

JANAÍNA MUNUERA MONTEIRO

O PAPEL DA HSP 60 NAS CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS DA PLACENTA BOVINA

São Paulo

2009

JANAÍNA MUNUERA MONTEIRO

O Papel da HSP 60 nas células leucocitárias da placenta bovina

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior

São Paulo

2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2196
FMVZ

Monteiro, Janaína Munuera
O papel da HSP 60 nas células leucocitárias da placenta bovina
/ Janaína Munuera Monteiro. – 2009.
219 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior.

1. Placenta. 2. Bovinos. 3. HSP 60. 4. Proliferação. 5. Fagocitose.. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1	2	220	219 f.
Abstract	1	2	220	219 f.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

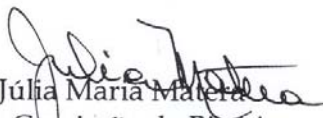
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Papel da heat shock protein (HSP) 60 nas células leucocitárias da placenta bovina", protocolo nº 834/2006, utilizando 30 (trinta) placentas de bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "The role of heat shock protein (HSP) 60 in leucocytes cells of bovine placenta", protocol number 834/2006, utilizing 30 (thirty) bovine's placenta, under the responsibility of Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 13 de fevereiro de 2006


Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Malena
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MONTEIRO, Janaína Munuera

Título: O papel da HSP 60 nas células leucocitárias da placenta bovina

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

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

“Nada no mundo consegue tomar o lugar da persistência. O talento não consegue; nada é mais comum que homens fracassados com talento. A genialidade não consegue; gênios não recompensados é quase um provérbio. A educação não consegue; o mundo é cheio de errantes educados. A persistência e determinação sozinhas são onipotentes.”

(Calvin Coolidge)

*Amor é fogo que arde sem se ver;
É ferida que dói e não se sente;
É um contentamento descontente;
É dor que desatina sem doer;*

*É um não querer mais que bem querer;
É solitário andar por entre a gente;
É nunca contentar-se de contente;
É cuidar que se ganha em se perder;*

*É querer estar preso por vontade;
É servir a quem vence, o vencedor;
É ter com quem nos mata lealdade.*

*Mas como causar pode seu favor
Nos corações humanos amizade,
Se tão contrário a si é o mesmo Amor?*

(Luís de Camões)

*Ao meu esposo Sílvio Monteiro,
Dedico essa tese à você pelo companheirismo,
pela compreensão e pelo amor durante todos
esses anos de convivência.*

Eu te amo...

A minha mãe Tânia Munuera,

*“A paz não é um período de tempo,
mas uma forma de vida”*

(Antônio Lisboa de Carvalho)

Dedico essa tese a você por ter me ensinado o verdadeiro valor da vida.....

*A minha irmã Tatiana Munuera Cunha, Dedico
essa tese à você pela grande admiração que tenho da sua
força de vontade e determinação.*

Nunca desistir de sonhar!!!!

Amo muito você!!!!

“Imagine uma nova história para sua vida e acredite nela”

(Paulo Coelho)

Agradecimentos

A DEUS por ter me dado grandes oportunidades.

Ao Departamento de Cirurgia – Setor de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

A professora Dra. Maria Angélica Miglino por ter me recebido de braços abertos em seu departamento. Muito obrigada pela confiança e oportunidade.

Ao meu orientador Dr. José Roberto Kfoury Jr, pela orientação e por disponibilizar seu laboratório para a realização desse trabalho.

A minha querida amiga Professora Dra. Flávia Thomas Verechia (Unesp-Dracena) principalmente pela amizade a cima de tudo....sem palavras pra você querida!!!!

Ao queridíssimo Professor Dr. Durvanei Augusto Maria (Instituto Butantan), pelo exemplo de pesquisador e professor (caráter e determinação). “Quero ser assim quando crescer...”

A querida Professora Dra. Maristela Camargo (ICB-IV/USP) pela colaboração intelectual, pela compreensão e pela força para a realização desse trabalho. Um ícone de conhecimento na área da imunologia...

A querida amiga Dra. Cris Massoco pelas palavras de ajuda, pela paciência e pelo carinho nas horas de desespero. Meiguice e elegância para conversas sérias...

A equipe do laboratório (LTIAM): Rosemary Viola Bosch, Thaís Martins Chucri, Ana Rita de Lima, Renata Stecca Iunes. Nas horas mais difíceis e complicadas....que dá vontade de desistir....foram as horas de maior união do grupo. Não consigo encontrar palavras pra agradecer...OBRIGADA!!!

Em especial a Rosemary Viola Bosch pelo apoio incansável e pelo incentivo desde o início desse projeto. Aprendi muito com você, no dia a dia a ser mais persistente, a ter mais confiança e acreditar em mim (principalmente na apresentação de seminários). Você é muito especial!!!!

A Lílian de Jesus Oliveira, pelo apoio mesmo de longe acompanhando passo a passo a realização de mais um árduo trabalho. Muuuuito obrigada! Você mora no meu coração....sempre...

As minhas queridíssimas amigas da anatomia: Renata Mari de Brito, Juliana Plácido Guimarães e Fernanda Agreste Rodrigues. Obrigada pela força, conselhos, apoio, companheirismo, fidelidade, amizade!!!

Ao meu padrasto José Caldas Barbosa pelo amor, compreensão e pelo cuidado especial dado a minha mãe.

A nova integrante e amiga do LTIAM, revisora desse trabalho Maria Leticia Salvadori. Obrigada pela nova amizade...

Aos meus queridos amigos da patologia pelo ensinamento dos protocolos testados e realizados e pela paciência que foram essenciais para a concretização desse projeto: Mônica Sakai, Karin Kieling, Andréa Latorre e Bruno Cogliati Sem vocês esse projeto não se realizaria...

A Professora Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara (VCM/pequenos-FMVZ) por acreditar em mim. Obrigada pela oportunidade oferecida.

Aos meus amigos enfermeiros dos Hovet/USP Otávio Rodrigues dos Santos e Jesus dos Anjos vieira, vocês são demais! Muito obrigada pela ajuda durante a correria desse trabalho.

Aos meus queridos amigas da clínica de ruminantes: Fernando N. Souza, Fernanda Cirilo e Milton Ricardo Azedo (VCM/ruminantes-FMVZ).

A Professora Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera (VCM/ruminantes-FMVZ) por ceder as vacas do Hospital de Ruminantes para as coletas de sangue.

A querida Dna. Marianna Viola pelas orações.....como me ajudaram!!! Obrigada!

Aos amigos da pós-graduação: Camila, Adriana Morini, João Morini, André Francioli, Gerlane de Medeiros Costa, Caio, Alex Santos, Thiago Aiola..

Aos residentes do Hospital de ruminantes pelas coletas de sangue (mesmo nos domingos e feriados): Camila, Juliana, Laura, Bruna Parapinski dos Santos, Paulo Afonso Barquet Carneiro e Fernanda Moda Piva.

Aos motoristas Marcelo Miguel Ribeiro, João Batista da Silva, Evaldo Gomes Laurentino, Cláudio Roberto Magro e Edson de Oliveira pelo companheirismo e cuidado durante todas as viagens para São José dos Campos.

*Aos meus queridos amigos **Benedito Devanei e Elizete da Silva** (Interprise) pela amizade, e pela prontidão e compromisso nos pedidos de materiais, reagentes e anticorpos utilizados nesse trabalho. Vocês são demais....prova viva de competência!!!*

*A família Monteiro, **Márcia, Maurício, Igor** e em especial **Dona Ignês e Sr. Francisco**. AMO vocês...*

*Ao meu querido professor e padrinho **Dr. Carlos Alberto Zican** pelos conselhos e por estar sempre ao meu lado. Você mora no meu coração!*

*Aos meus vizinhos **Renata Shapira Bastos e Adriano Bastos** pela amizade e pelo carinho.*

*A todos os funcionários do Frigorífico Mantiqueira (São José dos Campos – SP), principalmente, **Roberto, “Tonho”, “Fedido”, Luis, André, Paulo César e Dr. Aleimar**, pelas amostras cedidas e pela ajuda nos dias de coleta.*

*Aos técnicos dos laboratórios do departamento: **Diogo Palermo, Ronaldo Agostinho e Ednaldo Farias** (Índio) pela convivência.*

*Aos secretários do departamento: **Maicon Barbosa da Silva e Jaqueline Martins de Santana e Claudinha Lima** (pós-graduação) pelo apoio nas horas de sufoco.*

*As queridas “meninas” **Bernardete Ribeiro da Silva e Rozelita Pereira dos Reis**. Por cuidarem tão bem do laboratório. Muito obrigada!!!*

*Às vaquinhas do hospital de ruminantes que me cederam o sangue durante parte do processamento desse trabalho: **Jade e a Maria Carolina**.*

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho. MUITÍSSIMO OBRIGADO.

A amizade nasce no momento em que uma pessoa diz para outra: "O quê? Você também? Pensei que eu fosse o único!"

(Autor desconhecido)

RESUMO

MONTEIRO, J. M. **O papel da HSP 60 nas células leucocitárias da placenta bovina.**[The role of HSP 60 in leucocytes cells of bovine placenta]. 2009. 220 Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A tolerância materno-fetal envolve, além do sistema imune, muitas peculiaridades quanto ao tipo de placenta e placentação. A placenta em bovinos é considerada não invasiva, e como consequência de uma implantação superficial, sem invasão endometrial, se estabelece uma barreira placentária complexa que se interpõe entre a circulação materna e fetal. Aliado a isso, a placenta um órgão que se encontra em constante diferenciação e proliferação celular além da alta atividade metabólica, fontes constantes de estresse e desafio para o sistema imune. Atuando nesse contexto, destacamos as proteínas de choque térmico (heat shock proteins – HSP), proteínas que são expressadas em condições fisiológicas mas, em situações de estresse, sua expressão aumenta. Na placenta bovina já se constatou a expressão das HSP 60 e 70; contudo notou-se uma maior peculiaridade na expressão da HSP 60, que é maior no primeiro trimestre da gestação. Observando-se o perfil da presença e expressão dessa proteína na placenta bovina e, tendo em vista a característica desse órgão em apresentar populações leucocitárias funcionalmente distintas das do sangue periférico, levantou-se a hipótese da influência desta proteína sobre as células placentárias, particularmente sobre os leucócitos no processo de tolerância materno fetal. Desta forma, esse trabalho analisou a participação da HSP 60 em mecanismos imunes junto à alguns leucócitos placentários por meio de ensaio de proliferação pela técnica de CFSE, ensaio de fagocitose e ensaios bioquímicos como peroxidação lipídica; ciclo celular e potencial de membrana mitocondrial de células placentárias em cultivo. Nossos resultados mostraram que a HSP 60 não influencia a proliferação de linfócitos e outras células placentárias nas diversas condições testadas. Em contrapartida a HSP 60 aumenta a fagocitose e apoptose no terceiro terço gestacional, bem como a produção de radicais oxidados poliinsaturados e o potencial de membrana mitocondrial. Tendo em vista esses resultados, podemos observar que a HSP 60 nas células da placenta bovina possivelmente esteja modulando a cinética da ativação de mecanismos de sinalização de morte celular programada entre as células da placenta e o sistema imunológico. Esta hipótese assegura que, no conceito a termo, as variações hormonais e o sistema imune possam estar regulando o processo para o nascimento do feto.

Palavras chave: Placenta. Bovinos. HSP. Proliferação. Fagocitose.

ABSTRACT

MONTEIRO, J. M. **The role of HSP 60 in leucocytes cells of bovine placenta** [O papel da HSP 60 nas células leucocitárias da placenta bovina]. 2009. 220 Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The maternal-fetal tolerance involves, besides the immune system, many peculiarities regarding the type of placenta and placentation. The bovine placenta is considered not invasive and, as consequence of a superficial implantation without endometrial invasion, it establishes itself as complex barrier that interposes between the maternal and fetal circulation. In addition to that, placenta is an organ that undergoes continuous differentiation and cellular proliferation besides the high metabolic activity that represents a constant source of stress and challenge for the immune system. As an important component in this context, we highlight the heat shock proteins - HSP, that are usually expressed in physiological conditions but, in situations of stress, their expression increases. In the bovine placenta the expression of HSP 60 and 70 has already been verified; however HSP 60 showed a peculiar expression behavior, with higher staining in the first trimester of pregnancy. Considering the presence and expression profiles of HSP 60 in the bovine placenta allied to the particularity of presenting functional distinct leucocytes populations, a hypothesis was raised regarding the influence of this protein on the placental cells, particularly on the leucocytes in the process of fetal-maternal tolerance. Therefore, this work analyzed the role of HSP 60 in immune mechanisms related to some placental leucocytes by several approaches like proliferation assay by CFSE technique, phagocytosis assay and biochemical assays as lipoperoxidation; cell cycle phases and mitochondrial membrane potential of placental cells in culture. Our results showed that HSP 60 does not influence the proliferation of lymphocytes or any other placental cells in various conditions tested. On the other hand, HSP 60 increases phagocytosis and apoptosis in the third trimester, as well as the production of polyunsaturated oxide radicals and the mitochondrial membrane potential. In view of these results, we may infer that HSP 60 may be modulating the kinetics of activation mechanisms for signaling programmed cellular death between placental and immune cells. This hypothesis assures that, on the termed conceptus, the hormonal variation and the immune tolerance may be responsible for regulating the parturition process.

Key words: Placenta. Bovine. HSP. Proliferation. Phagocytosis.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Gráfico de barra da porcentagem de proliferação de células mononucleares do sangue periférico de vacas não gestantes e vacas gestantes nos três trimestres gestacionais. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma	80
Gráfico 2-	Gráfico de barra da porcentagem de proliferação de células mononucleares do sangue periférico de vacas não gestantes e vacas gestantes nos três trimestres gestacionais tratadas com HSP 60. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma.....	81
Gráfico 3-	Gráfico de barra da porcentagem de células fagocitárias do sangue periférico total de vacas do primeiro, segundo e terceiro terço gestacional. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma.....	95
Gráfico 4-	Gráfico de barra da porcentagem de células fagocitárias da placenta de vacas do primeiro, segundo e terceiro terço gestacional. O controle do sangue periférico de vaca não gestante. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma.....	96
Gráfico 5-	Gráfico de barra da porcentagem de células fagocitárias totais do sangue periférico e de células placentárias de vacas do primeiro, segundo e terceiro terço gestacional. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma	97
Gráfico 6-	Gráfico de barras expresso em nmoles/MDA de cultura de células placentárias e seus tratamentos de animais de segundo terço gestacional. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma.....	99
Gráfico 7-	Gráfico de barras expresso em nmoles/MDA de cultura de células placentárias e seus tratamentos de animais de terceiro terço gestacional. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma.....	100
Gráfico 8-	Gráfico em barras da porcentagem das fases do ciclo celular de células placentárias e seus tratamentos em animais do segundo e terceiro terço gestacional. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma	103
Gráfico 9-	Gráfico em barras da porcentagem das fases do ciclo celular de células placentárias de animais do segundo e terceiro terço gestacional tratadas com HSP 60. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma	104

Gráfico 10-	Gráfico em barras da porcentagem da população placentária de animais de segundo e terceiro terço gestacional, onde R1 e R2 viáveis e R3 marcadas com PI inviáveis ou mortas. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma	106
Gráfico 11-	Gráfico em barras da porcentagem do potencial da membrana mitocondrial de animais de segundo e terceiro terço gestacional, onde observam-se células ativas e células não ativas. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma	110
Gráfico 12-	Gráfico em barras da porcentagem da viabilidade celular de células placentárias representativo do terceiro terço gestacional, onde M1 viáveis com alto potencial mitocondrial e M2 inviáveis ou mortas com baixo potencial de membrana. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-	(A) Suspensão de células placentárias sobre o gradiente de densidade Ficoll-Paque®. (B) Formação do anel de células mononucleares (entre a suspensão celular e o gradiente de densidade). Nota-se abaixo um botão vermelho, referente aos glóbulos vermelhos.....	64
Figura 2-	O gráfico de Dot plot demonstra R 1 referente a região de linfócitos do sangue periférico bovino pela citometria de fluxo selecionado para análise de proliferação de células totais placentárias, células mononucleares do sangue periférico e do ensaio com sobrenadante.....	67
Figura 3-	(A) Dot plot das células totais da placenta bovina representativo de animal de segundo terço. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo).....	68
Figura 4-	(A) Dot plot das células totais da placenta bovina representativo de animal de segundo terço. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo).....	68
Figura 5-	(A) Dot plot das células totais da placenta bovina representativo de animal de segundo terço. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo).....	69
Figura 6-	(A) Dot plot das células totais da placenta bovina representativo de animal de terceiro terço. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo).....	69
Figura 7-	(A) Dot plot das células totais da placenta bovina representativo de animal de terceiro terço. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo).....	70
Figura 8-	(A) Dot plot das células totais da placenta bovina representativo de animal de terceiro terço. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo).....	70

Figura 9-	(A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)	73
Figura 10-	(A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)	74
Figura 11-	(A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico tratadas com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo)	74
Figura 12-	(A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante células totais de placenta representativo de animal de segundo terço sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)	75
Figura 13-	(A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante células totais de placenta representativo de animal de segundo terço estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)	75
Figura 14-	(A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante células totais de placenta representativo de animal de segundo terço tratadas com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo)	76
Figura 15-	(A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante células mononucleares representativo de animal de terceiro terço sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)	76

Figura 16-	(A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante células mononucleares representativo de animal de terceiro terço estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)	77
Figura 17-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas não gestantes sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo).....	77
Figura 18-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas não gestantes sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo).....	82
Figura 19-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas não gestantes estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo).....	82
Figura 20-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas não gestantes tratadas com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo)	83
Figura 21-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas não gestantes tratadas com HSP 60 + ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 + ConA (Programa de análise Flow Jo)	83
Figura 22-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas gestante de primeiro terço sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)	84
Figura 23-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas gestante de primeiro terço estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)	84

Figura 24-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de primeiro terço tratadas com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo).....	85
Figura 25-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de primeiro terço tratadas com HSP 60 + ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 + ConA (Programa de análise Flow Jo).....	85
Figura 26-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de segundo terço sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)	86
Figura 27-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de segundo terço estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)	86
Figura 28-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de segundo terço tratadas com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo).....	87
Figura 29-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de segundo terço tratadas com HSP 60 + ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 + ConA (Programa de análise Flow Jo).....	87
Figura 30-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de terceiro terço sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)	88
Figura 31-	(A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de terceiro terço estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)	88

- Figura 32- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de terceiro terço tratadas com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo).....89
- Figura 33- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de terceiro terço tratadas com HSP 60 + ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 + ConA (Programa de análise Flow Jo).....89
- Figura 34- Gráfico em Dot Plot adquirido pelo programa *Cell-Quest* em (A) controle positivo do sangue periférico total de uma vaca não gestante (B) região de fagocitose (FL-2/PI) de células tratadas com HSP 60 e analisado no programa Flow Jo.....93
- Figura 35- Gráfico em Dot Plot adquirido pelo programa *Cell-Quest* em (A) controle positivo do sangue periférico total de uma vaca gestante representativo de terceiro terço (B) Região de fagocitose (FL-2/PI) de células tratadas com HSP 60 e analisado no programa de análise Flow Jo93
- Figura 36- Gráfico em Dot Plot adquirido pelo programa *Cell-Quest* em (A) controle positivo de células totais de placenta representativo de um animal de terceiro terço gestacional (B) Região de fagocitose (FL-2) de células tratadas com HSP 60. Programa de análise Flow Jô94
- Figura 37- Gráfico em Dot Plot o ciclo celular da cultura após 72 horas de células placentárias representando animais de segundo (A) e terceiro (B) terço gestacional. Programa de análise *Cell Quet-Pro*.....102
- Figura 38- Gráfico em Dot Plot representativo de populações de animais de segundo (A) e terceiro (B) terço gestacional, onde R1 e R2 são viáveis e R3 marcadas com PI inviáveis ou mortas. Programa de análise *Cell Quest*105
- Figura 39- Gráfico de histograma representativo das populações celulares placentárias de animais de segundo (A) e terceiro (B) com diferentes potenciais da membrana mitocondrial M1 viáveis e ativas e M2 inviáveis. Programa de análise *Cell Quet – Pro*.....108
- Figura 40- Gráfico de histograma representativo das populações celulares de animais do segundo (A) e terceiro (B) terço gestacional com diferentes potenciais da membrana mitocondrial M1 viáveis e ativas e M2 inviáveis (traço em rosa) *overlay* com o controle (traço em verde). Programa de análise *Cell Quest-Pro*108

Figura 41- Gráfico em Dot Plot representativo dos animais de segundo (A) e terceiro (B) terço gestacional das populações de R1 viáveis e R2 mortas. Programa de análise *Cell Quest-Pro*112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HSP- *Heat Shock Proteins* - Proteínas do choque térmico

ConA – Concanavalina do tipo A

PHA - fitohemaglutinina

NK - *Natural killer*

T $\gamma\delta$ – Linfócitos T gama-delta

APC – *Antigen Present Cells* - Células apresentadoras de antígenos

MHC – *Major Histocompatibility Complex* - Molécula de histocompatibilidade principal

HLA – *Human Leucocyte Antigen*

EVT – Trofoblastos extravilosos

IDO – Indoleamina 2,3-dioxigenase

Th1 – Linfócitos T helper tipo 1

Th2 - Linfócitos T helper tipo 2

DC – *Dendritic Cell* - Célula dendrítica

IFN- γ – Intérféron gama

Treg – Linfócito T regulatório

IL – Interleucinas

LPS - Lipopolissacarídeo

TGF- β – Fator de crescimento tumoral beta

TLR- *Toll-like Receptor* - Receptor tipo Toll

CLR - *C-type lectin receptors*

PRR - *Pattern-Recognition Receptors* – Receptores de Reconhecimento Padrão

PAMP - *Pathogen Associated Molecular Patterns* –Patógenos Associados a Padrões Moleculares

BCR - *B cell receptor* – Receptor de Células B

TCR - *T cell receptor* - Receptor de Células T

SR - *Scavenger Receptors*

LOX-1 - *Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor*

SUMÁRIO

- 1 INTRODUÇÃO 26**
- 2 OBJETIVOS 29**
- 3 REVISÃO DE LITERATURA 32**
 - 3.1 INTRODUÇÃO A IMUNOLOGIA 32
 - 3.2 *HEAT SHOCK PROTEINS* (HSPs) 35
 - 3.2.1 A participação das HSP na reprodução 40**
 - 3.3 PLACENTA 42
 - 3.3.1 Placenta humana vs Placenta bovina 43**
 - 3.4 IMUNOLOGIA DA GESTAÇÃO 44
 - 3.4.1 Leucócitos placentários 48**
 - 3.4.1.1 Células *Natural Killer* (uNK) 48
 - 3.4.1.2 Linfócitos placentários 49
 - 3.4.1.3 Macrófagos uterinos 51
- 4 MATERIAL E MÉTODO 54**
 - 4.1 ANIMAIS 54
 - 4.2 PROLIFERAÇÃO PELA TÉCNICA DE *CFSE* 54
 - 4.2.1 Avaliação da capacidade proliferativa de células placentárias
totais em resposta a HSP 60 55**
 - 4.2.2 Influência do sobrenadante de células placentárias totais ou células
mononucleares placentários na proliferação de monocamada de células
mononucleares do sangue periférico estimuladas ou não com HSP 60 56**
 - 4.2.3 Avaliação da capacidade proliferativa de células mononucleares do sangue
periférico de vacas gestantes e não gestantes 58**

4.3 FAGOCITOSE	58
4.4 PEROXIDACAO LIPIDICA (LPO)	58
4.5 CICLO CELULAR.....	60
4.6 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	62
4.7 ESTATISTICA.....	62
5 RESULTADOS	64
5.1 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA PLACENTA BOVINA E DO SANGUE PERIFÉRICO POR GRADIENTE DE DENSIDADE	64
5.2 PROLIFERACAO PELA TECNICA DO CFSE	65
5.2.1 Influência da HSP 60 na capacidade proliferativa de células da placenta.....	65
5.2.2 Influência do sobrenadante de células placentárias totais ou células mononucleares placentárias na proliferação de monocamada de células mononucleares do sangue periférico	71
5.2.3 Avaliação da capacidade proliferativa de células mononucleares do sangue periférico de vacas gestantes e não gestantes	78
5.3 FAGOCITOSE	90
5.4 PEROXIDACAO LIPIDICA (LPO)	98
5.5 ANALISE DO CICLO CELULAR.....	101
5.6 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	107
6 DISCUSSÃO	115
7 CONCLUSÕES.....	130
REFERÊNCIAS	132
ANEXOS

*I
N
T
R
O
D
U
Ç
Ã
O*

1 INTRODUÇÃO

A importância de pesquisas nos campos da reprodução e genética e investimentos na pecuária brasileira são relevantes, pois estas possuem significativa participação na economia do país e no mercado mundial.

Dentre os diversos aspectos reprodutivos dos bovinos destacamos a placenta, órgão temporário, de comunicação entre mãe e feto e enigmático, no qual o sistema imune materno precisa tolerar os antígenos fetais para o sucesso da gestação.

Desde o momento da implantação até o momento do parto, o meio-ambiente uterino encontra-se alterado (PICCINI, 2003). Células leucocitárias como células *uNK* (*uterine natural killer cells*), células dendríticas, macrófagos, células T, hormônios, citocinas, fatores de crescimento e proteínas como as proteínas do choque térmico (HSP), favorecem (ou não) a tolerância imunológica contribuindo para o desenvolvimento do embrião e seu nascimento.

As proteínas do choque térmico são expressas em condições fisiológicas, (POCKLEY et al., 2007), mas sua expressão aumenta em situações de estresse como de meio ambiente (choque térmico, radiação ultravioleta, metais pesados), patológicos (vírus, bactérias, infecções parasitárias, febre, inflamação, auto-imunidade) ou estímulos fisiológicos (fatores de crescimento, diferenciação celular, estimulação hormonal ou desenvolvimento tecidual) (ASEA et al., 2000). Também possuem funções distintas como chaperonas; montagem protéica intracelular; citoproteção; direcionamento de antígenos tumorais a APCs; indução de apoptose; auxiliam na manutenção da homeostase do organismo (LANNEAU et al., 2008). Como chaperoninas moleculares (proteínas intracelulares), auxiliam outras proteínas, prevenindo a agregação protéica mal formada, no dobramento e desdobramento sem alterar sua conformação final, estabilização e maturação de proteínas (BUKAU e HORWICH, 1998); como chaperoninas moleculares (proteínas extracelulares) possuem função na indução de reposta imune celular, ou atuam como carreadores moleculares para peptídeos imunogênicos ou as próprias HSPs atuam como moléculas ativadoras do sistema imune inato (MULTHOFF, 2009).

Como a placenta está em constante diferenciação celular, alta atividade metabólica e hormonal, ocorre a expressão das *Heat Shock Proteins* (HSPs), principalmente das famílias 27, 60, 70 e 90 que foram observadas por Shah et al. (1998) nas células estromais decíduais durante cada trimestre na placenta humana. Estudos realizados anteriormente na placenta

bovina, por nosso grupo, mostrou a expressão das HSP 60 e 70 no trofoblasto, células binucleadas e epitélio materno nos três terços gestacionais com algumas peculiaridades entre as elas, como a forte expressão da HSP 60 no primeiro trimestre gestacional (MONTEIRO, 2005).

Observando os resultados da expressão da HSP na placenta bovina e tendo em vista a peculiaridade desse órgão em apresentar populações leucocitárias funcionalmente distintas das do sangue periférico, a qual se estende também às respostas imune inata e adaptativa na tolerância materno-fetal, desenvolvemos um estudo que pudesse esclarecer se haveria a participação da HSP 60 em mecanismos imunes junto a alguns leucócitos placentários nos diferentes terços gestacionais.

*O
B
J
E
T
I
V
O
S*

2 OBJETIVOS

O principal objetivo desse projeto foi verificar a influência da HSP 60 na proliferação das células mononucleares e células totais da placenta bovina.

Os objetivos específicos:

- Resposta proliferativa de células totais da placenta bovina:
 - por ensaio de proliferação com o CFSE (5,6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster) realizado com células totais da placenta bovina nos diferentes períodos gestacionais, estimulados com HSP 60, ConA e PHA;
- Resposta proliferativa de células mononucleares da placenta bovina:
 - por ensaio de proliferação com o CFSE (5,6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster) realizado com células mononucleares da placenta bovina nos diferentes períodos gestacionais, estimuladas com HSP 60, ConA e PHA;
- Resposta proliferativa sob influência de sobrenadante de células totais da placenta bovina e células mononucleares placentárias em cultivo:
 - ensaio de proliferação com o CFSE (5,6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster) realizado com monocamada de células mononucleares do sangue periférico bovino acrescentados de sobrenadante oriundo de cultivo de células totais da placenta bovina ou de células mononucleares placentárias nos diferentes trimestres gestacionais, estimuladas com HSP 60, PHA e ConA;
- Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico:
 - Ensaio de proliferação com o CFSE (5,6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster) realizado com células mononucleares de sangue periférico de vaca não gestante e de vaca gestante nos diferentes períodos gestacionais, estimulados com HSP 60, ConA e HSP 60 + ConA;
- Avaliação da fagocitose de macrófagos placentários e de células totais do sangue periférico de vacas gestantes e não gestantes após estímulo com HSP 60 pelo teste de fagocitose com *E. coli*
- Fases do Ciclo Celular: verificar se a HSP 60 exerce citotoxicidade em células placentárias em cultivo

- Potencial da Membrana Mitocondrial – Rodamina123: verificar se a HSP 60 atua no potencial de membrana mitocondrial das células placentárias após cultivo
- Formação de radicais livres peroxidados poliinsaturados - LPO (lipoperoxidação lipídica): verificar se a HSP 60 atua no estresse oxidativo de células placentárias, mantidas em cultura

*L
I
T
E
R
A
T
U
R
A*

*R
E
V
I
S
Ã
O*

3 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão procura apresentar sucintamente, a participação das *Heat Shock Proteins* (HSPs) no sistema imune inato e adquirido e o estudo da imunologia da placenta bovina.

3.1 INTRODUÇÃO À IMUNOLOGIA

Devido ao fato do estudo ao sistema imune ser complexo, a revisão de literatura a seguir mostrará alguns aspectos mais relevantes para a melhor compreensão desse trabalho.

O sistema imune é formado por várias células e moléculas que são responsáveis pela imunidade de um indivíduo. As células do sistema imune são originadas da medula óssea onde muitas delas também amadurecem. Essas células migram e se mantêm em tecidos periféricos, circulando no sangue e sistema especializado de vasos chamados de sistema linfático (JANEWAY, 2001). A resposta imune pode ser classificada em dois tipos principais: inata (natural) e adquirida (adaptativa) (ABBAS, 2005).

Os principais componentes da imunidade inata são: barreiras físicas e químicas, tais como o epitélio e as substâncias anti-bacterianas nas superfícies epiteliais; fagocitárias (macrófagos e neutrófilos) e NK (*natural killer*); proteínas do sangue, incluindo frações do sistema complemento e outros mediadores da inflamação; e proteínas denominadas citocinas, que regulam e coordenam várias atividades das células (ABBAS, 2005). A resposta imune inata é caracterizada pela inespecificidade antigênica, por não gerar memória e pelo reconhecimento de padrões moleculares comuns entre patógenos (PAMPs – *pathogen associated molecular patterns*) (DELVES; ROITT, 2000). Este reconhecimento ocorre por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRR - *pattern-recognition receptors*), que podem ser solúveis como os lisossomos, os componentes do complemento ou podem ser receptores associados à célula, como os *Toll-like receptors* (TLR) e os *C-type lectin receptors* (CLR). Os TLR possuem um domínio citoplasmático homólogo ao receptor de citocina IL-1, chamado de TIR (Toll/IL-1) o que é essencial para sinalização (JANEWAY, 2001). Esse

domínio de TLR pode interagir com outros domínios TIR, incluindo uma proteína adaptadora chamada de MyD88. Esta possui um domínio de morte celular que se liga a outra proteína também de morte celular (IRAK) a qual inicia a ativação de cascata de quinases que culmina no fator de transcrição chamado de NF κ B. Este entra no núcleo e liga a vários promotores, ativando genes (JANEWAY, 2001) que codificam proteínas importantes em muitos componentes diferentes da resposta imune inata como inflamatórias (TNF- α , IL1, IL-12), moléculas de adesão endotelial (E-selectina) e proteínas envolvidas nos mecanismos de morte microbiana (síntese induzida de óxido nítrico) (ABBAS, 2005).

A imunidade inata fornece a linha de defesa inicial contra os microrganismos. Em contraste com esta, existem outras respostas imunológicas que são estimuladas pela exposição a agentes infecciosos cuja magnitude e capacidade defensiva aumentam com a exposição posterior a um determinado microrganismo em particular (ABBAS, 2005).

A imunidade adaptativa possui resposta específica, atribuindo características de especificidade antigênica, diversidade, memória imunológica e reconhecimento do que é “próprio” e “não próprio” (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000). Na imunidade adaptativa, existem dois tipos de resposta: a imunidade humoral, a qual é mediada por anticorpos produzidos pelos linfócitos B presentes nas secreções das mucosas e no sangue; e a imunidade celular, a qual é mediada por linfócitos T (ABBAS, 2005). Os receptores dos linfócitos são diferentes dos receptores da imunidade inata. Eles são chamados de receptores de linfócitos B (BCR - *B cell receptor*), receptores de linfócitos T (TCR - *T cell receptor*), células dendríticas (DC - *Dendritic cells*) e NK (DELVES; ROITT, 2000).

Os linfócitos T são divididos em dois tipos de acordo com a expressão de duas moléculas de superfície: CD4 e CD8. O linfócitos T CD4+ desempenham importante papel na defesa do hospedeiro contra patógenos intra e extra-celulares. Os linfócitos T CD4+ podem ser divididos em subpopulações funcionalmente distintas, de acordo com o perfil de citocinas: Th1, Th2, Treg (linfócitos T regulatórios) e Th17 (HARRINGTON et al., 2005). O linfócitos T CD8+ auxiliados pelos T CD4+ são essenciais na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, principalmente vírus. Esses linfócitos lisam as células alvos por meio de granzimas e perforinas (ABBAS, 2005).

Os linfócitos Th1 produzem citocinas inflamatórias IL-2 (interleucina-2), IFN- γ (intérferon- γ), TNF- α (fator de necrose tumoral- α), TNF- β (fator de necrose tumoral- β) que são sinalizadas intracelularmente por meio de fatores de transcrição como: STAT-1, STAT-4 e T-bet (SZABO et al., 2000).

Os linfócitos Th2 produzem citocinas anti-inflamatórias IL-4 (interleucina-4), IL-5 (interleucina-5), IL-6 (interleucina-6), IL-10 (interleucina-10) e IL-13 (interleucina-13) ativadoras para a produção de anticorpos (IWAKABE, 1998; RAGHUPATHY, 2001). A produção dessas citocinas é sinalizada por meio de fatores transcricionais como: STAT-6, GATA-3 e c-Maf que controlam IL-4 (AGNELLO; LANKFORD, 2003).

Dentre as Treg mais estudadas são as CD4⁺ que representam cerca de 5-10% dos linfócitos CD4⁺ periféricos e são capazes de suprimir a atividade de uma variedade de células tanto na imunidade inata como da adquirida (CEDERBOM et al., 2000; MALOY et al., 2003).

Os linfócitos Th17 aumentam a proteção do hospedeiro contra bactérias e fungos extracelulares que não promovem respostas de Th1 e Th2 satisfatórias e apresentam associação com o desenvolvimento de doenças auto-imune (KORN et al., 2007). Os subtipos de citocinas IL-17 possuem propriedades pró-inflamatórias, atuam em diferentes tipos celulares para induzir citocinas, quimiocinas e metaloproteinases, também são essenciais no recrutamento, ativação e migração de neutrófilos (BETTELLI et al., 2007).

Para o início e o desenvolvimento da imunidade adquirida é necessário que os antígenos sejam capturados e apresentados aos linfócitos específicos. As células que desempenham esse papel são chamadas de células apresentadoras de antígenos (APC – *antigen presenting cells*). Sendo a mais especializada para essa função são as DC (ABBAS, 2005).

Os peptídeos associados as APC são apresentados aos linfócitos que reconhece e interage com moléculas do MHC (*major histocompatibility complex* - complexo de histocompatibilidade principal) de classe I ou II. Os linfócitos T CD4⁺ reconhecem peptídeos antigênicos apresentados pelas moléculas de MHC-II, enquanto os linfócitos T CD8⁺ reconhecem os peptídeos apresentados por MHC-I (ABBAS, 2005).

O reconhecimento do peptídeo associado ao MHC na superfície das APC se dá pelo TCR, o qual promove a ativação dos linfócitos com a fosforilação das tirosinas na cadeia citoplasmática da molécula CD3 e levam a transdução de sinais que culminam na ativação de diversos genes, como por exemplo da IL-2 (ABBAS, 2005). Este reconhecimento gera um sinal que é insuficiente para ativar completamente os linfócitos T. As APC juntamente com as moléculas co-estimulatórias (CD80, CD2, CD40L e ICAM) que são relacionadas aos linfócitos T emitem o segundo sinal para ativação completa desses os quais desencadeiam uma resposta dirigida ao antígeno que o ativou (ABBAS, 2005).

3.2 HEAT SHOCK PROTEINS (HSPS)

As *heat shock proteins* (HSP) foram descobertas segundo estudo feito por Ritosa (1962) em cromossomos politênicos da glândula salivar de larvas de *Drosophila melanogaster*. Observou-se que o aumento da temperatura de incubação dessas larvas levava a uma mudança no padrão desses cromossomos e a alteração dos genes devido ao choque térmico. Futuramente, esses genes expressos diferentemente devido à mudança de calor foram clonados e seus produtos protéicos denominados de proteínas do choque térmico (TISSIÈRS et al., 1974).

As proteínas do choque térmico são expressas em condições fisiológicas, constituindo cerca de 5 a 10% de proteínas totais (POCKLEY et al., 2007), mas sua expressão aumenta em situações de estresse como de meio ambiente (choque térmico, radiação ultravioleta, metais pesados), patológicos (vírus, bactérias, infecções parasitárias, febre, inflamação, autoimunidade) ou estímulos fisiológicos (fatores de crescimento, diferenciação celular, estimulação hormonal ou desenvolvimento tecidual) (ASEA et al., 2000).

As HSPs possuem funções distintas como chaperonas; montagem protéica intracelular; citoproteção; direcionamento de antígenos tumorais a APCs; indução de apoptose via caspases ou por ligação a fatores apoptóticos ou diretamente nos lisossomos; auxiliando na manutenção da homeostase do organismo (LANNEAU et al., 2008). No entanto, novas funções vêm sendo atribuídas às HSP. Calderwood et al. (2007) mostraram que as HSPs após serem liberadas do conteúdo intracitoplasmático, por necrose ou apoptose, podem se ligar a células intactas, seja via *Toll*, CD40, CD91 e iniciar cascatas de sinalização como transportar consigo peptídeos antigênicos. Além disso, as HSP 60 e 70 são capazes de entrar na corrente sanguínea e, assim, de exercerem seus efeitos em sítios distantes do seu local de liberação.

Dentre essas funções as HSP se destacam como chaperoninas moleculares (proteínas intracelulares), pois auxiliam outras proteínas, prevenindo a agregação protéica mal formada ou gastando ATP no dobramento e desdobramento sem alterar sua conformação final, estabilização e maturação de proteínas alvo (BUKAU; HORWICH, 1998). Essas proteínas alvo podem ser de diferentes categorias com funções distintas como: transdução de sinal; controle do ciclo celular; regulação transcricional; crescimento e diferenciação celular; apoptose (SREEDHAR et al., 2004; SUN; LIAO, 2004). Além disso, as HSP também possuem um importante papel na resposta imune pois, peptídeos antigênicos chaperonados e formando complexos com as HSP são capazes de induzir respostas em células T CD8+

(BINDER; SRIVASTAVA, 2005). E como chaperoninas moleculares (proteínas extracelulares) possuem função na indução de reposta imune celular, atuando como carreadores moleculares para peptídeos imunogênicos que são apresentados as APC e estas às células T citotóxicas ou as próprias HSPs atuam como moléculas ativadoras do sistema imune inato (MULTHOFF, 2009).

Imunologistas se dividem em diferentes linhas de pesquisa quanto ao estudo das propriedades das HSP: quanto aos seus efeitos extracelulares como sendo sinalizador de “perigo” ao sistema imune (CHEN et al., 1999; BREOLER et al., 2001; GALLUCCI; MATZINGER, 2001; WALLIN et al., 2002) e potente agente inflamatório; e quanto aos seus efeitos anti-inflamatórios (POCKEY et al., 2008).

As proteínas do choque térmico participam da imunidade inata pois são capazes de se ligar a TLR4 e TLR2, CD91, CD14 e CD40 (GASTON, 2002; POCKLEY et al., 2003; QUINTANA et al., 2005; CALDERWOOD et al., 2007). Para que essa ligação ocorra é necessária a transdução de sinal feita por MyD88/NF κ B que é dependente de CD14 e que ambos TLR2 e TLR4 trabalham sinergicamente para aumentar a produção de IL-6 intracelular em resposta a estimulação com HSP 70 (ASEA et al., 2000). Na inflamação, a HSP 60 via TLR2 (mas não o TLR4) pode induzir a ativação da integrina B1 em linfócitos T humanos e aumentar a adesão dessas células (ZANIN-ZHOROV et al., 2003). As proteínas do choque térmico servem também como um estímulo endógeno para o receptor de sinalização Toll/IL-1 (TIR) que utiliza TLR2 e TLR4 (VABULAS et al., 2002), mas para que isso ocorra, primeiramente a HSP 60 precisa ser internalizada a fim de estimular a via de sinalização do TIR nos macrófagos (VABULAS et al., 2001) ou pelas células dendríticas (DC) por meio de um mecanismo mediado não por receptor (POCKLEY et al., 2007). A via de sinalização induzida pela HSP 60 nos macrófagos tem sido atribuída as proteínas ativadoras de estresse quinase N-terminal c-Jun (JNK) e a proteína quinase ativadora de mitógeno p38 (MAPK), bem como I κ B quinase, que são ativadas depois da endocitose da HSP60 pelos macrófagos murinos (VABULAS et al., 2002). Estas quinases induzem os fatores de transcrição NF- κ B que são responsáveis pela transcrição gênica de citocinas (TNF- α). Entretanto, Habich et al. (2002) demonstrou que a ligação da HSP 60 nos macrófagos é independente de TLR4.

A ativação de células do sistema imune inato não leva necessariamente a um perfil pró-inflamatório porque ativam TLR de subgrupos diferentes que podem tender a respostas pró e anti-inflamatórias. A ativação da imunidade inata pode aumentar a expressão e liberação de HSP 60 “própria” a qual pode ativar populações de células T imunoregulatórias específicas que têm a capacidade de controlar eventos inflamatórios (QUINTANA; COHEN, 2005).

Estes achados indicam a presença de uma rede complexa imunoregulatória de HSP *in vivo* que envolve a ativação da imunidade inata, liberação de HSP 60 e o recrutamento e ativação de populações de células T regulatórias (POCKLEY et al., 2008).

O contato inicial da HSP 60 com as células do sistema imune inato representa um processo complexo com conseqüente ativação desse sistema direcionando para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa em potencial (HABICH; BURKART, 2007), pois essas proteínas, sendo apresentadas pelo MHC, levam a ativação de células T CD4 e T CD8 (BLANCHERE et al., 1997; ROMAN; MORENO, 1997; VAN EDEN et al., 2003).

As proteínas do choque térmico vêm sendo estudadas por vários grupos que sugerem um perfil inflamatório da HSP 60 a qual, juntamente com o TLR, transmitiu as células “sinal de perigo” que induziu linfócitos T a produzirem citocinas inflamatórias (CHEN et al., 1999). Pela via TLR2 atua diretamente nos linfócitos T, promovendo um aumento de resposta do tipo Th2 e, pela via TLR4-MyD88 ativa linfócitos B os quais estimulam a proliferação de células T próprias e a secreção de citocinas (COHEN-SFADY, 2005). As células B ativadas por HSP 60 induziram células T alogênicas a secretarem IFN- γ por meio TLR4. A proliferação de linfócitos B, regulação de moléculas de superfície incluindo MHC-II e a secreção de citocinas são dependentes da ativação de TLR4-MyD88 pela HSP 60 (OSTERLOH et al., 2008). Macrófagos humanos e murinos respondem a HSP 60 humana e bacteriana com a liberação de mediadores de citocinas de perfil Th1 (IL-12 e IL-15) (CHEN et al., 1999).

Osterloh et al. (2008) propuseram, segundo seus resultados, que a HSP 60 ativaria a resposta imune por dois mecanismos: (i) na presença de LPS, como num caso de infecção bacteriana *in vivo*. A HSP 60 contribuiria no reconhecimento de patógeno uma vez que funcionaria como uma proteína similar carreadora de LPS para a proteína LBP (*LPS-binding protein* - proteína ligante ao LPS, é uma proteína plasmática melhor caracterizada na imunidade inata). O complexo LPS-LBP facilita a ligação ao complexo receptor CD14/TLR4 na APC, aumentando a sinalização do TLR4 resultando na ativação de NF κ B no núcleo (JANEWAY et al., 2001). (ii) HSP 60 atuaria como um mediador de “sinal de perigo” clássico, aumentando a ativação de células T dependente de antígeno na ausência de LPS ou qualquer estrutura bacteriana. Entretanto, a HSP 60 aumentaria a ativação da célula T antígeno-específico pela produção de IFN- γ .

A idéia que a HSP 60 possui efeito imunorregulador, também é discutida por alguns autores, pois segundo estudo realizado com essa proteína *in vitro*, foi verificado que esta modula a expressão de Th1/Th2 por meio de fatores transcricionais: regulando negativamente T-bet, NF κ B e NFATp (componente pré-existente de fator nuclear de células T ativadas) e

positivamente GATA-3, levando a uma diminuição da secreção de TNF- α e INF- γ e ao aumento de IL-10 (ZANIN-ZHOROV et al., 2005). Cohen (1997) verificou que o tratamento de camundongos NOD com diabetes auto-imune com o peptídeo p277 da HSP 60 foi capaz de modificar o padrão de citocinas de linfócitos Th1 para Th2 com a produção de IL-4 e IL-13, prevenindo o aparecimento de diabetes auto-imune. Em outro estudo realizado por Quintana et al. (2002) utilizando ratos Lewis, foi demonstrado que vacinação com HSP 60 inibiram o aparecimento de uma doença auto-imune chamada de “artrite adjuvante”, aumentando também a proliferação de células T e a produção de TGF- β (citocina anti-inflamatória) e diminuindo a produção de INF- γ (citocina inflamatória). Nos transplantes de pele feitos em camundongos transgênicos que possuíam alta expressão de HSP 60 apresentaram um retardo da rejeição do alo-enxerto de pele e, apresentando uma modulação de resposta Th1 para Th2 (BIRK et al., 1999). Em transplante de pele feito em diferentes ratos, observou-se que a auto-imunidade da HSP 60 modula as repostas para a rejeição do transplante, resultando no aumento da expressão da HSP 60 no tecido enxertado. E a vacinação feita com peptídeos de HSP 60 de ratos pode alterar o tipo de resposta de células T especificamente para HSP 60 própria para a resposta Th2 (BIRK et al., 1999). A resposta celular anti-HSP humana em pacientes normais e com transplante renal, foi verificado a existência de células T reativas as HSP 60 e 70, para respostas pró-inflamatórias e reguladoras. Houve uma proliferação de células T reativas as HSP próprias durante o período de pré-transplante e rejeição, sugerindo que as células T possuem atividade contra as HSP auto-reativas. Em contraste a essa resposta, a produção de IL-4 (pela HSP 60) foi associada a rejeição do enxerto, sugerindo uma atividade reguladora de populações de células T reativas a algumas HSP próprias. Também se observou um predomínio de células Th2 no período pós-transplante tardio (0-6 meses), a qual teria participação na regulação da resposta inflamatória (GRANJA et al., 2004).

Recentemente vários estudos têm mostrado que células T reativas as HSP possuem fenótipo imunoregulatório, indicando que as HSP 60 e 70 constituem um grupo de auto-antígenos com potencial de disparar vias imunorregulatórias as quais podem suprimir respostas imunes que ocorrem em doenças inflamatórias humanas como artrite reumatóide, diabetes tipo 1, aterosclerose e alergia (VAN EDEN et al., 2005).

