R. E. G. Comparação da imunolocalização de receptores de progesterona em placentas de bovinos normais e clonados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 3, p. 194 -198, 2012.

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. 670p.

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.

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.

HAFEZ, E. S. E. Inseminação artificial. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; ROSNINA, Y. Ciclos reprodutivos. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 33-54.

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

HANUKOGLU, I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 43, p. 779-804, 1992.

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

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.

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. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, p. 10863-10879, 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.

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.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da pecuária Municipal Rio de Janeiro - 38:65**. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> . Acesso em: 20 mar. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção Animal no 4º trimestre de 2013**. 2014. Disponível em:< <http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 23 out. 2014.

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

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia-o sistema immune na saúde e na doença**. 5. ed. Artmed, 2002.

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.

KAUFMANN, P. Vergleichend-anatomische und funktionelle Aspekte des Placenta-Baues, Funkt. **Biology and Medicine**; n. 2, p. 71-79, 1983.

KAWANO, T.; CUI, J.; KOEZUKA, Y.; TOURA, I.; KANEKO, Y.; SATO, H.; KONDO, E.; HARADA, M.; KOSEKI, H.; NAKAYAMA, T.; TANAKA, Y.; TANIGUCHI, M. Natural Killer-like non-specific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated v14 NKT cells. **Proceedings of the National Academy Sciences**, n. 95, p. 5690-5693, 1998.

KINDHAL, H.; KORNMATITSUK, B.; KÖNIGSSON, K.; GUSTAFSSON, H. Endocrine changes in late bovine pregnancy with special emphasis on fetal well-being. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 321-328, 2002.

KING, A.; BIRKBY, C.; LOKE, Y. M. Early human decidual cells exhibit NK activity against the K 562 cell line but not against first trimester trophoblast. **Cellular Immunology**, v. 118, n. 2, p. 337-344, 1989.

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.

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.

LEAÑOS-MIRANDA, A.; PASCOE-LIRA, D.; CHÁVEZ-RUEDA, K. A.; BLANCO-FAVELA, F. Persistence of macroprolactinemia due to antiprolactin autoantibody before, during, and after pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, n. 86, p. 2619-2624, 2001.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 122-34, 1994.

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

LIGAM, P.; MANUELPILLAI, U.; WALACE, 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.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; ROBINSON, R. S.; WATHES, D. C. The regulation of interferon- τ production and uterine hormone receptors during pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 317-328, 1999. Supplement.

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.

McCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 79, p. 263-324, 1999.

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

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.

MIGLINO, M. A. **Pesquisa Anatômica sobre artéria e veias do cordão umbilical, sua ramificação e disposição na placenta de bovinos**. 1991. 303 p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

MOFFET – KING, A. Natural killer and pregnancy. **Nature Reviews Immunology**, n. 2, p. 656-663, 2002.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 7. ed. Elsevier, 2008. 376 p.

MOR, G. **Immunology of pregnancy**. New York: Springer, 2006. 322 p.

MOR, G.; CARDEANS, I.; ABRAHAMS, V.; GULLER, S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1221, p. 80-87, 2011.

MOSSMAN, H. W. **Vertebrate fetal membranes**: Comparative ontogeny and morphology, evolution, phylogenetic significance, basic functions, research opportunities. London: MacMillan Press, 1987.

MULDER, J. E. Thyroid disease in women. Women's health issue, part I. **Medical Clinics of North America**, n. 82, p. 103-125, 1998.

MUNN, D. H.; ZHOU, M.; ATTWOOD, J. T.; BOMDAREV, 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.

MUSSI –PINHATA, M. M.; REGO, M. A. Particularidades imunológicas pré-termo extremo: um desafio para prevenção da sepse hospitalar. **Jornal de Pediatria**, n. 81, p. S59-S68, 2005. Suplemento.

NEVES, C.; MEDINA, J. L.; DELGADO, J. L. Alterações endócrinas e imunomodulação na gravidez. **Arquivos de Medicina**, v. 21, n. 5/6, p. 175-182, 2007.

NOGUEIRA, A. A.; MUSTEFAGA, P. S. Mercado nacional e internacional de carne bovina. In: SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA DE CORTE, 5., 2004, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2004. p. 85-87.

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

ØSTENSEN, M. Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 22, n. 876, p. 131-143, 1999.