Vários pesquisadores vêm estudando a existência de receptores de superfície celular para as HSP 60 e HSP 70. As respostas das células do sistema imune as proteínas do choque térmico provavelmente envolvem dois tipos de receptores, um receptor internalizador (R1) e um receptor sinalizador (R2). Os receptores internalizadores incluem membros da família *scavenger receptors* (SR) como o LOX-1 (*lectin-like oxidized low-density lipoprotein*

receptor), no qual a HSP 70 liga-se com alta afinidade e CD91 receptor de lipoproteína de baixa densidade (THÉRIAULT et al., 2005). Os receptores envolvidos na sinalização são os TLR. A via de sinalização disparada por TLR pode ajudar a compreensão de como as HSP interagem com o sistema TLR e resolver as propriedades incertas de perfil pró e anti-inflamatórias das HSP 60 e HSP 70 (POCKLEY et al., 2008). Castellino et al. (2000) revelaram que os complexos saturados, através da interação com um ou mais receptores de superfície são importantes para a liberação de antígenos associados a HSP para o processamento via endosomal (TAP e independente de proteossomos) ou via citosólica (TAP e dependente de proteossomos) na apresentação as moléculas de MHC. Contudo, Ohashi et al. (2000) verificaram que macrófagos responderam a estimulação de HSP 60 pela produção de TNF- α , sendo dependente do TLR4, sugerindo a existência de um ligante endógeno do complexo TLR4 e um papel de receptores *Toll-like* na discriminação da imunidade inata normal vs células estressada ou tecido em perigo.

Moudgil et al. (1997) propuseram que diferentes regiões da HSP 60 poderiam induzir respostas imunes distintas, sendo uma delas a indução de células T reguladoras (Treg). Diversos trabalhos na literatura têm demonstrado que tanto as respostas a patógenos quanto as respostas reguladoras e anti-inflamatórias mediada pelas HSP são dirigidas aos peptídeos mais imunodominantes dessas proteínas (COHEN, 1997).

Cohen (2002) demonstrou que HSP 60 possui um peptídeo que é composto de 24 aminoácidos (região 437-469) que foi chamado de p277 e este passou a ser utilizado por possuir propriedades imunorreguladoras. Em 2006 Habich et al. identificaram 3 regiões de aminoácidos distintas (241-260; 391-410 e 461-480) que estão envolvidas na interação com estruturas de superfície celular dos macrófagos, os quais levam a ativação dessas células promovendo um potencial imunorregulatório da HSP 60.

A HSP 60 parece exercer seus efeitos por ligação direta aos TLR2 e TLR4 ou por apresentação pelas APCs e posteriormente reconhecimento por células T (via MHC-I ou II). A ligação direta da HSP 60 a receptores TLR2 expressos por linfócitos T reguladores foi mostrada por Zanin-Zhorov et al. (2006) onde o tratamento de células Treg com baixas concentrações de HSP 60 foi capaz de inibir a proliferação celular e a produção de citocinas inflamatórias por linfócitos T CD4+CD25- e por linfócitos T CD8+. A inibição das respostas dos linfócitos efetores parece ter sido mediada pela secreção das citocinas Il-10 e TGF- β pelas células Treg tratadas com HSP 60.

3.2.1 A participação da HSP na reprodução

O sistema imune é atuante desde o início, quando o espermatozóide fecunda o óvulo até o nascimento do feto. E para que haja sucesso na manutenção da gestação os mecanismos imunes envolvidos são: o feto não induz resposta imune; a resposta imune materna é suprimida; o útero é um sítio privilegiado imunologicamente; e a placenta é uma barreira entre a mãe e o feto (MEDDAWAR¹ 1953 *apud* WEETMAN, 1999). Um dos fatores envolvidos nesse processo está a expressão de *Heat Shock Proteins*, que tende a estar aumentada em condições de rápido crescimento ou diferenciação celular, ou exposição ao estresse do ambiente como inflamações, febres ou agentes tóxicos (NEUER et al., 1998). A região de decídua e da placenta são áreas de alta atividade metabólica e por isso um lugar em potencial para os elevados níveis de expressão das HSP (SHAH et al., 1998). No contexto da reprodução, as HSP mais importantes são as das famílias 60 e 70 (NEUER et al., 2000).

Nas fêmeas, as HSP têm importante papel na manutenção da atividade metabólica pós-ovulatória com conseqüente sobrevivência do oócito e, segundo Neuer et al. (2000) são expressas no endométrio. Sendo o útero um tecido de altas trocas hormonais, principalmente de esteróides, supõe-se que os receptores para esses hormônios são regulados por um grupo de HSP. Dessa forma, estas proteínas permaneceriam em níveis normais desde que não fossem induzidas por esses hormônios ou por citocinas (TABIBZADEH et al., 1996).

Vários estudos foram feitos relacionando as diferentes famílias de HSP ao aparelho reprodutor feminino, ao embrião, ao período gestacional e às enfermidades relacionadas a mulheres. Os autores Shah et al. (1998) verificaram que na placenta humana as HSP 90, 70 e 60 foram expressas durante os três trimestres da gestação e observaram a variação da intensidade da marcação para a HSP 70 e 90 no trofoblasto intermediário e decídua diminuindo com o avanço gestacional, e no endotélio variando de forte a moderada, o que não ocorreu com a HSP 60 onde nenhuma alteração foi verificada. Wataba et al. (2004) incluindo a família da HSP 27, demonstram a fundamental importância dessas para a viabilidade e função celular placentárias. Essas mesmas proteínas foram expressas no endométrio humano durante diferentes fases do ciclo menstrual (CIOCCA et al., 1996; TABIBZADEH et al., 1996), na decídua durante a fase de gestação inicial (NEUER et al., 1999), e também no cordão umbilical (LI et al., 1996). Divers et al. (1995) sugeriram que as HSP 60, 70 e 90 não estão associadas ao parto prematuro, pois verificaram que a expressão foi constante no terceiro trimestre para as gestações a termo e que não houve alteração destas proteínas em partos de

diferentes idades gestacionais. Ziegert et al. (1999) sugeriram o oposto ao estudarem a relação da gestação e a expressão das HSP e os complexos de anticorpos-HSP para as HSP 60, 70 e 90 no tecido placentário e na circulação. Eles acreditam que a ligação desses complexos anticorpo-HSP podem ser indicador do parto prematuro. Sotiriou et al. (2004), através da análise diferença qualitativa e quantitativa da expressão das famílias de HSP 70 e 90 nos vilos coriônicos dessas placentas, inferiu que a expressão dessas proteínas em mulheres que sofreram aborto foi muito forte em relação a mulheres com parto normal.

A suposição de que as HSP estariam envolvidas na regulação de hormônios esteróides no endométrio de mulheres levou Tabibzadeh et al. (1996) estudarem a expressão dessas proteínas durante o ciclo menstrual. Foi verificado que as HSP aumentam na fase secretória do ciclo e que são expressadas no estroma e no epitélio endometrial. Sendo assim, certas HSP associadas à função dos receptores hormonais nos tecidos reprodutivos indicaram que essas proteínas exercem um papel durante a implantação, decidualização e placentação.

Em ratas, as HSP 25 e 70 não seriam necessárias para a proliferação celular no desenvolvimento do oviduto e a expressão dessas proteínas iniciaria quando as células desses tecidos tornam-se diferenciadas. Essas pesquisas sugerem que a HSP 70 protegeria o oviduto durante a implantação do blastocisto, enquanto a HSP 25 facilitaria a implantação no endométrio (MARIANI et al., 2000). Matwee et al. (2001) estudaram os efeitos das HSP 70 *in vitro* em embrião bovino, seu desenvolvimento, a interação espermatozóide-oócito e fertilização, sugerindo que essas HSP participariam da proteção do desenvolvimento embrionário, pois a redução no desenvolvimento do embrião em resposta a inibição da HSP 70 está associada com o aumento da apoptose.

Outra enfermidade relacionada às mulheres grávidas é a pré-eclampsia, causada por uma ativação da resposta inflamatória materna. Achados de Livingston et al. (2002) sugeriram que a expressão da HSP 70 não é induzida e suas concentrações não se alteram em achados inflamatórios nessas mulheres. O diagnóstico para nascimentos prematuros e pré-eclampsia através da detecção dos níveis de HSP 70 no soro de mulheres grávidas, foi avaliado por Fukushima et al. (2005). Os estudos demonstraram altos níveis de HSP 70 no soro do sangue periférico dessas gestantes quando comparado ao de mulheres com gestação normal sugerindo que a HSP 70 sozinha seria insuficiente para prever essas alterações. O que não ocorreu com os estudos feitos por Molvarec et al. (2007) utilizando técnica de *microarray*, observou-se que os níveis no soro de HSP 70 diminuiram em mulheres com gestações normais. HSP 70 pode mediar a ativação endotelial e tem papel importante na patogênese de PVD (doença vascular placentária onde a injúria celular endotelial e ativação na placenta são padrões para essa

doença), pois foi expressa principalmente, em células endoteliais e células da musculatura lisa em microvasos placentais (LIU et al., 2008).

A placenta age como um local de origem de fatores imunoreguladores, os quais modificam a produção de anticorpos humorais da mãe, cuja relevante importância na proteção do feto e as interleucinas sintetizadas pela placenta estão certamente envolvidas nesse processo (MIRANDA et al., 2001).

No âmbito da fertilidade masculina, o estudo do estresse e das HSP são importantes, pois fatores intrínsecos e extrínsecos podem causar danos à proteína de DNA, interromper a síntese protéica, interrupção do ciclo celular e apoptose, resultando numa espermatogênese anormal (FENG; SANDLOW; SPARKS, 2001). Estudando a qualidade do sêmen de varões quanto a sazonalidade, Huang et al. (2000) observaram a diminuição dos níveis de HSP 70 em relação à qualidade do sêmen em épocas quentes do ano.

A HSP 70 é o único dos antígenos espermáticos de importância na fertilização e na interação entre o espermatozóide e o óvulo, e a inibição desta, levou a diminuição no desenvolvimento blastocístico, evidenciando a ação protetora da proteína no embrião (MATWEE et al., 2001). Isso pode ser devido a persistência da resposta inflamatória induzida pelas HSP, ou talvez, estas proteínas serviriam como alvos antigênicos para o sistema imune, ou a homologia de aminoácidos entre as HSP humanas e as HSP microbianas resultariam em auto-imunidade, podendo mediar falhas reprodutivas (NEUER et al., 2000).

3.3 PLACENTA

A placenta é um órgão transitório presente somente durante a gestação que desempenha várias funções como de respiração, nutrição, filtração, secreção interna entre a mãe e o feto além de conferir uma tolerância imunológica para o mesmo. Constituída por uma parte fetal e uma parte materna, a placenta é o único órgão formado por células de dois indivíduos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A implantação embrionária está associada à placentação, processos determinantes no estabelecimento da comunicação materno-fetal em cada espécie (LEISER; KAUFMANN, 1994; MARQUES et al., 2007). Nas espécies mamíferas, diferentes estratégias estão envolvidas no processo de implantação. Em roedores, primatas e humanos, os blastocistos são

rapidamente implantados no endométrio materno, antes mesmo de se expandirem e formarem as membranas embrionárias (CARSON et al., 2000). Já em ruminantes, o blastocisto evolui da forma esférica para tubular, alonga-se rapidamente, e as membranas embrionárias são formadas antes da implantação (SPENCER et al., 2004).

A placenta é o primeiro tecido fetal em contato com o sistema imune materno, tornando-se base de pesquisa para imunologistas da reprodução, estudar aloantígenos expressos no trofoblasto (AAGAARD-TILLERY et al., 2006).

3.3.1 Placenta humana vs Placenta bovina

A placenta humana é classificada como hemocorial onde a mucosa uterina é transformada em um tecido altamente especializado conhecido como decídua, processo conhecido como decidualização (MOFFETT; LOKE, 2006). As células epiteliais uterinas são perdidas durante a implantação do conceito e uma reposta endometrial decidual é induzida (CROY et al., 2008). Na placentação hemocorial ocorre a invasão do trofoblasto no tecido materno com isso, a superfície do córion fica em contato direto com a circulação materna (ZHOU et al., 1997). Os EVT (trofoblastos extravilosos fetais) invadem o útero estendendo-se através da decídua até o terço médio do miométrio, causando uma erosão em sua parede (KHONG et al., 1997). O sincíotrofoblasto é uma camada celular que acompanha paralelamente os vilos coriônicos que possuem contato direto com o sangue materno, onde ocorrem trocas de gases e nutrientes (AAGAARD-TILLERY et al., 2006; RILLEY, 2008). A barreira placentária situada entre a mãe e o feto é constituída por três camadas de tecidos na mulher, assim a transferência de imunoglobulinas via placenta nessa espécie, é facilitada quando comparada com outros tipos de placentação (LEISER; KAUFFMAN, 1994).

Em bovinos a placenta é classificada como cotiledonária compreendendo uma porção materna (carúncula) e uma porção fetal (cotilédone), contendo áreas de comunicação entre elas. Com o avanço da gestação, ocorre a invaginação do tecido fetal (trofoblasto) em direção ao tecido materno, formando unidades placentárias denominadas de placentônios e separadas por áreas de córion liso (estrutura membranosa fina) conhecida como região intercotiledonária. A placenta é impermeável às imunoglobulinas, sendo assim, não há possibilidade de transferência de imunidade durante a gestação (GRUNERT, 1982), pois existem seis camadas de tecidos na interface materno-fetal: endotélio materno, tecido

conectivo e epitélio uterino e trofoblasto, mesênquima e endotélio (JOOSTEN; HENSEN, 1992). Quanto às camadas de tecidos que separam a mãe do feto, no início a placenta é considerada epiteliocorial. O córion fetal coberto pelo trofoblasto é fixado a mucosa uterina de maneira não invasiva, ou seja, o epitélio fetal e uterino são intactos. Como consequência de uma implantação superficial, sem invasão endometrial, se estabelece uma barreira placentária complexa que se interpõe entre a circulação materna e fetal. Com o avanço da gestação torna-se sinepiteliocorial, devido à migração de células trofoblásticas em direção ao epitélio materno. (LEISER; KAUFMANN, 1994). Os placentônios possuem dois tipos de células trofoblásticas de acordo com sua morfologia e sua função: as células trofoblásticas mononucleares, presentes na interface envolvidas nas trocas de nutrientes; e as células trofoblásticas gigantes, em sua maioria binucleadas, que são células de síntese, produtoras de hormônios como a progesterona, estradiol, lactogênio placentário. Estas se fundem com o epitélio materno formando as células trofoblásticas trinucleadas presentes no final da gestação (DAVIES; FISHER; KLISCH et al., 1999; SCHLAFER, 2000).

3.4 IMUNOLOGIA DA GESTAÇÃO

A gestação é considerada um modelo de estudos para os imunologistas no que se refere ao transplante de tecidos entre diferentes indivíduos, pois o enxerto fetal possui material genético tanto do pai quanto da mãe e, a placenta participa intensamente desse processo para o desenvolvimento e manutenção do embrião até o nascimento. Muitos estudos vêm sendo feitos em humanos no intuito de conhecer mecanismos imunes que levam a não-tolerância e problemas como infertilidade, abortamentos recorrentes, nascimento prematuro, pré-eclampsia e infecções. Mas pouco se conhece sobre a imunologia da gestação em bovinos e os problemas que refletem nesse período.

Nos mamíferos ocorrem diversas peculiaridades em relação ao tipo de placenta e placentação e, para compensar as diversidades o sistema imune materno é desafiado de acordo com a morfologia placentária de cada espécie.

Durante a gestação ocorrem diversas alterações no útero, dentre elas a modificação do endométrio pela implantação do blastocisto através de suas células trofoblásticas, criando um meio ambiente que envolve diversas citocinas, hormônios e fatores de crescimento, para o

desenvolvimento do embrião e para sua tolerância ao sistema imune materno (DUC-GOIRAN et al., 1999).

Na placenta humana existem poucas células T no sítio de implantação do embrião (KABAWA et al., 1985). A existência de trocas na atividade funcional das populações de linfócitos maternos durante a gestação levam a um re-direcionamento da resposta imune celular, a uma tolerância transitória para os antígenos fetais envolvendo a ativação de populações linfocíticas específicas envolvidas na imunossupressão ou liberação de citocinas que estimulam a função placentária (HANSEN, 1997). Em bovinos, estudos revelaram que a distribuição de linfócitos foi menor em carúnculas gestantes e na região intercaruncular quando comparadas a fêmeas não gestantes (GOGOLIN-EWENS, 1989).

Em humanos vários autores corroboram idéias de que há diversos mecanismos tanto do sistema imune materno quanto do conceito para a tolerância nessa interface. São eles: (i) HLA (*human leucocyte antigen*) -C, G, E e F expressos no EVT (trofoblastos extravilosos) modulam a expressão do MHC (moléculas de histocompatibilidade principal) evitando que sejam atacados pelas células NK e células T (RILLEY, 2008; THELLIN et al., 2000). O HLA-G em especial, inibe a função das NK bem como a resposta das células T citotóxicas; (ii) induz a apoptose de $CD8^+$ ativadas pelo Fas/FasL; (iii) família B7 os membros dessa família são diferentemente expressos em células do trofoblasto e na interface materno-fetal durante a gestação e possuem papel na regulação de células efetoras do sistema imune levando a uma tolerância materna (RILLEY, 2008; AAGAARD-TILLERY et al., 2006); (iv)IDO (indoleamina 2, 3-dioxigenase) pode levar a inibição de células T da proliferação pelo catabolismo do triptofano aminoácido essencial para sobrevivência de célula T (THELLIN et al., 2000; GULERIA; SAYEGH, 2006); (v) anexina II, inibe parcialmente a proliferação de IgG e IgM secretadas pelo sistema imune materno (THELLIN et al., 2000); (vi) sistema complemento, diminuição da atividade do sistema complemento (reduz sua ativação quando esse sistema reconhece os antígenos fetais paternos) (THELLIN et al., 2000; RILLEY, 2008).

Rango (2008) propõe um modelo de tolerância e limitação dos trofoblastos extravilosos (EVT) em humanos como sendo: as EVT podem sofrer apoptose dentro da decídua e os corpos apoptóticos juntamente com o MHC-I são apresentados de forma cruzada às células T $CD8^+$. Em condições não inflamatórias, ou seja, sem sinal de inflamação ou co-estimulação, esses peptídeos trofoblásticos são apresentados às células T. Em vez de uma indução para uma defesa específica, isso pode resultar em uma tolerância antígeno-específico das células T no reconhecimento dos peptídeos paternos apresentados. O CTLA-4 é induzido nas células T depois da ativação do receptor TCR pelo contato inicial com uma APC

que fornece um sinal co-estimulatório (podendo ocorrer dentro da decídua também). O CTLA-4 liga-se ao receptor co-estimulatório B7 de DC/macrófagos resultando em um sinal inibitório para as células T. Essa ligação do CTLA-4 com o receptor das DC aumenta a expressão de IFN- γ o qual induz a regulação autócrina da expressão deIDO nas DC, mas não em macrófagos. AIDO por sua vez causa uma anergia na proliferação de células T ativadas. As DC e a expressão deIDO são capazes de induzir a diferenciação de Treg antígeno-específicas. Essas células necessitam de IFN- γ , o qual inibe a ativação de T efetoras por contato célula a célula ou por meio de citocinas imunossupressoras como IL-10. Também induzem a produção deIDO nas APC via CTLA-4, IL-10 ou expressão de IFN- γ .

Conforme descrito acima, durante todo o período gestacional existe uma modulação da resposta imune na interface materno-fetal. Além de células imunológicas especializadas também estão presentes as citocinas. Elas podem ser oriundas da ativação dos linfócitos T *helper* por meio da atividade de macrófagos e células *NK* (*natural killer*) na resposta inata e também do epitélio decidual e estroma, citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto, córion, âmnion e células de Hofbauer, locais de indução parcial da tolerância materna, imunidade local contra infecções, produção hormonal pela modulação placentária e remodelação durante a invasão trofoblástica (VINCE et al., 1992; WILCZYNSKI, 2005). Sabe-se que existe um balanço entre as citocinas Th1 e Th2 desde a implantação, desenvolvimento e nascimento (WILCZYNSKI, 2005). Segundo a “hipótese imunotrófica” criada por Wegmann et al. em 1993 postula que para o sucesso de uma gestação normal aconteça graças ao predomínio de citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) sobre as citocinas de perfil Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α) as quais são incompatíveis com a gestação. O perfil de citocinas na gestação foi averiguado por Chaouat et al.(1990) e Haimovici et al. (1991) quando as citocinas de perfil Th1 foram injetadas em camundongas prenhes e inibiram o desenvolvimento embrionário e fetal e finalizaram a gestação. Em casos de aborto recorrente espontâneo em humanos, de causas desconhecidas, há uma predominância de citocinas de perfil Th1 se comparado as gestações normais (MAKHSEED et al., 1999; RAGHUPATHY et al., 2000). As citocinas parecem ser responsáveis pela regulação de dois sistemas ligados à gestação, o endócrino e o imune. Esse mecanismo se dá pela indução das células trofoblásticas por citocinas IL-4 e IL-6 a liberarem hCG (gonadotrofina coriônica humana) o qual induz a produção de progesterona e conseqüentemente estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias (SAITO, 2000).

Outra molécula importante na gestação é o MHC de classe I, importante na apresentação antigênica para células T e células NK e estão presentes em todas as células do corpo, exceto nas células trofoblásticas fetais (HUDDLESTON; SCHUST, 2004). Em

ovelhas, essa molécula é mais expressa nas células estromais de placentônios, nos estágios mais avançados da gestação, ao contrário do que ocorre com o MHC classe II, mais evidente no início da prenhez (GOGOLIN-EWENS et al., 1989). Davies et al. (2004) verificaram a expressão do MHC de classe I em gestações bovinas alteradas e com retenção placentária e observaram que há diferenças na população linfocítica, produção de citocinas e células trofoblásticas apoptóticas, sugerindo que o reconhecimento do sistema imune materno ao MHC de classe I fetal dispara uma resposta inflamatória que contribui para a separação placentária durante o parto. Além disso, a supressão do MHC de classe I no início da gestação nos trofoblastos é essencial para o desenvolvimento e sobrevivência do feto.

Nos animais clonados, a expressão de MHC de classe I foi acompanhada pelo aumento do número de linfócitos T CD3⁺ endometriais, sugerindo que a imunologia da gestação desses animais é alterada. Tendo em vista a distribuição e a quantidade elevada dessas células, sugere-se ser esta a causa ou sintoma de alta mortalidade embrionária no início da gestação em clones (HILL et al., 2002).

Um hormônio muito importante na gestação citado anteriormente é a progesterona, a qual se atribui ser um bom imunomodulador, pois bloqueia a proliferação de linfócitos estimulados por mitógenos, melhora o tempo de sobrevivência do enxerto fetal, modula a produção de anticorpos, diminui o *burst* oxidativo de monócitos, reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos em resposta a produtos bacterianos e altera a secreção de citocinas de clones de células T favorecendo a produção de IL-10 (PELTIER, 2003).

Deve-se considerar também que os componentes do líquido seminal influenciam na expressão de quimiocinas pelas células do estroma endometrial, as quais secundariamente ativam neutrófilos a secretarem espécies reativas de oxigênio (*ROS*) e macrófagos a fagocitarem os debris celulares. Esses mecanismos induzem mudanças no número de leucócitos endometriais, ativam fatores endoteliais e estromais proporcionando um meio ambiente favorável para a apresentação de alo-antígenos paternos para as células imunocompetentes da mãe e preparando esse tecido para a implantação do embrião (ROBERTSON et al., 1994; KAYISLI et al., 2002).

Muitas pesquisas vêm sendo feitas em humanos na tentativa de explicar problemas como infertilidade, abortamentos recorrentes, nascimento prematuro, etc relacionando-os com a tolerância materna. Em bovinos o entendimento do sistema imune materno em tolerar antígenos fetais está mais obscuro ainda.

3.4.1 Leucócitos Placentários

O diálogo na interface materno-fetal do útero gestante envolve várias populações celulares como macrófagos, células dendríticas, células *natural killer*, linfócitos B, linfócitos T, além de várias de citocinas do perfil Th1/Th2 as quais juntamente com hormônios, fatores de crescimento e outras proteínas, favorecem ou não a manutenção da gestação.

3.4.1.1 Células *Natural Killer* uterinas (*uNK*)

As células NK são uma população diferenciada de linfócitos devido à ausência de receptores encontrados normalmente nas células T e B atuam nas respostas imunes inatas para eliminar células infectadas por microrganismos por meio de mecanismos líticos diretos e pela secreção de IFN- γ . As células NK não expressam receptores de antígenos distribuídos por clonagem como os receptores de imunoglobulinas ou TCRs, e sua ativação é regulada por uma combinação de receptores estimuladores e inibidores da superfície celular, estes últimos reconhecendo moléculas próprias do MHC (ABBAS, 2005). O mecanismo utilizado para eliminar microrganismos é o mesmo utilizado pelas células T citotóxicas gerados na resposta imune adaptativa. Os grânulos citotóxicos (perforina e granzima-A) são liberados sobre a superfície da célula alvo e estas penetram pela membrana celular e induzem a morte celular programada. As NK são ativadas em resposta a interferons ou citocinas derivadas de macrófagos (JANEWAY, 2001).

As células *natural killer* uterinas diferem das do sangue periférico. Essas últimas possuem dois tipos distintos definidos por seus níveis de expressão de CD56 e CD16. Aproximadamente 90% das NK do sangue periférico expressam baixos níveis de CD56 e são positivos para CD16 (CD56^{dim}CD16⁺) e o restante expressa altos níveis de CD56 e são CD16⁻ (CD56^{bright}CD16⁻).

Em humanos, as *uNK* são CD56^{bright}CD16⁻ e constituem cerca de 90% da população leucocitária com características especiais como secreção de citocinas e citólise além de possuírem grandes quantidades de grânulos em seus conteúdos (PARHAM, 2004).

O número exacerbado dessas células no útero durante a gestação, sugere que elas tenham importante papel na regulação imune da gestação, mantendo a sua ação citotóxica

quiescente e não atacando o embrião alogênico em desenvolvimento. Isto tem sido correlacionado ao fato das uNk expressarem receptores inibitórios da ação lítica – KIR (*killer cell Ig-like receptor*) (LANIER, 1998). Esses receptores ligam-se ao MHC-I (HLA-C, HLA-E e HLA-G) expressos pelos trofoblastos, inibindo a atividade lítica das uNK (HIBY et al., 1997; VERMA et al., 1997). A interação entre as células uNK e os trofoblastos pode representar o principal mecanismo através do qual o útero materno controla a implantação e o desenvolvimento da placenta alogênica (KING et al., 2000), sugerindo uma atuação das células uNK na tolerância materno-fetal.

Segundo revisão feita por Bulmer e Lash (2005) as células uNK estão localizadas na decídua no início da gestação, freqüentemente formando um agregado celular envolvendo a artéria espiral e glândulas, também estão presentes antes da implantação e no endométrio de mulheres não gestantes alterando seu número durante o ciclo menstrual (TRUNDLEY; MOFFETT, 2004). Tanto em camundongos quanto em humanos as células uNK apresentam o seu potencial citotóxico inibido na gestação normal, sendo conhecidas apenas a produção de citocinas que sustentam a gestação normal (GAMBEL et al., 1985; ASHKAR; CROY, 1999). Bulmer e Lash (2005) inferiram que as células uNK participam do controle da invasão trofoblástica em humanos no início da gestação, na produção de citocinas e também possuem seu número aumentado na decídua depois do tratamento com progesterona.

As uNK produzem varias citocinas como INF- γ que influencia a placentação, atua na modelação vascular uterina, e sendo o trofoblasto um de seus alvos em potencial. Destaca-se por ser o mediador químico comprovadamente produzido pelas uNK durante a gestação (ASHKAR et al., 2000; ASHKAR; CROY, 2001). Outra citocina importante e o TNF- α que pode ter efeito negativo sobre a implantação e a invasão trofoblástica (ASHKAR; CROY, 2001).

3.4.1.2 Linfócitos T

Na decídua a população de linfócitos T constitui pouco menos que 20%, mas sua presença em infiltrações decíduais aumenta com o decorrer da gestação (WILCZYNSKI et al., 2003). No sítio de implantação do embrião também existem poucas células T (KABAWA et al., 1985). São encontrados espalhados no estroma, dentro do epitélio e também em agregados linfóides e, como os linfócitos B durante o ciclo menstrual seus números permanecem inalterados (TRUNDLEY; MOFFETT, 2004). Em bovinos, estudos revelaram

uma significativa redução no número de linfócitos no epitélio uterino entre 19 e 27 dias após a fertilização (GOGOLIN-EWENS, 1989).

Nas gestações de humanos e roedores, há uma grande mudança dentro do útero na população de leucócitos principalmente de células NK e linfócitos as quais acompanham a decidualização para o estroma endometrial na ausência de gestação. Em espécies não decidualizadas isso ainda é obscuro. Segundo experimento feito em porcas prenhes por Engelhardt, Croy e King (2002), foi verificado que os leucócitos estão difusamente espalhados através do estroma endometrial e estes são raros ou ausentes no epitélio luminal. E a densidade dos leucócitos durante a fase luteal foi similar àquela do sítio de ligação, sugerindo que o recrutamento leucocitário foi uma resposta localizada do embrião.

Estudos comparando as sub-populações linfocitárias em útero de mulheres com gestações normais e mulheres com pré-eclampsia, verificaram que essas últimas possuíam um aumento na porcentagem de células NK e linfócitos T citotóxicos e, uma diminuição de linfócitos T maduros, linfócitos B e linfócitos T supressor quando comparadas às gestações normais. Também foi dosada a secreção de citocinas e verificou-se que as de perfil Th1 foram favorecidas (extremamente alta de IFN- γ e baixa de IL-6 e IL-10) e em pacientes com pré-eclâmpsia a secreção de IL-12 estava diminuída quando comparada aos controles (WILCZYNSKI et al., 2003).

Em bovinos, estudos revelaram que a distribuição de linfócitos foi menor em carúnculas gestantes quando comparadas a fêmeas não gestantes e na região intercaruncular (GOGOLIN-EWENS, 1989). Leung et al. (2000) estudaram a distribuição de leucócitos uterinos (CD4, CD21 e CD14) e a expressão de interleucinas (IL-1 α , IL-2, IL-6 e IL-10) no dia 16 da gestação em bovinos. Verificaram que essas células estavam em altas concentrações no estroma sub-epitelial e, que nem a concentração de INF-tau nem o tamanho do embrião foram relacionados com a densidade dessas células. E somente a interleucina IL-1 α foi detectada no período estudado.

A existência de trocas na atividade funcional das populações de linfócitos maternos durante a gestação leva a um re-direcionamento da resposta imune de uma imunidade celular; uma tolerância transitória para os antígenos fetais; e ativação de populações linfocíticas específicas envolvidas na imunossupressão ou liberação de citocinas que estimulam a função da placenta (HANSEN, 1997).

Outra população de destaque nos bovinos são as células T $\gamma\delta$ onde de acordo com Oliveira e Hansen (2008) em estudo feito em vacas gestantes no dia 33-34 e no final de

gestação quando comparadas com vaca não gestantes, foi observado que há um aumento na proporção de células $CD4^+$ que são positivas para CD25 e na porcentagem de PBMC que são células $T\gamma\delta$ e que são $CD4^+CD25^+$.

3.4.1.3 Macrófagos uterinos

O número de macrófagos na decídua humana é de aproximadamente 10-15% do total de células permanecendo durante toda a gestação (HUNT et al., 2000).

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

No sítio de implantação há um aumento no número dessas células, contudo, durante a invasão trofoblástica essas são escassas (TRUNDLEY; MOFFETT, 2004). Estão distribuídos na decídua e estão concentrados na porção da decídua abaixo dos trofoblastos (AAGAARD-TILLERY et al., 2006). De acordo com Piccini (2003) podem ser distribuídos na decídua parietal onde possuem íntimo contato com o citotrofoblasto coriônico. São abundantes no estroma endometrial e tecidos conectivos do útero. Sugere-se que os hormônios esteróides recrutam macrófagos uterinos através do ciclo menstrual (WIRA et al., 2005), são abundantes na fase luteal no endométrio, mas diminui na fase secretória (AAGAARD-TILLERY et al., 2006).

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

Os macrófagos uterinos se ligam a bactérias, de maneira dose-dependente os quais subseqüentemente levam a fagocitose. Estes também produzem radicais superóxido e citocinas pró-inflamatórias quando desafiadas com LPS (lipopolissacarídeo), sugerindo um importante papel para essas células no reconhecimento de infecções bacterianas durante a gestação (SINGH et al., 2005).

A placenta também é rica em macrófagos de origem fetal (células de Hofbauer) que participam da manutenção da gestação e a sobrevivência fetal. A termo, alguns macrófagos na

parte basal da placenta são de origem fetal. Suas funções não estão claras, mas acredita-se que possam atuar como células fagocíticas na remoção de debris celulares na interface materno-fetal, e sua capacidade de apresentação de antígenos é reduzida quando comparada aos monócitos sistêmicos (AAGAARD-TILLERY et al., 2006).

Em bovinos, há um grande número de macrófagos localizados no parênquima das carúnculas durante toda a gestação, bem como logo após o parto (MIYOSHI; SAWAMUKAI, 2004).

No estudo feito em ratas prenhes (multíparas ou primíparas) com idades diferentes foi verificado que o número de macrófagos observados em fêmeas primíparas velhas foi maior do que em primíparas jovens e sua expressão também foi aumentada. Esses resultados indicaram que o estado de paridade, ou seja, em fêmeas múltiparas, há a influencia do número de macrófagos local (LAGADARI et al., 2004).

Outra população de destaque nos bovinos são as células $T\gamma\delta$ onde de acordo com Oliveira e Hansen (2008) em estudo feito em vacas gestantes no dia 33-34 e no final de gestação quando comparadas com vaca não gestantes, foi observado que há um aumento na proporção de células $CD4^+$ que são positivas para CD25 e na porcentagem de PBMC que são células $T\gamma\delta$ e que são $CD4^+CD25^+$.

M
A
T *M*
E *É*
R *T*
I *O*
A *D*
I *O*
S *S*

4 MATERIAS E MÉTODOS

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

4.1 ANIMAIS

Para os ensaios de proliferação de células mononucleares placentárias e células totais da placenta, foram utilizados placentônios oriundos de 27 vacas gestantes nos diferentes trimestres gestacionais coletados do Frigorífico Mantiqueira localizado na cidade de São José dos Campos/SP.

Para os ensaios de linfoproliferação de células mononucleares do sangue periférico, foram utilizados sangue periférico de 4 vacas não gestantes, colhidos de animais do HOVET (Hospital Veterinário de ruminantes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo) e 9 vacas gestantes nos diferentes terços gestacionais coletados do Frigorífico Mantiqueira localizado na cidade de São José dos Campos/SP. O tamanho dos fetos foram estimados segundo crown-rump (NODEN; LAHUNTA, 1990).

4.2 PROLIFERAÇÃO PELA TÉCNICA DE CFSE

A técnica de CFSE (5, 6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster) é utilizada para enumerar e estudar a resposta funcional de células T antígeno-específico *in vivo* (ABBAS, 2005). Esse corante possui propriedades bioquímicas que consiste em uma molécula contendo duas metades de acetato e um grupo funcional éster succinimidil o qual é permeável e não fluorescente. Quando ocorre a difusão para dentro da célula, as esterases endógenas celulares removem o grupo acetato, tornando a molécula altamente fluorescente e não permeável na membrana celular. O grupo éster succinimidil reage com grupo amina das proteínas celulares e corando-as. Com essas propriedades há pouca chance de reverter as características de fluorescência e favorecendo a longa permanência da coloração pelo CFSE nas células (LYONS, 2000).

Após a extração das células placentárias totais, e de células mononucleares da interface de 1077 após separação por gradiente, foram ajustadas para $0,5-10 \times 10^6$ células por mL de RPMI sem soro fetal e incubadas com 1 μ L de *CFSE Vybrant* (Invitrogen®) na concentração final de 10 μ M por 5 minutos a temperatura ambiente. Após esse período a reação foi interrompida com o acréscimo de 2 mL de RPMI contendo 5% de *FBS* gelado. As células foram lavadas a 1200 rpm por 5 minutos a 4°C por três vezes e ressuspensas em volume conhecido de RPMI suplementado com 5% de *FBS* e 1mL de 2-mercaptoetanol (Gibco®) e 1mM de piruvato de sódio (Gibco®). Essas células foram ajustadas para 2×10^5 células por poço em placas de 96 *wells* de fundo arredondado. Essas células foram acondicionadas em incubadoras a 37°C em 5% de CO₂ por 96 horas. Os estímulos foram realizados em triplicata para cada população da seguinte forma: células marcadas com CFSE, estimuladas com Concanavalina A (Sigma®) [5 μ g/mL], fitohemaglutinina (Sigma®) [10 μ g/mL] e tratadas com HSP 60 recombinante *Low Endotoxin* (Lionex®)[10 μ g/mL].

O controle positivo para esse ensaio foi realizado com sangue humano e sangue bovino.

4.2.1 Avaliação da capacidade proliferativa células placentárias totais em resposta a HSP 60

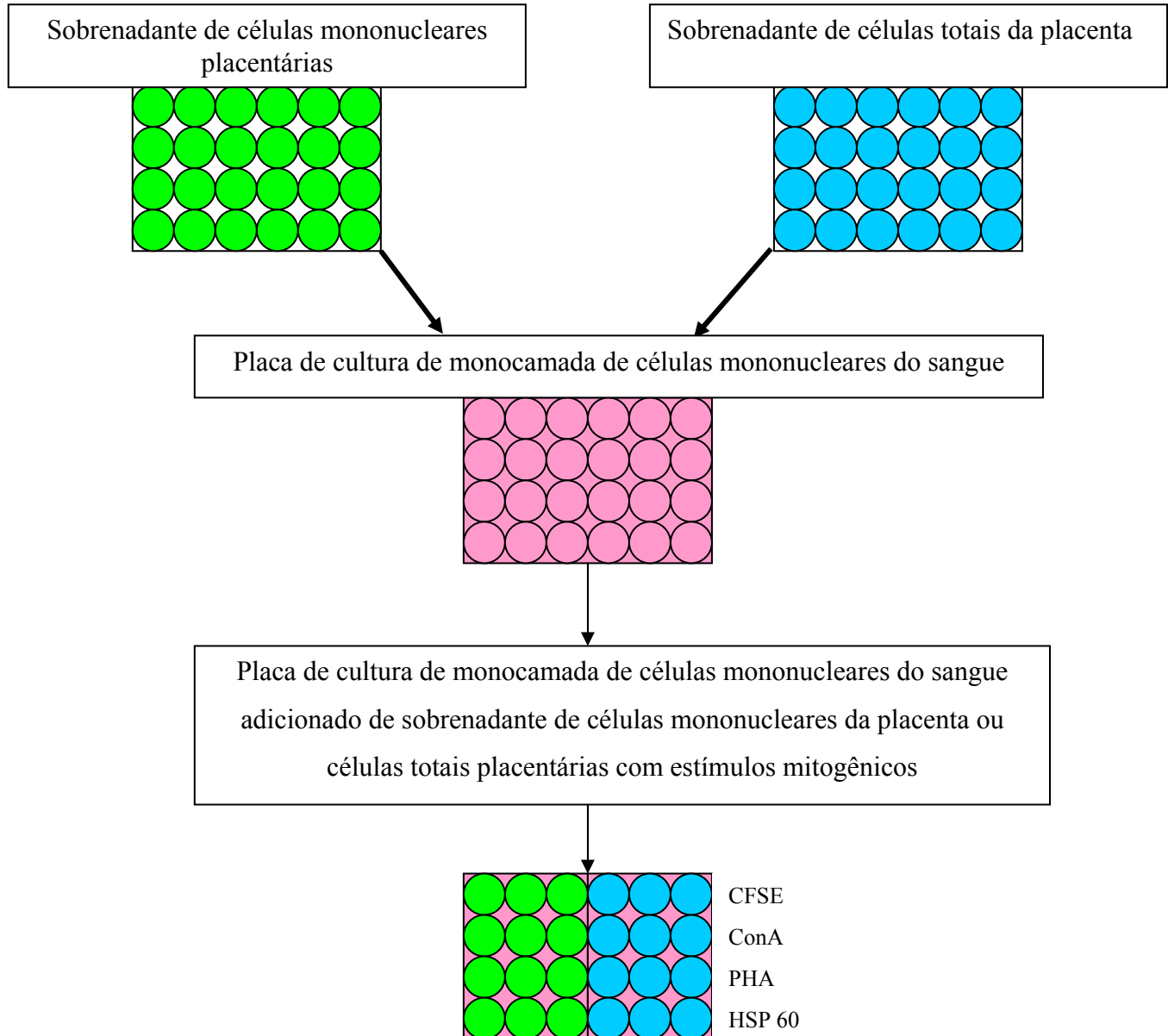
Após a extração das células placentárias totais as concentrações celulares foram ajustadas para $0,5-10 \times 10^6$ células por mL de meio de cultura RPMI sem soro fetal e incubadas com 1 μ L de *CFSE Vybrant* (Invitrogen®) na concentração final de 10 μ M por 5 minutos a temperatura ambiente. Após esse período a reação foi interrompida com o acréscimo de 2 mL de RPMI contendo 5% de *FBS* gelado. As células foram lavadas a 300 G por 5 minutos a 4°C por três vezes e ressuspensas em volume conhecido de meio de cultura RPMI suplementado com 5% de *FBS* e 1mM de 2-mercaptoetanol (Gibco®). Essas células foram ajustadas para 2×10^5 células por poço em placas de 96 *wells* de fundo arredondado. Essas células foram acondicionadas em incubadoras a 37°C em 5% de CO₂ por 72 horas. Os estímulos foram realizados em triplicata para cada população da seguinte forma: células marcadas com CFSE, estimuladas com Concanavalina A (ConA) (Sigma®) [5 μ g/mL], fitohemaglutinina (PHA) (Sigma®) [10 μ g/mL] e tratadas com HSP 60 recombinante *Low Endotoxin* (Lionex®)[10 μ g/mL].

O controle positivo para esse ensaio foi realizado com sangue humano e sangue bovino.

4.2.2 Influência do sobrenadante de células placentárias totais ou células mononucleares placentários na proliferação de monocamada de células mononucleares do sangue periférico estimuladas ou não com HSP 60

Após a extração das células placentárias totais, e de células mononucleares da placenta em gradiente de Ficoll-Paque, e após o período de incubação por 18 horas, o sobrenadante de ambas as placas contendo células placentárias totais e células mononucleares placentárias foram centrifugadas, e seus sobrenadantes removidos e cerca de 80 μ L e acondicionados sobre a monocamada de células mononucleares do sangue, e incubados a 37°C em 5% de CO₂ por um período de 3 dias para a proliferação celular e posteriormente analisadas no citômetro de fluxo. Esquema (1) ilustrativo do protocolo para o sobrenadante de células placentárias totais ou células mononucleares placentárias.

Esquema (1)



Após 72 horas, as células foram ressuspensas e retiradas das placas e analisadas no citômetro de fluxo.

Como controle positivo, a monocamada de linfócitos de sangue periférico foi acondicionada de sobrenadante de linfócitos de sangue estimulados com os tratamentos mencionados acima.

4.2.3 Avaliação da capacidade proliferativa de células mononucleares do sangue periférico de vacas gestantes e não gestantes

O sangue foi coletado em seringa heparinizada e as células mononucleares do sangue periférico foi coletado após separação pelo Ficoll-Paque, como descrito no item 4.1, e a resposta de linfoproliferação pela técnica de CFSE, conforme descrito no item 4.2.1.

4.3 FAGOCITOSE

O ensaio de fagocitose foi realizado com as células placentárias bovinas, células totais do sangue periférico de vacas gestantes e não gestantes. As células placentárias bovinas após serem dissociadas mecanicamente foram ajustadas na concentração de 5×10^5 células e incubadas com 40 μ L de pHrodo™. Estas células, foram mantidas em banho-maria a 37°C por 2 horas e o controle negativo mantido no gelo pelo mesmo período. Após esse período as células do sangue foram lisadas com 2 mL da solução de NaCl (cloreto de sódio) a 0,2% e após 20 segundos foi acrescentado 2 mL da solução de NaCl a 1,6% e posteriormente as células foram lavadas e analisadas no citômetro de fluxo. Esse mesmo protocolo foi utilizado para as células totais do sangue periférico de vacas gestantes e não gestantes.

4.4 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

Efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos já eram conhecidos no final do século XIX (LORRAIN-SMITH, 1899), tornando-se objeto de intensa investigação científica nos últimos anos (HALLIWELL, 2000). Estes efeitos são resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lípidos, principalmente ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), mediada por espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), conhecidas genericamente como radicais livres (RL) (GILLER; SIGLER, 1995; ROMERO et al., 1998). A reação destas

espécies com os AGPI, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular (LIMA; ABDALLA, 2001).

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

Para a avaliação da peroxidação foi utilizada a técnica de Ohkawa et al.(1979), baseada na formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), predominantemente o malonaldeído (MDA), que ocorre após a lipoperoxidação das membranas celulares. Estes compostos produzem uma coloração característica (rosa), que foi medida espectrofotometricamente no comprimento de onda de 535nm. Com esta técnica avaliamos a degradação oxidativa de ácidos graxos presentes em sobrenadante da cultura de células placentárias adicionadas de fatores conforme descrito na tabela abaixo (Tabela 1). Foram feitas duas seqüências de *wells* com os fatores, sendo que, em uma das seqüências também adicionamos 0,54µg de Indoleamina-2,3- dioxigenase.

Alíquotas de 50µL do sobrenadante da cultura primária de cada amostra, conforme delineamento experimental foi avaliado nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Em uma série foram adicionados 250µL de TCA (ácido tricloroacético 20%) e em outra 250µL de TCA 20% e TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,86% na proporção v/v. As amostras foram mantidas por 10 minutos em banho-maria, a 100°C. Após este período os tubos correspondentes de TCA e TCA/TBA foram imediatamente imersos em gelo por 10 minutos e centrifugados por 4 minutos a 8000 rpm.

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

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

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

4.5 CICLO CELULAR

Em biologia, chama-se ciclo celular o conjunto de processos que se passam numa célula viva entre duas divisões celulares. O ciclo celular consiste na interfase e na fase mitótica, que inclui a mitose e a divisão celular (citocinese).

A vida de uma célula começa no momento em que a divisão celular que a originou acaba e o momento em que ela se divide ou morre. A interfase corresponde ao período entre o final de uma divisão celular e o início da segunda. Trata-se de um período de intensa atividade na célula, sendo neste momento que ocorre a duplicação do material genético. Geralmente a célula encontra-se nesta fase durante a maior parte da sua vida. A interfase divide-se em três fases: (i) *fase G₁* - fase de síntese de proteínas, enzimas e RNA; (ii) *fase S* - fase de auto-replicação das moléculas de DNA, a partir deste momento os cromossomos passam a possuir duas cromátides ligadas por um centrômero; (iii) *fase G₂* - período de síntese de moléculas necessárias à divisão celular.

O ciclo celular pode parar em determinados pontos e só avança se determinadas condições se verificarem, tais como a presença de uma quantidade adequada de nutrientes ou quando a célula atinge determinadas dimensões. A regulação do ciclo celular é realizada por ciclinas e por quinases ciclino-dependentes. Certas células, como os neurônios, param de se dividir quando o animal atinge o estado adulto, mantendo-se durante o resto da vida do indivíduo na fase G₀. Existem três momentos em que os mecanismos de regulação atuam: (i) na fase G₁, no fim desta fase existem células que não iniciam um novo ciclo ou que não estão em condições de fazê-lo, essas células permanecem num estágio denominado G₀. As razões

para a célula passar para o estágio G_0 podem ser: (a) células que não se dividem mais, essas células permaneceram neste estágio até a sua morte, são exemplos os neurônios e as células das fibras musculares; (b) células que não obtiveram a quantidade de nutrientes necessária; (c) células que não atingiram o tamanho requerido; (ii) na fase G_2 , antes de iniciar-se a mitose existe outro momento de controle caso a replicação do DNA não tenha ocorrido corretamente o ciclo pode ser interrompido e a célula volta a iniciar a fase S; (iii) na metáfase, no final da metáfase evidenciam-se mais um mecanismo de regulação responsável pela verificação da ligação do fuso acromático com os cromossomos, de forma a que migre sempre uma das cromátides para os pólos.

A citometria de fluxo aplicada no estudo do ciclo celular registra os parâmetros cinéticos da população, revelando o índice de DNA, ploidia, a fração de proliferação celular, a porcentagem de células encontradas nas fases G_0/G_1 , S e G_2/M , indicando parâmetros uni ou multivariáveis, prognósticos e possíveis direções terapêuticas.

Foram separadas $2,5 \times 10^5$ células/mL ressuspensas em etanol 70% na presença de $1 \mu\text{g}$ de RNase por 2 horas, ou a -20°C para posterior análise das fases do ciclo celular. As suspensões celulares foram centrifugadas duas vezes a 3000rpm com solução PBS e ressuspensas em $200 \mu\text{L}$ solução de iodeto de propídio (20mg/mL , Sigma®), $20 \mu\text{L}$ de Triton X-100 e 4mg RNase - A, por trinta minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz e transferidas para tubos de citometria, as imagens adquiridas em citômetro de fluxo (FACSCalibur - BD®). As fases do ciclo celular pré e pós-mitóticas (hipodiplóide, G_0-G_1 , fase S e G_2-M) foram analisadas em software *Cell Quest-pro*.

4.6 POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

A visualização da mitocôndria por microscopia de luz foi realizada por Kolliker em 1857 quando ele descreveu estruturas filamentosas e granulares nas células dos músculos as quais poderiam ser mitocôndrias. Utilizando a rodamina 123 (Rho 123) todas as mitocôndrias que estão presentes dentro das células vivas e que possuem alto potencial de membrana (característica exclusiva) são captadas por elas (CHEN, 1988). A morfologia mitocondrial é influenciada pelo estado metabólico celular, ciclo celular, desenvolvimento celular e diferenciação e por estado patológico (JOHNSON; WALSH; CHEN, 1980).

A marcação da mitocôndria pela Rho 123 em células vivas também é utilizada para monitoramento da motilidade mitocondrial e alterações morfológicas (CHEN, 1988).

A suspensão celular foi ressuspensa em volume final de 200 μ L em meio de reação contendo D-Manitol (250 mmol.L^{-1}); tampão Hepes (20 mmol.L^{-1}) pH 7,4, fosfato de sódio (1 mmol.L^{-1}), glutamato de sódio (3 mmol.L^{-1}) e Rho123 (0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Após 30 minutos de incubação em estufa de CO₂ a 37°C e o potencial de membrana foi determinado em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA), utilizando-se FL-1 para a Rho 123 a excitação ocorre em 485 nm e a emissão máxima em 530 nm (JOHNSON et al., 1981).

4.7 ESTATÍSTICA

A estatística foi realizada pelo teste de ANOVA seguida pelo teste comparativo de Tukey pelo software *Instat*, e os gráficos foram obtidos pelo *Prima* (v.5,0).

*R
E
S
U
L
T
A
D
O
S*

5 RESULTADOS

Os resultados das técnicas utilizadas neste trabalho estão descritos abaixo.

5.1 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DA PLACENTA BOVINA E DO SANGUE PERIFÉRICO POR GRADIENTE DE DENSIDADE

A separação de células mononucleadas da placenta bovina e do sangue periférico foi feita por gradiente de densidade padronizada para o Ficoll-Paque®. Estabeleceu-se uma associação entre a quantidade de leucócitos presentes no sangue periférico bovino e a técnica utilizada para a separação por gradiente de densidade pelo Ficoll-Paque, estimando-se a quantidade de linfócitos presentes na placenta bovina. Os resultados obtidos podem ser visualizados pela formação de células mononucleares, apresentados na figura 1.

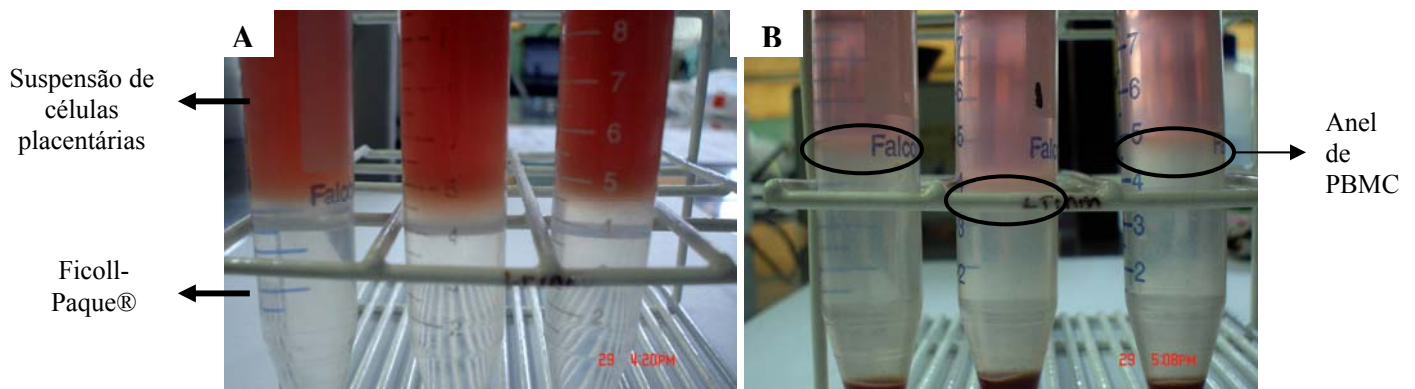


Figura 1-(A) Suspensão de células placentárias sobre o gradiente de densidade Ficoll-Paque®. (B) Formação do anel de células mononucleares (entre a suspensão celular e o gradiente de densidade). Nota-se abaixo um botão vermelho, referente aos glóbulos vermelhos.

5.2 PROLIFERAÇÃO PELA TÉCNICA DO CFSE

Os ensaios realizados para a avaliação da resposta proliferativa foram divididos em grupos utilizando-se: (1) células totais da placenta e linfócitos placentários; (2) monocamada de células mononucleares do sangue adicionados de células mononucleares do sangue, células totais da placenta e células mononucleares placentárias; (3) células mononucleares de sangue periférico de vaca não gestante e vaca gestante. Para calcular a porcentagem de divisão/proliferação dos resultados obtidos desses grupos foi utilizada a metodologia descrita e publicada por Lyons (2000), onde o número de eventos adquiridos nas gerações 1, 2 e 3 (células filha) foi dividido por 2, 4 e 8 (número de divisão celular), respectivamente. A porcentagem de divisão ou proliferação se dá pela divisão da soma das gerações de 1 a 3 pela soma das gerações de 0 a 3 (onde 0 é o número de eventos totais, ou seja, de células mãe).

A população celular da placenta é muito diversificada e os leucócitos envolvidos nesse órgão possuem mecanismos imunes peculiares em relação aos leucócitos do sangue periférico.

Para o controle da técnica de proliferação com o CFSE, a figura 2 de dot plot demonstra R 1 referente a região de linfócitos do sangue periférico bovino pela citometria de fluxo selecionado para análise de proliferação de células mononucleares da placenta, células totais placentárias, ensaio com sobrenadante e células mononucleares do sangue periférico bovino.

5.2.1 Influência da HSP 60 na capacidade proliferativa de células da placenta

As médias das porcentagens de proliferação das células totais da placenta nos animais de segundo terço gestacional foram de $10,10 \pm 2,78$ para o grupo controle (células placentárias somente marcadas com CFSE); $15,87 \pm 1,83$ para células estimuladas com ConA; $7,97 \pm 1,94$ para as células estimuladas com PHA e $9,27 \pm 3,17$ para células tratadas com HSP 60 não havendo diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Para os animais de terceiro terço, as médias das porcentagens de proliferação das células totais da placenta foram de $5,73 \pm 0,76$ para o grupo controle (células placentária

somente marcadas com CFSE); $6,25 \pm 0,86$ para células estimuladas com ConA; $3,39 \pm 1,05$ para as células estimuladas com PHA e $11,46 \pm 1,76$ para células tratadas com HSP 60 não havendo diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$).

As figuras de 3 a 5 representam dot plot de células placentárias de animal de segundo terço (controle, tratadas com ConA e HSP 60, respectivamente). As figuras de 6 a 8 representam dot plot de células placentárias de animal de terceiro terço (controle, tratadas com ConA e HSP 60, respectivamente).

Essas análises evidenciam que existe a proliferação placentária em células totais da placenta entre os terços estudados e que há um aumento significativo da HSP 60 no terceiro trimestre gestacional.

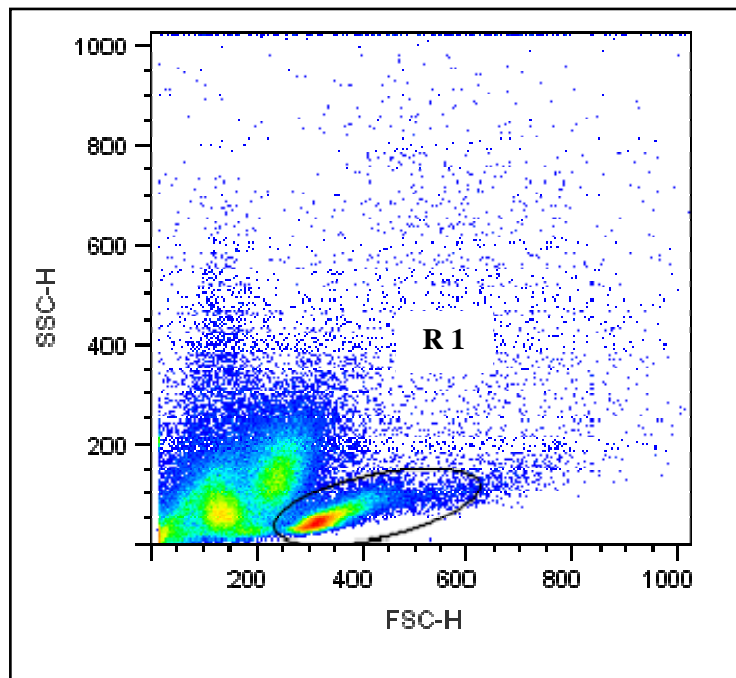


Figura 2- O gráfico de Dot plot demonstra R 1 referente a região de linfócitos do sangue periférico bovino pela citometria de fluxo selecionado para análise de proliferação de células totais placentárias, células mononucleares do sangue periférico e do ensaio com sobrenadante

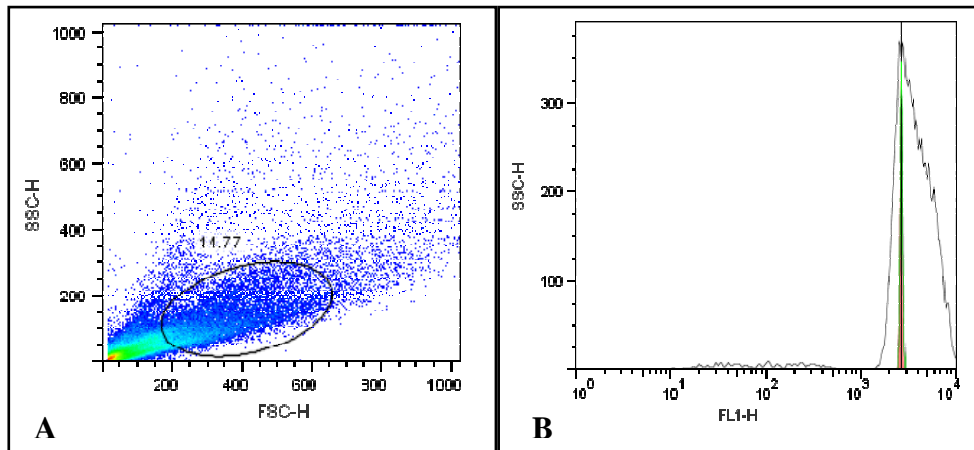


Figura 3- (A) Dot plot das células totais da placenta bovina representativo de animal de segundo terço. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)

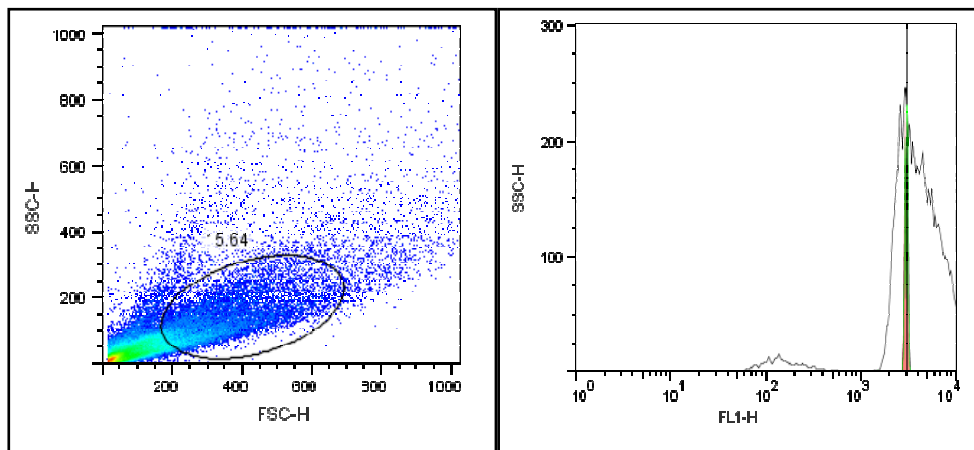


Figura 4- (A) Dot plot das células totais da placenta bovina representativo de animal de segundo terço. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)

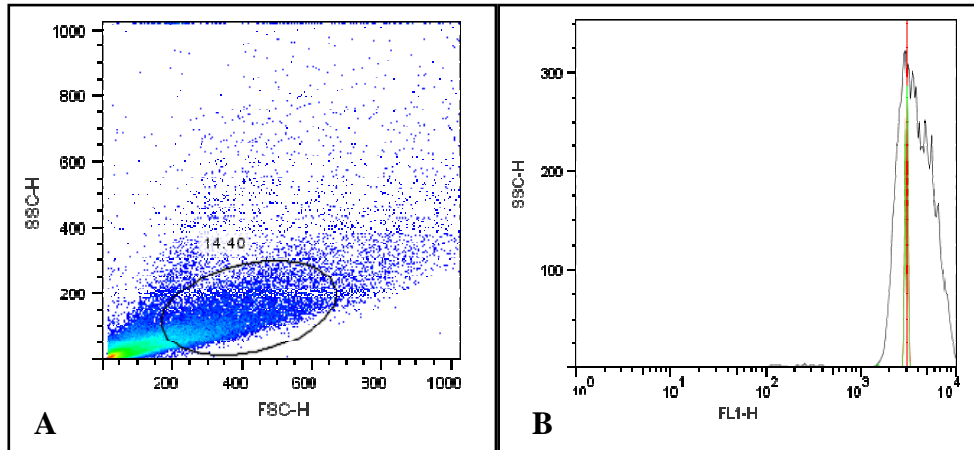


Figura 5- (A) Dot plot das células totais da placenta bovina representativo de animal de segundo terço. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo)

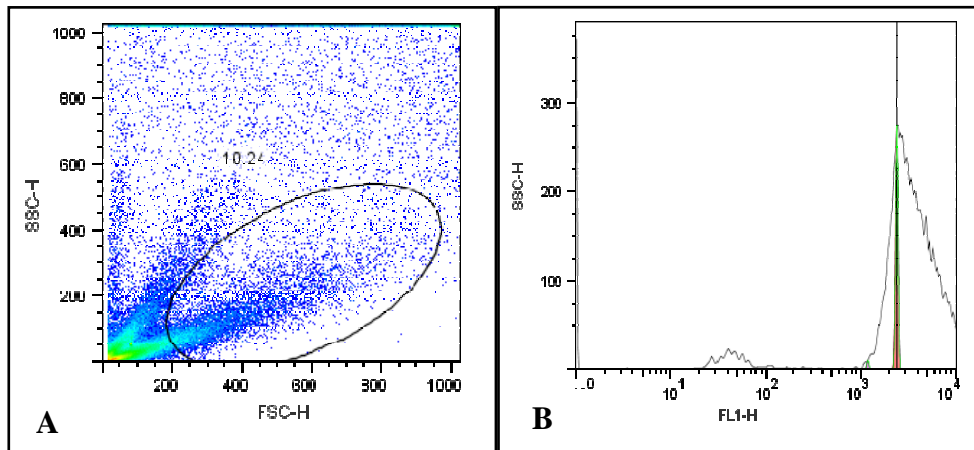


Figura 6- (A) Dot plot das células totais da placenta bovina representativo de animal de terceiro terço. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)

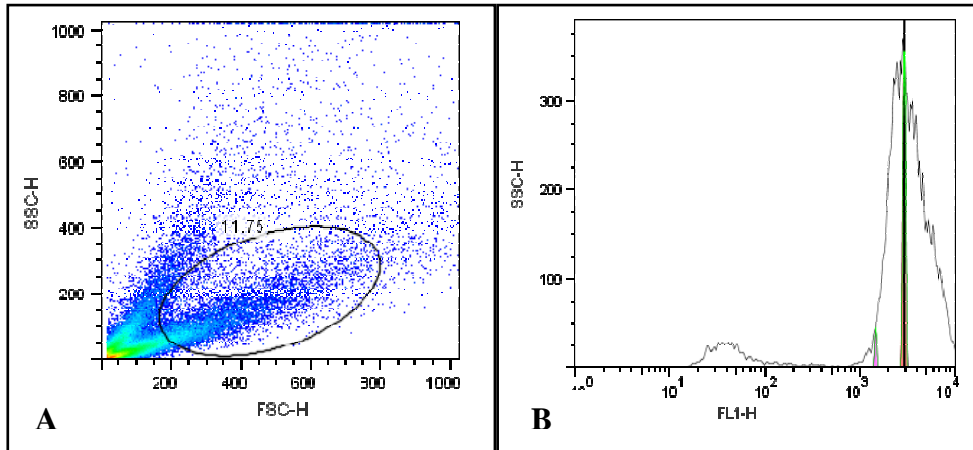


Figura 7- (A) Dot plot das células totais da placenta bovina representativo de animal de terceiro terço. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)

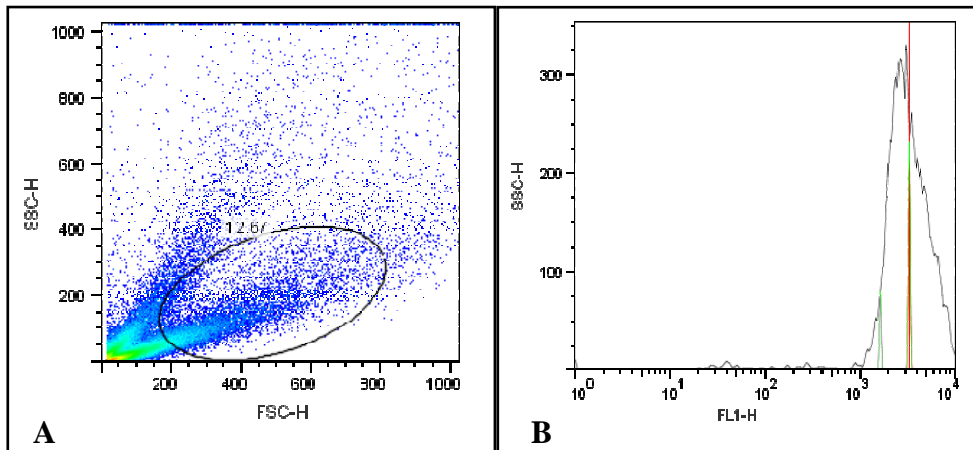


Figura 8- (A) Dot plot das células totais da placenta bovina representativo de animal de terceiro terço. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo)

5.2.2 Influência do sobrenadante de células placentárias totais ou células mononucleares placentários na proliferação de monocamada de células mononucleares do sangue periférico tratadas ou não com HSP 60

Devido ao fato de tanto as células placentárias totais não proliferando em nossos experimentos anteriores, aventamos a hipótese de haver algum mecanismo regulatório, talvez via proteínas como citocinas ou hormônios e por isso foi testado um protocolo utilizando monocamada de células mononucleares de sangue periférico de vaca não prenhe, acondicionadas de sobrenadante de células totais de placenta ou linfócitos placentários, conforme mostra o esquema 1.

O controle positivo, a monocamada de células mononucleares de sangue periférico acondicionada com sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico apresentaram média da porcentagem de proliferação de $1,64 \pm 1,62$; quando foram estimuladas com ConA a média foi de $1,88 \pm 1,52$; quando estimuladas com PHA a média foi de $2,00 \pm 1,41$; quando tratadas com HSP 60 média da porcentagem de proliferação foi de $1,68 \pm 1,43$, não apresentando diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

A monocamada de células mononucleares de sangue periférico quando acondicionada com sobrenadante de células placentárias de animais de segundo terço gestacional apresentaram as seguintes médias da porcentagem de proliferação de acordo com o tratamento: controle $15,48 \pm 13,91$; com ConA $2,05 \pm 1,08$; com PHA $2,41 \pm 1,60$; e com HSP 60 de $5,04 \pm 2,54$, não apresentando diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

A proliferação da monocamada de células mononucleares de sangue periférico quando acondicionada com sobrenadante de células placentárias de animais de terceiro terço gestacional a média da porcentagem de células não estimuladas foi de $0,90 \pm 0,52$; para a

ConA foi de $3,00 \pm 0,41$; para a PHA foi de $14,98 \pm 10,57$; e para a HSP 60 foi de $2,28 \pm 0,96$, não apresentando diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Em outro delineamento experimental, quando a monocamada de células mononucleares de sangue periférico foi quando acondicionada com sobrenadante de células mononucleares placentárias de animais de segundo terço gestacional a média da porcentagem de proliferação do controle foi de $4,21 \pm 1,66$; para a ConA foi de $5,17 \pm 1,85$; para a PHA foi de $3,24 \pm 2,30$; e para a HSP 60 foi de $1,99 \pm 1,99$, não apresentando diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Quando a monocamada de células mononucleares de sangue periférico foi quando acondicionada com sobrenadante de células mononucleares placentárias de animais do terceiro terço gestacional a média da porcentagem de proliferação de células não estimuladas foi de $1,58 \pm 0,53$; para a ConA foi de $2,33 \pm 1,23$; para a PHA foi de $2,88 \pm 0,10$; e para a HSP 60 foi de $0,98 \pm 0,65$, não apresentando diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

A análise estatística do controle, ou seja, de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$).

Não houve proliferação celular da monocamada de células mononucleares do sangue periférico quando adicionadas de sobrenadante de células placentárias tanto de segundo e terceiro terço e também quando adicionadas de sobrenadante de células mononucleares placentárias de segundo e terceiro terço gestacional.

Na monocamada de células mononucleares de sangue periférico acondicionada de sobrenadante de células totais de placenta pode-se observar que não houve proliferação tanto nas células estimuladas com ConA, quanto nas células tratadas com HSP 60.

As figuras de 9 a 11 representam dot plot de monocamada células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante de células mononucleares do sangue periférico sem

estímulo, estimuladas com ConA e tratadas com HSP 60, respectivamente. As figuras de 12 a 14 representam dot plot de monocamada células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante de células placentárias totais representativos de animal de segundo terço, sem estímulo, estimuladas com ConA e tratadas com HSP 60, respectivamente. As figuras de 15 a 17 representam dot plot de monocamada células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante de células mononucleares placentárias representativos de animal de terceiro terço, sem estímulo, estimuladas com ConA e tratadas com HSP 60, respectivamente.

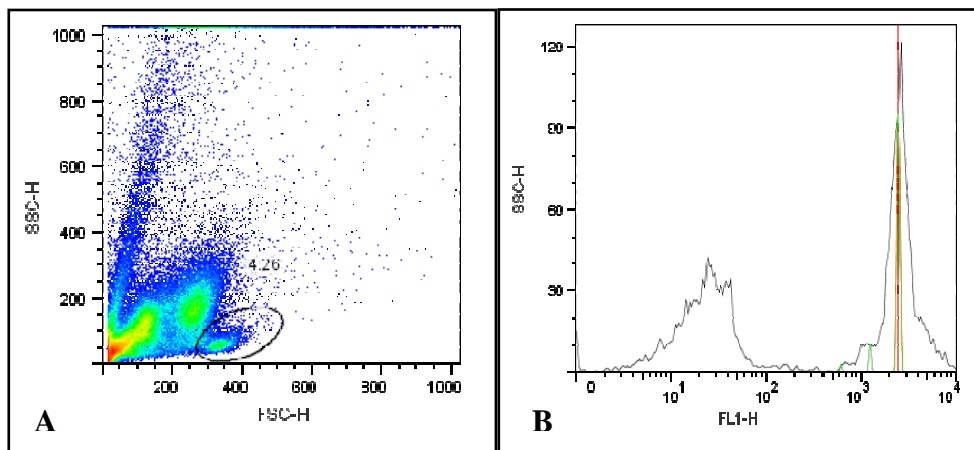


Figura 9- (A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)

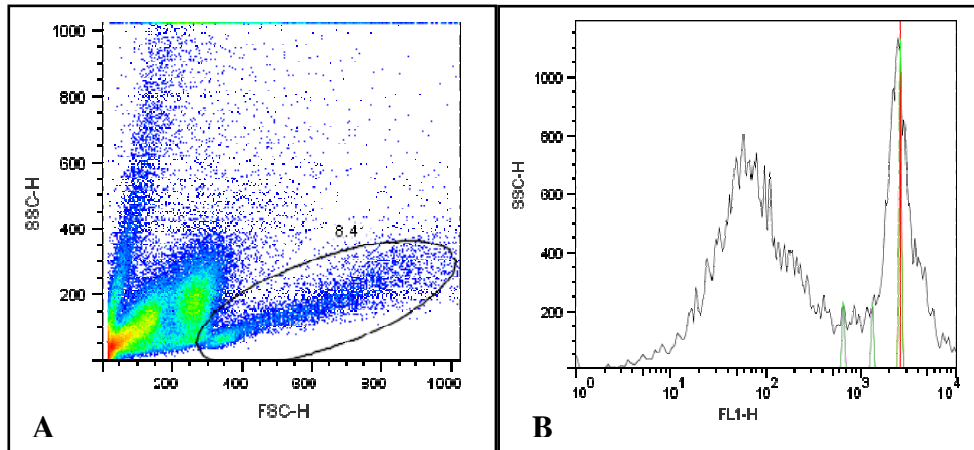


Figura 10- (A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)

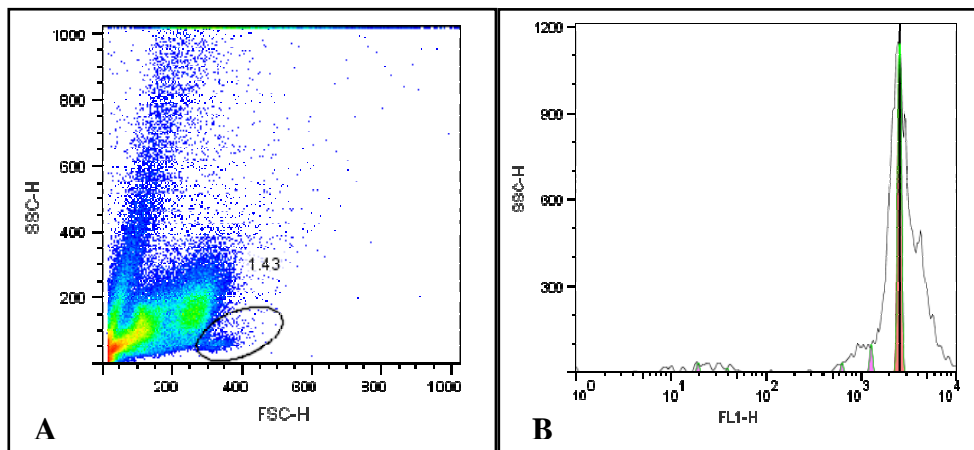


Figura 11- (A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico tratadas com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo)

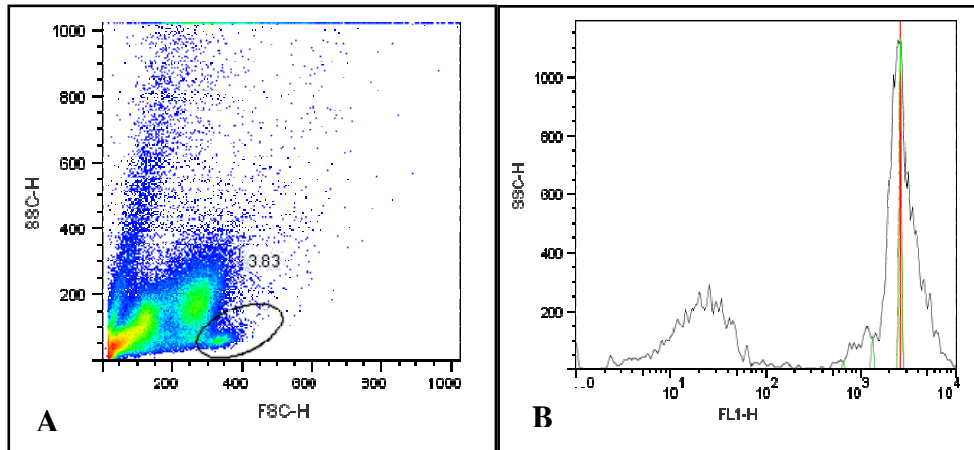


Figura 12- (A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante células totais de placenta representativo de animal de segundo terço sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)

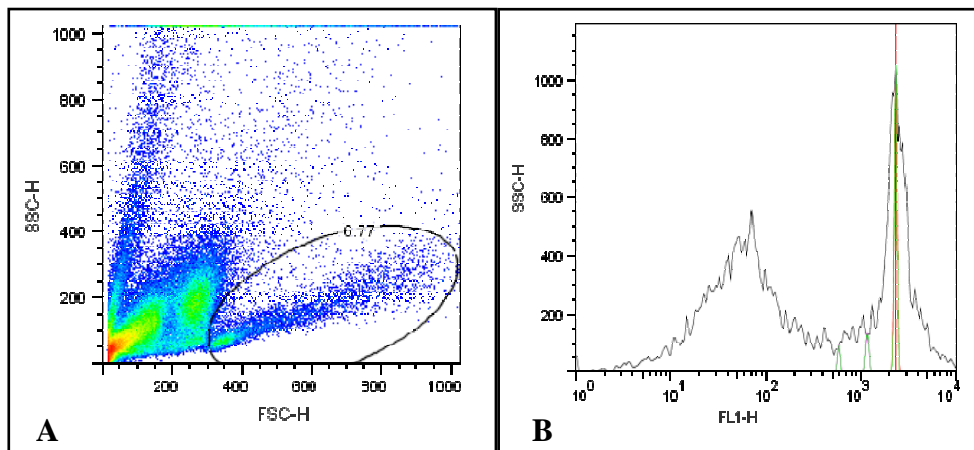


Figura 13- (A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante células totais de placenta representativo de animal de segundo terço estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)

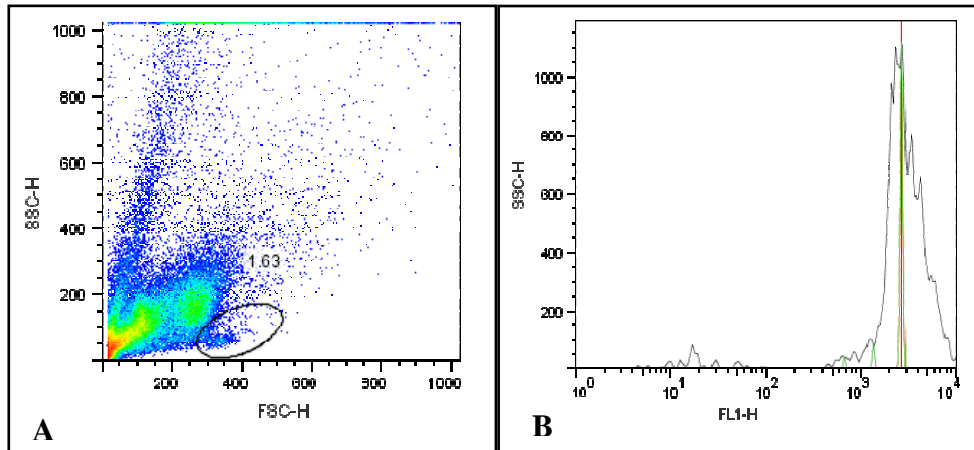


Figura 14- (A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante células totais de placenta representativo de animal de segundo terço tratadas com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo)

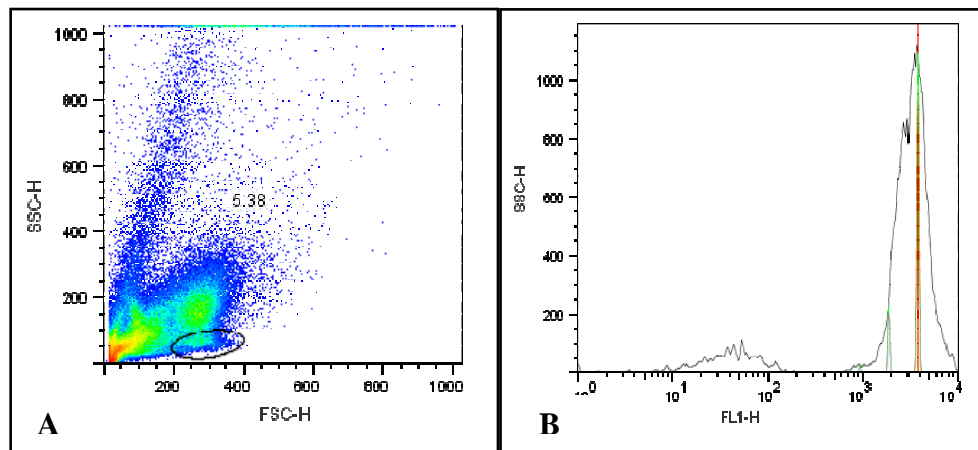


Figura 15- (A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante células mononucleares representativo de animal de terceiro terço sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)

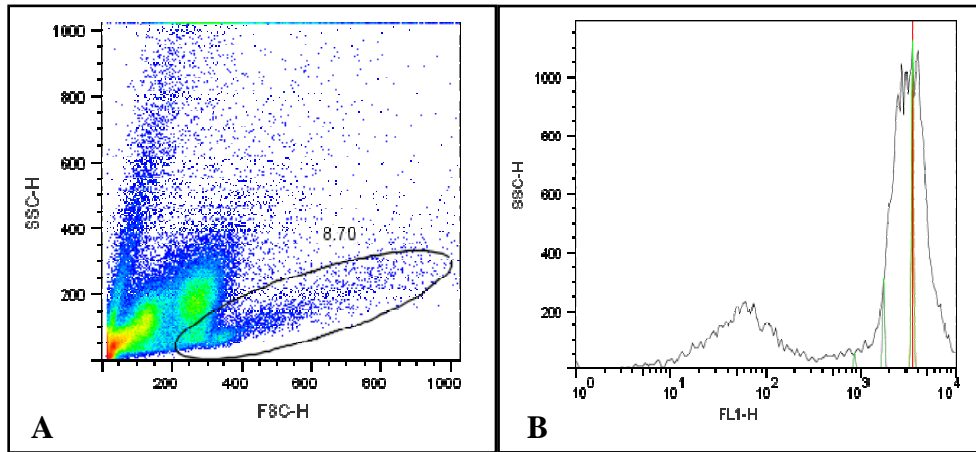


Figura 16- (A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante células mononucleares representativo de animal de terceiro terço estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)

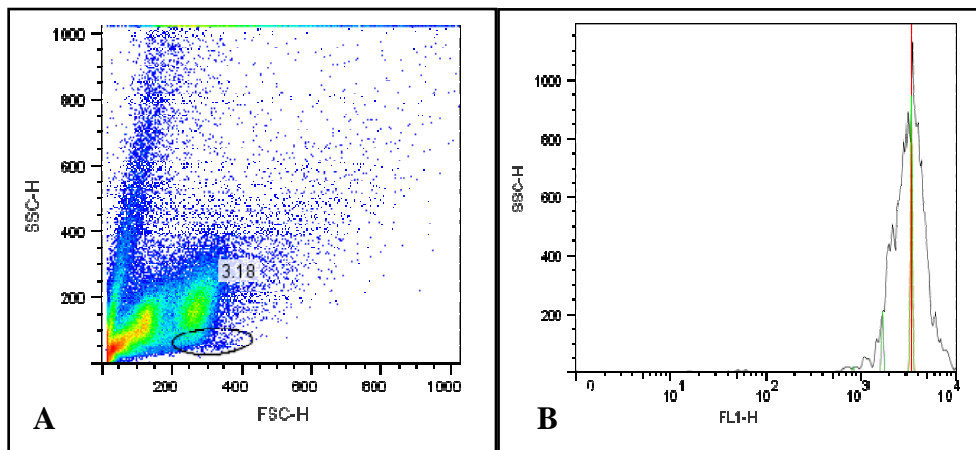


Figura 17- (A) Gráfico em Dot plot da monocamada de células mononucleares do sangue periférico com sobrenadante células mononucleares representativo de animal de terceiro terço tratados com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratados com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo)

5.2.3 Avaliação da capacidade proliferativa de células mononucleares do sangue periférico de vacas gestantes e não gestantes

Como os controles dos ensaios de resposta proliferativa estavam sendo realizados com células mononucleares do sangue periférico bovino de vacas não gestantes, foi levantada a hipótese se poderia haver diferença na capacidade de resposta proliferativa dessas células quando comparadas com vacas não gestantes durante o período gestacional.

O ensaio de proliferação foi realizado nas células mononucleares do sangue periférico comparando vacas gestantes e não gestantes para verificar se poderia estar havendo algum mecanismo de regulação sistêmica, já que nos ensaios anteriores com células placentárias totais e sobrenadante de células mononucleares placentárias e células totais de placenta houve proliferação celular.

Como se pode verificar, a média da porcentagem de proliferação do controle de células de vacas não gestantes, ou seja, de células não tratadas foi de $0,019 \pm 0,04$; estimuladas com ConA foi de $13,83 \pm 0,6$; para HSP 60 foi de $0,16 \pm 0,11$; e para as células tratadas com HSP 60 + ConA foi de $14,29 \pm 7,33$, sendo a diferença extremamente significativa entre os grupos ($P < 0,001$).

Nos animais de primeiro terço gestacional, a média da porcentagem de proliferação do controle de células foi de $6,45 \pm 5,54$; para as células estimuladas com ConA foi de $9,28 \pm 3,45$; para HSP 60 foi de $5,67 \pm 4,75$; e para as células tratadas com HSP 60 + ConA foi de $9,75 \pm 4,83$, não apresentando diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

A média de porcentagem de proliferação realizada nos animais de segundo terço gestacional para o controle foi de $0,22 \pm 0,18$; de células estimuladas com ConA foi de $6,16 \pm 2,56$; para HSP 60 foi de $0,79 \pm 0,16$; e para as células tratadas com HSP 60 + ConA foi de $7,56 \pm 4,11$, sendo a diferença extremamente significativa entre os grupos ($P < 0,001$).

Nos animais de terceiro terço gestacional, a média da porcentagem de proliferação do controle foi de $6,60 \pm 3,34$; de células estimuladas com ConA foi de $9,08 \pm 5,51$; para HSP 60 foi de $5,21 \pm 6,96$; e para as células tratadas com HSP 60 + ConA foi de $2,14 \pm 3,03$, não apresentando diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

Comparando-se as médias da porcentagem de proliferação entre vacas gestantes e não gestantes pode-se observar que houve diferença extremamente significativa entre os grupos ($P < 0,001$). A média da proliferação de células mononucleares do sangue periférico de vacas do segundo terço gestacional são semelhantes às médias de porcentagem de proliferação células do sangue periférico de vacas não gestantes, onde houve diferença extremamente significativa entre esses grupos ($P < 0,001$). Esses dados podem ser observados no gráfico 1.

Analisando as médias da porcentagem de proliferação de vacas não gestantes com as vacas gestantes nos três terços gestacionais e ambas tratadas com HSP 60 pode-se observar que não houve proliferação, ou seja, a HSP 60 não estimulou a proliferação dessas células ($P > 0,05$). Essa comparação pode ser observada no gráfico 2.

As figuras de 18 a 21 representam dot plot de células mononucleares do sangue periférico de vacas não gestantes sem estímulo, estimuladas com ConA, tratadas com HSP 60 e com HSP 60 + ConA, respectivamente. As figuras de 22 a 25 representam dot plot de células mononucleares do sangue periférico de vacas no primeiro terço de gestação sem estímulo, estimuladas com ConA, tratadas com HSP 60 e com HSP 60 + ConA, respectivamente. As figuras de 26 a 29 representam dot plot de células mononucleares do sangue periférico de vacas no segundo terço de gestação sem estímulo, estimuladas com ConA, tratadas com HSP 60 e com HSP 60 + ConA, respectivamente. As figuras de 30 a 33 representam dot plot de células mononucleares do sangue periférico de vacas no segundo terço de gestação sem estímulo, estimuladas com ConA, tratadas com HSP 60 e com HSP 60 + ConA, respectivamente.

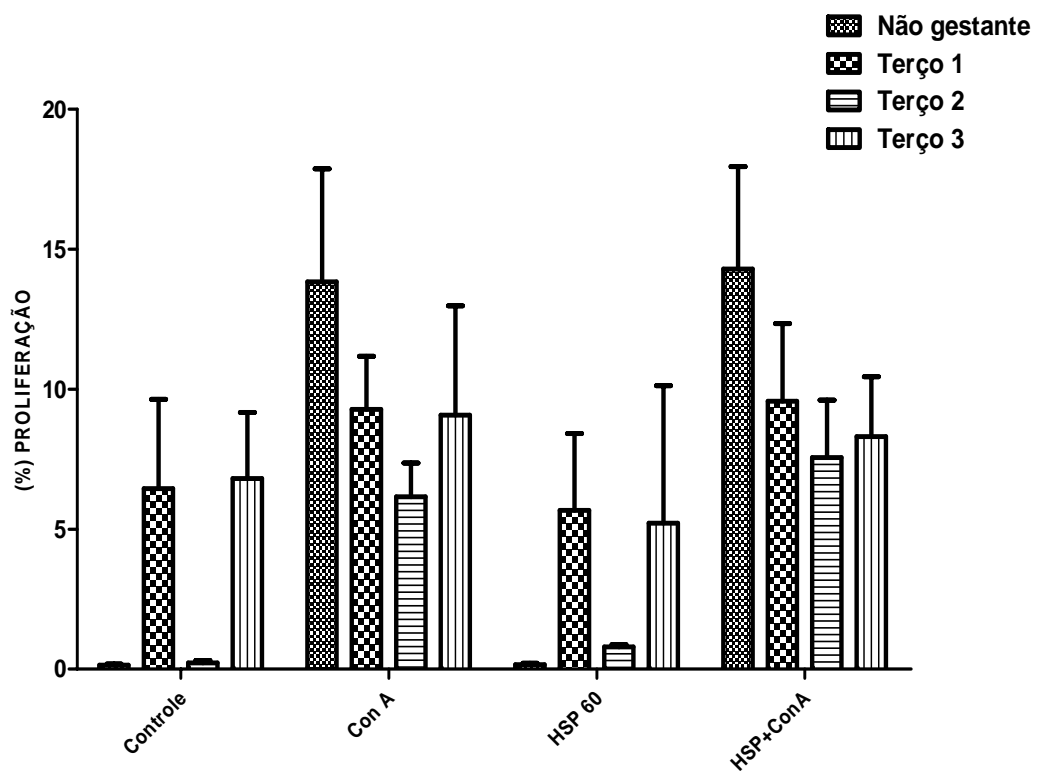


Gráfico 1- Gráfico de barra da porcentagem de proliferação de células mononucleares do sangue periférico de vacas não gestantes e vacas gestantes nos três trimestres gestacionais. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma

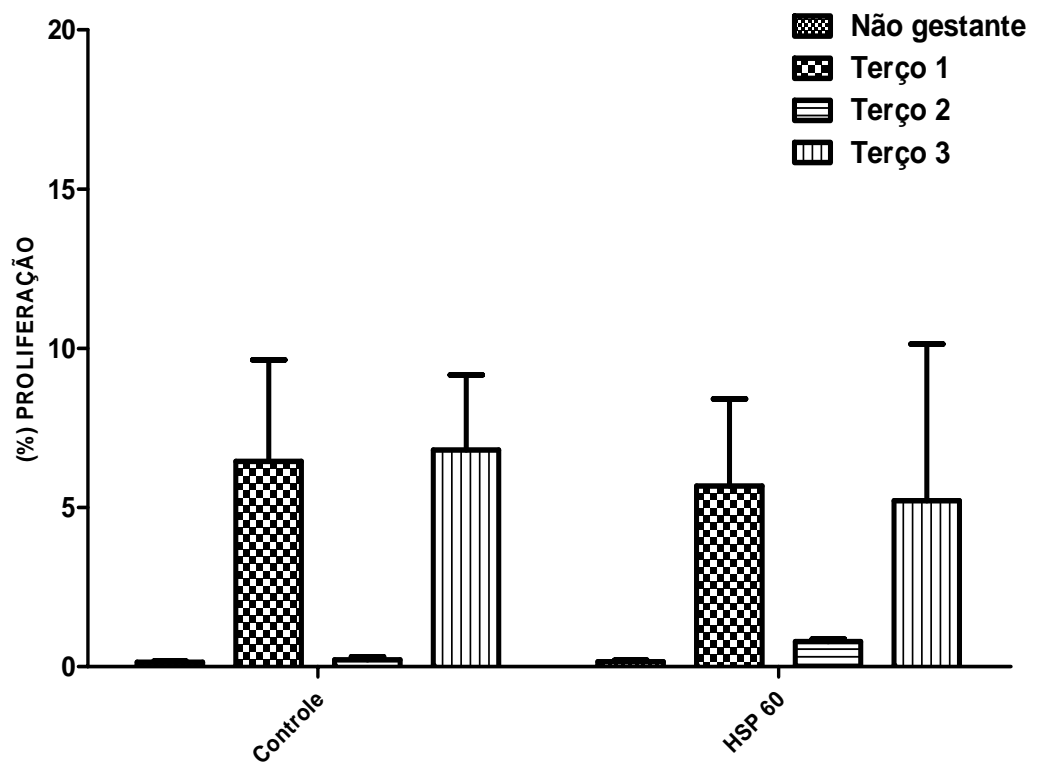


Gráfico 2- Gráfico de barra da porcentagem de proliferação de células mononucleares do sangue periférico de vacas não gestantes e vacas gestantes nos três trimestres gestacionais tratadas com HSP 60. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma

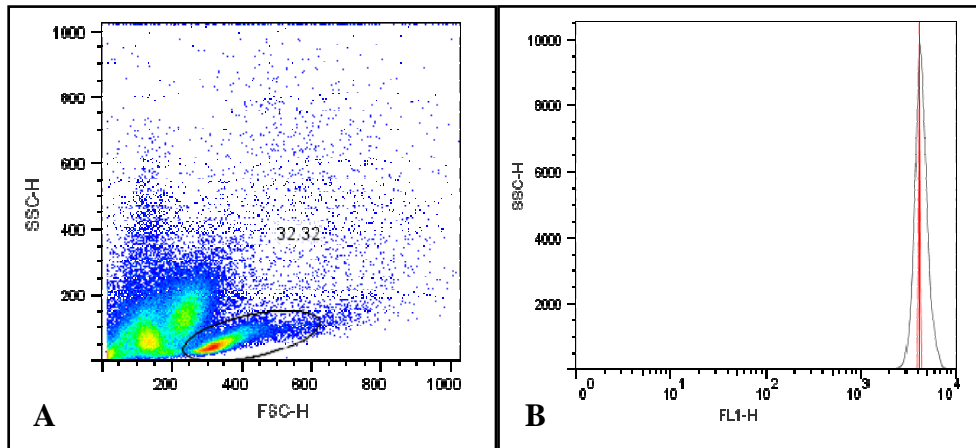


Figura 18- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas não gestantes sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)

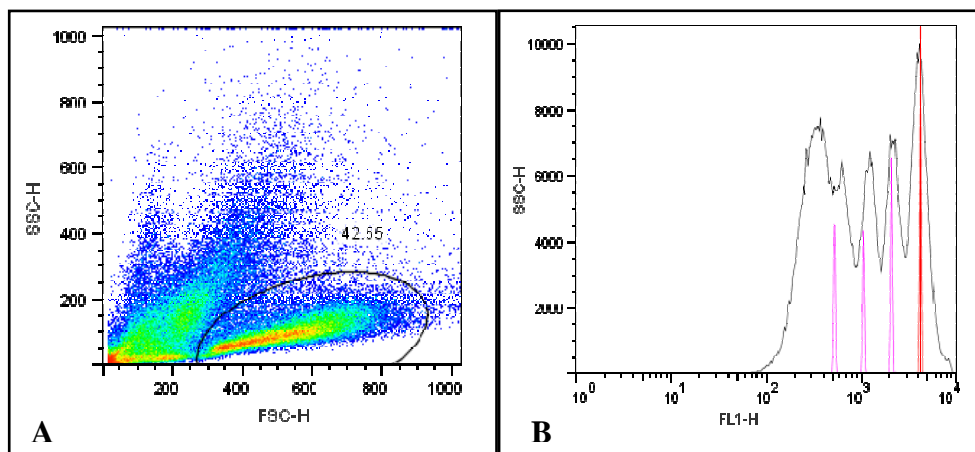


Figura 19- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas não gestantes estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)