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

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

PEREIRA, A. C.; LIMA, M. C. B. S.; JESÚS, N. R.; FRANÇA, M. M.; NAHUM JUNIOR, H. S.; LEVY, R. A. Estudo-piloto: células NK nas gestantes com LES. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 4, p. 387-401, 2009.

PFARRER, C.; WEISE, S.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; LEISES, R.; HOFFMANN, B.; SHULLER, G. Fibroblast growth factor (FGF) -1, FGF receptors are uniformly Expressed in trophoblast giant cells during restricted trophoblast invasion in cows. **Placenta**, n. 27, p. 758-770, 2006.

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

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

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.

REDMER, D. A.; WALLACE, J. M.; REYNOLDS, L. P. Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. **Domestic Animal Endocrinology**, n. 27, p. 199-217, 2004.

RICHARDS, A. S. Hormonal control of gene expression in the ovary. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 6, p. 725-751, 1994.

RIQUELME, G. Placental chloride channels: a review. **Placenta**, v. 30, p. 659-669, 2009.

ROSENFELD, C. S.; WAGNER, J. S.; ROBERTS, R. M.; LUBAHN, D. B. Intraovarian actions of oestrogen. **Reproduction**, v. 122, p. 215-236, 2001.

RUDIN, C. M.; THOMPSON, C. B. B-Cell development and maturation. **Seminars in Oncology**, v. 25, n. 4, p. 435-446, 1998.

SARAFANA, S.; COELHO, R.; NEVES, A.; TRINDADE, J. C. Aspectos da imunologia da gravidez. **Acta Médica Portuguesa**, n. 20, p. 355-358, 2007.

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

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.

SCHWARZE, E.; SCHRÖDER, L. **Compêndio de anatomia veterinária**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1970. v. 3, p. 33-34,

SIITERI, P. K.; FEBRES, F.; CLEMENS, L. E. Progesterone and maintenance of pregnancy: is progesterone nature's immunosuppressant ? **Annual NY Academical Science**, v. 286, n. 11, p. 384-397, 1977.

SOMPARAYRAC, L. **How the immune system works**. Malden, M.A: Blackwell Science, 1999.

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 indoleamina 2,3 dioxygenase and prostaglandin E2. **Blood**, v. 111, p. 1327-1333, 2008.

STECKEL, N. K.; KUHN, U.; BEELEN, D. W.; ELMAAGACLI, A. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance ? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 57, p. 185-19, 2003.

SZEKERES- BARTHO, J. Immunological relationship between the mother and the fetus. **International Reviews of Immunology**, v. 21, p. 471-495, 2002.

SZEKERES-BARTHO, J.; POLGAR, B.; KOZMA, N.; MIKO, E.; PAR, G.; SZEREDAY, L.; BARAKONYI, A.; PALKOVICS, T.; PAPP, O.; VARGA, P. Progesterone-dependent immunomodulation. **Chemical Immunology Allergy**, n. 89, p. 118-125, 2005.

SZYPER-KRAVITZ, M.; ZANDMAN-GODDARD, G.; LAHITA, R. G.; SHOENFELD, Y. The neuroendocrine-immune interactions in systemic lupus erythematosus: A basis for understanding disease pathogenesis and complexity. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, n. 31, p. 161-175, 2005.

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

TENBROCK, K. O.; TENBROCK, K. Inflammatory cytokines in systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1-14, 2011;

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

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

USDA. **Livestock and poultry**: word market and trade circular archives. 2013. Disponível em:< [http: www.fas.usda.gov](http://www.fas.usda.gov)>. Acesso em: 24 out. 2014.

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.

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.

VEGETO, E.; BONINCONTRO, C.; POLLIO, G.; SALA, A.; VIAPPIANI, S.; NARDI, F.; BRUSARELLI, A.; VIVIANI, B.; CIANA, P.; MAGGI, A. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 6, p. 1809–1818, 2001.

WOOD, C. E. Control of parturition in ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 54, p. 115-126, 1999.

YASUI, H.; TAKAI, K.; YOSHIDA, R.; HAYAISHI, O. O Interferon γ enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3 dioxygenase: it's possible occurrence in cancer patients. **Proceeding 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.; HAYASHI, O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3 dioxygenase by interferon γ . **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 129-132, 1981.

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.