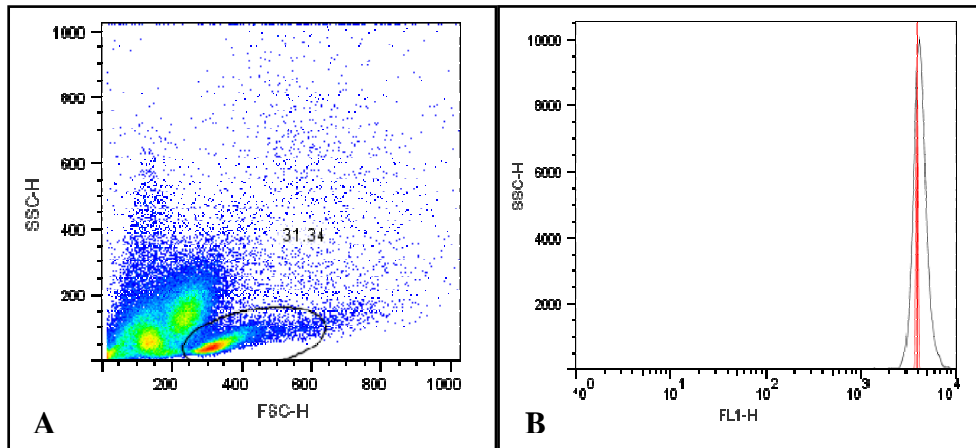


Figura 20- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas não gestantes tratadas com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo)

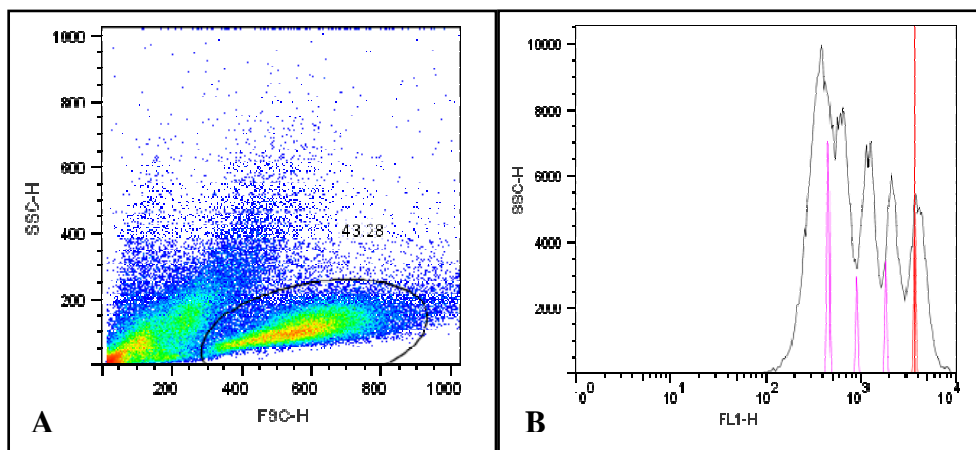


Figura 21- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas não gestantes tratadas com HSP 60 + ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 + ConA (Programa de análise Flow Jo)

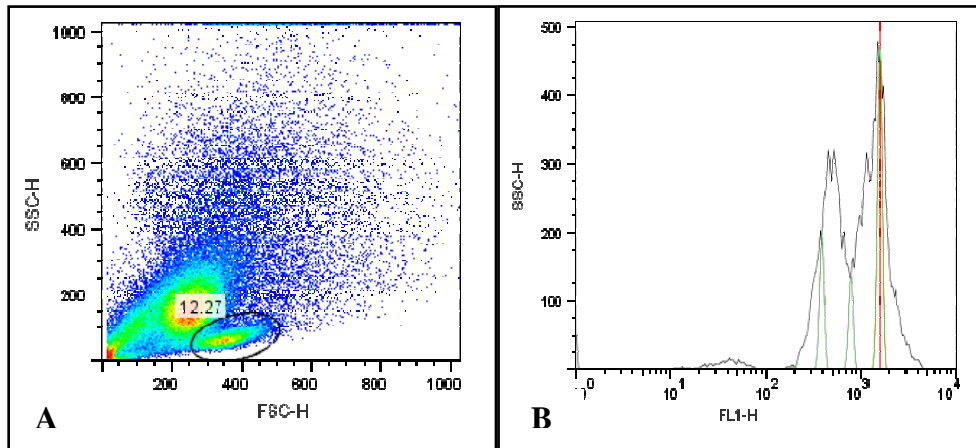


Figura 22- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas gestante de primeiro terço sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)

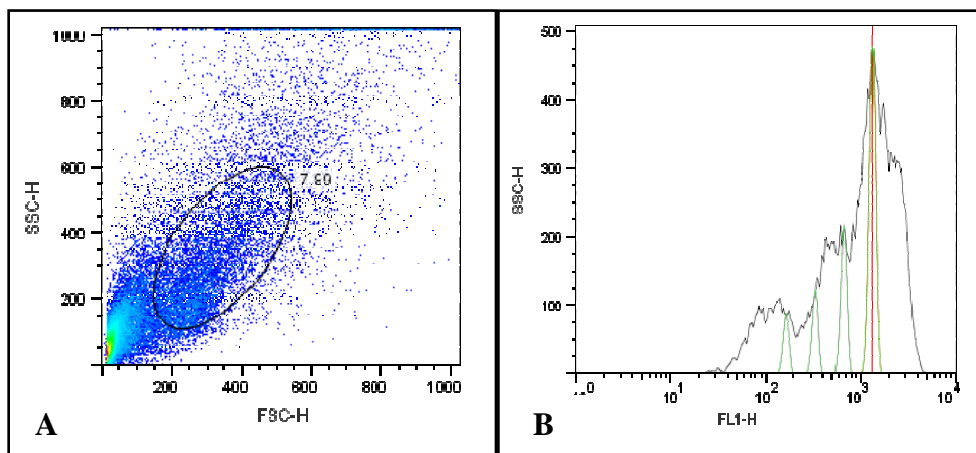


Figura 23- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vacas gestante de primeiro terço estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)

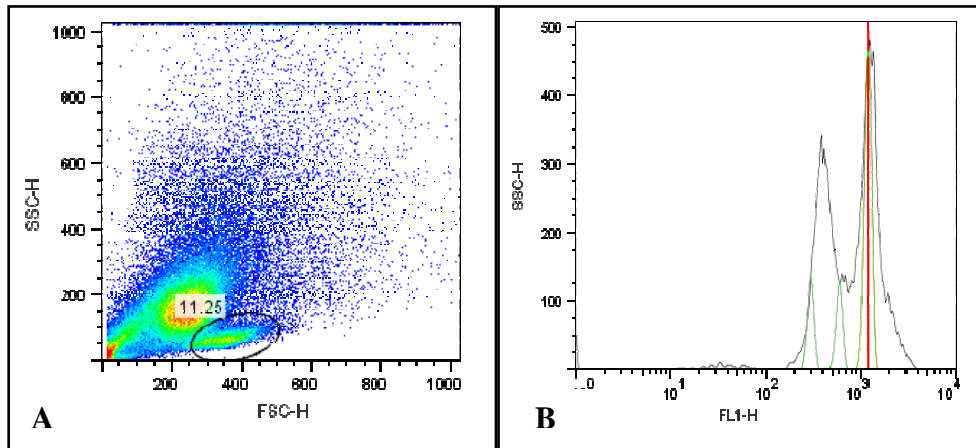


Figura 24- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de primeiro terço tratadas com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo)

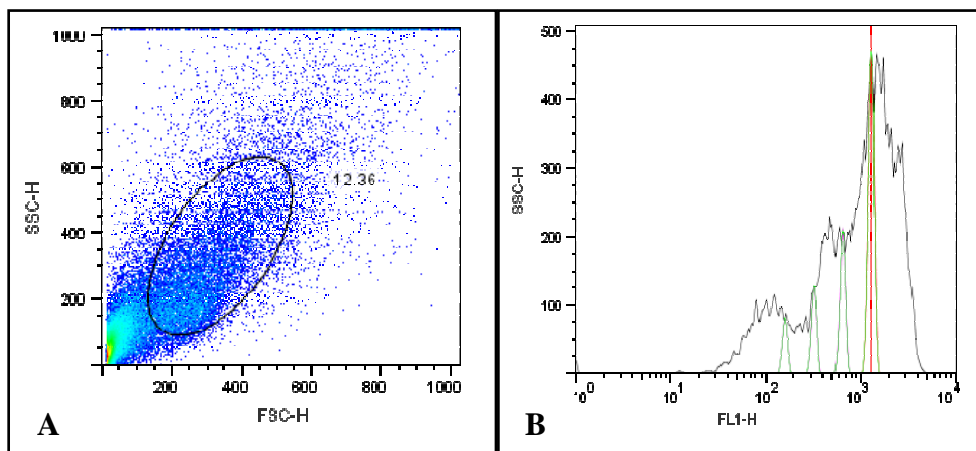


Figura 25- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de primeiro terço tratadas com HSP 60 + ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 + ConA (Programa de análise Flow Jo)

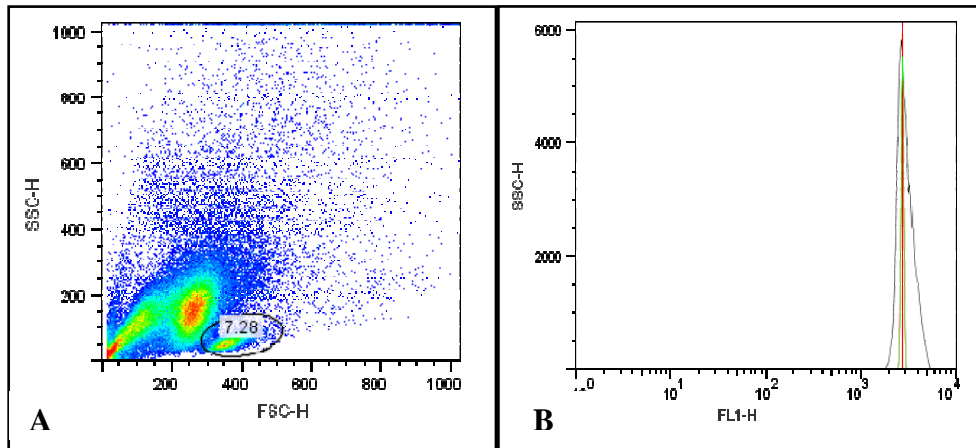


Figura 26- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de segundo terço sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)

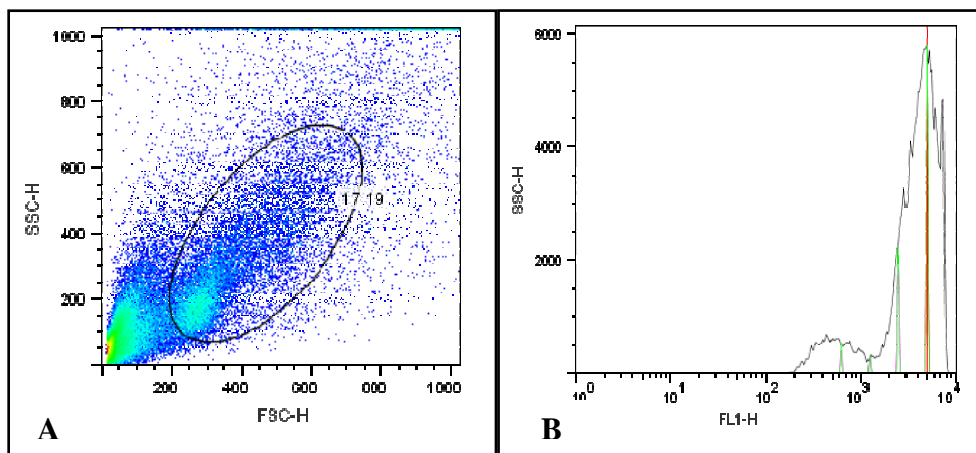


Figura 27- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de segundo terço estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)

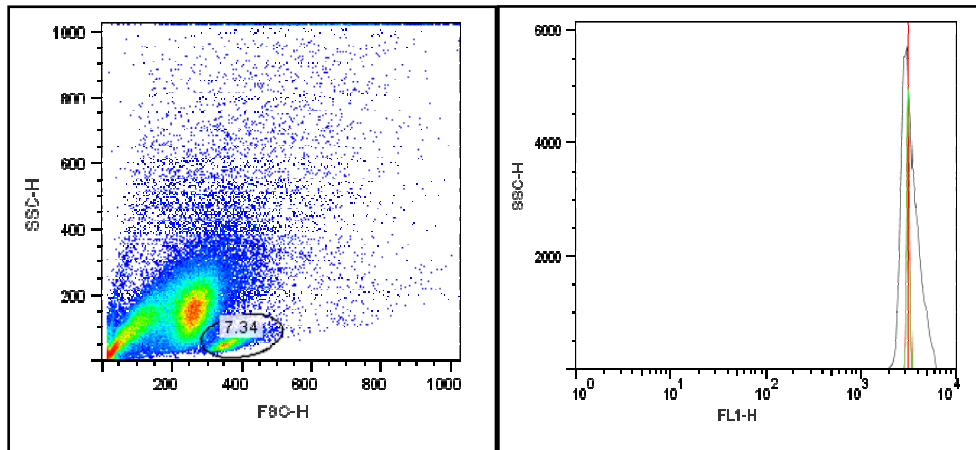


Figura 28- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de segundo terço tratadas com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo)

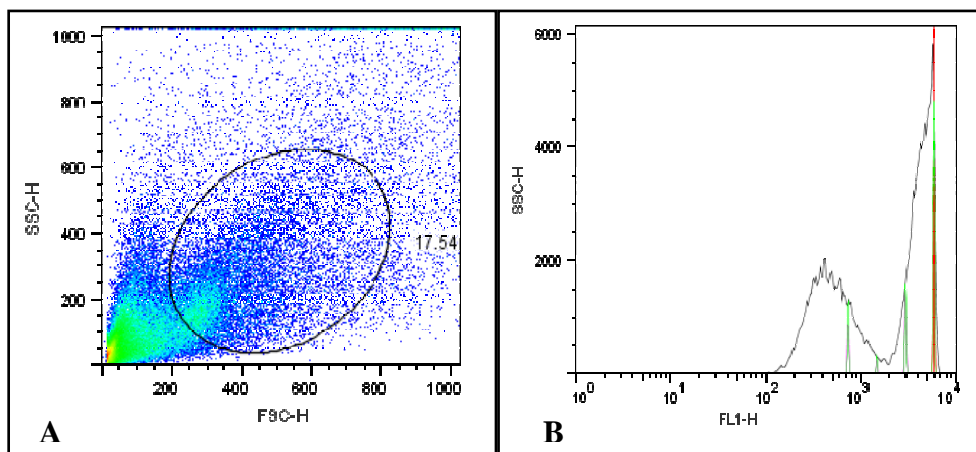


Figura 29- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de segundo terço tratadas com HSP 60 + ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 + ConA (Programa de análise Flow Jo)

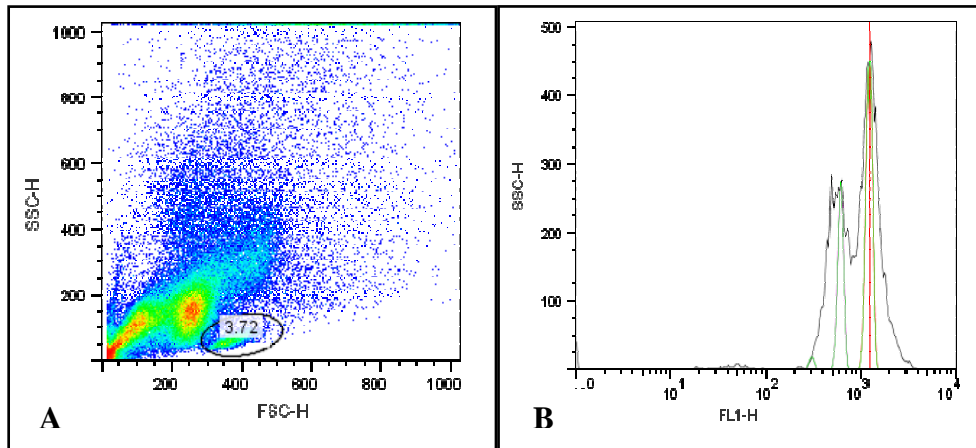


Figura 30- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de terceiro terço sem estímulo. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot sem estímulo (Programa de análise Flow Jo)

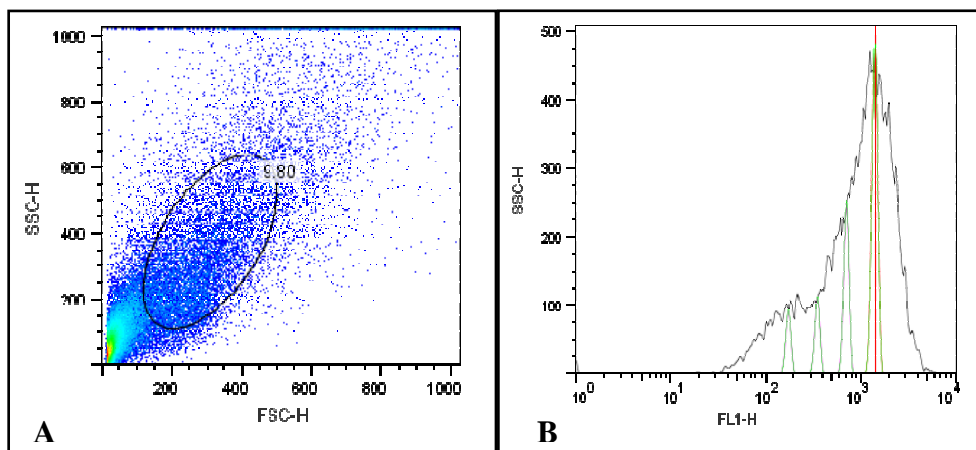


Figura 31- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de terceiro terço estimuladas com ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot estimuladas com ConA (Programa de análise Flow Jo)

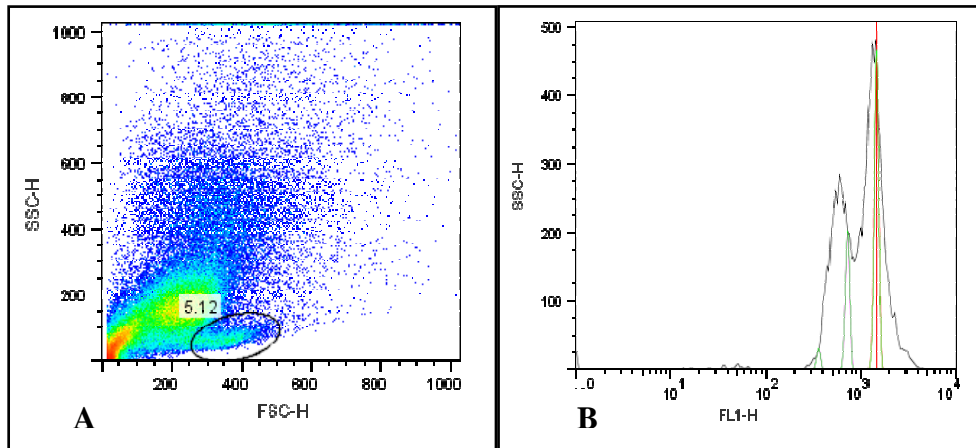


Figura 32- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de terceiro terço tratadas com HSP 60. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 (Programa de análise Flow Jo)

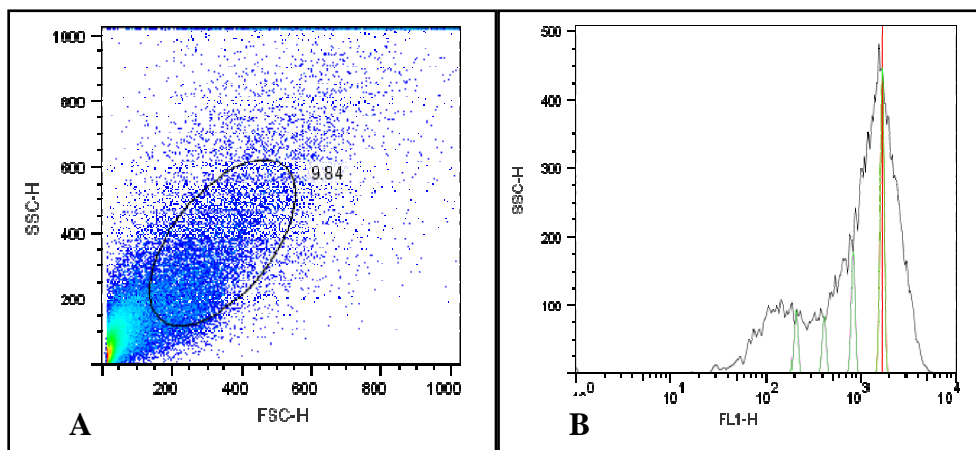


Figura 33- (A) Gráfico em Dot plot de células mononucleares do sangue periférico representativo de vaca gestante de terceiro terço tratadas com HSP 60 + ConA. (B) Histograma de proliferação da região de linfócitos no dot plot tratadas com HSP 60 + ConA (Programa de análise Flow Jo)

5.3 FAGOCITOSE

Os macrófagos são uma das primeiras células do sistema imune observadas no sítio de implantação. Sua presença é explicada como resultado da resposta imune ao antígeno paterno. Os mecanismos de regulação, migração e diferenciação no sítio de implantação são desconhecidos.

A técnica de fagocitose mede quantitativamente a atividade fagocitária de macrófagos baseando na acidificação de partículas de como elas são ingeridas. Foram realizados ensaios tanto para células do sangue periférico de vacas gestantes e células placentárias do primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional. .

A média da porcentagem de fagocitose realizada com células totais do sangue periférico de animais no primeiro terço gestacional para o controle (apenas células do sangue) foi de $1,50 \pm 0,034$; nas células marcadas com a bactéria, foi de $8,36 \pm 1,95$; e das células marcadas com a bactéria e tratadas com HSP 60 foi de $3,50 \pm 0,54$, quase havendo diferença significativa entre os grupos estudados ($P > 0,05$).

Nos animais de segundo terço a média da porcentagem de fagocitose realizada em sangue periférico total para o controle (apenas células do sangue) foi de $1,88 \pm 0,26$; para as células placentárias marcadas com a bactéria foi de $4,68 \pm 1,40$; e para as células tratadas com HSP 60 foi de $3,42 \pm 2,73$, havendo diferença altamente significativa entre os grupos estudados ($P < 0,01$).

A média da fagocitose para o sangue periférico total de animais de terceiro terço gestacional para o controle (apenas células do sangue) foi de $1,95 \pm 0,21$; nas células marcadas com a bactéria foi de $3,71 \pm 0,91$; e das células marcadas com a bactéria e tratadas

com HSP 60 foi de $2,87 \pm 1,69$, não havendo diferença significativa entre os grupos estudados ($P > 0,05$).

Analisando as médias da porcentagem de fagocitose de células totais do sangue periférico entre os terços estudados, observa-se que houve diferença significativa entre os terços estudados ($P < 0,01$). Esses dados podem ser observados no gráfico 3.

A média da porcentagem de fagocitose realizada com células totais da placenta no primeiro terço gestacional para o controle (apenas células placentárias) foi de $1,40 \pm 0,24$; nas células marcadas com a bactéria, foi de $10,65 \pm 5,65$; e das células marcadas com a bactéria e tratadas com HSP 60 foi de $11,45 \pm 7,29$, não havendo diferença significativa entre os grupos estudados ($P > 0,05$).

Nos animais de segundo terço a média da porcentagem de fagocitose para o controle (apenas células placentárias) foi de $8,08 \pm 4,99$; para as células placentárias marcadas com a bactéria foi de $3,80 \pm 1,10$; e para as células tratadas com HSP 60 foi de $4,97 \pm 2,62$, não havendo diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$).

A média da fagocitose para os animais de terceiro terço gestacional para o controle (apenas células placentárias) foi $1,74 \pm 0,46$; nas células marcadas com a bactéria foi de $6,51 \pm 3,41$; e das células marcadas com a bactéria e tratadas com HSP 60 foi de $7,01 \pm 3,69$, havendo diferença extremamente significativa entre os grupos estudados ($P < 0,001$).

Analisando as médias da porcentagem de fagocitose de células placentárias entre os terços estudados, observa-se que houve diferença extremamente significativa entre os terços estudados ($P < 0,001$). Esses dados podem ser observados no gráfico 4.

Comparando as médias da porcentagem de fagocitose realizada com células totais do sangue periférico de todos os terços gestacionais, com as médias da porcentagem da fagocitose realizada com células totais da placenta nos diferentes terços gestacionais, pode-se observar que houve diferença extremamente significante entre os grupos ($P < 0,001$) (gráfico

5). As figuras 34 a 36 representam dot plot do ensaio de fagocitose realizado para células totais do sangue periférico de vaca não gestante (controle), células totais do sangue periférico representativo de vaca no terceiro terço gestacional e células totais da placenta representativo de vaca do terceiro terço, respectivamente.

Pode-se observar que houve maior significância da porcentagem de fagocitose nas células da placenta do terceiro terço gestacional.

Comparando a porcentagem de fagocitose entre as células totais do sangue periférico com a porcentagem de fagocitose de células da placenta durante todo o período gestacional, nota-se que a fagocitose foi extremamente significativa nas células da placenta.

Quando as células totais do sangue periférico e da placenta foram tratadas com HSP 60 em todos os terços gestacionais, nota-se que a porcentagem de fagocitose aumenta significativamente nas células da placenta ($P < 0,001$), enquanto que a porcentagem de fagocitose das células totais do sangue não foi significativa ($P > 0,05$).

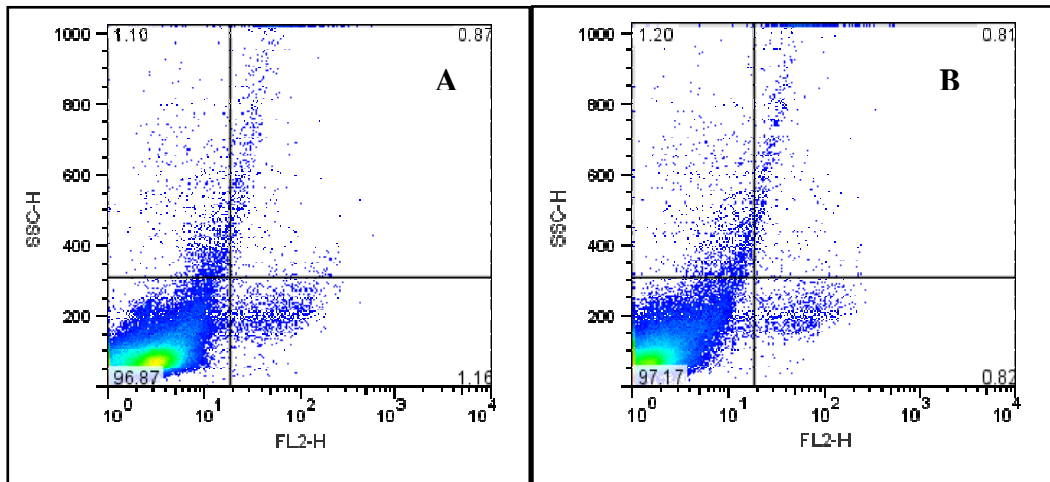


Figura 34- Gráfico em Dot Plot adquirido pelo programa *Cell-Quest* em (A) controle positivo do sangue periférico total de uma vaca não gestante (B) região de fagocitose (FL-2/PI) de células tratadas com HSP 60 e analisado no programa Flow Jo

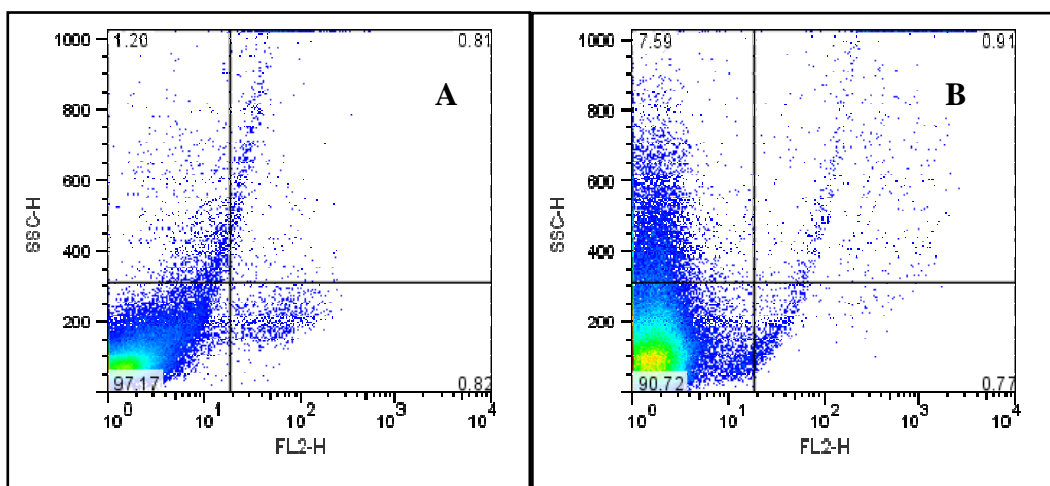


Figura 35- Gráfico em Dot Plot adquirido pelo programa *Cell-Quest* em (A) controle positivo do sangue periférico total de uma vaca gestante representativa de terceiro terço (B) Região de fagocitose (FL-2/PI) de células tratadas com HSP 60 e analisado no programa de análise Flow Jo

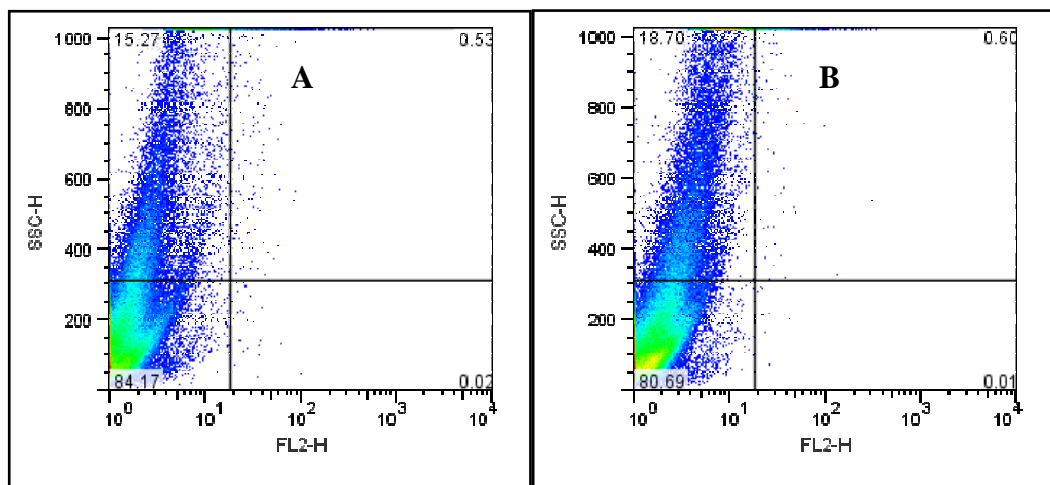


Figura 36- Gráfico em Dot Plot adquirido pelo programa *Cell-Quest* em (A) controle positivo de células totais de placenta representativo de um animal de terceiro terço gestacional (B) Região de fagocitose (FL-2) de células tratadas com HSP 60. Programa de análise Flow Jo

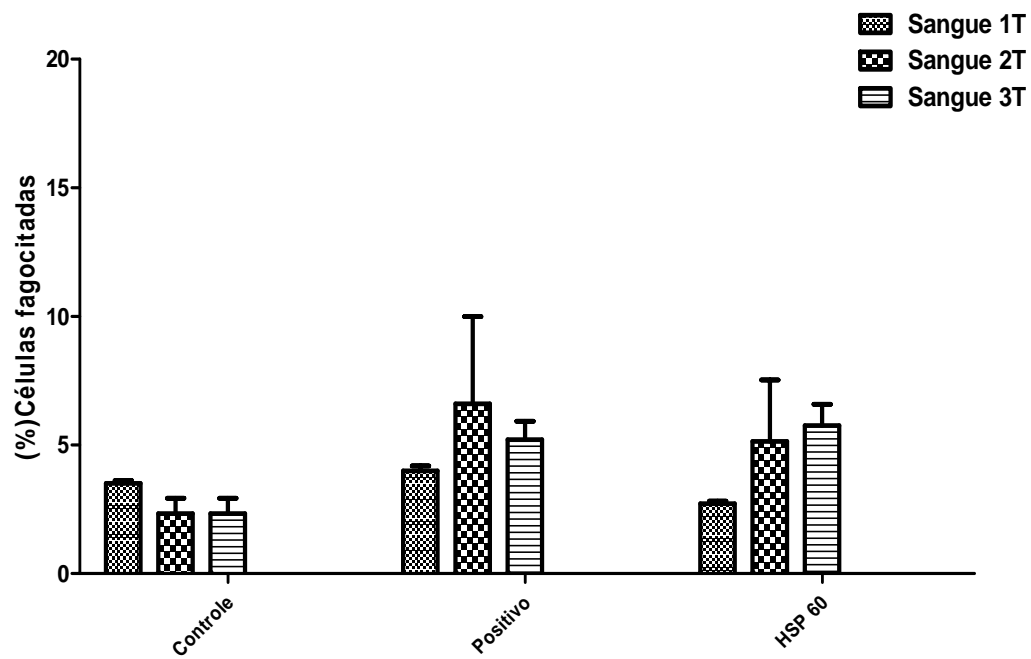


Gráfico 3- Gráfico de barra da porcentagem de células fagocitárias do sangue periférico total de vacas do primeiro, segundo e terceiro terço gestacional. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma

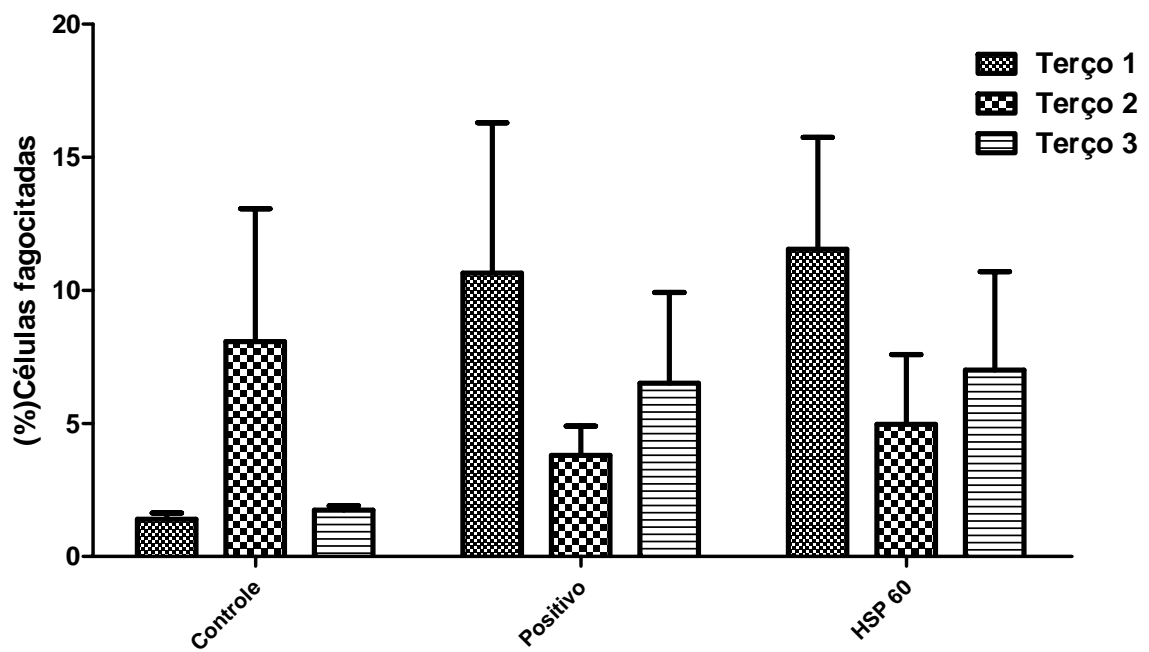


Gráfico 4- Gráfico de barra da porcentagem de células fagocitárias da placenta de vacas do primeiro, segundo e terceiro terço gestacional. O controle do sangue periférico de vaca não gestante. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma

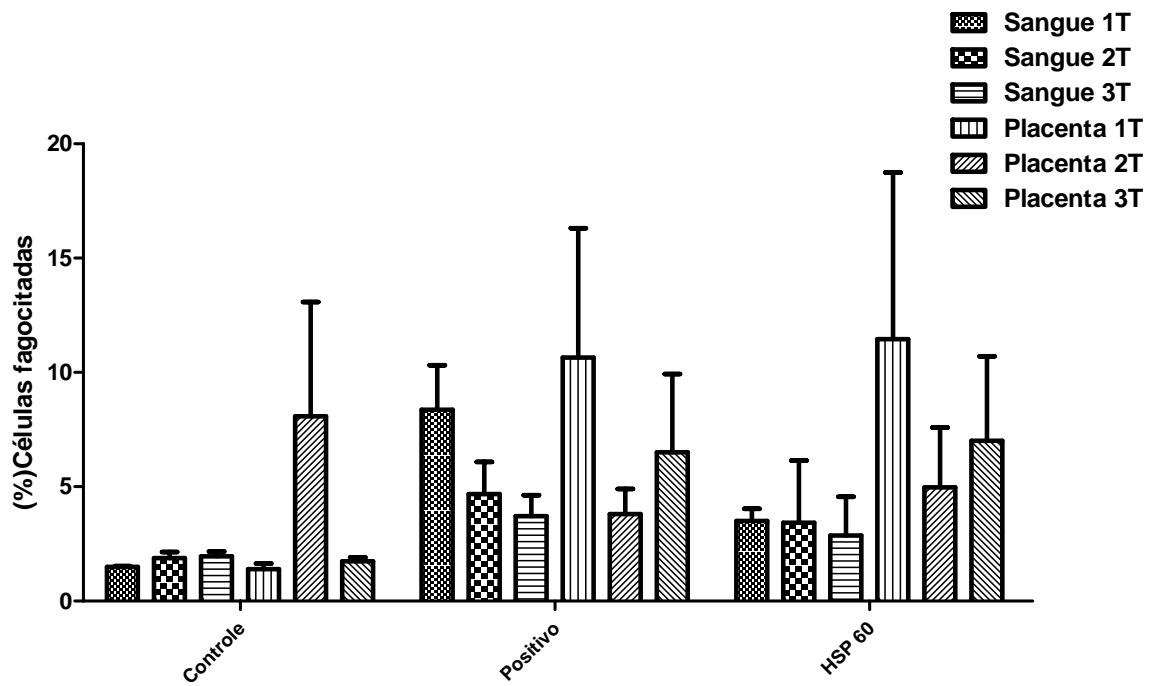


Gráfico 5- Gráfico de barra da porcentagem de células fagocitárias totais do sangue periférico e de células placentárias de vacas do primeiro, segundo e terceiro terço gestacional. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma

5.4 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (LPO)

LPO consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial. Nos sistemas biológicos a LPO pode ocorrer principalmente: (i) via enzimática envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos ácidos graxos e (ii) via peroxidação não enzimática, que envolve a participação de ROS, RNS, metais de transição e outros radicais livres. Neste projeto foram avaliados os efeitos sobre a peroxidação lipídica no sobrenadante de culturas celulares de placentas de bovinos nos segundo e terceiro terços de gestação em diferentes condições experimentais de tratamento.

Foi observado que há uma diferença altamente significativa no terceiro terço gestacional em relação ao segundo terço. Após o estímulo com os mitógenos ConA e PHA há uma expressiva produção de radicais oxidados poliinsaturados no sobrenadante dessas culturas que também foram produzidos em níveis maiores após o tratamento por 72 horas com HSP 60. Os resultados das médias e desvio-padrão obtidos do sobrenadante das culturas das células placentárias dos animais do segundo e terceiro gestacional estão representados nos gráficos 6 e 7.

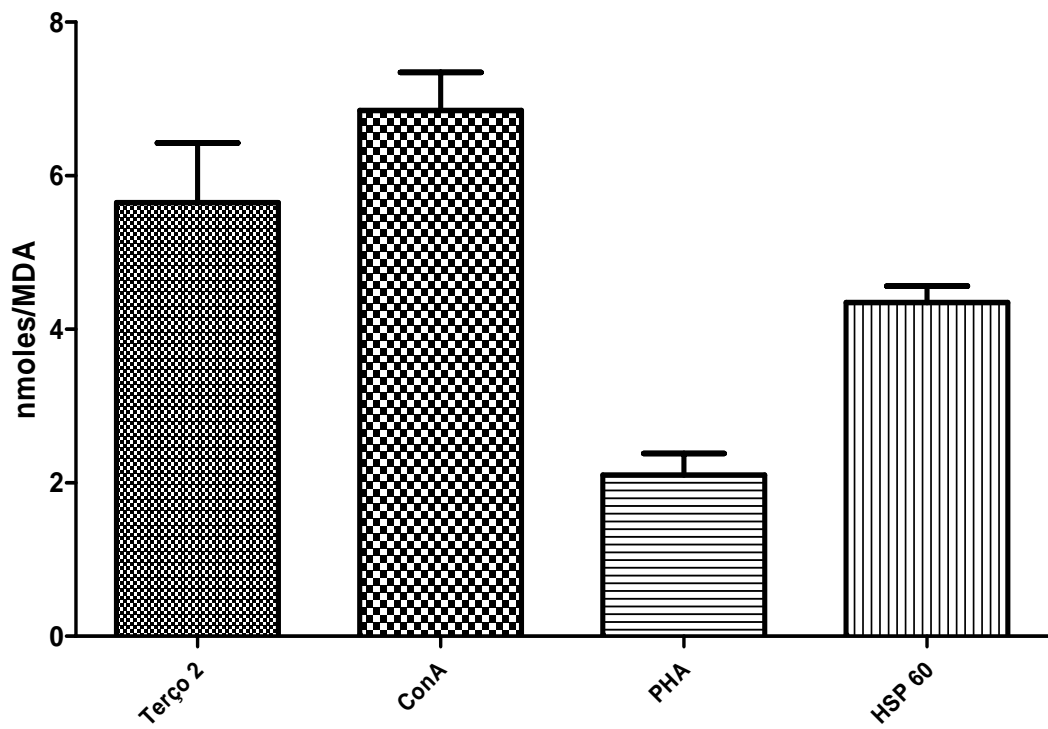


Gráfico 6- Gráfico de barras expresso em nmoles/MDA de cultura de células placentárias e seus tratamentos de animais de segundo terço gestacional. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma

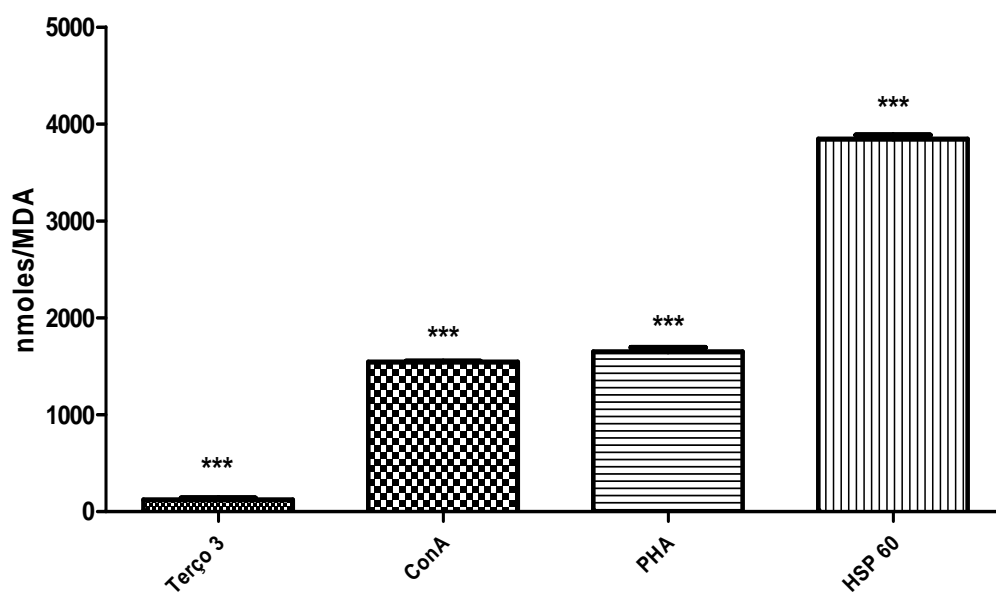


Gráfico 7- Gráfico de barras expresso em nmoles/MDA de cultura de células placentárias e seus tratamentos de animais de terceiro terço gestacional. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma

5.5 CICLO CELULAR

A persistência da produção de fatores estressantes pelas células endógenos e exógenos durante a gestação pode explicar parcialmente algumas características sobre o crescimento do concepto, ativação de reguladores da divisão celular, checagem do ciclo celular, reparo do DNA, produção de fatores de transcrição e instabilidade genômica, entre outras.

Após 72 horas de cultura celular, células placentárias dos animais de segundo e terceiro trimestre gestacional foram recolhidas das placas de cultura celular, congeladas e mantidas em álcool 70° contendo RNase e acondicionadas em nitrogênio líquido. A determinação das diferentes fases do ciclo celular foi realizada em citômetro de fluxo (FACScalibur – BD®) utilizando-se a marcação do DNA íntegro e degradado ou fragmentado pela metodologia do iodeto de propídium (PI).

A aquisição da população celular nas diferentes fases do ciclo foi realizada em média com 10000 eventos pelo programa de aquisição *Cell-Quest®* e o conteúdo de DNA distribuído nas diferentes populações celulares foi avaliada pela intensidade de fluorescência (FL-2). Os resultados foram expressos em porcentagem da média das células nas diferentes fases do ciclo celular: que apresentaram DNA fragmentado ou necróticos; quiescentes (G0/G1); em síntese (S); e em divisão celular (G2/M), o esquema desta aquisição está representado na figura 37 do histograma, sendo que a população M1 representa a população em G2/M; M2 em fase S; M3 a população em G0/G1 e a população com DNA fragmentado corresponde a M4.

Os resultados mostraram diferenças extremamente significativas na população de células que apresentaram DNA fragmentado após a adição da proteína HSP 60 nas células placentárias do segundo e terceiro terço gestacional. Foi evidente que o aumento dessa

proporção de células mortas ocorreu nas culturas do terceiro terço gestacional, os resultados estão apresentados no gráfico 8.

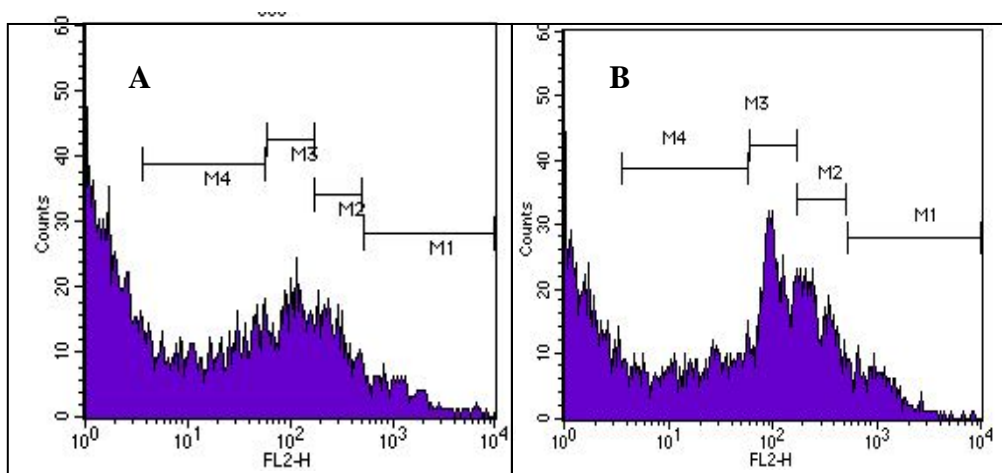


Figura 37- Gráfico em Dot Plot o ciclo celular da cultura após 72 horas de células placentárias representando animais de segundo (A) e terceiro (B) terço gestacional. Programa de análise *Cell Quet-Pro*

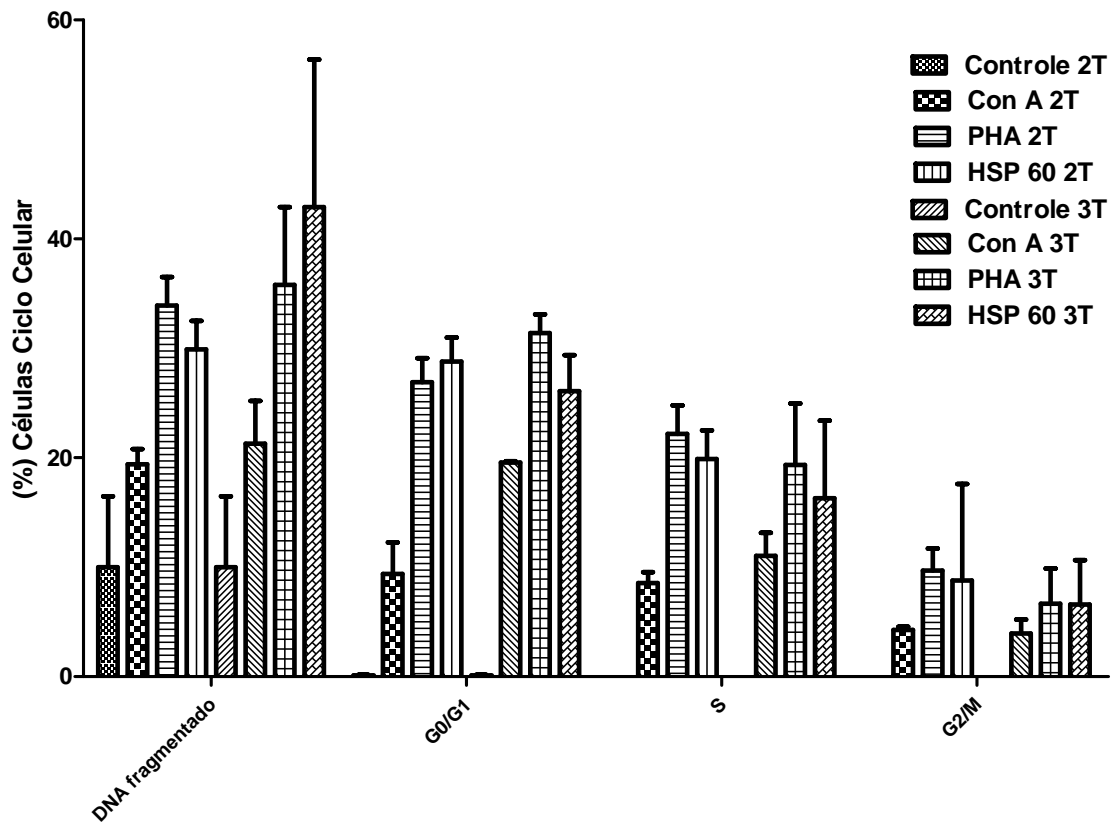


Gráfico 8- Gráfico em barras da porcentagem das fases do ciclo celular de células placentárias e seus tratamentos em animais do segundo e terceiro terço gestacional. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma

As análises estatísticas comparativas da população com DNA fragmentado do segundo e terceiro trimestre gestacional mostraram diferenças altamente significativas após a adição da HSP 60, quando comparadas ao grupo controle. Os dados estão apresentados no gráfico 9.

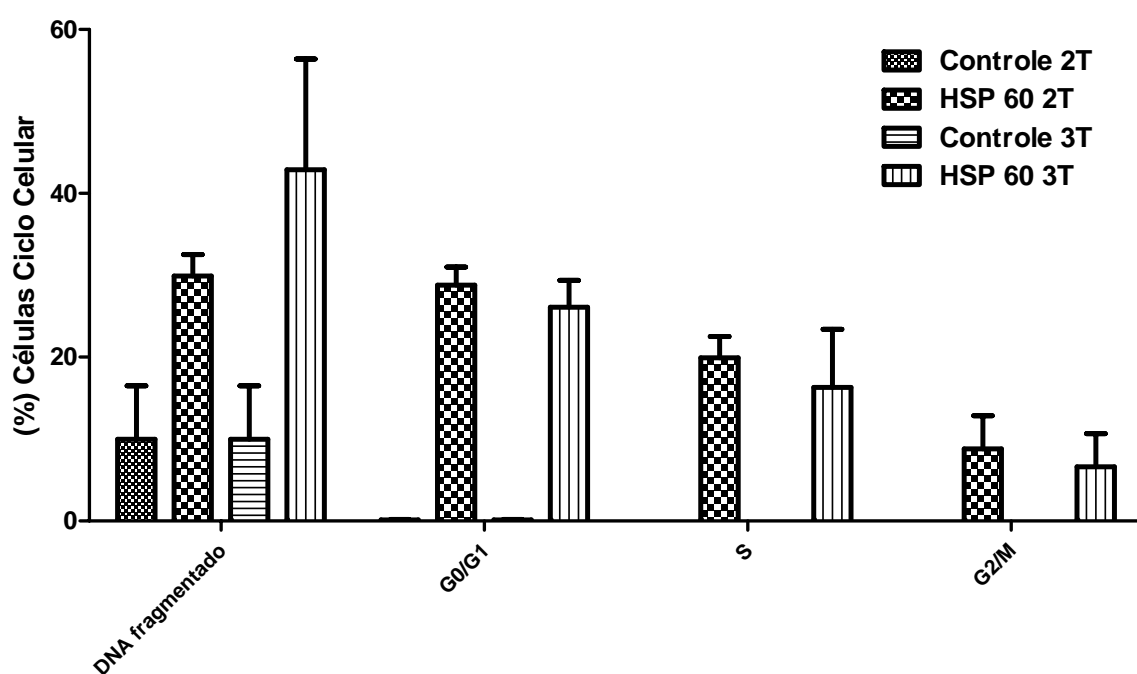


Gráfico 9- Gráfico em barras da porcentagem das fases do ciclo celular de células placentárias de animais do segundo e terceiro trimestre gestacional tratadas com HSP 60. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma

As análises dos Dot Plot adquiridos pelo programa *Cell-Quest* mostraram três populações de células placentárias de animais de segundo e terceiro terço gestacional definidas após 72 horas de cultura nos diferentes grupos de tratamentos. Foram definidas nos gráficos de Dot Plot as populações de R1 e R2 viáveis e R3 marcadas com PI inviáveis ou mortas. Os gráficos de Dot Plot estão representados na figura 38.

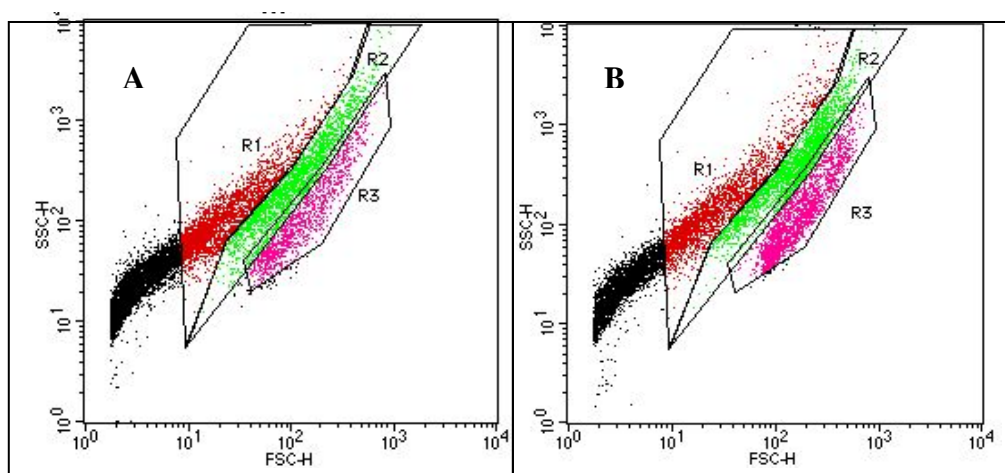


Figura 38- Gráfico em Dot Plot representativo de populações de animais de segundo (A) e terceiro (B) terço gestacional, onde R1 e R2 são viáveis e R3 marcadas com PI inviáveis ou mortas. Programa de análise *Cell Quest*

As análises comparativas dos resultados dessas populações celulares não mostraram diferenças significativas entre as populações R1 e R2 do segundo e terceiro terço gestacional. Por outro lado, a população do quadrante R3 mostrou-se elevada e em maior proporção significativa no terceiro terço gestacional em comparação ao segundo terço (Gráfico 10).

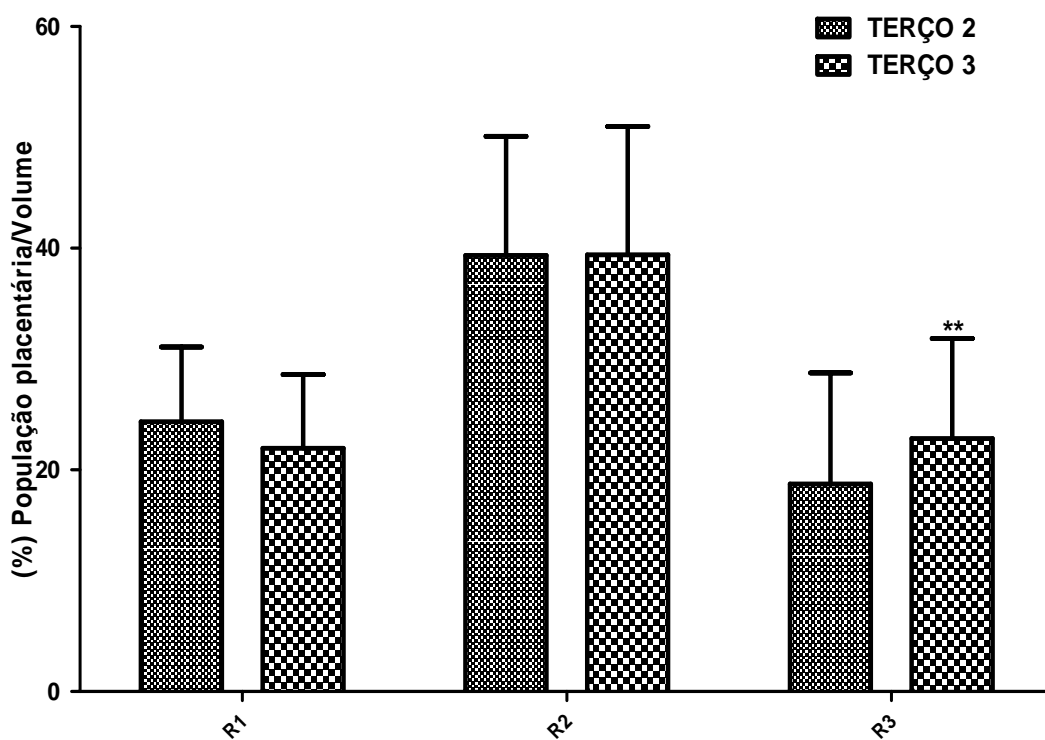


Gráfico 10- Gráfico em barras da porcentagem da população placentária de animais de segundo e terceiro terço gestacional, onde R1 e R2 viáveis e R3 marcadas com PI inviáveis ou mortas. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma

5.6 POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

Rodamina 123 (Rho123) é um fluorocromo capaz de corar mitocôndrias e promover imagens de alta fluorescência de mitocôndrias em células vivas (BENEL et al., 1986). É um componente catiônico que excita a 488 nm e emite fluorescência verde a 515-575 nm.

As mitocôndrias das células placentárias de animais de segundo e terceiro terço gestacional foram avaliadas, após 72 horas de cultivo. A determinação do potencial elétrico de membrana mitocondrial interna foi realizada por citometria de fluxo utilizando como sonda a rodamina 123 (Rho123). O histograma representativo das populações celulares com diferentes potenciais da membrana mitocondrial M1 viáveis e ativas e M2 inviáveis estão representados na figura 39 e figura 40 a diferença entre os potenciais de uma célula tratada e não tratada (controle negativo).

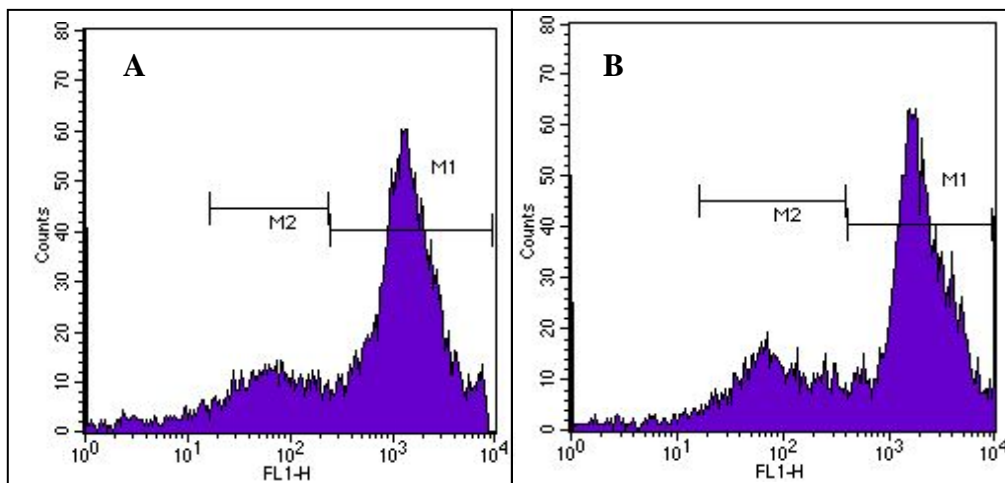


Figura 39- Gráfico de histograma representativo das populações celulares placentárias de animais de segundo (A) e terceiro (B) com diferentes potenciais da membrana mitocondrial M1 viáveis e ativas e M2 inviáveis. Programa de análise *Cell Quest – Pro*

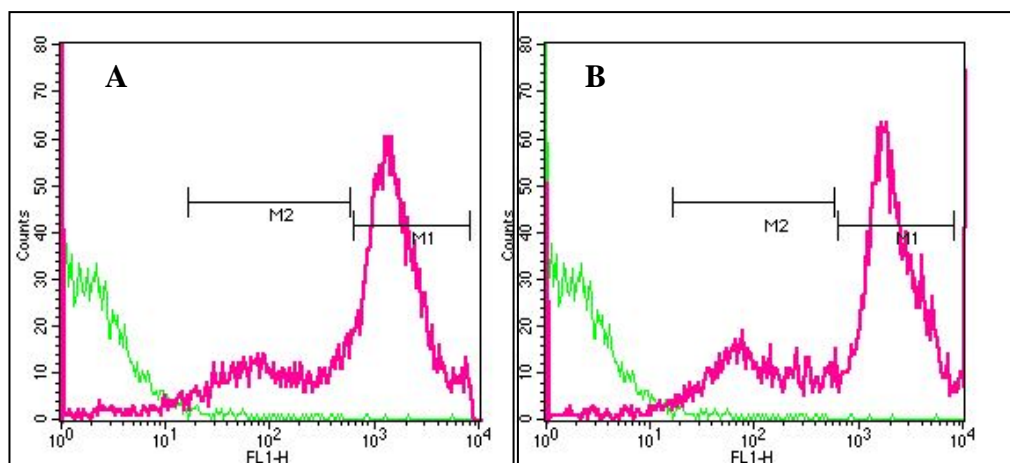


Figura 40- Gráfico de histograma representativo das populações celulares de animais do segundo (A) e terceiro (B) terço gestacional com diferentes potenciais da membrana mitocondrial M1 viáveis e ativas e M2 inviáveis (traço em rosa) *overlay* com o controle (traço em verde). Programa de análise *Cell Quest-Pro*

As análises do potencial de membrana mitocondrial expressos em Dot Plot adquiridos pelo programa *Cell-Quest* das células marcadas e não marcadas com rodamina 123 mostraram duas populações de células placentárias de animais de segundo e terceiro terço gestacional definidas após 72 horas de cultura nos diferentes grupos de tratamentos, com diferentes potenciais da membrana mitocondrial. Foram definidas nos gráficos de Dot Plot as populações de M1 viáveis com alto potencial mitocondrial e M2 inviáveis ou mortas com baixo potencial de membrana. Os resultados mostraram aumento do potencial de membrana em ambos os terços gestacionais, sendo que este aumento foi altamente significativo no terceiro terço gestacional. O gráfico 11 representa as médias das populações M1 e M2 .

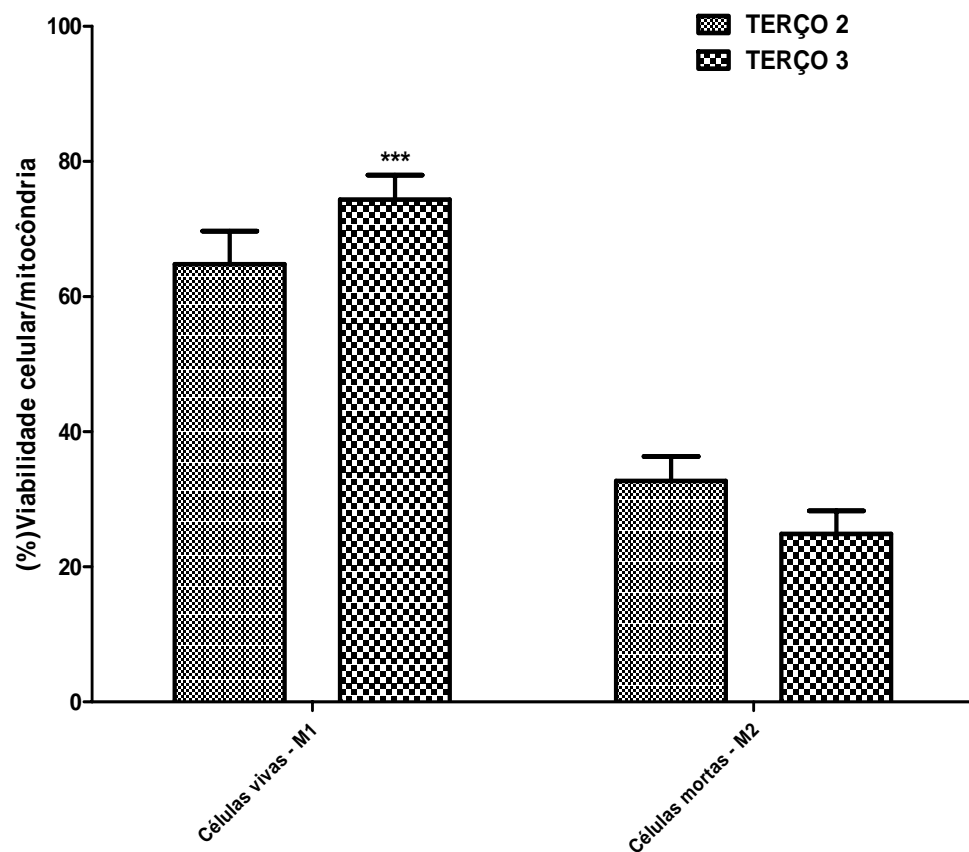


Gráfico 11- Gráfico em barras da porcentagem da viabilidade celular de células placentárias representativo do terceiro terço gestacional, onde M1 viáveis com alto potencial mitocondrial e M2 inviáveis ou mortas com baixo potencial de membrana. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma

As análises das populações celulares pelo Dot Plot adquiridas pelo programa *Cell-Quest* mostraram duas populações de células placentárias representativas de animais de segundo e terceiro terço gestacional definidas, após 72 horas de cultura (Gráfico 12). Foram definidas nos gráficos de Dot Plot as populações de R1 viáveis e R2 mortas. Os resultados mostraram um aumento significativo do segundo e terceiro terço de células viáveis quando comparadas a população de células mortas distribuídas no quadrante R2. Salienta-se que há um aumento da população de células viáveis maior no terceiro terço em relação ao segundo terço gestacional presentes no quadrante R1. O gráfico de Dot Plot está representado na figura 41.

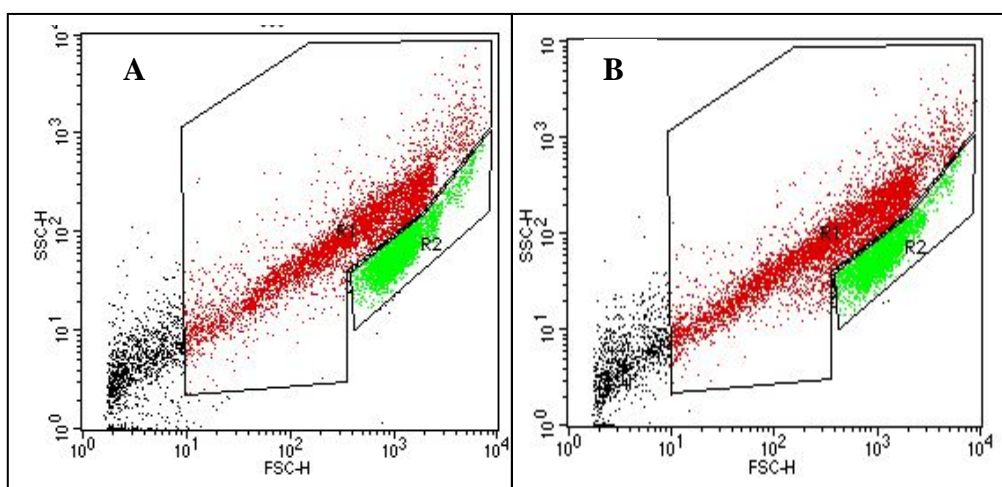


Figura 41- Gráfico em Dot Plot representativo dos animais de segundo (A) e terceiro (B) terço gestacional das populações de R1 viáveis e R2 mortas. Programa de análise *Cell Quest-Pro*

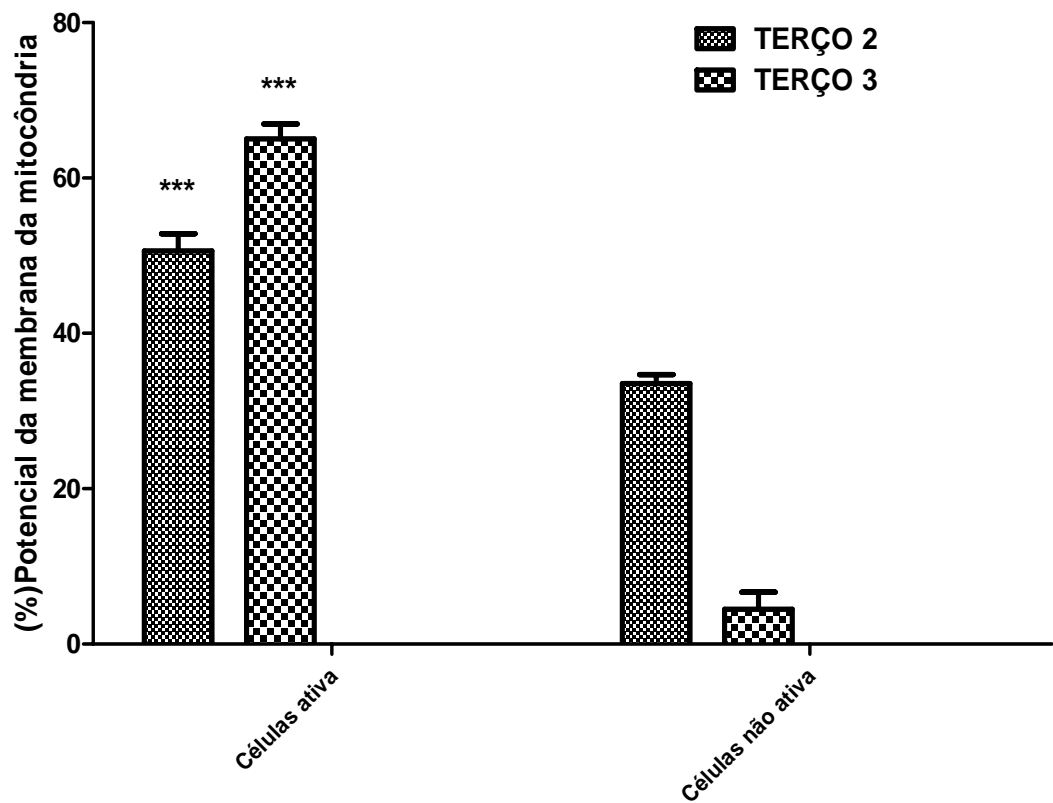


Gráfico 12- Gráfico em barras da porcentagem do potencial da membrana mitocondrial de animais de segundo e terceiro terço gestacional, onde observam-se células ativas e células não ativas. Programa de análise estatístico Graph Pad Prisma

*D
I
S
C
U
S
S
Ã
O*

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram avaliados os diferentes efeitos biológicos sobre a resposta proliferativa e danos oxidativos envolvendo a HSP 60 em sistemas de culturas células placentárias e sobrenadantes de culturas de células mononucleares de sangue periférico de animais gestantes e não gestantes. Foram avaliados diversos parâmetros da capacidade proliferativa, distribuição das populações nas fases do ciclo celular, produção de compostos peroxidados poliinsaturados e o potencial de membrana mitocondrial.

Durante a gestação o útero passa por inúmeras alterações morfológicas e bioquímicas que ocorrem para acomodar o crescimento do conceito, e a placenta sofre intenso e rigoroso processo de proliferação, diferenciação e maturação celular ao longo da gestação. Sua regulação exige um balanço e a interação entre fatores promotores ou inibidores do ciclo celular (PFARRER et al., 2006).

Assim, o balanço entre os mecanismos imunológicos, antioxidantes e os efeitos celulares moduladores da dinâmica e da cinética celular conseguem manter o metabolismo e o funcionamento entre os compartimentos celulares, como os existentes entre a placenta e o conceito.

Em estudos anteriores, realizados com as proteínas do choque térmico da família 60 e 70 em placentas bovinas nos diferentes trimestres de gestação, demonstraram, por ensaios de imunohistoquímica e imunomicroscopia eletrônica de transmissão, expressões diferenciadas ao longo da gestação; a HSP 60 foi expressa preferencialmente no primeiro trimestre da gestação, no último terço gestacional não houve expressão dessa proteína, enquanto que a HSP 70 manteve-se constante em toda a gestação (MONTEIRO, 2005).

As famílias de proteínas de choque térmico (HSP) são conservadas em espécies de procariontes e eucariontes. Essas proteínas têm papéis essenciais no processamento e transporte de proteínas recém sintetizadas. As HSP são geralmente intracelulares, mas também podem ser expressas na superfície celular (SOLTYS; GUPTA, 1997).

Alterações nos mecanismos antioxidantes, no ciclo celular ou em ambos, promovem a geração do estresse oxidativo. As conseqüências do estresse oxidativo podem ser variadas, de acordo com o tipo celular e sua intensidade. Segundo Halliwell e Gutteridge (2007), os principais efeitos da perda deste controle são: (i) aumento da capacidade proliferativa; (ii) aumento das respostas de defesas celulares; (iii) danos celulares: pode envolver dano a um ou mais tipos de biomoléculas, como lipídios, proteínas, DNA, carboidratos, entre outros; (iv) senescência: sobrevivência da célula, mas com o sistema de divisão celular comprometido; (v) morte celular: após o dano a célula pode desencadear o processo de morte celular; (vi) danos oxidativos ao DNA, mitocôndria, ou em outros alvos celulares, podem causar morte celular por apoptose ou por necrose.

As HSP possuem funções citoprotetoras. Em experimentos com células musculares lisas de artérias, a adição exógena de HSP 60 aumenta a taxa de sobrevivência e protege as células da morte celular programada (MOSSER et al., 2000). As proteínas do choque térmico atuam no bloqueio da apoptose via caspase, sendo que o aumento da sua expressão (HSP 27, 60, 70 e 90), inibe a apoptose e previne a ativação de caspases em diferentes tipos celulares, possivelmente pelo acúmulo de proteínas recém sintetizadas, espécies reativas do oxigênio e danos ao DNA (GARRIDO et al., 1999; MOSSER et al., 2000; MOSSER; MORIMOTO, 2004; GARRIDO et al., 2006). Distintamente do que ocorreu com nossos resultados onde mostraram diferenças significativas na população de células que apresentaram DNA fragmentado após a adição da HSP 60, em células placentárias do segundo e terceiro terço

gestacional. Foi evidente o aumento da proporção de células mortas nas culturas do terceiro terço gestacional.

A HSP 60 presente no citosol pode formar um complexo com proteínas pró-apoptóticas, conhecidas como BAX (GUPTA; KNOWLTON, 2002). Com a evidência do aumento de células apoptóticas observadas pelo ensaio de ciclo celular no terceiro terço gestacional, juntamente com os ensaios realizados anteriormente por nosso grupo, onde não houve a expressão da proteína nesse período gestacional, sugere-se que a HSP 60 não consegue inibir a apoptose de células placentárias. Esses dados corroboram com experimentos realizados na placenta bovina onde o número de células apoptóticas aumenta significativamente durante a gestação. Estes estudos indicam que a maturação incompleta do placentônio tem papel importante na retenção de membranas fetais (BOOS; MÜLLING et al., 2003). A quantificação de células apoptóticas e atividade proliferativa de diferentes regiões da placenta de bovinos clonados a termo, também foi averiguada. Usando a citometria de fluxo, o tecido estudado mostrou maior atividade proliferativa e número reduzido de apoptose nas regiões centrais de placentônio e interplacentomal. Estas características podem ser associadas com a falha da placentação no início da gestação, placentônios em números reduzidos ou perda da maturação fetal ou placentária até o final da gestação (FACCIOTTI et al., 2009).

Os macrófagos são células altamente heterogêneas quanto ao fenótipo e a função, os quais são determinados por um meio ambiente específico. Os macrófagos são essenciais para a homeostase dos tecidos, principalmente nos processos de remodelação tecidual pela sua capacidade de fagocitose, digestão e morte celular (FEST et al., 2007).

Os macrófagos estão presentes no útero gestante de camundongos, ratas e mulheres e são células dominantes (BULMER; JOHNSON, 1984; HUNT et al., 1985). Na medicina humana são referidos como células de *Hofbauer* (BENIRSCHKE, 1995; KAUFMANN, 1995). Em geral, os macrófagos uterinos aumentam com o progresso da gestação em contraste

com outros leucócitos. Os macrófagos placentários podem se originar do mesênquima coriônico no início da gestação. Estas células produzem citocinas pró-inflamatórias e também possuem a função na apresentação de antígeno sugerindo que possam funcionar como células sentinelas (SCHLAFER et al., 2000). Em bovinos muitos macrófagos estão localizados no parênquima das carúnculas após o parto, evidenciando forte atividade da fosfatase ácida em partos normais (MIYOSHI et al., 2002). A patologia mais comum da placenta bovina é retenção placentária. Os mecanismos que provocam, e conduzem à liberação placentária ainda não estão elucidados (LAVEN; PETERS, 1996). Nossos resultados mostraram que a fagocitose foi significativa nas células da placenta de todos os terços estudados quando comparada à porcentagem de fagocitose das células totais do sangue periférico durante todo o período gestacional. A fagocitose foi maior nas células da placenta do terceiro terço gestacional, corroborando com os achados de Miyoshi et al. (2002), onde os macrófagos tiveram seu número aumentado com o progresso da gestação e a atividade da fosfatase ácida dessas células foram observadas no 5-6 meses de gestação e permaneceram até o parto. A fosfatase ácida é uma enzima lisossomal presente nos macrófagos para a digestão. Os macrófagos da mucosa intestinal normal são ricos em fosfatase ácida e fagocitam células apoptóticas epiteliais dos vilos intestinais (IWANAGA, 1995; SUZUKI et al., 1997).

O peróxido de oxigênio induz monócitos humanos a síntese de HSP (POLLA et al., 1987) e a pré-exposição a temperaturas induzem a síntese dessas proteínas as quais protegem parcialmente monócitos da morte celular induzida por H_2O_2 (POLLA et al., 1988), um dos aspectos avaliados neste projeto e que se mostrou diferente nos terços gestacionais, durante a gestação pelos lipídeos poliinsaturados peroxidados formados. A indução de neutrófilos humanos a resposta a HSP pelo calor ou ao cádmio é associado à inibição da produção de superóxido (MARIDONNEAU-PARINI et al., 1988) e estas observações sugerem a implicação potencial da HSP na biologia da fagocitose (POLLA, 1988). Os radicais de

oxigênio livre gerado na presença de ferro derivado da hemoglobina e conseqüentemente a depleção de glutatona estão envolvidos na síntese de proteínas do estresse durante a eritrofagocitose. As HSP sintetizadas durante o mecanismo de fagocitose tem papel importante na própria fagocitose e na imunidade (CLERGET; POLLA, 1990). Na placenta bovina pode-se observar que a HSP 60 aumenta significativamente a fagocitose nas células da placenta bovina durante a gestação, em todos os períodos analisados.

As HSP de pequeno peso molecular (então chamadas de *small proteins*) são um grupo de proteínas que variam seu peso molecular de 15 a 30 kDa e apresentam em sua estrutura seqüências homólogas entre si e propriedades bioquímicas de fosforilação e oligomerização. A oligomerização é um processo dinâmico da fosforilação dependente do nível de fosforilação da proteína e da exposição ao estresse. A fosforilação das HSP é um processo catalítico reversível por quinases em resposta a diferentes agentes diferenciadores como mitógenos, TNF- α , IL-1B e peróxido de hidrogênio (GARRIDO, 2002). A HSP 60 em mamíferos é encontrada na matriz mitocondrial, preferencialmente, e no citosol (ELLIS, 1999; KHAN, 1998). Na matriz mitocondrial, essa proteína facilita o dobramento de outras proteínas e facilita a degradação proteolítica e denaturação dependente do ATP, sendo este processo regulado pela HSP 10 (BUKAU; HORWICH, 1998). A HSP 60 representa uma etapa inicial na liberação de muitas proteínas destinadas a matriz mitocondrial, a membrana interna e ao espaço intra-membranoso.

Como uma organela intracelular composta por dupla membrana lipoprotéica a mitocôndria mostra plasticidade, mobilidade e heterogeneidade morfológica para os diferentes tipos celulares. A morfologia mitocondrial é influenciada pelo estado metabólico das células, ciclo celular, desenvolvimento celular e diferenciação e pelo estado patológico. Mudanças morfológicas e funcionais na mitocôndria têm sido estudadas em neoplasias (JOHNSON; WALSH; CHEN, 1980).

A Rodamina 123 (Rh 123) é um fluorescente altamente específico para mitocôndria em células vivas; pode ser excitada por luz azul (485 nm) a luz verde (546 nm) e emite uma fluorescência de verde amarelada a vermelha (CHEN, 1988). A Rh123 entra na célula comumente pelo potencial de membrana mitocondrial. A Rh123 entra na mitocôndria de células vivas que também são afetadas pelo potencial elétrico de membrana. Toda mitocôndria possui potencial de membrana mitocondrial idêntico, e isso sugere que apesar da variação de tipo, tamanho, localização e distância entre elas, essas organelas respondem aos mesmos reguladores pelo ajuste de potencial elétrico. Os maiores potenciais elétricos de membrana são encontrados nas mitocôndrias de células musculares cardíaca seguidos de todas as células do músculo esquelético, células do músculo liso, macrófagos, hepatócitos, fibroblastos, células neuronais, células da glia e queratinócios. Os menores valores são encontrados nas células do epitélio da vesícula urinária e linfócitos B e T (LAMPIDIS et al., 1982; CHEN et al., 1982).

As células coradas com Rh123 são ideais para análise da concentração e atividade mitocondrial pelo citômetro de fluxo (SHAPIRO, 1985; RNOT et al., 1986). Células com números de mitocôndrias variados ou potencial de membrana mitocondrial pode ser separado por um FACS *sorter* (CHEN et al., 1988). As análises dos resultados do potencial de membrana mitocondrial de células placentárias após o tratamento com HSP 60 marcadas com alto potencial elétrico e não marcadas com menor potencial elétrico pela rodamina 123 mostraram a presença de duas populações de células placentárias de animais de segundo e terceiro terço gestacional, após 72 horas de cultura. Os dados obtidos por essa técnica mostraram que há um aumento significativo no terceiro terço gestacional induzido pela HSP 60 em células placentárias, possivelmente modulando a cinética da ativação de mecanismos de sinalização de morte celular programada entre as células da placenta e o sistema

imunológico. Esta hipótese assegura que, no terceiro terço de gestação, no conceito a termo, as variações hormonais e o sistema imune podem ser reguladoras para o nascimento do feto.

Os efeitos deletérios conhecidos provocados ou associados aos radicais livres são inúmeros, podem induzir diversos processos degenerativos como a artrite, a catarata, o enfisema, a doença de Parkinson, a lesão isquêmica, além do câncer, do envelhecimento. Os mecanismos através dos quais as células são atacadas pelos radicais livres são complexos e ainda não estão muito bem elucidados, porém levam à destruição de proteínas, através da oxidação de grupamentos sulfidril, além de poderem oxidar bases púricas e pirimídicas, gerando alterações no DNA. Isso pode ser observado nos ensaios de LPO e no ciclo celular onde houve aumento de radicais peroxidados e de DNA fragmentado, respectivamente, quando tratados com HSP 60, sugerindo que essa proteína nas células da placenta não exerce função protetora. As modificações nas proteínas causam modificações em aminoácidos, provocam oxidação de grupos sulfidril resultando em mudanças conformacionais o que altera atividades enzimáticas, quebra de ligações peptídicas bem como modificações em glicoproteínas, pela perda de metal em metaloproteínas e aumento na susceptibilidade à proteólise. No DNA, provocando mutações nas bases nitrogenadas e alterações nos ácidos graxos polinsaturados como o ácido araquidônico, provocando lipoperoxidação. Lipídeos que fazem parte de membranas biológicas também são modificados quimicamente por radicais livres alterando a permeabilidade da membrana ao cálcio, com conseqüente ativação de fosfodiesterase, e eventual ruptura da membrana. Com a deterioração da membrana celular, acredita-se que o acúmulo dos produtos formados na lipoperoxidação (malonildialdeído e 4-hidroxiacetalquênil), aumenta a rigidez e diminui a eficiência funcional da membrana causando o envelhecimento gradual das células (VACA et al., 1988; FRAGA et al., 1994), o que poderia ser um dos efeitos exógenos da HSP sobre sua atividade pró-apoptótica encontrada neste trabalho.

Em condições fisiológicas e na homeostasia, o balanço entre agentes pró-oxidantes e as defesas antioxidantes se mantém equilibrado. Quando este balanço é rompido em favor dos agentes oxidantes, a célula ou organismo está sob “estresse oxidativo”, com potenciais danos em diversos sistemas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). A injúria inicial de regeneração ou ao logo do período gestacional ocorrem alterações intracelulares, como recrutamento de macrófagos, dano mitocondrial, interferência com defesas antioxidantes, aumento do cálcio intracelular e conversão de xantina desidrogenase à xantina oxidase, condições que produzem estresse oxidativo. Essas possibilidades de resposta do organismo são: a adaptação por aumento na atividade antioxidante, podendo gerar hiperproteção à célula contra danos futuros; o dano tecidual, por agressão a lipídios, carboidratos ou proteínas; e a morte celular, por necrose ou apoptose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Quando as células placentárias no terceiro trimestre foram tratadas com HSP 60 nos ensaios bioquímicos e no ensaio de fagocitose, pode-se observar que essa proteína exerce funções distintas e especiais nesse tecido. Os produtos da membrana celular peroxidados como os lipídeos, têm um importante papel em promover a proliferação, os processos de hipertrofia e de remodelamento celular. (KITIYAKA; WILCOX, 1998).

Além desses mecanismos as famílias das HSP estão envolvidas no processamento e na apresentação de antígenos por APC e NK. Esses mecanismos são modulados por diversos fatores solúveis como as prostaglandinas que em particular aumentam sua concentração ao longo dos trimestres da gestação. Prostaglandinas A, D e E tem se mostrado como fator inibidor da proliferação e promotora da diferenciação celular (FUKUSHIMA et al.; 1989); controlando a proliferação celular e parando as células na fase G1 do ciclo celular (OHNO et al., 1988). A síntese das proteínas do choque térmico pelas prostaglandinas pode também alterar processo de glicosilação, alternando o transporte intracelular de proteínas. HSP 60 distribuída difusamente no núcleo e no citoplasma durante as fases do ciclo celular pode

aumentar a síntese do RNA mensageiro para a IL-2 em 15 vezes alterando a distribuição da célula durante o ciclo (FERRIS et al., 1988).

Seqüências imuno-reativas ou epítomos da HSP 60 em humanos estão associadas adversidades ao longo da gestação. Mulheres com anticorpos anit-HSP 60 na cérvix IgA+ apresentam uma diminuição na taxa de fertilização *in vitro* e na transferência de embriões (WITKIN et al., 1994; WITKIN et al., 1996). A detecção de imunocomplexos anti-HSP 60 e HSP 70 em tecidos placentários humanos podem resultar em uma reação subsequente de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias que influenciam o desenvolvimento normal da gestação ou mesmo induzem partos prematuros (WITKIN; MCGREGOR, 1991; BEARGEN et al., 1994). Por outro lado, vários autores determinaram a presença dessa proteína no soro e no plasma de mulheres não gestantes normais. Na gestação normal, os níveis de HSP 60 mostraram uma correlação significativa com a idade materna e uma correlação positiva significativa com a idade gestacional com a segunda metade da gestação. As células trofoblásticas expressaram HSP 60, o que pode resultar no aumento dos níveis plasmáticos dessa proteína com a idade gestacional na gestação normal (ZIEGERT et al., 1999).

O concepto é um tecido semi-alogênico cujas estruturas antigênicas têm origem parcialmente paterna. A HSP 60 está implicada em mecanismo de manutenção e da tolerância imunológica entre o feto e o embrião (JURETIC et al., 2004; ADAMS, 2007).

A ação extracelular da HSP atua na expressão dos receptores CD14, CD36, CD40, CD91, LOX 1, TLR2 e TLR4, na apresentação antigênica no estímulo pró-inflamatório Th1, TNF- α , IL-1B, produção de IL-6, quimiocinas e óxido nítrico como também em moléculas co-estimulatórias (ASEA et al., 2000; BASU et al., 2001; ASEA et al. 2002; ASEA, 2005). Além disso, as HSP podem contribuir para a maturação, ativação e migração de DC, como também permitir a sensibilização de compostos tolerogênicos e imunogênicos (ASEA, 2005). A expressão da HSP 70 estimula diretamente a maturação, ativação e migração das células

NK (GASTPAR et al., 2005). Estudos realizados em células tumorais mostraram a atividade citotóxica é mediada por células T $\gamma\delta$ (THOMAS et al., 2000).

Vários mecanismos são sugeridos e hipóteses são aventadas por diferentes autores na tentativa de explicar a tolerância na interface materno-fetal. Mas todos eles ocorrem sincronizadamente para que o sucesso de uma gestação termine com o nascimento de um indivíduo saudável.

Muitos estudos são feitos na placenta humana, mas pouco se conhece sobre a placenta bovina. Apesar das diferenças quanto ao tipo de placentação das espécies, e até mesmo quanto ao tipo de aquisição das amostras a serem estudadas, acredita-se que os mecanismos de tolerância sejam semelhantes, mas com algumas peculiaridades.

A proliferação dos linfócitos *in vivo* frente a antígenos estranhos ao organismo precisa ser rápida e eficaz para evitar infecções. A placenta utiliza mecanismos característicos e diferentes do restante do organismo para driblar os alo-antígenos fetais. Os métodos utilizados para a proliferação *in vitro* como a incorporação de timidina no DNA são utilizados tanto na placenta humana (hemocorial) (DONG, et al., 2008) quanto na placenta de ovelhas (epiteliocorial) (MICHAEL et al., 2006; WATTEGEDERA et al., 2008). Entretanto esse método não detecta números reduzidos de células responsivas a estímulos e não é compatível para outra caracterização por meio de suas células filhas viáveis. Também não identifica células que possuem DNA recém-sintetizado não informando se as células coradas foram divididas ou o número de divisão celular que ocorreu antes da exposição a timidina (WALLACE et al., 2008). Diferentemente da técnica utilizada nesse estudo com a técnica de CFSE (5,6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster) como marcador fluorescente intracelular que se divide igualmente entre as células filhas, pode-se avaliar a divisão celular por múltiplas gerações empregando-se a citometria de fluxo, permitindo a identificação de até 4 gerações em ensaios *in vitro*.

Por meio da técnica de proliferação com CFSE pôde-se observar que tanto a proliferação basal (células sem tratamento) de células totais é alta quando comparada ao controle do sangue periférico de vacas não gestantes. No ensaio de sobrenadante com monocamada de células mononucleares do sangue periférico, não houve proliferação dessas células sob influência dos sobrenadantes de células mononucleares placentárias e células totais de placenta em todos os terços gestacionais estudados. Em nosso estudo, as células mononucleares da placenta foram separadas por gradiente de densidade à partir de uma suspensão de células placentárias, nessa separação podem estar presentes tanto linfócitos maternos quanto fetais. A produção de citocinas regulatórias poderia ser descartada pelo fato do nosso experimento, feito com o sobrenadante de células placentárias e de células mononucleares de placenta acondicionadas sobre a monocamada de células mononucleares do sangue periférico, não houve inibição da proliferação dessas células. Esse fato corrobora com a idéia de Saito et al. (2008) que para o efeito inibitório de Treg é necessário o contato célula a célula. Outro efeito imunomodulatório desse contato é a expressão CTLA-4 na superfície das Treg e a ligação dessa molécula em uma célula APC como as DC ou macrófagos que induz a expressão de IDO (enzima que cataboliza o triptofano, um aminoácido essencial na proliferação de linfócitos T) a qual inibe a proliferação de células T. Mas segundo Thuere et al., (2007) o aumento da expressão de IDO na placenta de camundongos, não é direcionada pelas Treg pois elas se expandem no 2 dias de gestação e são encontradas na decídua e não na placenta e a IDO é expressa na placenta no início da gestação no dia 8 e atingindo seu pico no dia 10. Esta hipótese pode ser aventada pelo experimento feito por Mold et al. (2008) indicando que as células T fetais não são deficientes em responder aos aloantígenos maternos, sua função é suprimida por uma grande quantidade de Treg fetais, demonstrando que o sistema imune adaptativo periférico fetal pode gerar Treg supressivas, provando um outro mecanismo pelo qual o feto pode

estabelecer tolerância ao aloantígeno e ao próprio antígeno presente durante o desenvolvimento no útero.

Uma subpopulação de linfócitos conhecida são as células $T\gamma\delta$ as quais são importantes componentes do sistema imune inato e são encontradas no endométrio de todos os mamíferos durante a gestação (MINCHEVA-NILSSON, 2003). Podem reconhecer antígenos estranhos não processados e que não expressam o MHC (ex. trofoblasto) e a maioria delas são ativadas (SZEKERES-BARTHO et al., 2001). Estão aumentadas na decídua em humanos e em ovelhas se acumulam no epitélio uterino e podem participar do crescimento do concepto, imunossupressão e liberação da placenta (HANSEN, 2007).

Considerando-se o tipo da placentação humana ser deciduada, ou seja, altamente invasiva, a pequena quantidade de camadas entre a mãe e feto permite a constante passagem de antígenos fetais para a circulação da mãe e faz com que o sistema imune materno na mulher ser muito mais desafiado comparado ao de outras espécies. Isso reflete na resposta imune materna, que requer todos os tipos de mecanismos imunológicos, como contatos entre células, diferentes tipos de subpopulações de linfócitos, balanço entre citocinas, quimiocinas, proteínas, enzimas, receptores de superfície e hormônios envolvidos nesse diálogo. Diferente do que acontece com o tipo de placentação em bovinos, por não ser decidualizada e possuir seis camadas entre a mãe e o feto, os antígenos fetais não fazem com que o sistema imune materno seja tão exposto, ocorrendo apenas uma necessidade limitada para a tolerância do feto.

Apesar da pouca exposição e baixa estimulação do sistema imune materno nos bovinos, nossos experimentos mostraram que houve uma diferença significativa na proliferação de células mononucleares do sangue periférico entre vacas prenhes nos três terços gestacionais e vacas não gestantes. Tal fato somente não foi evidenciado no segundo trimestre, onde a proliferação de células mononucleares do sangue periférico foi semelhante à

proliferação de células do sangue periférico de vacas não gestantes. Entretanto, Innes et al. (2001) estudando gestações bovinas, verificou que houve uma supressão na proliferação de células mononucleares do sangue periférico quando estimuladas com ConA no segundo terço de gestação quando comparado ao primeiro e terceiro terços. Wattedegera et al. (2008) que realizaram ensaio de proliferação de células T em células mononucleares do sangue periférico em ovelhas gestantes e não gestantes com incorporação de timidina, observaram que não houve diferença entre os grupos estudados quanto a proliferação dessas células estimuladas com ConA. Em ensaios recentes foram verificados que a imunoglobulina de célula T reg e domínio de mucina (Tim-3) são identificados como moléculas de superfície celular específicas que suprimem respostas Th1 através da transdução de sinalização da apoptose. O Tim-3 pode modular o balanço entre Th1/Th2, mas recentes estudos também mostraram quem essa molécula é expressada nas células do sistema imune inato como células dendríticas. Durante a gestação, o Tim-3 é regulado no sangue periférico de mulheres gestantes, na maioria pelos monócitos mas não por linfócitos T e B, sendo que o aumento de IL-4/STAT6 pode contribuir para a regulação do Tim-3 (ZHAO et al., 2009).

A baixa proliferação de células mononucleares do sangue periférico de vacas gestantes no primeiro e terceiro trimestres gestacionais pode estar relacionada às células Treg. Isso pode ser explicado por vários trabalhos que mostram a importância desses linfócitos durante a gestação, onde essas células regulam a imunidade materna ao alo-antígenos fetais (ALUVIHARE et al., 2005), encontrando-se aumentados durante a gestação em mulheres grávidas e em número diminuído em mulheres que sofreram aborto (ZENCLUSSEN, 2006; SAITO et al., 2007). Aliado a isso, as células Treg FoxP3+CD4+CD25+ ativadas suprimem respostas deletérias de linfócitos auto-reativos e a homeostasia dentro do desenvolvimento fetal (CUPEDO et al., 2005). Em ratas grávidas as Treg promoveram um micro-ambiente tolerogênico caracterizado pelo aumento de TGF- β , e LIF (ZENCLUSSEN, 2006).

Distintamente das funções citoprotetoras da HSP 60 nas células de mamíferos, nas células placentárias, principalmente no terceiro terço gestacional, essa proteína exerce papel no controle da apoptose, aumento do estresse oxidativo, ciclo celular, potencial de membrana mitocondrial e fagocitose.

*C
O
N
C
L
U
S
Õ
E
S*

7 CONCLUSÕES

Conclui-se que:

- ✓ HSP 60 aumenta o número de células mortas após cultivo em células placentárias do terceiro terço gestacional;
- ✓ sugere-se que a HSP 60 não consiga inibir a apoptose de células placentárias;
- ✓ a fagocitose é maior em células da placenta em todos os terços estudados quando comparada à fagocitose das células totais do sangue periférico;
- ✓ A fagocitose é maior nas células da placenta no terceiro terço gestacional;
- ✓ HSP 60 aumenta o potencial de membrana mitocondrial no terceiro terço gestacional ;
- ✓ HSP 60 modula a cinética da ativação de mecanismos de sinalização de morte celular programada das células da placenta;
- ✓ HSP 60 exerce efeito exógeno sobre sua atividade pró-apoptótica;
- ✓ A HSP 60 não influencia na proliferação de células placentárias totais;
- ✓ A HSP 60 não influencia na proliferação da monocamada de células mononucleares do sangue periférico sob adição dos sobrenadantes de células mononucleares

placentárias e células totais de placenta em todos os terços gestacionais estudados, sugerindo uma regulação local célula a célula;

- ✓ A proliferação de células mononucleares do sangue periférico de vacas no segundo terço gestacional foi semelhante à proliferação de células do sangue periférico de vacas não gestantes;

- ✓ A proliferação de células mononucleares do sangue periférico de vacas gestantes no primeiro e terceiro trimestres gestacionais foi menor do que a proliferação de células mononucleares do sangue periférico de vacas gestantes no segundo terço gestacional e de vacas não gestantes.

*R
E
F
E
R
R
Ê
N
C
I
A
S*

REFERÊNCIAS

- AAGAARD-TILLERY, K.; SILVER, R.; DALTON, J. **Immunology of Normal Pregnancy**, v. 11, p. 279-295, 2006.
- ABRAHAMS, V. M.; KIM, Y. M.; STRASZEWSKI, S. L.; ROMERO, R.; MOR, G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. **American Journal of Reproduction Immunology**, v. 51, p. 275-282, 2004.
- ADAMS, K. M.; YAN, Z.; STEVENS, A. M.; NELSON, J. L. The changing maternal “self” hypothesis: a mechanism for maternal tolerance of the fetus. **Placenta**, 28, p. 378-382, 2007.
- AGNELLO, D.; LANKFORD, C. S. R.; BREAM, J.; MORINOBU A.; GADINA M.; O’SHEA J. J.; FRUCHT, D. M. Cytokines and Transcription Factors That Regulate T Helper Cell Differentiation: New Players and New Insights. **Journal of Clinical Immunology**, v. 23, n. 3, p. 2003.
- ARNOLD-SCHILD, D.; HANAU, D.; SPEHNER, D.; SCHID, C.; RAMMENSEE, H.; DE LA SALLE, H.; SCHILD, H. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. **The Journal of Immunology**, v. 162, p. 3757-3760, 1999.
- ASEA, A.; REHLI, M.; KABINGU, E.; BOCH, J. A.; BARÉ, O.; AURON, P. E.; STEVENSON, M. A.; CALDERWOOD, S. K. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP 70. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 15028-15034, 2002.
- ASEA, A. Chaperokine-induced signal transduction pathways. **Exercise Immunology Review**, v. 9, p. 25-33, 2003.
- ASEA, A. Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of Hsp 72. **Exerc Immunology**, v. 11, p. 34-45, 2005.
- ASHKAR, A. A.; DI SANTO, J. P.; CROY, B. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. **Journal Experimental Medicine Journal of Immunology**, v. 192, p. 259- 269, 2000
- ASHKAR, A. A.; CROY, B. A. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. **Biology Reproduction**, v. 61, p. 493- 502, 1999.
- ATRE, N.; THOMAS, L.; MISTRY, R.; PATHAK, K.; CHIPLUNKAR, S. Role of nitric oxide in heat shock protein induced apoptosis of $\gamma\delta$ T cells. **International Journal of Cancer**, v. 119, p. 1368-1376, 2006.
- BASU, S.; BINDER, R. J.; SUTO, R.; ANDERSON, K. M.; SRIVASTAVA, C. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation

signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway, **International Immunology**, v. 12, n. 11, p. 1539-1546, 2000.

BEARGEN, R.; BENIRSOHKE, K.; ULICH, T. R. Cytokine expression in the placenta. The role of interleukine 1 and interleukine 1 receptor antagonist expression in chorioamnionitis and parturition. **Archive Pathology Laboratory Medicine**, v. 118, p. 52-55, 1994.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 8, n. 4, p. 345-350, 2007.

BENIRSCHKE, K. The biology of the twinning process: how placentation influences outcome. **Semin Perinatol.**, v. 19, n. 5, p. 342-50, 1995.

BINDER, R. J.; HARRIS, M. L.; MÉNORET, A.; SRIVASTAVA, P. K. Saturation, competition, and specificity in interction of heat shock proteins (HSP) gp 96, HSP 90, and HSP 70 with CD11+ cells. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 2582-2587, 2000.

BINDER, R. J.; SRIVASTAVA, P. K. Essential role of CD91 in re-presentation of gp96-chaperoned peptides. **PNAS**, v.101, n. 16, p. 6128-6133, 2004.

BINDER, R. J.; WATNER, R.; SRIVASTAVA, P. The heat-shock protein receptors: some answers and more questions, **Tissue Antigens**, v. 64, n. 4, p. 442-451, 2004.

BRELOER, M.; DORNER, B.; MORÉ, S. H.; RODERIAN, T.; FLEISCHER, B.; VON BONIN, A. Heat shock proteins as “danger signals”: eukaryotic HSP 60 enhances and accelerates antigen-specific IFN- γ production in T cells. **European journal immunology**, v. 31, p. 2051-2059, 2001.

BRZEZINSKA-SLEBODINSKA, E., MILLER, J. K., QUIGLEY III, J. D., MOORE, J. R., MADSEN, F. C. Antioxidant status off dairy supplemented prepartum with vitamin E and selenium. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 3087-3095, 1994.

BRELOER, M.; MORÉ, S. H.; OSTRELOH, A.; STELTER, F.; JACK, R.S.; VON BONIN, A. Macrophages as main inducers of IFN- γ in T cells follwing administration of human and mouse heat shock protein 60. **International Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1247-1253, 2002.

BOOS, A.; MÜLLING, C. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. **Reproduction**, v. 126, p. 469-480, 2003.

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 6, n. 92, p. 351- 366, 1998.

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

CALDERWOOD, S. K.; MAMBULA, S. S.; GRAY JR., P. J. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1113, p. 28-39, 2007.

CASTELLINO, F.; BOUCHER, P. E.; EICHELBERG, K.; MAYHEW, M.; ROTHMAN, J. E.; HOUGHTON, A. L.; GERMAIN, R. N. Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock

protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 11, p. 1957-1964, 2000.

CEDERBOM, L.; HALL, H.; IVARS, F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate costimulatory molecules on antigen-presenting cells. **European Journal Immunology**, v. 30, p. 1538-1543, 2000.

CHEN, L. B.; SUMMERHAYES, I. C.; JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; BERNAL, S. D.; LAMPIDIS, T. J. Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Cold Spring Harb Symposium Quant Biology**, v. 46, p.141-155, 1982.

CHEN, LAN BO Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annual Reviews Cell Biology**, v. 4, p. 155-181, 1988.

CHEN, W.; SYLDATH, U.; BELLMANN, K.; BURKART, V.; KOLB, H. Human 60-kDa heat shock protein: a danger signal to the innate immune system. **The Journal of Immunology**, v. 162, p. 3212-3219, 1999.

COHEN, I. R. the Th1/Th2 dichotomy, hsp 60 autoimmunity, and type I diabetes. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 84, n. 2, p. 103-106, 1997.

COHEN-SFADY, M.; NUSSBAUM, G.; PEVSNER-FISHER, M.; MOR, F.; CARMI, P.; ZANIN-ZHOROV, A.; LIDR, O.; COHEN, I. R. Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway, **The Journal of Immunology**, v. 175, p. 3594-3602, 2005.

CLERGET, M.; POLLA, B. S. Erythrophagocytosis induces heat shock protein synthesis by human monocytes-macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 3, p.1081-1085, 1990.

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

DAVIES, C. J.; HILL, J. R.; EDWARDS, J. L.; SCHRICK, F. N.; FISHER, P. J.; ELDRIDGE, J. A.; SCHLAFER, D. H. Major histocompatibility antigen expression on the bovine placenta: its relationship to abnormal pregnancies and retained placenta. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 267-280, 2004.

DIVERS, M.; BULMER, J. N.; MILLER, D.; LILFORD, R. J. Placental heat shock proteins: no immunohistochemical evidence for a differential stress response in preterm labour. **Gynecology Obstetrics Investigation**, v. 40, p. 236-243, 1995.

ENGELHARDT, H.; CROY, A.; KING, G. J. Conceptus influences the distribution of uterine leucocytes during early porcine pregnancy. **Biology of Reproduction**, 66, p. 1875-1880, 2002.

ELLIS, R. J. Molecular chaperones: pathways and networks. **Current Biology**, v. 9, p. 137-139, 1999.

FERRIS, D. K.; HAREL-BELLAN, A.; MORIMOTO, R.; WELCH, W. J.; FARRAR, W. I. Mitogens and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. **Proc Natl Acad Science**, v. 85, p. 3850-3854, 1988.

FLOHÉ, S. B.; BRÜGGEMANN, J.; LENDEMANS, S.; NIKULINA, M.; MEIERHOFF, G.; FLOHÉ, S.; KOLB, H. Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 2340-2348, 2000.

FACCIOTTI, P.R.; RICCI, R. E. G., MARIA, D. A., BERTOLINI, M.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Patterns of cell proliferation and apoptosis by topographic region in normal *Bos taurus* vs. *Bos indicus* crossbreeds bovine placentae during pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, v. 25, p. 1-7, 2009.

FEST, S.; ALDO, P. B.; ABRAHAMS, V. M.; VISINTIN, I.; ALVERO, A.; CHEN, R.; CHAVEZ, S. L.; ROMERO, R.; MOR, G. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 1, p. 55-66, 2007.

FRAGA, C.G.; ONUKI, J.; LUCESOLI, F.; BECHARA, E. J.H.; DI MASCIO, P. 5 – Amino levulinic acid mediates the in vivo formation of 8 – hydroxi –2'- deoxyguanosine in DNA. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 10, p. 2241 – 2244, 1994.

GAMBEL, P.; CROY, B. A.; MOORE, W. D.; HUNZIDER, R. D.; WEGMANN, T. G.; ROSSANT, J. Characterization of immune effector cells present in early murine decidua. **Cellular Immunology**, v. 92, p. 303-314, 1985.

GARRIDO, C. BRUEY J. M.; FROMENTIN, A.; HAMMANN, A.; ARRIGO, A. P.; SOLARY, E. HSP 37 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. **Faseb Journal**, v. 13, p. 2061-2070, 1999.

GARRIDO, C. Size matters: of the small HSP 27 and its large oligomers. **Cell Death Differentiation**, v. 9, p. 483-485, 2002.

GARRIDO, C.; BRUNET, M.; DIDELOT, C.; ZEMATI, Y.; SCHMITT, E.; KROEMER, G. heat shock protein 27 and 780: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. **Cell Cycle**, v. 5, p. 2569-2561, 2006.

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

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

GUPTA, S.; KNOWITON, A. A. Cytosolic heat shock protein 60, hypoxia, and apoptosis. **Circulation**, v. 106, p. 2727-2733, 2002.

HABICH, C.; BAUMGART, K.; LKOLB, H.; BURKART, V. The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 569-576, 2002.

HABICH, C.; BURKART, V. Heat shock protein 60: regulatory role on innate immune cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 742-751, 2007.

HABICH, C.; KEMPE, K.; GOMEZ, F. J.; LILLICRAP, M.; GASTON, H.; VAN DER ZEE, R.; KOLB, H.; BURKART, V. **FEBS letters**, v. 580, p. 115-120, 2006.

HALLIWELL, B. Antioxidants: The basis – what they are and how to evaluate them. In : SIES, H. (ed.) : Antioxidants in diseases: mechanisms and therapy. Advances in Pharmacology, v.38, California, Academic Press, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C.M. Free Radicals in Biology and Medicine. 3th ed. Oxford University Press, 1999.

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

HIBY, S. E.; KING, A.; SHRKEY, A. M.; LOKE, Y. W. Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing. **Molecular Immunology**, v. 34 p. 419-430, 1997.

HILL, J. R. Abnormal in utero development of cloned animals: implications for human cloning differentiation. **Biological Reproduction**, v. 69, p. 174–178, 2002

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

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

HUNT, J. S.; PETROFF, M. G.; BURNETT, T. G. Uterine leukocytes: key players in pregnancy. **Cell & Developmental Biology**, v. 11, p. 127-137, 2000.

INNES, E. A.; WRIGHT, S. E.; MALEY, S.; RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTLEY, P.; HAMILTON, C.; CAREY, I. M. BUXTON, D. protection against vertical transmission in bovine neosporosis. **International Parasitology**, v. 31, p. 1523-1234, 2001.

IWANAGA, T. The involvement of macrophages and lymphocytes in the apoptosis of enterocytes. **Arch Histol Cytol.**, v. 58, n. 2, p.151-9, 1995.

JANEWAY C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. Receptors of the innate immune system. In: ___ **Immuno Biology**. 5th ed. Local: Garland Publishing, 2001. 732 p.

JAUNIAUX, E.; WATSON, A. L.; HEMPSTOCK, J. BAO, Y.; SKEPPER, J. N.; BURTON, G. J. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress, **American Journal of Pathology**, v. 157, p. 211-2122, 2000.

ZHAO, J.; LEI, Z.; LIU, Y. Y.; LI, B.; ZHANG, L.; FANG, H.; SONG, C.; WANG, X.; ZHANG, G.; FENG, Z.; HUANG, B. Human Pregnancy Up-Regulates Tim-3 in Innate Immune Cells for Systemic Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 6618–6624, 2009.

JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 77, v. 2, p. 990-994, 1990.

JURETIC, K.; STRBO, N.; CRNIC, T. B.; KASKARIN, G.; RUKAVINA, D. An insight into the dendritic cells at the maternal-fetal interface. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, p. 350-355, 2004.

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

KHAN, I. U.; WALLIN, R.; GUPTA, R. S.; KAMMER, G. M. protein kinase A-catalyzed phosphorylation of heat shock protein 60 chaperone regulates its attachment to histone 2B in the T lymphocyte plasma membrane. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 10425-10430, 1998.

KING, A.; BURROWS, T. D.; HIBY, S. E.; BOWEN, J. M.; JOSEPH, S.; VERMA, S.; LIM, P. B.; GARDNER, L.; LE BOUTEILLER, P.; ZIEGLER, A.; UCHANSKA-ZIEGLER, B.; LOKE, Y. W. Surface expression of HLA-C human extravillous trophoblast. **Placenta**, v. 21, p. 376-387, 2000.

KITIYAKARA, C.; WILCOX, C.S. Antioxidants for hypertension. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.7, p. 531 – 538, 1998.

KUPPNER, M. C.; GASTPAR, R.; GELWER S.; NOSSNER, E.; OSHMANN, O.; SCHAMER, A.; ISSELES, R. D. The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors, **European Journal of Immunology**, v.31, n.5, p.1602-1609, 2001.

LAMPIDIS, T. J.; BERNAL, S. D.; SUMMERHAYES, I. C.; CHEN, L.B. Selective toxicity of rhodamine 123 in carcinoma cells in vitro. **Cancer Resrsarch**, v. 43, n. 2, p. 716-20, 1983.

LANIER, L. L. NK cell receptor. **Annual Review Immunology**, v. 16, p. 359-393, 1998.

LANNEAU, D.; BRUNET, M.; FRISAN, E.; SOLARY, E.; FONTENAY, M.; GARRIDO, C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. **Journal of Cellular Molecular and Medicine**, v. 12, n. 3, p. 743-761, 2008.

LAVEN, R. A.; PETERS, A. R. Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. **Vet Rec.** v. 139, n. 19, p.465-471, 1996.

- LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 102, p. 122-134, 1994.
- LEUNG, S. T.; DERECKA, K.; MANN, G. E.; FLINT, A. P. E.; WATHES, D. C. Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 119, p. 25-33, 2000.
- LI, Z.; MENORET, A.; SRIVASAVA, P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 45-51, 2002.
- LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of Immunology Methods**, v. 243, p. 147-154, 2000.
- MALOY, K. J.; ANTONELLI, L. R.V.; LEFEVRE, M.; POWRIE, F. Cure of innate intestinal immune pathology by CD4+CD25+ regulatory T cells. **Immunology Letters**, v. 97, p. 189-192, 2005.
- MARGOLIN, Y.; ATEN, R. F.; BEHRMAN, H. R. Antigonadotropic and antisteroidogenic actions of peroxide in rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 127, n. 1, p. 245-250, 1990.
- MARIDONNEAU-PARINI, I.; CLERC, J.; POLLA, B. S. Heat shock inhibits NADPH oxidase in human neutrophils. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.154, n.1, p.179-186, 1988.
- MILLER, G.V., BARTLETT, P. C., ERSKINE, R. J., SMITH, K.L. Factors affecting serum selenium and vitamin E concentrations in dairy cows. **JAVMA**, v. 206, p.1369, 1995.
- MIRANDA, S. GENTILE, T.; MARGNI, R. Enhancement of *in vitro* HSP 72 expression by placental IL-6. **American Journal of Reproduction Immunology**, v. 46, p. 358-365, 2001.
- MINYUE, D.; GUOLIAN, D.; JUN, Z.; HANZHI, W.;YI, Z.; HEFENG, H. The Effect of Trophoblasts on T Lymphocytes: Possible Regulatory Effector Molecules - A Proteomic Analysis. *Cell Physiol Biochem*, v. 21, p. 463- 472, 2008.
- MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y.; IWANAGA, T. Reduced phagocytotic activity of macrophages in the bovine retained placenta. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n.1, p. 53-56, 2002
- MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y. Specific localization of macrophages in pregnant bovine caruncles. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 39, p. 125-128, 2004.
- Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 26 jan. 2005.
- MOFFETT, A.; LOKE, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. **Immunology**, v. 6, p. 584-594, 2006.
- MOLD, J. E.; MICHAËLSSON, J.; BURT, T. D.; MUENCH, M. O.; BECKERMAN, K. P.; BUSCH, M. P.; LEE, T. H.; NIXON, D. F.; MCCUNE, J. M. Maternal Alloantigens promote

the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. **Science**, v. 322, p. 1562-1565, 2008.

MONTEIRO, J. M. **Imunolocalização das *Heat Shock Proteins (HSPs) 60 e 70 na placenta bovina***. 2005. 81f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MORÉ, S. H.; BRELOER, M.; VON BONIN, A. Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: HSP 60-mediated activation of cytotoxic T cells. **International Immunology**, v. 13, n. 9, p. 1121-1127, 2001.

MOSSER, D. D.; CARON, A. W.; BOURGET, L.; MERLIN, A. B.; SHERMAN, M. Y.; MORIMOTO, R. I.; MASSIE, B. The chaperone function of HSP 70 is required for protection against stress-induced apoptosis. **Molecular Cell Biology**, v. 20, p. 7146-7159, 2000.

MOSSER, D. D.; MORIMOTO, R. I. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. **Oncogene**, v. 23, p. 2907-2918, 2004.

MOUDGIL, K. D.; CHANG, T. T.; ERADAT, H.; CHEN, A. M.; GUPTA, R. S.; BRAHN, E.; SERCARZ, E. E. Diversification of T cell Responses to carboxy-terminal determinants within the 65-kD heat-shock protein is involved in regulation of autoimmune arthritis. **Journal of Experimental Medicine**, v.185, n. 7, p. 1307 a 1316, 1997.

MUNN, D. H.; ZHOU M.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I; CONWAY, S. J.; MARSHALL, B; BROWN, C; MELLOR, A. L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, v. 281, n. 5380, p.1191-1193, 1998.

NAGAEVA, O.; BONDESTAM, K.; OLOFSSON, J.; DAMBER, M. G.; MINCHEVA-NILSSON, L. Optimized Technique for Separation of Human Decidual Leukocytes for Cellular and Molecular Analyses. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 47, p. 203-212, 2002.

OHASHI, K.; BURKART, V.; FLOHÉ, S.; KOLB, H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 558-561, 2000.

OHNO, K.; FUJIWARA, M.; FUKUSHIMA, M.; NARUMIYA, S. Induction of 68,000 dalton heat shock proteins by cyclopentenone prostaglandins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 163, p.19764-19770, 1988.

OSTERLOH, A.; MEIER-STIEGEN, F.; VEIT, A.; FLEISCHER, B.; VON BONIN, A.; BRELOER, M. Lipopolysaccharide-free heat shock protein 60 activates T cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 46, p. 47906-47911, 2004.

OSTERLOH, A.; KALINKE, U.; WEISS, S.; FLEISCHER, B.; BRELOER, M. Synergistic and differential modulation of immune response by HSP 60 and lipopolysaccharide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 7, p. 4669-4680, 2007.

- OSTERLOH, A.; VEIT, A.; GESSNER, A.; FLEISCHER, B.; BRELOER, M. HSP60-mediated T cell stimulation is independent of TLR4 and IL-12. **International Immunology**, v. 20, n. 3, p. 433-443, 2008.
- PARHAM, P. NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy. **Journal of Experience and Medicine**. v. 200, n. 8, p. 951-955, 2004.
- PELTIER, M. R. Immunology of term and preterm labor. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 122, p. 11, 2003.
- PFARRER, C. D.; HEEB, C.; LEISER, R. Expression of gap junctional connexins 26, 32 and 43 in bovine placentomes during pregnancy. **Placenta**, v. 27, n. 1, p. 79-86, 2006.
- PICCINNI, M. P. Role of immune cells in pregnancy. **Autoimmunity**, v. 36, n. 1, p. 1-4, 2003.
- POCKLEY A. G. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? (Cambridge): Cambridge University Press, 2001. Disponível em: www-emmm.cbcu.com.ac.uk. Acesso em: 14/04/2003.
- POCKLEY, A. G.; FAIRBURN, B.; MIRZA, S.; SLACK, L. K.; HOPKINSON, K.; MUTHANA, M. A non receptor-mediated mechanism for internalization of molecular chaperones, **Methods**, v. 43, n. 3, p. 238-244, 2007.
- POCKLEY, A. G.; MUTHANA, M.; CADERWOOD, S. K. The dual immunoregulatory roles of stress proteins. **Cell**, v. 33 n. 2, p. 71-79, 2008.
- QUINTANA, F. J.; MIMRAN, A.; CARMÍ, P.; MOR, F.; COHEN, I. R. HSP60 as target of anti-ergotypic regulatory T cells. **Plos One**, v. 3, n. 12, p. 1-11, 2008.
- RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Immunology**, v. 13, p. 219-227, 2001.
- RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, v. 18 n. 10, p. 478-482, 1997.
- RILLEY, J. K. Trophoblast immune receptors in Maternal-fetal tolerance. **Immunological Investigation**, v. 37, p. 395-426, 2008.
- ROBERTSON, S. A. Control of the immunological environment of the uterus. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 164-174, 2000.
- RONOT, X.; BENEL, L.; ADOLPHE, M.; MOUNOLOU, J. Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry. **Biology Cell**, v. 57, p. 1-8, 1986.
- SAITO, S. Cytokine network at the feto-maternal interface. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 47, p. 87-103, 2000.
- SAITO, S.; SHIMA, T.; NAKASHIMA, A.; SHIOZAKI, A.; ITO, M.; SASAKI, Y. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? **Journal of Assistance Reproductive Genetic**, v. 24, p. 379-386, 2007.

SHAH, M.; STANEK, J.; HANDWERGER, S. Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 e 27 in human decidua and placenta during pregnancy. **Histochemical Journal**, v. 30, p. 509-518, 1998.

SHAPIRO, H. M. Practical flow cytometry. New York: Liss. 1985, 256 pp.

SREEDHAR, A. S.; NARDAI, G.; CSERMELY, P. Enhancement of complement-induced cell lysis: a novel mechanism for the anticancer effects of Hsp90 inhibitors. **Immunology Letters**, v. 92, p. 157-161, 2004.

SRIVASTAVA, P. K.; MENORET, A.; BASU, S.; BINDER, R. J.; McQUADE, K. L. Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. **Immunity**, v. 8, p. 657-665, 1998.

SRIVASTAVA, P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. **Annual Review Immunology**, v. 20, p. 395-425, 2002.

SUGINO, N.; KASHIDA, S.; TAKIGUCHI, S.; KARUBE-HARADA, A.; KATO, H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in rat corpus luteum: regulation by oestradiol during mid-pregnancy. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 875-81, 2001.

SUZUKI, Y.; MORI, K.; IWANAGA, T. Intraepithelial gamma delta T cells are closely associated with apoptotic enterocytes in the bovine intestine. **Arch Histol Cytol.**, v. 60, n. 4, p.319-328, 1997.

SZABO, S. J.; KIM, S. T.; ZHANG, X.; FATHMAN, C. G.; GLIMCHER L. H. A Novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, p. 655-669, 2000.

SZEKERES-BARTHO, J.; BARAKONYI, A.; MIKO, E.; POLGAR, B.; PALKOVICS, T. The role of gamma/delta T cells in the feto-maternal relationship. **Seminary Immunology**, v. 13, p. 229-233, 2001.

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

THOMAS, M. L.; SMANT, U. C.; DESHPANDE, R. K. CHIPLUNKAR, S.V. Gamma delta T cells lyse autologous and allogenic oesophageal tumours: involvement of heat shock proteins in the tumour cell lysis. **Cancer Immunology Immunother**, v. 48, p. 653-659, 2000.

THUERE, C.; ZENCLUSSEN, M. L.; SCHUMACHER, A.; LANGWISCH, S.; SCHULTE-WREDE, U.; TELES, A.; PAESCHKE, S.; VOLK, H. D.; ZENCLUSSEN A. C. Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 58, p. 514-423, 2007.

TRUNKLEY, A.; MOFFETT, A. Human uterine leucocytes and pregnancy. **Tissue Antigens**, v. 63, p. 1-12, 2004.

TSAN, MIN-FU.; GAO, B. Endogenous ligands of toll-like receptors. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, p. 514-517, 2004.

TSAN, MIN-FU.; GAO, B. Cytokine function of heat shock proteins. **American Journal Physiology Cell Physiology**, v. 286, p. 739-744, 2004.

TSAN, MIN-FU.; GAO, B. Heat shock proteins and immune system. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85 p. 1-6, 2009.

VABULAS, R. M.; AHMAD-NEJAD, P.; COSTA, C.; MIETHKE, T.; KIRSCHNING, C. J.; HACKER, H.; WAGNER, H. Endocytosed HSP 60s use toll-like receptor 2 (TLR2) an TLR4 to active the toll/interleukine-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 30, p. 31332-31339, 2001.

VABULAS R. M.; AHMAD-NEJAD, P.; GHOSE, S.; KIRCHNING, C. J.; ISSELS, R. D.; WAGNER, H. HSP 70 as endogenous stimulus of the toll/interleukine-1 receptor signal pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 1507-1512, 2002.

VACA, C. E.; WILHELM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA, a review. **Mutation Research**, v. 195, p.137 –149, 1988.

VAN EDEN, W.; KOETS, A.; VAN KOOTEN, P.; PRAKEN, B.; VAN DER ZEE, R. Immunopotentiating heat shock proteins: negotiators between innate danger and control of autoimmunity. **Vaccine**, v. 21, p. 897-901, 2002.

VERMA, S.; KING, A.; LOKE, Y. W. Expression of killer cell inhibitory receptors on human uterine natural killer cells. **European Journal of immunology**, v. 27, p. 979-983, 1997.

ZANIN-ZHOROV, A.; BRUCK, R.; TAL, G.; OREN, S.; AEED, H.; HERSHKOVIZ, R.; COHEN, I. R.; LIDER, O. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 3227-3236, 2005.

ZANIN-ZHOROV, A.; CAHALON, L.; TAL, G.; MARGALIT, R.; LIDER, O.; COHEN, I. R. Heat shock protein 60 enhances CD4+CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 2022-2032, 2006.

ZANIN-ZHOROV, A.; NUSSBAUM, G.; FRANITZA, S.; COHEN, I. R.; LIDER, O. T cells respond to heat shock protein 60 via TLR2: activation of adhesion and inhibition of chemokine receptors. **The FASEB Journal**, v. 17, p. 1567-1571, 2003.

ZIEGERT, M.; WITKIN, S. S.; SZILLER, I.; ALEXANDER, H.; BRYLLA, E.; HARTIG, W. heat shock proteins and heat shock protein-antibody complexes in placental tissues. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 7, p. 180-185, 1999.

WALLACE, P. K.; TARIO, J. D.; FISHER, J. L.; WALLACE, S. S.; ERNSTOFF, M. S. Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: monitoring proliferation by dye dilution. **Cytometry**, v. 73A, p. 1019-1034, 2008.

WATTEGEDERA, S.; ROCCHI, M.; SALES, J.; HOWARD, C. J.; HOPE, J. C.; ENTRICAN, G. Antigen-specific peripheral immune responses are unaltered during normal pregnancy in sheep. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 77, p. 171-178, 2008.

WEGMANN, T. G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T. R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunology Today**, v. 14, p. 353-356, 1993.

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

WILCZYNSKI, J. R.; TCHORZEWSKI, H.; BANASIK, M.; GLOWACKA, E.; WIECZOREK, A.; LEWKOWICZ, P.; MALINOWSKI, A.; SZPAKOWSKI, M.; WILCZYNSKI, J. R. Lymphocytes subset distribution and cytokine secretion in third trimester deciduas in normal pregnancy and preeclampsia. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 109, p. 8-15, 2003.

WIRA, C. R.; FAHEY, J. V.; SENTMAN, C. L.; PIOLI, P. A.; SHEN, L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. **Immunological Reviews**, v. 206, p. 306-335, 2005.

WITKIN, S. S.; MCGREGOR, J. A. Infection-induced activation of cell-mediated immunity: possible mechanism for preterm birth. **Clinical Obstetrics Gynecology**, v. 34, p. 112-121, 1991.

WITKIN, S. S.; SULTAN, K. M. NEAL, G. S.; JEREMIAS, J.; GRIFO, J. A. ROSENWAKS, Z. Unsuspected *Chlamydia trachomatis* infection and in vitro fertilization outcome. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 171, p. 1208-1214, 1994.

WITKIN, S. S.; JEREMIAS, J. NEUER, A. Immune recognition of 60kD heat shock protein: Implication for subsequent infertility. **Infection Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 4, p. 152-158, 1996.

*A
N
E
X
O
S*

ANEXOS

 PROLIFERAÇÃO SOBRENADANTE SG VACA NÃO GESTANTE

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.9969, considered not significant. Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO	Too few values to test.		
CON A	Too few values to test.		
PHA	Too few values to test.		
HSP	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	0.1680	0.05599
Residuals (within columns)	4	14.319	3.580
Total	7	14.487	

$$F = 0.01564 = (MStreatment/MSresidual)$$

 Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
NÃO TTO	2	1.646	2.320	1.641	Unknown
CON A	2	1.880	2.162	1.529	Unknown
PHA	2	2.000	0.4116	0.2910	Unknown
HSP	2	1.683	2.023	1.430	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
NÃO TTO	Unknown	Unknown	-19.202	22.495
CON A	Unknown	Unknown	-17.544	21.305
PHA	Unknown	Unknown	-1.698	5.698
HSP	Unknown	Unknown	-16.490	19.855

 PROLIFERAÇÃO SOBRENADANTE CÉLULAS MONONUCLEARES TERÇO 2

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.6873, considered not significant. Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO			
CON A	Too few values to test.		
PHA	Too few values to test.		
HSP	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	16.695	5.565
Residuals (within columns)	8	87.543	10.943
Total	11	104.24	

$F = 0.5085 = (MStreatment/MSresidual)$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
NÃO TTO	3	4.218	2.889	1.668	Unknown
CON A	3	5.179	3.205	1.851	Unknown
PHA	3	3.245	3.985	2.301	Unknown
HSP	3	1.995	3.045	1.758	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval From	To
NÃO TTO	Unknown	Unknown	-2.959	11.395
CON A	Unknown	Unknown	-2.784	13.143
PHA	Unknown	Unknown	-6.655	13.144
HSP	Unknown	Unknown	-5.570	9.560

PROLIFERAÇÃO SOBRENADANTE MONONUCLEARES TERÇO 3

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The F value is 0.0607, considered not quite significant. Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO			
CON A	Too few values to test.		
PHA	Too few values to test.		
HSP	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	6.311	2.104
Residuals (within columns)	8	4.514	0.5643
Total	11	10.825	

$F = 3.728 = (MStreatment/MSresidual)$

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO	Too few values to test.		
CON A	Too few values to test.		
PHA	Too few values to test.		
HSP	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	6.311	2.104
Residuals (within columns)	8	4.514	0.5643
Total	11	10.825	

$F = 3.728 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
NÃO TTO	3	1.581	0.5338	0.3082	Unknown
CON A	3	2.337	1.236	0.7136	Unknown
PHA	3	2.889	0.1085	0.06264	Unknown
HSP	3	0.9827	0.6579	0.3798	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
NÃO TTO	Unknown	Unknown	0.2552	2.907
CON A	Unknown	Unknown	-0.7332	5.408
PHA	Unknown	Unknown	2.620	3.159
HSP	Unknown	Unknown	-0.6517	2.617

PROLIFERAÇÃO SOBRENADANTE DE PLACENTA TERÇO 3

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.2559, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle	Too few values to test.		
ConA	Too few values to test.		
PHA	Too few values to test.		
HSP 60	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	254.94	84.982
Residuals (within columns)	4	169.67	42.417
Total	7	424.61	

$$F = 2.003 = (MStreatment/MSresidual)$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle	2	0.9000	0.6435	0.4550	Unknown
ConA	2	3.000	0.5020	0.3550	Unknown
PHA	2	14.980	12.947	9.155	Unknown
HSP 60	2	2.280	1.174	0.8301	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle	Unknown	Unknown	-4.882	6.682
ConA	Unknown	Unknown	-1.510	7.510
PHA	Unknown	Unknown	-101.34	131.30
HSP 60	Unknown	Unknown	-8.268	12.828

PROLIFERAÇÃO SOBRENADANTE SG X PL 2T X PL 3T X MONO 2T X MONO 3T X HSP

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0007, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.038 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
Controle SG vs HSP60 SG	0.9600	0.3155	ns	P>0.05
Controle SG vs Controle PL 2T	-13.840	4.548	ns	P>0.05
Controle SG vs HSP60 PL 2T	-3.400	1.117	ns	P>0.05
Controle SG vs Controle PL3T	0.7400	0.2432	ns	P>0.05
Controle SG vs HSP60 PL 3T	-0.6400	0.2103	ns	P>0.05
Controle SG vs Controle linf 2	-2.570	0.8445	ns	P>0.05
Controle SG vs HSP60 linf 2T	-17.360	5.704	*	P<0.05
Controle SG vs Controle linf 3	0.06000	0.01972	ns	P>0.05

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
Controle SG vs HSP60 SG	0.9600	0.3155	ns	P>0.05
Controle SG vs Controle PL 2T	-13.840	4.548	ns	P>0.05
Controle SG vs HSP60 PL 2T	-3.400	1.117	ns	P>0.05
Controle SG vs Controle PL3T	0.7400	0.2432	ns	P>0.05
Controle SG vs HSP60 PL 3T	-0.6400	0.2103	ns	P>0.05
Controle SG vs Controle linf 2	-2.570	0.8445	ns	P>0.05
Controle SG vs HSP60 linf 2T	-17.360	5.704	*	P<0.05
Controle SG vs Controle linf 3	0.06000	0.01972	ns	P>0.05
Controle SG vs HSP60 linf 3T	0.6600	0.2169	ns	P>0.05
HSP60 SG vs Controle PL 2T	-14.800	5.437	*	P<0.05
HSP60 SG vs HSP60 PL 2T	-4.360	1.602	ns	P>0.05
HSP60 SG vs Controle PL3T	-0.2200	0.08082	ns	P>0.05
HSP60 SG vs HSP60 PL 3T	-1.600	0.5878	ns	P>0.05
HSP60 SG vs Controle linf 2	-3.530	1.297	ns	P>0.05
HSP60 SG vs HSP60 linf 2T	-18.320	6.730	**	P<0.01
HSP60 SG vs Controle linf 3	-0.9000	0.3306	ns	P>0.05
HSP60 SG vs HSP60 linf 3T	-0.3000	0.1102	ns	P>0.05
Controle PL 2T vs HSP60 PL 2T	10.440	3.835	ns	P>0.05
Controle PL 2T vs Controle PL3T	14.580	5.356	*	P<0.05
Controle PL 2T vs HSP60 PL 3T	13.200	4.849	ns	P>0.05
Controle PL 2T vs Controle linf 2	11.270	4.140	ns	P>0.05
Controle PL 2T vs HSP60 linf 2T	-3.520	1.293	ns	P>0.05
Controle PL 2T vs Controle linf 3	13.900	5.107	*	P<0.05

Controle PL 2T vs HSP60 PL 2T	10.440	3.835	ns	P>0.05
Controle PL 2T vs Controle PL3T	14.580	5.356	*	P<0.05
Controle PL 2T vs HSP60 PL 3T	13.200	4.849	ns	P>0.05
Controle PL 2T vs Controle linf 2	11.270	4.140	ns	P>0.05
Controle PL 2T vs HSP60 linf 2T	-3.520	1.293	ns	P>0.05
Controle PL 2T vs Controle linf 3	13.900	5.107	*	P<0.05
Controle PL 2T vs HSP60 linf 3T	14.500	5.327	*	P<0.05
HSP60 PL 2T vs Controle PL3T	4.140	1.521	ns	P>0.05
HSP60 PL 2T vs HSP60 PL 3T	2.760	1.014	ns	P>0.05
HSP60 PL 2T vs Controle linf 2	0.8300	0.3049	ns	P>0.05
HSP60 PL 2T vs HSP60 linf 2T	-13.960	5.129	*	P<0.05
HSP60 PL 2T vs Controle linf 3	3.460	1.271	ns	P>0.05
HSP60 PL 2T vs HSP60 linf 3T	4.060	1.492	ns	P>0.05
Controle PL3T vs HSP60 PL 3T	-1.380	0.5070	ns	P>0.05
Controle PL3T vs Controle linf 2	-3.310	1.216	ns	P>0.05
Controle PL3T vs HSP60 linf 2T	-18.100	6.650	**	P<0.01
Controle PL3T vs Controle linf 3	-0.6800	0.2498	ns	P>0.05
Controle PL3T vs HSP60 linf 3T	-0.08000	0.02939	ns	P>0.05
HSP60 PL 3T vs Controle linf 2	-1.930	0.7090	ns	P>0.05
HSP60 PL 3T vs HSP60 linf 2T	-16.720	6.143	**	P<0.01
HSP60 PL 3T vs Controle linf 3	0.7000	0.2572	ns	P>0.05
HSP60 PL 3T vs HSP60 linf 3T	1.300	0.4776	ns	P>0.05
Controle linf 2 vs HSP60 linf 2T	-14.790	5.434	*	P<0.05
Controle linf 2 vs Controle linf 3	2.630	0.9662	ns	P>0.05
Controle linf 2 vs HSP60 linf 3T	3.230	1.187	ns	P>0.05
HSP60 linf 2T vs Controle linf 3	17.420	6.400	**	P<0.01

HSP60 linf 2T vs Controle linf 3	17.420	6.400	**	P<0.01
HSP60 linf 2T vs HSP60 linf 3T	18.020	6.620	**	P<0.01
Controle linf 3 vs HSP60 linf 3T	0.6000	0.2204	ns	P>0.05

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
Controle SG - HSP60 SG	0.9600	-14.372	16.292
Controle SG - Controle PL 2T	-13.840	-29.172	1.492
Controle SG - HSP60 PL 2T	-3.400	-18.732	11.932
Controle SG - Controle PL3T	0.7400	-14.592	16.072
Controle SG - HSP60 PL 3T	-0.6400	-15.972	14.692
Controle SG - Controle linf 2	-2.570	-17.902	12.762
Controle SG - HSP60 linf 2T	-17.360	-32.692	-2.028
Controle SG - Controle linf 3	0.06000	-15.272	15.392
Controle SG - HSP60 linf 3T	0.6600	-14.672	15.992
HSP60 SG - Controle PL 2T	-14.800	-28.513	-1.087
HSP60 SG - HSP60 PL 2T	-4.360	-18.073	9.353
HSP60 SG - Controle PL3T	-0.2200	-13.933	13.493
HSP60 SG - HSP60 PL 3T	-1.600	-15.313	12.113
HSP60 SG - Controle linf 2	-3.530	-17.243	10.183
HSP60 SG - HSP60 linf 2T	-18.320	-32.033	-4.607
HSP60 SG - Controle linf 3	-0.9000	-14.613	12.813
HSP60 SG - HSP60 linf 3T	-0.3000	-14.013	13.413
Controle PL 2T - HSP60 PL 2T	10.440	-3.273	24.153
Controle PL 2T - Controle PL3T	14.580	0.8667	28.293

Controle PL 2T - HSP60 PL 2T	10.440	-3.273	24.153
Controle PL 2T - Controle PL3T	14.580	0.8667	28.293
Controle PL 2T - HSP60 PL 3T	13.200	-0.5133	26.913
Controle PL 2T - Controle linf 2	11.270	-2.443	24.983
Controle PL 2T - HSP60 linf 2T	-3.520	-17.233	10.193
Controle PL 2T - Controle linf 3	13.900	0.1867	27.613
Controle PL 2T - HSP60 linf 3T	14.500	0.7867	28.213
HSP60 PL 2T - Controle PL3T	4.140	-9.573	17.853
HSP60 PL 2T - HSP60 PL 3T	2.760	-10.953	16.473
HSP60 PL 2T - Controle linf 2	0.8300	-12.883	14.543
HSP60 PL 2T - HSP60 linf 2T	-13.960	-27.673	-0.2467
HSP60 PL 2T - Controle linf 3	3.460	-10.253	17.173
HSP60 PL 2T - HSP60 linf 3T	4.060	-9.653	17.773
Controle PL3T - HSP60 PL 3T	-1.380	-15.093	12.333
Controle PL3T - Controle linf 2	-3.310	-17.023	10.403
Controle PL3T - HSP60 linf 2T	-18.100	-31.813	-4.387
Controle PL3T - Controle linf 3	-0.6800	-14.393	13.033
Controle PL3T - HSP60 linf 3T	-0.08000	-13.793	13.633
HSP60 PL 3T - Controle linf 2	-1.930	-15.643	11.783
HSP60 PL 3T - HSP60 linf 2T	-16.720	-30.433	-3.007
HSP60 PL 3T - Controle linf 3	0.7000	-13.013	14.413
HSP60 PL 3T - HSP60 linf 3T	1.300	-12.413	15.013
Controle linf 2 - HSP60 linf 2T	-14.790	-28.503	-1.077
Controle linf 2 - Controle linf 3	2.630	-11.083	16.343
Controle linf 2 - HSP60 linf 3T	3.230	-10.483	16.943
HSP60 linf 2T - Controle linf 3	17.420	3.707	31.133
HSP60 linf 2T - HSP60 linf 3T	18.020	4.307	31.733
Controle linf 3 - HSP60 linf 3T	0.6000	-13.113	14.313

Controle linf 2 - HSP60 linf 2T	-14.790	-28.503	-1.077
Controle linf 2 - Controle linf 3	2.630	-11.083	16.343
Controle linf 2 - HSP60 linf 3T	3.230	-10.483	16.943
HSP60 linf 2T - Controle linf 3	17.420	3.707	31.133
HSP60 linf 2T - HSP60 linf 3T	18.020	4.307	31.733
Controle linf 3 - HSP60 linf 3T	0.6000	-13.113	14.313

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
-------	----	---------	------------------------

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle SG			Too few values to test.
HSP60 SG			Too few values to test.
Controle PL 2T			Too few values to test.
HSP60 PL 2T			Too few values to test.
Controle PL3T			Too few values to test.
HSP60 PL 3T			Too few values to test.
Controle linf 2			Too few values to test.
HSP60 linf 2T			Too few values to test.
Controle linf 3			Too few values to test.
HSP60 linf 3T			Too few values to test.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	9	1151.5	127.94
Residuals (within columns)	19	422.32	22.228
Total	28	1573.8	

$$F = 5.756 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of	
				Mean	Median
Controle SG	2	1.640	1.640	1.160	Unknown
HSP60 SG	3	0.6800	1.166	0.6732	Unknown
Controle PL 2T	3	15.480	13.937	8.047	Unknown
HSP60 PL 2T	3	5.040	2.540	1.466	Unknown
Controle PL3T	3	0.9000	0.5254	0.3033	Unknown
HSP60 PL 3T	3	2.280	0.9584	0.5533	Unknown
Controle linf 2	3	4.210	1.663	0.9601	Unknown
HSP60 linf 2T	3	19.000	1.755	1.013	Unknown
Controle linf 3	3	1.580	0.5477	0.3162	Unknown
HSP60 linf 3T	3	0.9800	0.6524	0.3767	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle SG	Unknown	Unknown	-13.095	16.375
HSP60 SG	Unknown	Unknown	-2.217	3.577
Controle PL 2T	Unknown	Unknown	-19.144	50.104
HSP60 PL 2T	Unknown	Unknown	-1.270	11.350
Controle PL3T	Unknown	Unknown	-0.4053	2.205
HSP60 PL 3T	Unknown	Unknown	-0.1010	4.661

HSP60 PL 2T	3	5.040	2.540	1.466	Unknown
Controle PL3T	3	0.9000	0.5254	0.3033	Unknown
HSP60 PL 3T	3	2.280	0.9584	0.5533	Unknown
Controle linf 2	3	4.210	1.663	0.9601	Unknown
HSP60 linf 2T	3	19.000	1.755	1.013	Unknown
Controle linf 3	3	1.580	0.5477	0.3162	Unknown
HSP60 linf 3T	3	0.9800	0.6524	0.3767	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle SG	Unknown	Unknown	-13.095	16.375
HSP60 SG	Unknown	Unknown	-2.217	3.577
Controle PL 2T	Unknown	Unknown	-19.144	50.104
HSP60 PL 2T	Unknown	Unknown	-1.270	11.350
Controle PL3T	Unknown	Unknown	-0.4053	2.205
HSP60 PL 3T	Unknown	Unknown	-0.1010	4.661
Controle linf 2	Unknown	Unknown	0.07855	8.341
HSP60 linf 2T	Unknown	Unknown	14.640	23.360
Controle linf 3	Unknown	Unknown	0.2193	2.941
HSP60 linf 3T	Unknown	Unknown	-0.6408	2.601

PROLIFERAÇÃO SOBRENADANTE MONONUCLEARES SG X PL TERÇO 2 X PL TERÇO 3

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0124, considered significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.099 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
NÃO TTO SG vs CON A SG	-0.7561	0.2542	ns P>0.05
NÃO TTO SG vs PHA SG	-1.308	0.4397	ns P>0.05
NÃO TTO SG vs HSP SG	0.5986	0.2013	ns P>0.05
NÃO TTO SG vs NÃO TTO PL 2T	-13.903	4.675	ns P>0.05
NÃO TTO SG vs CON A PL 2T	-0.4772	0.1605	ns P>0.05
NÃO TTO SG vs PHA PL 2T	-0.8372	0.2815	ns P>0.05
NÃO TTO SG vs HSP PL 2T	-3.467	1.166	ns P>0.05
NÃO TTO SG vs NÃO TTO PL 3T	0.6797	0.2285	ns P>0.05
NÃO TTO SG vs CON A PL 3T	-1.421	0.4779	ns P>0.05
NÃO TTO SG vs PHA PL 3T	-13.400	4.505	ns P>0.05
NÃO TTO SG vs HSP PL 3T	-0.7064	0.2375	ns P>0.05
CON A SG vs PHA SG	-0.5517	0.1855	ns P>0.05
CON A SG vs HSP SG	1.355	0.4555	ns P>0.05
CON A SG vs NÃO TTO PL 2T	-13.147	4.421	ns P>0.05
CON A SG vs CON A PL 2T	0.2789	0.09377	ns P>0.05
CON A SG vs PHA PL 2T	-0.08108	0.02726	ns P>0.05
CON A SG vs HSP PL 2T	-2.710	0.9114	ns P>0.05
CON A SG vs NÃO TTO PL 3T	1.436	0.4828	ns P>0.05
CON A SG vs CON A PL 3T	-0.6653	0.2237	ns P>0.05
CON A SG vs PHA PL 3T	-12.643	4.251	ns P>0.05
CON A SG vs HSP PL 3T	0.04968	0.01670	ns P>0.05
PHA SG vs HSP SG	1.906	0.6410	ns P>0.05
PHA SG vs NÃO TTO PL 2T	-12.596	4.235	ns P>0.05
PHA SG vs CON A PL 2T	0.8305	0.2793	ns P>0.05
PHA SG vs PHA PL 2T	0.4706	0.1582	ns P>0.05
PHA SG vs HSP PL 2T	-2.159	0.7259	ns P>0.05
PHA SG vs NÃO TTO PL 3T	1.987	0.6683	ns P>0.05
PHA SG vs CON A PL 3T	-0.1137	0.03822	ns P>0.05
PHA SG vs PHA PL 3T	-12.092	4.066	ns P>0.05

PHA PL 2T vs HSP PL 2T	-2.629	0.8841	ns	P>0.05
PHA PL 2T vs NÃO TTO PL 3T	1.517	0.5100	ns	P>0.05
PHA PL 2T vs CON A PL 3T	-0.5843	0.1965	ns	P>0.05
PHA PL 2T vs PHA PL 3T	-12.562	4.224	ns	P>0.05
PHA PL 2T vs HSP PL 3T	0.1308	0.04397	ns	P>0.05
HSP PL 2T vs NÃO TTO PL 3T	4.146	1.394	ns	P>0.05
HSP PL 2T vs CON A PL 3T	2.045	0.6877	ns	P>0.05
HSP PL 2T vs PHA PL 3T	-9.933	3.340	ns	P>0.05
HSP PL 2T vs HSP PL 3T	2.760	0.9281	ns	P>0.05
NÃO TTO PL 3T vs CON A PL 3T	-2.101	0.7065	ns	P>0.05
NÃO TTO PL 3T vs PHA PL 3T	-14.079	4.734	ns	P>0.05
NÃO TTO PL 3T vs HSP PL 3T	-1.386	0.4661	ns	P>0.05
CON A PL 3T vs PHA PL 3T	-11.978	4.028	ns	P>0.05
CON A PL 3T vs HSP PL 3T	0.7150	0.2404	ns	P>0.05
PHA PL 3T vs HSP PL 3T	12.693	4.268	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
NÃO TTO SG - CON A SG	-0.7561	-15.921	14.409
NÃO TTO SG - PHA SG	-1.308	-16.472	13.857
NÃO TTO SG - HSP SG	0.5986	-14.566	15.763
NÃO TTO SG - NÃO TTO PL 2T	-13.903	-29.068	1.261
NÃO TTO SG - CON A PL 2T	-0.4772	-15.642	14.687
NÃO TTO SG - PHA PL 2T	-0.8372	-16.002	14.327
NÃO TTO SG - HSP PL 2T	-3.467	-18.631	11.698
NÃO TTO SG - NÃO TTO PL 3T	0.6797	-14.485	15.844
NÃO TTO SG - CON A PL 3T	-1.421	-16.586	13.743
NÃO TTO SG - PHA PL 3T	-13.400	-28.564	1.765
NÃO TTO SG - HSP PL 3T	-0.7064	-15.871	14.458
CON A SG - PHA SG	-0.5517	-15.716	14.613
CON A SG - HSP SG	1.355	-13.810	16.519
CON A SG - NÃO TTO PL 2T	-13.147	-28.312	2.017
CON A SG - CON A PL 2T	0.2789	-14.886	15.444
CON A SG - PHA PL 2T	-0.08108	-15.246	15.084
CON A SG - HSP PL 2T	-2.710	-17.875	12.454
CON A SG - NÃO TTO PL 3T	1.436	-13.729	16.600
CON A SG - CON A PL 3T	-0.6653	-15.830	14.499
CON A SG - PHA PL 3T	-12.643	-27.808	2.521
CON A SG - HSP PL 3T	0.04968	-15.115	15.214
PHA SG - HSP SG	1.906	-13.258	17.071
PHA SG - NÃO TTO PL 2T	-12.596	-27.760	2.569
PHA SG - CON A PL 2T	0.8305	-14.334	15.995
PHA SG - PHA PL 2T	0.4706	-14.694	15.635
PHA SG - HSP PL 2T	-2.159	-17.323	13.006
PHA SG - NÃO TTO PL 3T	1.987	-13.177	17.152
PHA SG - CON A PL 3T	-0.1137	-15.278	15.051

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
NÃO TTO SG - CON A SG	-0.7561	-15.921	14.409
NÃO TTO SG - PHA SG	-1.308	-16.472	13.857
NÃO TTO SG - HSP SG	0.5986	-14.566	15.763
NÃO TTO SG - NÃO TTO PL 2T	-13.903	-29.068	1.261
NÃO TTO SG - CON A PL 2T	-0.4772	-15.642	14.687
NÃO TTO SG - PHA PL 2T	-0.8372	-16.002	14.327
NÃO TTO SG - HSP PL 2T	-3.467	-18.631	11.698
NÃO TTO SG - NÃO TTO PL 3T	0.6797	-14.485	15.844
NÃO TTO SG - CON A PL 3T	-1.421	-16.586	13.743
NÃO TTO SG - PHA PL 3T	-13.400	-28.564	1.765
NÃO TTO SG - HSP PL 3T	-0.7064	-15.871	14.458
CON A SG - PHA SG	-0.5517	-15.716	14.613
CON A SG - HSP SG	1.355	-13.810	16.519
CON A SG - NÃO TTO PL 2T	-13.147	-28.312	2.017
CON A SG - CON A PL 2T	0.2789	-14.886	15.444
CON A SG - PHA PL 2T	-0.08108	-15.246	15.084
CON A SG - HSP PL 2T	-2.710	-17.875	12.454
CON A SG - NÃO TTO PL 3T	1.436	-13.729	16.600
CON A SG - CON A PL 3T	-0.6653	-15.830	14.499
CON A SG - PHA PL 3T	-12.643	-27.808	2.521
CON A SG - HSP PL 3T	0.04968	-15.115	15.214
PHA SG - HSP SG	1.906	-13.258	17.071
PHA SG - NÃO TTO PL 2T	-12.596	-27.760	2.569
PHA SG - CON A PL 2T	0.8305	-14.334	15.995
PHA SG - PHA PL 2T	0.4706	-14.694	15.635
PHA SG - HSP PL 2T	-2.159	-17.323	13.006
PHA SG - NÃO TTO PL 3T	1.987	-13.177	17.152
PHA SG - CON A PL 3T	-0.1137	-15.278	15.051
PHA SG - PHA PL 3T	-12.092	-27.256	3.073
PHA SG - HSP PL 3T	0.6013	-14.563	15.766
HSP SG - NÃO TTO PL 2T	-14.502	-29.667	0.6628
HSP SG - CON A PL 2T	-1.076	-16.240	14.089
HSP SG - PHA PL 2T	-1.436	-16.600	13.729
HSP SG - HSP PL 2T	-4.065	-19.230	11.099
HSP SG - NÃO TTO PL 3T	0.08104	-15.084	15.246
HSP SG - CON A PL 3T	-2.020	-17.185	13.145
HSP SG - PHA PL 3T	-13.998	-29.163	1.167
HSP SG - HSP PL 3T	-1.305	-16.470	13.860
NÃO TTO PL 2T - CON A PL 2T	13.426	-1.739	28.591
NÃO TTO PL 2T - PHA PL 2T	13.066	-2.099	28.231
NÃO TTO PL 2T - HSP PL 2T	10.437	-4.728	25.601
NÃO TTO PL 2T - NÃO TTO PL 3T	14.583	-0.5817	29.748
NÃO TTO PL 2T - CON A PL 3T	12.482	-2.683	27.646
NÃO TTO PL 2T - PHA PL 3T	0.5037	-14.661	15.668
NÃO TTO PL 2T - HSP PL 3T	13.197	-1.968	28.362

NÃO TTO PL 2T - CON A PL 2T	13.426	-1.739	28.591
NÃO TTO PL 2T - PHA PL 2T	13.066	-2.099	28.231
NÃO TTO PL 2T - HSP PL 2T	10.437	-4.728	25.601
NÃO TTO PL 2T - NÃO TTO PL 3T	14.583	-0.5817	29.748
NÃO TTO PL 2T - CON A PL 3T	12.482	-2.683	27.646
NÃO TTO PL 2T - PHA PL 3T	0.5037	-14.661	15.668
NÃO TTO PL 2T - HSP PL 3T	13.197	-1.968	28.362
CON A PL 2T - PHA PL 2T	-0.3600	-15.525	14.805
CON A PL 2T - HSP PL 2T	-2.989	-18.154	12.175
CON A PL 2T - NÃO TTO PL 3T	1.157	-14.008	16.322
CON A PL 2T - CON A PL 3T	-0.9442	-16.109	14.220
CON A PL 2T - PHA PL 3T	-12.922	-28.087	2.242
CON A PL 2T - HSP PL 3T	-0.2292	-15.394	14.935
PHA PL 2T - HSP PL 2T	-2.629	-17.794	12.535
PHA PL 2T - NÃO TTO PL 3T	1.517	-13.648	16.681
PHA PL 2T - CON A PL 3T	-0.5843	-15.749	14.580
PHA PL 2T - PHA PL 3T	-12.562	-27.727	2.602
PHA PL 2T - HSP PL 3T	0.1308	-15.034	15.295
HSP PL 2T - NÃO TTO PL 3T	4.146	-11.018	19.311
HSP PL 2T - CON A PL 3T	2.045	-13.120	17.210
HSP PL 2T - PHA PL 3T	-9.933	-25.098	5.232
HSP PL 2T - HSP PL 3T	2.760	-12.404	17.925
NÃO TTO PL 3T - CON A PL 3T	-2.101	-17.266	13.064
NÃO TTO PL 3T - PHA PL 3T	-14.079	-29.244	1.085
NÃO TTO PL 3T - HSP PL 3T	-1.386	-16.551	13.779
CON A PL 3T - PHA PL 3T	-11.978	-27.143	3.187
CON A PL 3T - HSP PL 3T	0.7150	-14.450	15.880
PHA PL 3T - HSP PL 3T	12.693	-2.472	27.858

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO SG	Too few values to test.		
CON A SG	Too few values to test.		
PHA SG	Too few values to test.		
HSP SG	Too few values to test.		
NÃO TTO PL 2T	Too few values to test.		
CON A PL 2T	Too few values to test.		
PHA PL 2T	Too few values to test.		
HSP PL 2T	Too few values to test.		
NÃO TTO PL 3T	Too few values to test.		
CON A PL 3T	Too few values to test.		
PHA PL 3T	Too few values to test.		
HSP PL 3T	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	11	868.05	78.913
Residuals (within columns)	24	636.84	26.535
Total	35	1504.9	

$$F = 2.974 = (MS_{\text{treatment}} / MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
NÃO TTO SG	3	1.581	0.5338	0.3082	Unknown
CON A SG	3	2.337	1.236	0.7136	Unknown
PHA SG	3	2.889	0.1085	0.06264	Unknown
HSP SG	3	0.9827	0.6579	0.3798	Unknown
NÃO TTO PL 2T	3	15.485	13.918	8.036	Unknown
CON A PL 2T	3	2.059	1.085	0.6264	Unknown
PHA PL 2T	3	2.419	1.601	0.9243	Unknown

Treatments (between columns)	11	868.05	78.913
Residuals (within columns)	24	636.84	26.535
Total	35	1504.9	

F = 2.974 = (MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
NÃO TTO SG	3	1.581	0.5338	0.3082	Unknown
CON A SG	3	2.337	1.236	0.7136	Unknown
PHA SG	3	2.889	0.1085	0.06264	Unknown
HSP SG	3	0.9827	0.6579	0.3798	Unknown
NÃO TTO PL 2T	3	15.485	13.918	8.036	Unknown
CON A PL 2T	3	2.059	1.085	0.6264	Unknown
PHA PL 2T	3	2.419	1.601	0.9243	Unknown
HSP PL 2T	3	5.048	2.335	1.348	Unknown
NÃO TTO PL 3T	3	0.9017	0.5900	0.3406	Unknown
CON A PL 3T	3	3.003	0.4136	0.2388	Unknown
PHA PL 3T	3	14.981	10.574	6.105	Unknown
HSP PL 3T	3	2.288	0.9637	0.5564	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval From	Interval To
NÃO TTO SG	Unknown	Unknown	0.2552	2.907
CON A SG	Unknown	Unknown	-0.7332	5.408
PHA SG	Unknown	Unknown	2.620	3.159
HSP SG	Unknown	Unknown	-0.6517	2.617
NÃO TTO PL 2T	Unknown	Unknown	-19.092	50.062
CON A PL 2T	Unknown	Unknown	-0.6369	4.754
PHA PL 2T	Unknown	Unknown	-1.559	6.396
HSP PL 2T	Unknown	Unknown	-0.7530	10.849
NÃO TTO PL 3T	Unknown	Unknown	-0.5641	2.367
CON A PL 3T	Unknown	Unknown	1.975	4.030
PHA PL 3T	Unknown	Unknown	-11.289	41.250
HSP PL 3T	Unknown	Unknown	-0.1064	4.682

PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TOTAIS DE PLACENTA TERÇO 2

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.5553, considered not significant. Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO TERÇO 2			Normality test requires raw data.
CON A TERÇO 2			Too few values to test.
PHA TERÇO 2			Normality test requires raw data.
HSP TERÇO 2			Normality test requires raw data.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	21.810	7.270
Residuals (within columns)	14	140.95	10.068
Total	17	162.76	

F = 0.7221 = (MStreatment/MSresidual)

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO TERÇO 2			Normality test requires raw data.
CON A TERÇO 2			Too few values to test.
PHA TERÇO 2			Normality test requires raw data.
HSP TERÇO 2			Normality test requires raw data.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	21.810	7.270
Residuals (within columns)	14	140.95	10.068
Total	17	162.76	

$$F = 0.7221 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
NÃO TTO TERÇO 2	5	7.675	2.978	1.332	Unknown
CON A TERÇO 2	3	10.640	5.334	3.080	Unknown
PHA TERÇO 2	5	7.978	1.737	0.7768	Unknown
HSP TERÇO 2	5	7.518	3.021	1.351	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval From	Interval To
NÃO TTO TERÇO 2	Unknown	Unknown	3.978	11.372
CON A TERÇO 2	Unknown	Unknown	-2.611	23.891
PHA TERÇO 2	Unknown	Unknown	5.821	10.134
HSP TERÇO 2	Unknown	Unknown	3.768	11.268

PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS TOTAIS DE PLACENTA TERÇO 3

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0349, considered significant. Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.327 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
NÃO TTO TERÇO 3 vs CON A TERÇO 3	-0.5150	0.2566	ns P>0.05
NÃO TTO TERÇO 3 vs PHA TERÇO 3	2.342	1.430	ns P>0.05
NÃO TTO TERÇO 3 vs HSP TERÇO 3	-5.702	3.480	ns P>0.05
CON A TERÇO 3 vs PHA TERÇO 3	2.857	1.424	ns P>0.05
CON A TERÇO 3 vs HSP TERÇO 3	-5.188	2.585	ns P>0.05
PHA TERÇO 3 vs HSP TERÇO 3	-8.045	4.910	* P<0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	Interval To
NÃO TTO TERÇO 3 - CON A TERÇO 3	-0.5150	-9.198	8.168
NÃO TTO TERÇO 3 - PHA TERÇO 3	2.342	-4.747	9.432
NÃO TTO TERÇO 3 - HSP TERÇO 3	-5.702	-12.792	1.387
CON A TERÇO 3 - PHA TERÇO 3	2.857	-5.826	11.541
CON A TERÇO 3 - HSP TERÇO 3	-5.188	-13.871	3.496
PHA TERÇO 3 - HSP TERÇO 3	-8.045	-15.135	-0.9552

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO TERÇO 3			Too few values to test.
CON A TERÇO 3			Too few values to test.
PHA TERÇO 3			Too few values to test.
HSP TERÇO 3			Too few values to test.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	137.60	45.866
Residuals (within columns)	10	107.39	10.739
Total	13	244.98	

$$F = 4.271 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
NÃO TTO TERÇO 3	4	5.735	0.7622	0.3811	Unknown
CON A TERÇO 3	2	6.250	0.8700	0.6152	Unknown
PHA TERÇO 3	4	3.393	1.055	0.5275	Unknown
HSP TERÇO 3	4	11.438	5.818	2.909	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval From	Interval To
NÃO TTO TERÇO 3	Unknown	Unknown	4.522	6.948
CON A TERÇO 3	Unknown	Unknown	-1.567	14.067
PHA TERÇO 3	Unknown	Unknown	1.714	5.071
HSP TERÇO 3	Unknown	Unknown	2.181	20.694

PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SG DE VACAS NÃO GESTANTES

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

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

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
NÃO TTO vs CON A	-13.690	35.920	*** P<0.001
NÃO TTO vs HSP	-0.02000	0.05248	ns P>0.05
NÃO TTO vs HSP + CON A	-14.150	37.127	*** P<0.001
CON A vs HSP	13.670	35.867	*** P<0.001
CON A vs HSP + CON A	-0.4600	1.207	ns P>0.05
HSP vs HSP + CON A	-14.130	37.074	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	Interval To
NÃO TTO - CON A	-13.690	-15.290	-12.090
NÃO TTO - HSP	-0.02000	-1.620	1.580
NÃO TTO - HSP + CON A	-14.150	-15.750	-12.550
CON A - HSP	13.670	12.070	15.270
CON A - HSP + CON A	-0.4600	-2.060	1.140
HSP - HSP + CON A	-14.130	-15.730	-12.530

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 27.938

The P value is < 0.0001.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is extremely significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO	Too few values to test.		
CON A	Too few values to test.		
HSP	Too few values to test.		
HSP + CON A	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	774.38	258.13
Residuals (within columns)	12	6.972	0.5810
Total	15	781.35	

F = 444.26 = (MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
NÃO TTO	4	0.1400	0.04000	0.02000	Unknown
CON A	4	13.830	0.6000	0.3000	Unknown
HSP	4	0.1600	0.05000	0.02500	Unknown
HSP + CON A	4	14.290	1.400	0.7000	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval From	To
NÃO TTO	Unknown	Unknown	0.07636	0.2036
CON A	Unknown	Unknown	12.875	14.785
HSP	Unknown	Unknown	0.08045	0.2396
HSP + CON A	Unknown	Unknown	12.063	16.517

PROLIFERAÇÃO MONONUCLEARES SG VACAS NÃO GESTANTES X SG TERÇO 1 X SG TERÇO 2 X SG TERÇO 3

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

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

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.206 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
NÃO TTO SG vs CON A SG	-13.690	11.181 ***	P<0.001
NÃO TTO SG vs HSP SG	-0.02000	0.01634 ns	P>0.05
NÃO TTO SG vs HSP+CONA SG	-14.150	11.557 ***	P<0.001
NÃO TTO SG vs NÃO TTO SG 1T	-6.310	4.771 ns	P>0.05
NÃO TTO SG vs CON A SG 1T	-9.140	6.911 **	P<0.01
NÃO TTO SG vs HSP SG 1T	-5.530	4.182 ns	P>0.05
NÃO TTO SG vs HSP+CONA SG 1T	-9.430	7.131 **	P<0.01
NÃO TTO SG vs NÃO TTO SG 2T	-0.06000	0.06534 ns	P>0.05
NÃO TTO SG vs CON A SG 2T	-6.020	4.917 ns	P>0.05
NÃO TTO SG vs HSP SG 2T	-0.6500	0.5309 ns	P>0.05
NÃO TTO SG vs HSP+CONA SG 2T	-7.420	6.060 *	P<0.05
NÃO TTO SG vs NÃO TTO SG 3T	-6.670	4.448 ns	P>0.05
NÃO TTO SG vs CON A SG 3T	-8.940	5.962 *	P<0.05
NÃO TTO SG vs HSP SG 3T	-5.070	3.381 ns	P>0.05
NÃO TTO SG vs HSP+CONA SG 3T	-8.170	5.448 *	P<0.05
CON A SG vs HSP SG	13.670	11.165 ***	P<0.001
CON A SG vs HSP+CONA SG	-0.4600	0.3757 ns	P>0.05
CON A SG vs NÃO TTO SG 1T	7.380	5.581 *	P<0.05
CON A SG vs CON A SG 1T	4.550	3.441 ns	P>0.05
CON A SG vs HSP SG 1T	8.160	6.170 **	P<0.01
CON A SG vs HSP+CONA SG 1T	4.260	3.221 ns	P>0.05
CON A SG vs NÃO TTO SG 2T	13.610	11.116 ***	P<0.001
CON A SG vs CON A SG 2T	7.670	6.264 **	P<0.01
CON A SG vs HSP SG 2T	13.040	10.650 ***	P<0.001
CON A SG vs HSP+CONA SG 2T	6.270	5.121 ns	P>0.05
CON A SG vs NÃO TTO SG 3T	7.020	4.681 ns	P>0.05
CON A SG vs CON A SG 3T	4.750	3.168 ns	P>0.05
CON A SG vs HSP SG 3T	8.620	5.748 *	P<0.05
CON A SG vs HSP+CONA SG 3T	5.520	3.681 ns	P>0.05
CON A SG vs HSP SG	13.670	11.165 ***	P<0.001
CON A SG vs HSP+CONA SG	-0.4600	0.3757 ns	P>0.05
CON A SG vs NÃO TTO SG 1T	7.380	5.581 *	P<0.05
CON A SG vs CON A SG 1T	4.550	3.441 ns	P>0.05
CON A SG vs HSP SG 1T	8.160	6.170 **	P<0.01
CON A SG vs HSP+CONA SG 1T	4.260	3.221 ns	P>0.05
CON A SG vs NÃO TTO SG 2T	13.610	11.116 ***	P<0.001
CON A SG vs CON A SG 2T	7.670	6.264 **	P<0.01
CON A SG vs HSP SG 2T	13.040	10.650 ***	P<0.001
CON A SG vs HSP+CONA SG 2T	6.270	5.121 ns	P>0.05
CON A SG vs NÃO TTO SG 3T	7.020	4.681 ns	P>0.05
CON A SG vs CON A SG 3T	4.750	3.168 ns	P>0.05
CON A SG vs HSP SG 3T	8.620	5.748 *	P<0.05
CON A SG vs HSP+CONA SG 3T	5.520	3.681 ns	P>0.05
HSP SG vs HSP+CONA SG	-14.130	11.541 ***	P<0.001
HSP SG vs NÃO TTO SG 1T	-6.290	4.756 ns	P>0.05
HSP SG vs CON A SG 1T	-9.120	6.896 **	P<0.01
HSP SG vs HSP SG 1T	-5.510	4.166 ns	P>0.05
HSP SG vs HSP+CONA SG 1T	-9.410	7.116 **	P<0.01
HSP SG vs NÃO TTO SG 2T	-0.06000	0.04901 ns	P>0.05
HSP SG vs CON A SG 2T	-6.000	4.901 ns	P>0.05
HSP SG vs HSP SG 2T	-0.6300	0.5146 ns	P>0.05
HSP SG vs HSP+CONA SG 2T	-7.400	6.044 *	P<0.05
HSP SG vs NÃO TTO SG 3T	-6.650	4.435 ns	P>0.05
HSP SG vs CON A SG 3T	-8.920	5.949 *	P<0.05
HSP SG vs HSP SG 3T	-5.050	3.368 ns	P>0.05
HSP SG vs HSP+CONA SG 3T	-8.150	5.435 *	P<0.05
HSP+CONA SG vs NÃO TTO SG 1T	7.840	5.928 *	P<0.05
HSP+CONA SG vs CON A SG 1T	5.010	3.788 ns	P>0.05
HSP+CONA SG vs HSP SG 1T	8.620	6.518 **	P<0.01
HSP+CONA SG vs HSP+CONA SG 1T	4.720	3.569 ns	P>0.05
HSP+CONA SG vs NÃO TTO SG 2T	14.070	11.492 ***	P<0.001
HSP+CONA SG vs CON A SG 2T	8.130	6.640 **	P<0.01
HSP+CONA SG vs HSP SG 2T	13.500	11.026 ***	P<0.001
HSP+CONA SG vs HSP+CONA SG 2T	6.730	5.497 *	P<0.05
HSP+CONA SG vs NÃO TTO SG 3T	7.480	4.988 ns	P>0.05
HSP+CONA SG vs CON A SG 3T	5.210	3.474 ns	P>0.05
HSP+CONA SG vs HSP SG 3T	9.080	6.055 *	P<0.05
HSP+CONA SG vs HSP+CONA SG 3T	5.980	3.988 ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs CON A SG 1T	-2.830	2.002 ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs HSP SG 1T	0.7800	0.5517 ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs HSP+CONA SG 1T	-3.120	2.207 ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs NÃO TTO SG 2T	6.230	4.711 ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs CON A SG 2T	0.2900	0.2193 ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs HSP SG 2T	5.660	4.280 ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs HSP+CONA SG 2T	-1.110	0.8393 ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs NÃO TTO SG 3T	-0.3600	0.2278 ns	P>0.05

NÃO TTO SG 1T vs CON A SG 1T	-2.830	2.002	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs HSP SG 1T	0.7800	0.5517	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs HSP+CONA SG 1T	-3.120	2.207	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs NÃO TTO SG 2T	6.230	4.711	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs CON A SG 2T	0.2900	0.2193	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs HSP SG 2T	5.660	4.280	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs HSP+CONA SG 3T	-1.110	0.8393	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs NÃO TTO SG 3T	-0.3600	0.2278	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs CON A SG 3T	-2.630	1.664	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs HSP SG 3T	1.240	0.7845	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 1T vs HSP+CONA SG 3T	-1.860	1.177	ns	P>0.05
CON A SG 1T vs HSP SG 1T	3.610	2.553	ns	P>0.05
CON A SG 1T vs HSP+CONA SG 1T	-0.2900	0.2051	ns	P>0.05
CON A SG 1T vs NÃO TTO SG 2T	9.060	6.851	**	P<0.01
CON A SG 1T vs CON A SG 2T	3.120	2.359	ns	P>0.05
CON A SG 1T vs HSP SG 2T	8.490	6.420	**	P<0.01
CON A SG 1T vs HSP+CONA SG 3T	1.720	1.301	ns	P>0.05
CON A SG 1T vs NÃO TTO SG 3T	2.470	1.563	ns	P>0.05
CON A SG 1T vs CON A SG 3T	0.2000	0.1265	ns	P>0.05
CON A SG 1T vs HSP SG 3T	4.070	2.575	ns	P>0.05
CON A SG 1T vs HSP+CONA SG 3T	0.9700	0.6137	ns	P>0.05
HSP SG 1T vs HSP+CONA SG 1T	-3.900	2.759	ns	P>0.05
HSP SG 1T vs NÃO TTO SG 2T	5.450	4.121	ns	P>0.05
HSP SG 1T vs CON A SG 2T	-0.4900	0.3705	ns	P>0.05
HSP SG 1T vs HSP SG 2T	4.880	3.690	ns	P>0.05
HSP SG 1T vs HSP+CONA SG 3T	-1.890	1.429	ns	P>0.05
HSP SG 1T vs NÃO TTO SG 3T	-1.140	0.7212	ns	P>0.05
HSP SG 1T vs CON A SG 3T	-3.410	2.157	ns	P>0.05
HSP SG 1T vs HSP SG 3T	0.4600	0.2910	ns	P>0.05
HSP SG 1T vs HSP+CONA SG 3T	-2.640	1.670	ns	P>0.05
HSP+CONA SG 1T vs NÃO TTO SG 2T	9.350	7.070	**	P<0.01
HSP+CONA SG 1T vs CON A SG 2T	3.410	2.579	ns	P>0.05
HSP+CONA SG 1T vs HSP SG 2T	8.780	6.639	**	P<0.01
HSP+CONA SG 1T vs HSP+CONA SG 3T	2.010	1.520	ns	P>0.05
HSP+CONA SG 1T vs NÃO TTO SG 3T	2.760	1.746	ns	P>0.05
HSP+CONA SG 1T vs CON A SG 3T	0.4900	0.3100	ns	P>0.05
HSP+CONA SG 1T vs HSP SG 3T	4.360	2.758	ns	P>0.05
HSP+CONA SG 1T vs HSP+CONA SG 3T	1.260	0.7971	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 2T vs CON A SG 2T	-5.940	4.852	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 2T vs HSP SG 2T	-0.5700	0.4655	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 2T vs HSP+CONA SG 3T	-7.340	5.928	*	P<0.05
NÃO TTO SG 2T vs NÃO TTO SG 3T	-6.590	4.395	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 2T vs CON A SG 3T	-8.860	5.909	*	P<0.05
NÃO TTO SG 2T vs HSP SG 3T	-4.990	3.328	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 2T vs HSP+CONA SG 3T	-8.090	5.395	*	P<0.05
CON A SG 2T vs HSP SG 2T	5.370	4.386	ns	P>0.05
CON A SG 2T vs HSP+CONA SG 3T	-1.400	1.143	ns	P>0.05

CON A SG 2T vs HSP SG 2T	5.370	4.386	ns	P>0.05
CON A SG 2T vs HSP+CONA SG 3T	-1.400	1.143	ns	P>0.05
CON A SG 2T vs NÃO TTO SG 3T	-0.6500	0.4335	ns	P>0.05
CON A SG 2T vs CON A SG 3T	-2.920	1.947	ns	P>0.05
CON A SG 2T vs HSP SG 3T	0.9500	0.6335	ns	P>0.05
CON A SG 2T vs HSP+CONA SG 3T	-2.150	1.434	ns	P>0.05
HSP SG 2T vs HSP+CONA SG 3T	-6.770	5.529	*	P<0.05
HSP SG 2T vs NÃO TTO SG 3T	-6.020	4.015	ns	P>0.05
HSP SG 2T vs CON A SG 3T	-8.290	5.528	*	P<0.05
HSP SG 2T vs HSP SG 3T	-4.420	2.948	ns	P>0.05
HSP SG 2T vs HSP+CONA SG 3T	-7.520	5.015	ns	P>0.05
HSP+CONA SG 3T vs NÃO TTO SG 3T	0.7500	0.5002	ns	P>0.05
HSP+CONA SG 3T vs CON A SG 3T	-1.520	1.014	ns	P>0.05
HSP+CONA SG 3T vs HSP SG 3T	2.350	1.567	ns	P>0.05
HSP+CONA SG 3T vs HSP+CONA SG 3T	-0.7500	0.5002	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 3T vs CON A SG 3T	-2.270	1.311	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 3T vs HSP SG 3T	1.600	0.9241	ns	P>0.05
NÃO TTO SG 3T vs HSP+CONA SG 3T	-1.500	0.8663	ns	P>0.05
CON A SG 3T vs HSP SG 3T	3.870	2.235	ns	P>0.05
CON A SG 3T vs HSP+CONA SG 3T	0.7700	0.4447	ns	P>0.05
HSP SG 3T vs HSP+CONA SG 3T	-3.100	1.790	ns	P>0.05

Difference	Mean 95% Confidence Interval		
	Difference	From	To
NÃO TTO SG - CON A SG	-13.690	-20.064	-7.316
NÃO TTO SG - HSP SG	-0.02000	-6.394	6.354
NÃO TTO SG - HSP+CONA SG	-14.150	-20.524	-7.776
NÃO TTO SG - NÃO TTO SG 1T	-6.310	-13.195	0.5750
NÃO TTO SG - CON A SG 1T	-9.140	-16.025	-2.255
NÃO TTO SG - HSP SG 1T	-5.530	-12.415	1.355
NÃO TTO SG - HSP+CONA SG 1T	-9.430	-16.315	-2.545
NÃO TTO SG - NÃO TTO SG 2T	-0.08000	-6.454	6.294
NÃO TTO SG - CON A SG 2T	-6.020	-12.394	0.3543
NÃO TTO SG - HSP SG 2T	-0.6500	-7.024	5.724
NÃO TTO SG - HSP+CONA SG 3T	-7.420	-13.794	-1.046
NÃO TTO SG - NÃO TTO SG 3T	-6.670	-14.477	1.137
NÃO TTO SG - CON A SG 3T	-8.940	-16.747	-1.133
NÃO TTO SG - HSP SG 3T	-5.070	-12.877	2.737
NÃO TTO SG - HSP+CONA SG 3T	-8.170	-15.977	-0.3632
CON A SG - HSP SG	13.670	7.296	20.044
CON A SG - HSP+CONA SG	-0.4600	-6.834	5.914
CON A SG - NÃO TTO SG 1T	7.380	0.4950	14.265
CON A SG - CON A SG 1T	4.550	-2.335	11.435
CON A SG - HSP SG 1T	6.160	1.275	15.045
CON A SG - HSP+CONA SG 1T	4.260	-2.625	11.145
CON A SG - NÃO TTO SG 2T	13.610	7.236	19.984

CON A SG - HSP SG	13.670	7.296	20.044
CON A SG - HSP+CONA SG	-0.4600	-6.834	5.914
CON A SG - NÃO TTO SG 1T	7.380	0.4950	14.265
CON A SG - CON A SG 1T	4.550	-2.335	11.435
CON A SG - HSP SG 1T	8.160	1.275	15.045
CON A SG - HSP+CONA SG 1T	4.260	-2.625	11.145
CON A SG - NÃO TTO SG 2T	13.610	7.236	19.984
CON A SG - CON A SG 2T	7.670	1.296	14.044
CON A SG - HSP SG 2T	13.040	6.666	19.414
CON A SG - HSP+CONA SG 3T	6.270	-0.1043	12.644
CON A SG - NÃO TTO SG 3T	7.020	-0.7868	14.827
CON A SG - CON A SG 3T	4.750	-3.057	12.557
CON A SG - HSP SG 3T	8.620	0.8132	16.427
CON A SG - HSP+CONA SG 3T	5.520	-2.287	13.327
HSP SG - HSP+CONA SG	-14.130	-20.504	-7.756
HSP SG - NÃO TTO SG 1T	-6.290	-13.175	0.5950
HSP SG - CON A SG 1T	-9.120	-16.005	-2.235
HSP SG - HSP SG 1T	-5.510	-12.395	1.375
HSP SG - HSP+CONA SG 1T	-9.410	-16.295	-2.525
HSP SG - NÃO TTO SG 2T	-0.06000	-6.434	6.314
HSP SG - CON A SG 2T	-6.000	-12.374	0.3743
HSP SG - HSP SG 2T	-0.6300	-7.004	5.744
HSP SG - HSP+CONA SG 3T	-7.400	-13.774	-1.026
HSP SG - NÃO TTO SG 3T	-6.650	-14.457	1.157
HSP SG - CON A SG 3T	-8.920	-16.727	-1.113
HSP SG - HSP SG 3T	-5.050	-12.857	2.757
HSP SG - HSP+CONA SG 3T	-8.150	-15.957	-0.3432
HSP+CONA SG - NÃO TTO SG 1T	7.840	0.9550	14.725
HSP+CONA SG - CON A SG 1T	5.010	-1.875	11.895
HSP+CONA SG - HSP SG 1T	8.620	1.735	15.505
HSP+CONA SG - HSP+CONA SG 1T	4.720	-2.165	11.605
HSP+CONA SG - NÃO TTO SG 2T	14.070	7.696	20.444
HSP+CONA SG - CON A SG 2T	8.130	1.756	14.504
HSP+CONA SG - HSP SG 2T	13.500	7.126	19.874
HSP+CONA SG - HSP+CONA SG 3T	6.730	0.3557	13.104
HSP+CONA SG - NÃO TTO SG 3T	7.480	-0.3268	15.287
HSP+CONA SG - CON A SG 3T	5.210	-2.597	13.017
HSP+CONA SG - HSP SG 3T	9.080	1.273	16.887
HSP+CONA SG - HSP+CONA SG 3T	5.980	-1.827	13.787
NÃO TTO SG 1T - CON A SG 1T	-2.830	-10.190	4.530
NÃO TTO SG 1T - HSP SG 1T	0.7800	-6.580	8.140
NÃO TTO SG 1T - HSP+CONA SG 1T	-3.120	-10.480	4.240
NÃO TTO SG 1T - NÃO TTO SG 2T	6.230	-0.6550	13.115
NÃO TTO SG 1T - CON A SG 2T	0.2900	-6.595	7.175
NÃO TTO SG 1T - HSP SG 2T	5.660	-1.225	12.545
NÃO TTO SG 1T - HSP+CONA SG 3T	-1.110	-7.995	5.775
NÃO TTO SG 1T - NÃO TTO SG 3T	-0.3600	-8.589	7.869
NÃO TTO SG 1T - CON A SG 3T	-2.630	-10.859	5.599
NÃO TTO SG 1T - HSP SG 3T	1.240	-6.989	9.469
NÃO TTO SG 1T - HSP+CONA SG 3T	-1.860	-10.089	6.369
CON A SG 1T - HSP SG 1T	3.610	-3.750	10.970
CON A SG 1T - HSP+CONA SG 1T	-0.2900	-7.650	7.070
CON A SG 1T - NÃO TTO SG 2T	9.060	2.175	15.945
CON A SG 1T - CON A SG 2T	3.120	-3.765	10.005
CON A SG 1T - HSP SG 2T	8.490	1.605	15.375
CON A SG 1T - HSP+CONA SG 3T	1.720	-5.165	8.605
CON A SG 1T - NÃO TTO SG 3T	2.470	-5.759	10.699
CON A SG 1T - CON A SG 3T	0.2000	-8.029	8.429
CON A SG 1T - HSP SG 3T	4.070	-4.159	12.299
CON A SG 1T - HSP+CONA SG 3T	0.9700	-7.259	9.199
HSP SG 1T - HSP+CONA SG 1T	-3.900	-11.260	3.460
HSP SG 1T - NÃO TTO SG 2T	5.450	-1.435	12.335
HSP SG 1T - CON A SG 2T	-0.4900	-7.375	6.395
HSP SG 1T - HSP SG 2T	4.880	-2.005	11.765
HSP SG 1T - HSP+CONA SG 3T	-1.890	-8.775	4.995
HSP SG 1T - NÃO TTO SG 3T	-1.140	-9.369	7.089
HSP SG 1T - CON A SG 3T	-3.410	-11.639	4.819
HSP SG 1T - HSP SG 3T	0.4600	-7.769	8.689
HSP SG 1T - HSP+CONA SG 3T	-2.640	-10.869	5.589
HSP+CONA SG 1T - NÃO TTO SG 2T	9.350	2.465	16.235
HSP+CONA SG 1T - CON A SG 2T	3.410	-3.475	10.295
HSP+CONA SG 1T - HSP SG 2T	8.780	1.895	15.665
HSP+CONA SG 1T - HSP+CONA SG 3T	2.010	-4.875	8.895
HSP+CONA SG 1T - NÃO TTO SG 3T	2.760	-5.469	10.989
HSP+CONA SG 1T - CON A SG 3T	0.4900	-7.739	8.719
HSP+CONA SG 1T - HSP SG 3T	4.360	-3.869	12.589
HSP+CONA SG 1T - HSP+CONA SG 3T	1.260	-6.969	9.489
NÃO TTO SG 2T - CON A SG 2T	-5.940	-12.314	0.4343
NÃO TTO SG 2T - HSP SG 2T	-0.5700	-6.944	5.804
NÃO TTO SG 2T - HSP+CONA SG 3T	-7.340	-13.714	-0.9657
NÃO TTO SG 2T - NÃO TTO SG 3T	-6.590	-14.397	1.217
NÃO TTO SG 2T - CON A SG 3T	-8.860	-16.667	-1.053
NÃO TTO SG 2T - HSP SG 3T	-4.990	-12.797	2.817
NÃO TTO SG 2T - HSP+CONA SG 3T	-8.090	-15.897	-0.2832
CON A SG 2T - HSP SG 2T	5.370	-1.004	11.744
CON A SG 2T - HSP+CONA SG 3T	-1.400	-7.774	4.974
NÃO TTO SG 1T - CON A SG 1T	-2.830	-10.190	4.530
NÃO TTO SG 1T - HSP SG 1T	0.7800	-6.580	8.140
NÃO TTO SG 1T - HSP+CONA SG 1T	-3.120	-10.480	4.240
NÃO TTO SG 1T - NÃO TTO SG 2T	6.230	-0.6550	13.115
NÃO TTO SG 1T - CON A SG 2T	0.2900	-6.595	7.175
NÃO TTO SG 1T - HSP SG 2T	5.660	-1.225	12.545
NÃO TTO SG 1T - HSP+CONA SG 3T	-1.110	-7.995	5.775
NÃO TTO SG 1T - NÃO TTO SG 3T	-0.3600	-8.589	7.869
NÃO TTO SG 1T - CON A SG 3T	-2.630	-10.859	5.599
NÃO TTO SG 1T - HSP SG 3T	1.240	-6.989	9.469
NÃO TTO SG 1T - HSP+CONA SG 3T	-1.860	-10.089	6.369
CON A SG 1T - HSP SG 1T	3.610	-3.750	10.970
CON A SG 1T - HSP+CONA SG 1T	-0.2900	-7.650	7.070
CON A SG 1T - NÃO TTO SG 2T	9.060	2.175	15.945
CON A SG 1T - CON A SG 2T	3.120	-3.765	10.005
CON A SG 1T - HSP SG 2T	8.490	1.605	15.375
CON A SG 1T - HSP+CONA SG 3T	1.720	-5.165	8.605
CON A SG 1T - NÃO TTO SG 3T	2.470	-5.759	10.699
CON A SG 1T - CON A SG 3T	0.2000	-8.029	8.429
CON A SG 1T - HSP SG 3T	4.070	-4.159	12.299
CON A SG 1T - HSP+CONA SG 3T	0.9700	-7.259	9.199
HSP SG 1T - HSP+CONA SG 1T	-3.900	-11.260	3.460
HSP SG 1T - NÃO TTO SG 2T	5.450	-1.435	12.335
HSP SG 1T - CON A SG 2T	-0.4900	-7.375	6.395
HSP SG 1T - HSP SG 2T	4.880	-2.005	11.765
HSP SG 1T - HSP+CONA SG 3T	-1.890	-8.775	4.995
HSP SG 1T - NÃO TTO SG 3T	-1.140	-9.369	7.089
HSP SG 1T - CON A SG 3T	-3.410	-11.639	4.819
HSP SG 1T - HSP SG 3T	0.4600	-7.769	8.689
HSP SG 1T - HSP+CONA SG 3T	-2.640	-10.869	5.589
HSP+CONA SG 1T - NÃO TTO SG 2T	9.350	2.465	16.235
HSP+CONA SG 1T - CON A SG 2T	3.410	-3.475	10.295
HSP+CONA SG 1T - HSP SG 2T	8.780	1.895	15.665
HSP+CONA SG 1T - HSP+CONA SG 3T	2.010	-4.875	8.895
HSP+CONA SG 1T - NÃO TTO SG 3T	2.760	-5.469	10.989
HSP+CONA SG 1T - CON A SG 3T	0.4900	-7.739	8.719
HSP+CONA SG 1T - HSP SG 3T	4.360	-3.869	12.589
HSP+CONA SG 1T - HSP+CONA SG 3T	1.260	-6.969	9.489
NÃO TTO SG 2T - CON A SG 2T	-5.940	-12.314	0.4343
NÃO TTO SG 2T - HSP SG 2T	-0.5700	-6.944	5.804
NÃO TTO SG 2T - HSP+CONA SG 3T	-7.340	-13.714	-0.9657
NÃO TTO SG 2T - NÃO TTO SG 3T	-6.590	-14.397	1.217
NÃO TTO SG 2T - CON A SG 3T	-8.860	-16.667	-1.053
NÃO TTO SG 2T - HSP SG 3T	-4.990	-12.797	2.817
NÃO TTO SG 2T - HSP+CONA SG 3T	-8.090	-15.897	-0.2832
CON A SG 2T - HSP SG 2T	5.370	-1.004	11.744
CON A SG 2T - HSP+CONA SG 3T	-1.400	-7.774	4.974

CON A SG 2T - HSP SG 2T	5.370	-1.004	11.744
CON A SG 2T - HSP+CONA SG 3T	-1.400	-7.774	4.974
CON A SG 2T - NÃO TTO SG 3T	-0.6500	-8.457	7.157
CON A SG 2T - CON A SG 3T	-2.920	-10.727	4.887
CON A SG 2T - HSP SG 3T	0.9500	-6.857	8.757
CON A SG 2T - HSP+CONA SG 3T	-2.150	-9.957	5.657
HSP SG 2T - HSP+CONA SG 3T	-6.770	-13.144	-0.3957
HSP SG 2T - NÃO TTO SG 3T	-6.020	-13.827	1.787
HSP SG 2T - CON A SG 3T	-8.290	-16.097	-0.4832
HSP SG 2T - HSP SG 3T	-4.420	-12.227	3.387
HSP SG 2T - HSP+CONA SG 3T	-7.520	-15.327	0.2868
HSP+CONA SG 3T - NÃO TTO SG 3T	0.7500	-7.057	8.557
HSP+CONA SG 3T - CON A SG 3T	-1.520	-9.327	6.287
HSP+CONA SG 3T - HSP SG 3T	2.350	-5.457	10.157
HSP+CONA SG 3T - HSP+CONA SG 3T	-0.7500	-8.557	7.057
NÃO TTO SG 3T - CON A SG 3T	-2.270	-11.285	6.745
NÃO TTO SG 3T - HSP SG 3T	1.600	-7.415	10.615
NÃO TTO SG 3T - HSP+CONA SG 3T	-1.500	-10.515	7.515
CON A SG 3T - HSP SG 3T	3.870	-5.145	12.885
CON A SG 3T - HSP+CONA SG 3T	0.7700	-8.245	9.785
HSP SG 3T - HSP+CONA SG 3T	-3.100	-12.115	5.915

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO SG	Too few values to test.		
CON A SG	Too few values to test.		
HSP SG	Too few values to test.		
HSP+CONA SG	Too few values to test.		
NÃO TTO SG 1T	Too few values to test.		
CON A SG 1T	Too few values to test.		
HSP SG 1T	Too few values to test.		
HSP+CONA SG 1T	Too few values to test.		
NÃO TTO SG 2T	Too few values to test.		
CON A SG 2T	Too few values to test.		
HSP SG 2T	Too few values to test.		
HSP+CONA SG 3T	Too few values to test.		
NÃO TTO SG 3T	Too few values to test.		
CON A SG 3T	Too few values to test.		
HSP SG 3T	Too few values to test.		
HSP+CONA SG 3T	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	15	1146.7	76.446
Residuals (within columns)	36	215.86	5.996
Total	51	1362.5	

$F = 12.749 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
NÃO TTO SG	4	0.1400	0.04450	0.02225	Unknown
CON A SG	4	13.830	4.044	2.022	Unknown
HSP SG	4	0.1600	0.05690	0.02845	Unknown
HSP+CONA SG	4	14.290	3.667	1.834	Unknown
NÃO TTO SG 1T	3	6.450	3.199	1.847	Unknown
CON A SG 1T	3	9.280	1.997	1.153	Unknown
HSP SG 1T	3	5.670	2.745	1.585	Unknown
HSP+CONA SG 1T	3	9.570	2.789	1.610	Unknown
NÃO TTO SG 2T	4	0.2200	0.09187	0.04593	Unknown
CON A SG 2T	4	6.160	1.281	0.6405	Unknown
HSP SG 2T	4	0.7900	0.08340	0.04170	Unknown
HSP+CONA SG 2T	4	7.560	2.059	1.030	Unknown
NÃO TTO SG 3T	2	6.810	2.365	1.672	Unknown
CON A SG 3T	2	9.080	3.900	2.758	Unknown
HSP SG 3T	2	5.210	4.927	3.484	Unknown
HSP+CONA SG 3T	2	8.310	2.147	1.518	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval From	Interval To
NÃO TTO SG	Unknown	Unknown	0.06920	0.2108
CON A SG	Unknown	Unknown	7.396	20.264
HSP SG	Unknown	Unknown	0.06947	0.2505
HSP+CONA SG	Unknown	Unknown	8.456	20.124
NÃO TTO SG 1T	Unknown	Unknown	-1.497	14.397
CON A SG 1T	Unknown	Unknown	4.319	14.241
HSP SG 1T	Unknown	Unknown	-1.150	12.490
HSP+CONA SG 1T	Unknown	Unknown	2.641	16.499
NÃO TTO SG 2T	Unknown	Unknown	0.07383	0.3662
CON A SG 2T	Unknown	Unknown	4.122	8.198
HSP SG 2T	Unknown	Unknown	0.6573	0.9227
HSP+CONA SG 2T	Unknown	Unknown	4.284	10.836
NÃO TTO SG 3T	Unknown	Unknown	-14.438	28.058
CON A SG 3T	Unknown	Unknown	-25.960	44.120
HSP SG 3T	Unknown	Unknown	-39.057	49.477
HSP+CONA SG 3T	Unknown	Unknown	-10.980	27.600

PROLIFERAÇÃO MONONUCLEARES SG VACAS GESTANTES TERÇO 1

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.2685, considered not significant. Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO SG 1T	Too few values to test.		
CON SG 1T	Too few values to test.		
HSP 1T	Too few values to test.		
HSP + CON A 1T	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of Squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	35.008	11.669
Residuals (within columns)	8	59.070	7.384
Total	11	94.079	

$$F = 1.580 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data					
Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
NÃO TTO SG 1T	3	6.450	3.199	1.847	Unknown
CON SG 1T	3	9.280	1.997	1.153	Unknown
HSP 1T	3	5.670	2.745	1.585	Unknown
HSP + CON A 1T	3	9.570	2.789	1.610	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
NÃO TTO SG 1T	Unknown	Unknown	-1.497	14.397
CON SG 1T	Unknown	Unknown	4.319	14.241
HSP 1T	Unknown	Unknown	-1.150	12.490
HSP + CON A 1T	Unknown	Unknown	2.641	16.499

PROLIFERAÇÃO MONONUCLEARES SG VACAS GESTANTES TERÇO 2

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

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

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.199 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
NÃO TTO SG 2T vs CON A SG 2T	-5.940	9.807	*** P<0.001
NÃO TTO SG 2T vs HSP SG 2T	-0.5700	0.9410	ns P>0.05
NÃO TTO SG 2T vs HSP+CONA SG 2T	-7.340	12.118	*** P<0.001
CON A SG 2T vs HSP SG 2T	5.370	8.866	*** P<0.001
CON A SG 2T vs HSP+CONA SG 2T	-1.400	2.311	ns P>0.05
HSP SG 2T vs HSP+CONA SG 2T	-6.770	11.177	*** P<0.001

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
NÃO TTO SG 2T - CON A SG 2T	-5.940	-8.483	-3.397
NÃO TTO SG 2T - HSP SG 2T	-0.5700	-3.113	1.973
NÃO TTO SG 2T - HSP+CONA SG 2T	-7.340	-9.883	-4.797
CON A SG 2T - HSP SG 2T	5.370	2.827	7.913
CON A SG 2T - HSP+CONA SG 2T	-1.400	-3.943	1.143
HSP SG 2T - HSP+CONA SG 2T	-6.770	-9.313	-4.227

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 24.639

The P value is < 0.0001.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is extremely significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO SG 2T			Too few values to test.
CON A SG 2T			Too few values to test.
HSP SG 2T			Too few values to test.
HSP+CONA SG 2T			Too few values to test.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	166.11	55.371
Residuals (within columns)	12	17.611	1.468
Total	15	183.72	

$$F = 37.730 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of	
				Mean	Median
NÃO TTO SG 2T	4	0.2200	0.09185	0.04593	Unknown
CON A SG 2T	4	6.160	1.271	0.6355	Unknown
HSP SG 2T	4	0.7900	0.08340	0.04170	Unknown
HSP+CONA SG 2T	4	7.560	2.059	1.030	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
NÃO TTO SG 2T	Unknown	Unknown	0.07387	0.3661
CON A SG 2T	Unknown	Unknown	4.138	8.182
HSP SG 2T	Unknown	Unknown	0.6573	0.9227
HSP+CONA SG 2T	Unknown	Unknown	4.284	10.836

PROLIFERAÇÃO MONONUCLEARES SG VACAS GESTANTES TERÇO 2

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.7185, considered not significant. Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
NÃO TTO SG 3T			Too few values to test.
CON A SG 3T			Too few values to test.
HSP SG 3T			Too few values to test.
HSP+CONA SG 3T			Too few values to test.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	17.571	5.857
Residuals (within columns)	4	49.688	12.422
Total	7	67.260	

$$F = 0.4715 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of	
				Mean	Median
NÃO TTO SG 3T	2	6.810	2.365	1.672	Unknown
CON A SG 3T	2	9.080	3.900	2.758	Unknown
HSP SG 3T	2	5.210	4.927	3.484	Unknown
HSP+CONA SG 3T	2	8.310	2.147	1.518	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
NÃO TTO SG 3T	Unknown	Unknown	-14.438	28.058
CON A SG 3T	Unknown	Unknown	-25.960	44.120
HSP SG 3T	Unknown	Unknown	-39.057	49.477
HSP+CONA SG 3T	Unknown	Unknown	-10.980	27.600

MITOTOXIDADE TERÇO 2 X TERÇO 3

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.5043, considered not significant.
 Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
POP R1 TERÇO2			Too few values to test.
POP R2 TERÇO 2			Too few values to test.
POP R3 TERÇO 2			Too few values to test.
POP R1 TERÇO 3			Too few values to test.
POP R2 TERÇO 3			Too few values to test.
POP R3 TERÇO 3			Too few values to test.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	842.23	168.45
Residuals (within columns)	6	1045.1	174.19
Total	11	1887.3	

$$F = 0.9670 = (MStreatment/MSresidual)$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
POP R1 TERÇO2	2	24.330	9.570	6.767	Unknown
POP R2 TERÇO 2	2	39.340	15.210	10.755	Unknown
POP R3 TERÇO 2	2	18.720	14.160	10.013	Unknown
POP R1 TERÇO 3	2	21.940	9.420	6.661	Unknown
POP R2 TERÇO 3	2	39.390	16.420	11.611	Unknown
POP R3 TERÇO 3	2	22.820	12.780	9.037	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
POP R1 TERÇO2	Unknown	Unknown	-61.652	110.31
POP R2 TERÇO 2	Unknown	Unknown	-97.314	175.99
POP R3 TERÇO 2	Unknown	Unknown	-108.50	145.94
POP R1 TERÇO 3	Unknown	Unknown	-62.694	106.57
POP R2 TERÇO 3	Unknown	Unknown	-108.14	186.92
POP R3 TERÇO 3	Unknown	Unknown	-92.002	137.64

CITOTOXIDADE POPULAÇÃO 2T x 3T (R1)

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0075, considered very significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.597 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value	
Controle 2T vs Con A 2T	1.300	0.4396	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 2 T	15.150	5.123	ns	P>0.05
Controle 2T vs PHA 2T	16.280	5.506	ns	P>0.05
Controle 2T vs Controle 3T	-0.6800	0.2300	ns	P>0.05
Controle 2T vs Con A 3T	8.530	2.885	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 3T	13.240	4.477	ns	P>0.05
Controle 2T vs PHA 3T	17.470	5.908	*	P<0.05
Con A 2T vs HSP60 2 T	13.850	4.684	ns	P>0.05
Con A 2T vs PHA 2T	14.980	5.066	ns	P>0.05
Con A 2T vs Controle 3T	-1.980	0.6696	ns	P>0.05
Con A 2T vs Con A 3T	7.230	2.445	ns	P>0.05
Con A 2T vs HSP60 3T	11.940	4.038	ns	P>0.05
Con A 2T vs PHA 3T	16.170	5.468	ns	P>0.05
HSP60 2 T vs PHA 2T	1.130	0.3821	ns	P>0.05
HSP60 2 T vs Controle 3T	-15.830	5.353	ns	P>0.05
HSP60 2 T vs Con A 3T	-6.620	2.239	ns	P>0.05
HSP60 2 T vs HSP60 3T	-1.910	0.6459	ns	P>0.05
HSP60 2 T vs PHA 3T	2.320	0.7846	ns	P>0.05
PHA 2T vs Controle 3T	-16.960	5.735	*	P<0.05
PHA 2T vs Con A 3T	-7.750	2.621	ns	P>0.05
PHA 2T vs HSP60 3T	-3.040	1.028	ns	P>0.05
PHA 2T vs PHA 3T	1.190	0.4024	ns	P>0.05
Controle 3T vs Con A 3T	9.210	3.115	ns	P>0.05
Controle 3T vs HSP60 3T	13.920	4.707	ns	P>0.05
Controle 3T vs PHA 3T	18.150	6.138	*	P<0.05
Con A 3T vs HSP60 3T	4.710	1.593	ns	P>0.05
Con A 3T vs PHA 3T	8.940	3.023	ns	P>0.05
HSP60 3T vs PHA 3T	4.230	1.430	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
Controle 2T - Con A 2T	1.300	-15.250	17.850

Difference	Mean 95% Confidence Interval		
	Difference	From	To
Controle 2T - Con A 2T	1.300	-15.250	17.850
Controle 2T - HSP60 2 T	15.150	-1.400	31.700
Controle 2T - PHA 2T	16.280	-0.2705	32.830
Controle 2T - Controle 3T	-0.6800	-17.230	15.870
Controle 2T - Con A 3T	8.530	-8.020	25.080
Controle 2T - HSP60 3T	13.240	-3.310	29.790
Controle 2T - PHA 3T	17.470	0.9195	34.020
Con A 2T - HSP60 2 T	13.850	-2.700	30.400
Con A 2T - PHA 2T	14.980	-1.570	31.530
Con A 2T - Controle 3T	-1.980	-18.530	14.570
Con A 2T - Con A 3T	7.230	-9.320	23.780
Con A 2T - HSP60 3T	11.940	-4.610	28.490
Con A 2T - PHA 3T	16.170	-0.3805	32.720
HSP60 2 T - PHA 2T	1.130	-15.420	17.680
HSP60 2 T - Controle 3T	-15.830	-32.380	0.7205
HSP60 2 T - Con A 3T	-6.620	-23.170	9.930
HSP60 2 T - HSP60 3T	-1.910	-18.460	14.640
HSP60 2 T - PHA 3T	2.320	-14.230	18.870
PHA 2T - Controle 3T	-16.960	-33.510	-0.4095
PHA 2T - Con A 3T	-7.750	-24.300	8.800
PHA 2T - HSP60 3T	-3.040	-19.590	13.510
PHA 2T - PHA 3T	1.190	-15.360	17.740
Controle 3T - Con A 3T	9.210	-7.340	25.760
PHA 2T - Controle 3T	-16.960	-33.510	-0.4095
PHA 2T - Con A 3T	-7.750	-24.300	8.800
PHA 2T - HSP60 3T	-3.040	-19.590	13.510
PHA 2T - PHA 3T	1.190	-15.360	17.740
Controle 3T - Con A 3T	9.210	-7.340	25.760
Controle 3T - HSP60 3T	13.920	-2.630	30.470
Controle 3T - PHA 3T	18.150	1.600	34.700
Con A 3T - HSP60 3T	4.710	-11.840	21.260
Con A 3T - PHA 3T	8.940	-7.610	25.490
HSP60 3T - PHA 3T	4.230	-12.320	20.780

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle 2T			Too few values to test.
Con A 2T			Too few values to test.
HSP60 2 T			Too few values to test.
PHA 2T			Too few values to test.
Controle 3T			Too few values to test.
Con A 3T			Too few values to test.
HSP60 3T			Too few values to test.
PHA 3T			Too few values to test.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	7	829.38	118.48
Residuals (within columns)	8	139.90	17.488
Total	15	969.28	

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle 2T	2	32.510	8.301	5.870	Unknown
Con A 2T	2	31.210	4.759	3.365	Unknown
HSP60 2 T	2	17.360	0.9617	0.6800	Unknown
PHA 2T	2	16.230	0.1485	0.1050	Unknown
Controle 3T	2	33.190	5.247	3.710	Unknown
Con A 3T	2	23.980	0.3748	0.2650	Unknown
HSP60 3T	2	19.270	4.335	3.065	Unknown
PHA 3T	2	15.040	0.9687	0.6850	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle 2T	Unknown	Unknown	-42.070	107.09
Con A 2T	Unknown	Unknown	-11.547	73.967
HSP60 2 T	Unknown	Unknown	8.720	26.000
PHA 2T	Unknown	Unknown	14.896	17.564
Controle 3T	Unknown	Unknown	-13.952	80.332
Con A 3T	Unknown	Unknown	20.613	27.347
HSP60 3T	Unknown	Unknown	-19.678	58.218
PHA 3T	Unknown	Unknown	6.337	23.743

CITOTOXIDADE POPULAÇÃO 2T x 3T (R2)

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0038, considered very significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.597 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value	
Controle 2T vs Con A 2T	30.840	6.816	*	P<0.05
Controle 2T vs HSP60 2 T	4.040	0.8929	ns	P>0.05
Controle 2T vs PHA 2T	-2.810	0.6210	ns	P>0.05
Controle 2T vs Controle 3T	-5.250	1.160	ns	P>0.05
Controle 2T vs Con A 3T	22.380	4.946	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 3T	15.200	3.359	ns	P>0.05
Controle 2T vs PHA 3T	0.9500	0.2100	ns	P>0.05
Con A 2T vs HSP60 2 T	-26.800	5.923	*	P<0.05
Con A 2T vs HSP60 2 T	-26.800	5.923	*	P<0.05
Con A 2T vs PHA 2T	-33.650	7.437	*	P<0.05
Con A 2T vs Controle 3T	-36.090	7.976	**	P<0.01
Con A 2T vs Con A 3T	-8.460	1.870	ns	P>0.05
Con A 2T vs HSP60 3T	-15.640	3.457	ns	P>0.05
Con A 2T vs PHA 3T	-29.890	6.606	*	P<0.05
HSP60 2 T vs PHA 2T	-6.850	1.514	ns	P>0.05
HSP60 2 T vs Controle 3T	-9.290	2.053	ns	P>0.05
HSP60 2 T vs Con A 3T	18.340	4.053	ns	P>0.05
HSP60 2 T vs HSP60 3T	11.160	2.466	ns	P>0.05
HSP60 2 T vs PHA 3T	-3.090	0.6829	ns	P>0.05
PHA 2T vs Controle 3T	-2.440	0.5393	ns	P>0.05
PHA 2T vs Con A 3T	25.190	5.567	ns	P>0.05
PHA 2T vs HSP60 3T	18.010	3.980	ns	P>0.05
PHA 2T vs PHA 3T	3.760	0.8310	ns	P>0.05
Controle 3T vs Con A 3T	27.630	6.106	*	P<0.05
Controle 3T vs HSP60 3T	20.450	4.520	ns	P>0.05
Controle 3T vs PHA 3T	6.200	1.370	ns	P>0.05
Con A 3T vs HSP60 3T	-7.180	1.587	ns	P>0.05
Con A 3T vs PHA 3T	-21.430	4.736	ns	P>0.05
HSP60 3T vs PHA 3T	-14.250	3.149	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
Controle 2T - Con A 2T	30.840	5.515	56.165

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
Controle 2T - Con A 2T	30.840	5.515	56.165
Controle 2T - HSP60 2 T	4.040	-21.285	29.365
Controle 2T - PHA 2T	-2.810	-28.135	22.515
Controle 2T - Controle 3T	-5.250	-30.575	20.075
Controle 2T - Con A 3T	22.380	-2.945	47.705
Controle 2T - HSP60 3T	15.200	-10.125	40.525
Controle 2T - PHA 3T	0.9500	-24.375	26.275
Con A 2T - HSP60 2 T	-26.800	-52.125	-1.475
Con A 2T - PHA 2T	-33.650	-58.975	-8.325
Con A 2T - Controle 3T	-36.090	-61.415	-10.765
Con A 2T - Con A 3T	-8.460	-33.785	16.865
Con A 2T - HSP60 3T	-15.640	-40.965	9.685
Con A 2T - PHA 3T	-29.890	-55.215	-4.565
HSP60 2 T - PHA 2T	-6.850	-32.175	18.475
HSP60 2 T - Controle 3T	-9.290	-34.615	16.035
HSP60 2 T - Con A 3T	18.340	-6.985	43.665
HSP60 2 T - HSP60 3T	11.160	-14.165	36.485
HSP60 2 T - PHA 3T	-3.090	-28.415	22.235
PHA 2T - Controle 3T	-2.440	-27.765	22.885
PHA 2T - Con A 3T	25.190	-0.1347	50.515
PHA 2T - HSP60 3T	18.010	-7.315	43.335
PHA 2T - PHA 3T	3.760	-21.565	29.085
Controle 3T - Con A 3T	27.630	2.305	52.955
Controle 3T - Con A 3T	27.630	2.305	52.955
Controle 3T - HSP60 3T	20.450	-4.875	45.775
Controle 3T - PHA 3T	6.200	-19.125	31.525
Con A 3T - HSP60 3T	-7.180	-32.505	18.145
Con A 3T - PHA 3T	-21.430	-46.755	3.895
HSP60 3T - PHA 3T	-14.250	-39.575	11.075

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
-------	----	---------	------------------------

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle 2T			Too few values to test.
Con A 2T			Too few values to test.
HSP60 2 T			Too few values to test.
PHA 2T			Too few values to test.
Controle 3T			Too few values to test.
Con A 3T			Too few values to test.
HSP60 3T			Too few values to test.
PHA 3T			Too few values to test.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	7	2403.7	343.39
Residuals (within columns)	8	327.57	40.946
Total	15	2731.3	

$$F = 8.386 = (MStreatment/MSresidual)$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle 2T	2	47.360	8.370	5.918	Unknown
Con A 2T	2	16.520	4.050	2.864	Unknown
HSP60 2 T	2	43.320	1.400	0.9899	Unknown
PHA 2T	2	50.170	1.740	1.230	Unknown
Controle 3T	2	52.610	11.610	8.210	Unknown
Con A 3T	2	24.980	2.480	1.754	Unknown
HSP60 3T	2	32.160	4.680	3.309	Unknown
PHA 3T	2	46.410	8.560	6.053	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle 2T	Unknown	Unknown	-27.840	122.56
Con A 2T	Unknown	Unknown	-19.867	52.907
HSP60 2 T	Unknown	Unknown	30.742	55.898
PHA 2T	Unknown	Unknown	34.537	65.803
Controle 3T	Unknown	Unknown	-51.700	156.92
Con A 3T	Unknown	Unknown	2.698	47.262
HSP60 3T	Unknown	Unknown	-9.887	74.207
PHA 3T	Unknown	Unknown	-30.497	123.32

CITOTOXIDADE POPULAÇÃO 2T x 3T (R3)

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0018, considered very significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.597 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value	
Controle 2T vs Con A 2T	-10.000	2.169	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 2 T	-32.660	7.082	*	P<0.05
Controle 2T vs PHA 2T	-28.640	6.211	*	P<0.05
Controle 2T vs Controle 3T	-0.09000	0.01952	ns	P>0.05
Controle 2T vs Con A 3T	-21.210	4.599	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 3T	-32.000	6.939	*	P<0.05
Controle 2T vs PHA 3T	-36.570	7.930	**	P<0.01
Con A 2T vs HSP60 2 T	-22.660	4.914	ns	P>0.05
Con A 2T vs HSP60 2 T	-22.660	4.914	ns	P>0.05
Con A 2T vs PHA 2T	-18.640	4.042	ns	P>0.05
Con A 2T vs Controle 3T	9.910	2.149	ns	P>0.05
Con A 2T vs Con A 3T	-11.210	2.431	ns	P>0.05
Con A 2T vs HSP60 3T	-22.000	4.771	ns	P>0.05
Con A 2T vs PHA 3T	-26.570	5.762	*	P<0.05
HSP60 2 T vs PHA 2T	4.020	0.8718	ns	P>0.05
HSP60 2 T vs Controle 3T	32.570	7.063	*	P<0.05
HSP60 2 T vs Con A 3T	11.450	2.483	ns	P>0.05
HSP60 2 T vs HSP60 3T	0.6600	0.1431	ns	P>0.05
HSP60 2 T vs PHA 3T	-3.910	0.8479	ns	P>0.05
PHA 2T vs Controle 3T	28.550	6.191	*	P<0.05
PHA 2T vs Con A 3T	7.430	1.611	ns	P>0.05
PHA 2T vs HSP60 3T	-3.360	0.7286	ns	P>0.05
PHA 2T vs PHA 3T	-7.930	1.720	ns	P>0.05
Controle 3T vs Con A 3T	-21.120	4.580	ns	P>0.05
Controle 3T vs HSP60 3T	-31.910	6.920	*	P<0.05
Controle 3T vs PHA 3T	-36.480	7.911	**	P<0.01
Con A 3T vs HSP60 3T	-10.790	2.340	ns	P>0.05
Con A 3T vs PHA 3T	-15.360	3.331	ns	P>0.05
HSP60 3T vs PHA 3T	-4.570	0.9910	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
Controle 2T - Con A 2T	-10.000	-35.810	15.810

Difference	Difference	From	To
Controle 2T - Con A 2T	-10.000	-35.810	15.810
Controle 2T - HSP60 2 T	-32.660	-58.470	-6.850
Controle 2T - PHA 2T	-28.640	-54.450	-2.830
Controle 2T - Controle 3T	-0.09000	-25.900	25.720
Controle 2T - Con A 3T	-21.210	-47.020	4.600
Controle 2T - HSP60 3T	-32.000	-57.810	-6.190
Controle 2T - PHA 3T	-36.570	-62.380	-10.760
Con A 2T - HSP60 2 T	-22.660	-48.470	3.150
Con A 2T - PHA 2T	-18.640	-44.450	7.170
Con A 2T - Controle 3T	9.910	-15.900	35.720
Con A 2T - Con A 3T	-11.210	-37.020	14.600
Con A 2T - HSP60 3T	-22.000	-47.810	3.810
Con A 2T - PHA 3T	-26.570	-52.380	-0.7599
HSP60 2 T - PHA 2T	4.020	-21.790	29.830
HSP60 2 T - Controle 3T	32.570	6.760	58.380
HSP60 2 T - Con A 3T	11.450	-14.360	37.260
HSP60 2 T - HSP60 3T	0.6600	-25.150	26.470
HSP60 2 T - PHA 3T	-3.910	-29.720	21.900
PHA 2T - Controle 3T	28.550	2.740	54.360
PHA 2T - Con A 3T	7.430	-18.380	33.240
PHA 2T - HSP60 3T	-3.360	-29.170	22.450
PHA 2T - PHA 3T	-7.930	-33.740	17.880
Controle 3T - Con A 3T	-21.120	-46.930	4.690
Controle 3T - HSP60 3T	-31.910	-57.720	-6.100
Controle 3T - Con A 3T	-21.120	-46.930	4.690
Controle 3T - HSP60 3T	-31.910	-57.720	-6.100
Controle 3T - PHA 3T	-36.480	-62.290	-10.670
Con A 3T - HSP60 3T	-10.790	-36.600	15.020
Con A 3T - PHA 3T	-15.360	-41.170	10.450
HSP60 3T - PHA 3T	-4.570	-30.380	21.240

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle 2T			Too few values to test.
Con A 2T			Too few values to test.
HSP60 2 T			Too few values to test.
PHA 2T			Too few values to test.
Controle 3T			Too few values to test.
Con A 3T			Too few values to test.
HSP60 3T			Too few values to test.
PHA 3T			Too few values to test.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	7	3102.4	443.20
Residuals (within columns)	8	340.24	42.530
Total	15	3442.6	

$$F = 10.421 = (MStreatment/MSresidual)$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of	
				Mean	Median
Controle 2T	2	0.8900	0.8900	0.6293	Unknown
Con A 2T	2	10.890	3.230	2.284	Unknown
HSP60 2 T	2	33.550	0.7100	0.5020	Unknown
PHA 2T	2	29.530	1.130	0.7990	Unknown
Controle 3T	2	0.9800	9.030	6.385	Unknown
Con A 3T	2	22.100	2.090	1.478	Unknown
HSP60 3T	2	32.890	12.870	9.100	Unknown
PHA 3T	2	37.460	8.700	6.152	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle 2T	Unknown	Unknown	-7.106	8.886
Con A 2T	Unknown	Unknown	-18.130	39.910
HSP60 2 T	Unknown	Unknown	27.171	39.929
PHA 2T	Unknown	Unknown	19.378	39.682
Controle 3T	Unknown	Unknown	-80.150	82.110
Con A 3T	Unknown	Unknown	3.322	40.878
HSP60 3T	Unknown	Unknown	-82.740	148.52
PHA 3T	Unknown	Unknown	-40.705	115.63

CITOTOXIDADE hsp60 2T X 3T DNA FRAGMENTADO

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0118, considered significant.
 Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.757 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value	
Controle 2T vs HSP60 2T	-19.950	4.807	ns	P>0.05
Controle 2T vs Controle 3T	0.000	0.000	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 3T	-33.000	7.951	*	P<0.05
HSP60 2T vs Controle 3T	19.950	4.807	ns	P>0.05
HSP60 2T vs HSP60 3T	-13.050	3.144	ns	P>0.05
Controle 3T vs HSP60 3T	-33.000	7.951	*	P<0.05

MORFOLOGIA RODAMINA TERÇO 2 X TERÇO 3

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

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

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.757 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value	
POP R1 TERÇO2 vs POP R2 TERÇO 2	17.050	12.559	**	P<0.01
POP R1 TERÇO2 vs POP R1 TERÇO 3	-14.430	10.629	**	P<0.01
POP R1 TERÇO2 vs POP R2 TERÇO 3	46.130	33.979	***	P<0.001
POP R2 TERÇO 2 vs POP R1 TERÇO 3	-31.480	23.188	***	P<0.001
POP R2 TERÇO 2 vs POP R2 TERÇO 3	29.080	21.420	***	P<0.001
POP R1 TERÇO 3 vs POP R2 TERÇO 3	60.560	44.607	***	P<0.001

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
POP R1 TERÇO2 - POP R2 TERÇO 2	17.050	9.234	24.866
POP R1 TERÇO2 - POP R1 TERÇO 3	-14.430	-22.246	-6.614
POP R1 TERÇO2 - POP R2 TERÇO 3	46.130	38.314	53.946
POP R2 TERÇO 2 - POP R1 TERÇO 3	-31.480	-39.296	-23.664
POP R2 TERÇO 2 - POP R2 TERÇO 3	29.080	21.264	36.896
POP R1 TERÇO 3 - POP R2 TERÇO 3	60.560	52.744	68.376

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
POP R1 TERÇO2			Too few values to test.
POP R2 TERÇO 2			Too few values to test.
POP R1 TERÇO 3			Too few values to test.
POP R2 TERÇO 3			Too few values to test.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	4065.5	1355.2
Residuals (within columns)	4	14.745	3.686
Total	7	4080.3	

$F = 367.63 = (MStreatment / MSresidual)$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
POP R1 TERÇO2	2	50.610	2.206	1.560	Unknown
POP R2 TERÇO 2	2	33.560	1.131	0.7997	Unknown
POP R1 TERÇO 3	2	65.040	1.916	1.355	Unknown
POP R2 TERÇO 3	2	4.480	2.220	1.570	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
POP R1 TERÇO2	Unknown	Unknown	30.790	70.430
POP R2 TERÇO 2	Unknown	Unknown	23.399	43.721
POP R1 TERÇO 3	Unknown	Unknown	47.826	82.254
POP R2 TERÇO 3	Unknown	Unknown	-15.466	24.426

 RESPIRAÇÃO TERÇO 2 X TERÇO 3

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0032, considered very significant.
 Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.757 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value	
POP M1 TERÇO2 vs POP M2 TERÇO 2	32.090	7.414	*	P<0.05
POP M1 TERÇO2 vs POP M1 TERÇO 3	-9.530	2.202	ns	P>0.05
POP M1 TERÇO2 vs POP M2 TERÇO 3	39.920	9.223	**	P<0.01
POP M2 TERÇO 2 vs POP M1 TERÇO 3	-41.620	9.616	**	P<0.01
POP M2 TERÇO 2 vs POP M2 TERÇO 3	7.830	1.809	ns	P>0.05
POP M1 TERÇO 3 vs POP M2 TERÇO 3	49.450	11.425	**	P<0.01

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
POP M1 TERÇO2 - POP M2 TERÇO 2	32.090	7.173	57.007
POP M1 TERÇO2 - POP M1 TERÇO 3	-9.530	-34.447	15.387
POP M1 TERÇO2 - POP M2 TERÇO 3	39.920	15.003	64.837
POP M2 TERÇO 2 - POP M1 TERÇO 3	-41.620	-66.537	-16.703
POP M2 TERÇO 2 - POP M2 TERÇO 3	7.830	-17.087	32.747
POP M1 TERÇO 3 - POP M2 TERÇO 3	49.450	24.533	74.367

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
POP M1 TERÇO2			Too few values to test.
POP M2 TERÇO 2			Too few values to test.
POP M1 TERÇO 3			Too few values to test.
POP M2 TERÇO 3			Too few values to test.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	3	3476.5	1158.8
Residuals (within columns)	4	149.86	37.465
Total	7	3626.4	

$F = 30.931 = (MStreatment/MSresidual)$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
POP M1 TERÇO2	2	64.790	6.880	4.865	Unknown
POP M2 TERÇO 2	2	32.700	7.270	5.141	Unknown
POP M1 TERÇO 3	2	74.320	5.170	3.656	Unknown
POP M2 TERÇO 3	2	24.870	4.790	3.387	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
POP M1 TERÇO2	Unknown	Unknown	2.977	126.60
POP M2 TERÇO 2	Unknown	Unknown	-32.617	98.017
POP M1 TERÇO 3	Unknown	Unknown	27.870	120.77
POP M2 TERÇO 3	Unknown	Unknown	-18.166	67.906

FAGOCITOSE SG X PLACENTA

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

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

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 5.171 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
Controle sg 1T vs Positivo sg 1T	-5.190	2.518	ns P>0.05
Controle sg 1T vs HSP60 sg 1T	-2.000	0.9703	ns P>0.05
Controle sg 1T vs Controle sg 2t	-0.3800	0.2204	ns P>0.05
Controle sg 1T vs Positivo sg 2T	-3.180	1.844	ns P>0.05
Controle sg 1T vs HSP60 sg 2T	-1.920	0.9315	ns P>0.05
Controle sg 1T vs Controle sg 3T	-0.4500	0.2521	ns P>0.05
Controle sg 1T vs Positivo sg 3T	-2.210	1.238	ns P>0.05
Controle sg 1T vs HSP60 sg 3T	-1.370	0.7675	ns P>0.05
Controle sg 1T vs HSP60 sg 2T	-1.920	0.9315	ns P>0.05
Controle sg 1T vs Controle sg 3T	-0.4500	0.2521	ns P>0.05
Controle sg 1T vs Positivo sg 3T	-2.210	1.238	ns P>0.05
Controle sg 1T vs HSP60 sg 3T	-1.370	0.7675	ns P>0.05
Controle sg 1T vs Controle 1T	0.1000	0.05315	ns P>0.05
Controle sg 1T vs Positivo 1T	-9.150	4.863	ns P>0.05
Controle sg 1T vs HSP60 1T	-9.950	5.288	* P<0.05
Controle sg 1T vs Controle 2T	-6.580	3.816	ns P>0.05
Controle sg 1T vs Positivo 2T	-2.300	1.334	ns P>0.05
Controle sg 1T vs HSP60 2T	-3.470	2.012	ns P>0.05
Controle sg 1T vs Controle 3T	-0.2400	0.1452	ns P>0.05
Controle sg 1T vs Positivo 3T	-5.010	3.032	ns P>0.05
Controle sg 1T vs HSP60 3T	-5.510	3.334	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs HSP60 sg 1T	3.190	1.548	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs Controle sg 2t	4.810	2.789	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs Positivo sg 2T	2.010	1.166	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs HSP60 sg 2T	3.270	1.587	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs Controle sg 3T	4.740	2.655	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs Positivo sg 3T	2.980	1.669	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs HSP60 sg 3T	3.820	2.140	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs Controle 1T	5.290	2.812	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs Positivo 1T	-3.960	2.105	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs HSP60 1T	-4.760	2.530	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs Controle 2T	-1.390	0.8060	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs Positivo 2T	2.890	1.676	ns P>0.05
Positivo sg 1T vs HSP60 2T	1.720	0.9974	ns P>0.05

Positivo sg 1T vs HSP60 2T	1.720	0.9974	ns	P>0.05
Positivo sg 1T vs Controle 3T	4.950	2.995	ns	P>0.05
Positivo sg 1T vs Positivo 3T	0.1800	0.1089	ns	P>0.05
Positivo sg 1T vs HSP60 3T	-0.3200	0.1936	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs Controle sg 2t	1.620	0.9394	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs Positivo sg 2T	-1.180	0.6843	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs HSP60 sg 2T	0.08000	0.03881	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs Controle sg 3T	1.550	0.8683	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs Positivo sg 3T	-0.2100	0.1176	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs HSP60 sg 3T	0.6300	0.3529	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs Controle 1T	2.100	1.116	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs Positivo 1T	-7.150	3.800	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs HSP60 1T	-7.950	4.225	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs Controle 2T	-4.580	2.656	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs Positivo 2T	-0.3000	0.1740	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs HSP60 2T	-1.470	0.8524	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs Controle 3T	1.760	1.065	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs Positivo 3T	-3.010	1.821	ns	P>0.05
HSP60 sg 1T vs HSP60 3T	-3.510	2.124	ns	P>0.05
Controle sg 2t vs Positivo sg 2T	-2.800	2.148	ns	P>0.05
Controle sg 2t vs HSP60 sg 2T	-1.540	0.8930	ns	P>0.05
Controle sg 2t vs Controle sg 3T	-0.07000	0.05063	ns	P>0.05
Controle sg 2t vs Positivo sg 3T	-1.830	1.324	ns	P>0.05
Controle sg 2t vs HSP60 sg 3T	-0.9900	0.7160	ns	P>0.05
Controle sg 2t vs Controle 1T	0.4800	0.3189	ns	P>0.05
Controle sg 2t vs Positivo 1T	-8.770	5.826	*	P<0.05

Controle sg 2t vs Positivo 1T	-8.770	5.826	*	P<0.05
Controle sg 2t vs HSP60 1T	-9.570	6.358	**	P<0.01
Controle sg 2t vs Controle 2T	-6.200	4.756	ns	P>0.05
Controle sg 2t vs Positivo 2T	-1.920	1.473	ns	P>0.05
Controle sg 2t vs HSP60 2T	-3.090	2.370	ns	P>0.05
Controle sg 2t vs Controle 3T	0.1400	0.1160	ns	P>0.05
Controle sg 2t vs Positivo 3T	-4.630	3.836	ns	P>0.05
Controle sg 2t vs HSP60 3T	-5.130	4.251	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs HSP60 sg 2T	1.260	0.7307	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs Controle sg 3T	2.730	1.974	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs Positivo sg 3T	0.9700	0.7015	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs HSP60 sg 3T	1.810	1.309	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs Controle 1T	3.280	2.179	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs Positivo 1T	-5.970	3.966	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs HSP60 1T	-6.770	4.498	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs Controle 2T	-3.400	2.608	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs Positivo 2T	0.8800	0.6751	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs HSP60 2T	-0.2900	0.2225	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs Controle 3T	2.940	2.436	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs Positivo 3T	-1.830	1.516	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs HSP60 3T	-2.330	1.931	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs Controle sg 3T	1.470	0.8235	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs Positivo sg 3T	-0.2900	0.1625	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs HSP60 sg 3T	0.5500	0.3081	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs Controle 1T	2.020	1.074	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs Positivo 1T	-7.230	3.843	ns	P>0.05

HSP60 sg 2T vs Positivo 1T	-7.230	3.843	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs HSP60 1T	-8.030	4.268	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs Controle 2T	-4.660	2.702	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs Positivo 2T	-0.3800	0.2204	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs HSP60 2T	-1.550	0.8988	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs Controle 3T	1.680	1.017	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs Positivo 3T	-3.090	1.870	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs HSP60 3T	-3.590	2.172	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs Positivo sg 3T	-1.760	1.208	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs HSP60 sg 3T	-0.9200	0.6312	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs Controle 1T	0.5500	0.3494	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs Positivo 1T	-8.700	5.527	*	P<0.05
Controle sg 3T vs HSP60 1T	-9.500	6.035	**	P<0.01
Controle sg 3T vs Controle 2T	-6.130	4.434	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs Positivo 2T	-1.850	1.338	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs HSP60 2T	-3.020	2.184	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs Controle 3T	0.2100	0.1626	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs Positivo 3T	-4.560	3.530	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs HSP60 3T	-5.060	3.917	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs HSP60 sg 3T	0.8400	0.5764	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs Controle 1T	2.310	1.467	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs Positivo 1T	-6.940	4.409	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs HSP60 1T	-7.740	4.917	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs Controle 2T	-4.370	3.161	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs Positivo 2T	-0.09000	0.06509	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs HSP60 2T	-1.260	0.9113	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs HSP60 2T	-1.260	0.9113	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs Controle 3T	1.970	1.525	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs Positivo 3T	-2.800	2.167	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs HSP60 3T	-3.300	2.554	ns	P>0.05
HSP60 sg 3T vs Controle 1T	1.470	0.9338	ns	P>0.05
HSP60 sg 3T vs Positivo 1T	-7.780	4.942	ns	P>0.05
HSP60 sg 3T vs HSP60 1T	-8.580	5.450	*	P<0.05
HSP60 sg 3T vs Controle 2T	-5.210	3.768	ns	P>0.05
HSP60 sg 3T vs Positivo 2T	-0.9300	0.6726	ns	P>0.05
HSP60 sg 3T vs HSP60 2T	-2.100	1.519	ns	P>0.05
HSP60 sg 3T vs Controle 3T	1.130	0.8747	ns	P>0.05
HSP60 sg 3T vs Positivo 3T	-3.640	2.818	ns	P>0.05
HSP60 sg 3T vs HSP60 3T	-4.140	3.205	ns	P>0.05
Controle 1T vs Positivo 1T	-9.250	5.496	*	P<0.05
Controle 1T vs HSP60 1T	-10.050	5.972	**	P<0.01
Controle 1T vs Controle 2T	-6.680	4.438	ns	P>0.05
Controle 1T vs Positivo 2T	-2.400	1.594	ns	P>0.05
Controle 1T vs HSP60 2T	-3.570	2.372	ns	P>0.05
Controle 1T vs Controle 3T	-0.3400	0.2390	ns	P>0.05
Controle 1T vs Positivo 3T	-5.110	3.593	ns	P>0.05
Controle 1T vs HSP60 3T	-5.610	3.944	ns	P>0.05
Positivo 1T vs HSP60 1T	-0.8000	0.4754	ns	P>0.05
Positivo 1T vs Controle 2T	2.570	1.707	ns	P>0.05
Positivo 1T vs Positivo 2T	6.850	4.551	ns	P>0.05
Positivo 1T vs HSP60 2T	5.680	3.773	ns	P>0.05
Positivo 1T vs Controle 3T	8.910	6.264	**	P<0.01

Positivo 1T vs Positivo 3T	4.140	2.911	ns	P>0.05
Positivo 1T vs HSP60 3T	3.640	2.559	ns	P>0.05
HSP60 1T vs Controle 2T	3.370	2.239	ns	P>0.05
HSP60 1T vs Positivo 2T	7.650	5.082	ns	P>0.05
HSP60 1T vs HSP60 2T	6.480	4.305	ns	P>0.05
HSP60 1T vs Controle 3T	9.710	6.827	**	P<0.01
HSP60 1T vs Positivo 3T	4.940	3.473	ns	P>0.05
HSP60 1T vs HSP60 3T	4.440	3.122	ns	P>0.05
Controle 2T vs Positivo 2T	4.280	3.283	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 2T	3.110	2.386	ns	P>0.05
Controle 2T vs Controle 3T	6.340	5.253	*	P<0.05
Controle 2T vs Positivo 3T	1.570	1.301	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 3T	1.070	0.8866	ns	P>0.05
Positivo 2T vs HSP60 2T	-1.170	0.8975	ns	P>0.05
Positivo 2T vs Controle 3T	2.060	1.707	ns	P>0.05
Positivo 2T vs Positivo 3T	-2.710	2.245	ns	P>0.05
Positivo 2T vs HSP60 3T	-3.210	2.660	ns	P>0.05
HSP60 2T vs Controle 3T	3.230	2.676	ns	P>0.05
HSP60 2T vs Positivo 3T	-1.540	1.276	ns	P>0.05
HSP60 2T vs HSP60 3T	-2.040	1.690	ns	P>0.05
Controle 3T vs Positivo 3T	-4.770	4.330	ns	P>0.05
Controle 3T vs HSP60 3T	-5.270	4.783	ns	P>0.05
Positivo 3T vs HSP60 3T	-0.5000	0.4538	ns	P>0.05

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
Controle sg 1T - Positivo sg 1T	-5.190	-15.848	5.468
Controle sg 1T - HSP60 sg 1T	-2.000	-12.658	8.658
Controle sg 1T - Controle sg 2t	-0.3800	-9.297	8.537
Controle sg 1T - Positivo sg 2T	-3.180	-12.097	5.737
Controle sg 1T - HSP60 sg 2T	-1.920	-12.578	8.738
Controle sg 1T - Controle sg 3T	-0.4500	-9.680	8.780
Controle sg 1T - Positivo sg 3T	-2.210	-11.440	7.020
Controle sg 1T - HSP60 sg 3T	-1.370	-10.600	7.860
Controle sg 1T - Controle 1T	0.1000	-9.629	9.829
Controle sg 1T - Positivo 1T	-9.150	-18.879	0.5791
Controle sg 1T - HSP60 1T	-9.950	-19.679	-0.2209
Controle sg 1T - Controle 2T	-6.580	-15.497	2.337
Controle sg 1T - Positivo 2T	-2.300	-11.217	6.617
Controle sg 1T - HSP60 2T	-3.470	-12.387	5.447
Controle sg 1T - Controle 3T	-0.2400	-8.785	8.305
Controle sg 1T - Positivo 3T	-5.010	-13.555	3.535
Controle sg 1T - HSP60 3T	-5.510	-14.055	3.035
Positivo sg 1T - HSP60 sg 1T	3.190	-7.468	13.848
Positivo sg 1T - Controle sg 2t	4.810	-4.107	13.727
Positivo sg 1T - Positivo sg 2T	2.010	-6.907	10.927
Positivo sg 1T - HSP60 sg 2T	3.270	-7.388	13.928
Positivo sg 1T - Controle sg 3T	4.740	-4.490	13.970
Positivo sg 1T - Positivo sg 3T	2.980	-6.250	12.210

Positivo sg 1T - Positivo sg 3T	2.980	-6.250	12.210
Positivo sg 1T - HSP60 sg 3T	3.820	-5.410	13.050
Positivo sg 1T - Controle 1T	5.290	-4.439	15.019
Positivo sg 1T - Positivo 1T	-3.960	-13.689	5.769
Positivo sg 1T - HSP60 1T	-4.760	-14.489	4.969
Positivo sg 1T - Controle 2T	-1.390	-10.307	7.527
Positivo sg 1T - Positivo 2T	2.890	-6.027	11.807
Positivo sg 1T - HSP60 2T	1.720	-7.197	10.637
Positivo sg 1T - Controle 3T	4.950	-3.595	13.495
Positivo sg 1T - Positivo 3T	0.1800	-8.365	8.725
Positivo sg 1T - HSP60 3T	-0.3200	-8.865	8.225
HSP60 sg 1T - Controle sg 2t	1.620	-7.297	10.537
HSP60 sg 1T - Positivo sg 2T	-1.180	-10.097	7.737
HSP60 sg 1T - HSP60 sg 2T	0.08000	-10.578	10.738
HSP60 sg 1T - Controle sg 3T	1.550	-7.680	10.780
HSP60 sg 1T - Positivo sg 3T	-0.2100	-9.440	9.020
HSP60 sg 1T - HSP60 sg 3T	0.6300	-8.600	9.860
HSP60 sg 1T - Controle 1T	2.100	-7.629	11.829
HSP60 sg 1T - Positivo 1T	-7.150	-16.879	2.579
HSP60 sg 1T - HSP60 1T	-7.950	-17.679	1.779
HSP60 sg 1T - Controle 2T	-4.580	-13.497	4.337
HSP60 sg 1T - Positivo 2T	-0.3000	-9.217	8.617
HSP60 sg 1T - HSP60 2T	-1.470	-10.387	7.447
HSP60 sg 1T - Controle 3T	1.760	-6.785	10.305
HSP60 sg 1T - Positivo 3T	-3.010	-11.555	5.535
HSP60 sg 1T - HSP60 3T	-3.510	-12.055	5.035

HSP60 sg 1T - HSP60 3T	-3.510	-12.055	5.035
Controle sg 2t - Positivo sg 2T	-2.800	-9.541	3.941
Controle sg 2t - HSP60 sg 2T	-1.540	-10.457	7.377
Controle sg 2t - Controle sg 3T	-0.07000	-7.219	7.079
Controle sg 2t - Positivo sg 3T	-1.830	-8.979	5.319
Controle sg 2t - HSP60 sg 3T	-0.9900	-8.139	6.159
Controle sg 2t - Controle 1T	0.4800	-7.303	8.263
Controle sg 2t - Positivo 1T	-8.770	-16.553	-0.9867
Controle sg 2t - HSP60 1T	-9.570	-17.353	-1.787
Controle sg 2t - Controle 2T	-6.200	-12.941	0.5405
Controle sg 2t - Positivo 2T	-1.920	-8.661	4.821
Controle sg 2t - HSP60 2T	-3.090	-9.831	3.651
Controle sg 2t - Controle 3T	0.1400	-6.101	6.381
Controle sg 2t - Positivo 3T	-4.630	-10.871	1.611
Controle sg 2t - HSP60 3T	-5.130	-11.371	1.111
Positivo sg 2T - HSP60 sg 2T	1.260	-7.657	10.177
Positivo sg 2T - Controle sg 3T	2.730	-4.419	9.879
Positivo sg 2T - Positivo sg 3T	0.9700	-6.179	8.119
Positivo sg 2T - HSP60 sg 3T	1.810	-5.339	8.959
Positivo sg 2T - Controle 1T	3.280	-4.503	11.063
Positivo sg 2T - Positivo 1T	-5.970	-13.753	1.813
Positivo sg 2T - HSP60 1T	-6.770	-14.553	1.013
Positivo sg 2T - Controle 2T	-3.400	-10.141	3.341
Positivo sg 2T - Positivo 2T	0.8800	-5.861	7.621
Positivo sg 2T - HSP60 2T	-0.2900	-7.031	6.451
Positivo sg 2T - Controle 3T	2.940	-3.301	9.181

Positivo sg 2T - Controle 3T	2.940	-3.301	9.181
Positivo sg 2T - Positivo 3T	-1.830	-8.071	4.411
Positivo sg 2T - HSP60 3T	-2.330	-8.571	3.911
HSP60 sg 2T - Controle sg 3T	1.470	-7.760	10.700
HSP60 sg 2T - Positivo sg 3T	-0.2900	-9.520	8.940
HSP60 sg 2T - HSP60 sg 3T	0.5500	-8.680	9.780
HSP60 sg 2T - Controle 1T	2.020	-7.709	11.749
HSP60 sg 2T - Positivo 1T	-7.230	-16.959	2.499
HSP60 sg 2T - HSP60 1T	-8.030	-17.759	1.699
HSP60 sg 2T - Controle 2T	-4.660	-13.577	4.257
HSP60 sg 2T - Positivo 2T	-0.3800	-9.297	8.537
HSP60 sg 2T - HSP60 2T	-1.550	-10.467	7.367
HSP60 sg 2T - Controle 3T	1.680	-6.865	10.225
HSP60 sg 2T - Positivo 3T	-3.090	-11.635	5.455
HSP60 sg 2T - HSP60 3T	-3.590	-12.135	4.955
Controle sg 3T - Positivo sg 3T	-1.760	-9.296	5.776
Controle sg 3T - HSP60 sg 3T	-0.9200	-8.456	6.616
Controle sg 3T - Controle 1T	0.5500	-7.590	8.690
Controle sg 3T - Positivo 1T	-8.700	-16.840	-0.5600
Controle sg 3T - HSP60 1T	-9.500	-17.640	-1.360
Controle sg 3T - Controle 2T	-6.130	-13.279	1.019
Controle sg 3T - Positivo 2T	-1.850	-8.999	5.299
Controle sg 3T - HSP60 2T	-3.020	-10.169	4.129
Controle sg 3T - Controle 3T	0.2100	-6.470	6.890
Controle sg 3T - Positivo 3T	-4.560	-11.240	2.120
Controle sg 3T - HSP60 3T	-5.060	-11.740	1.620
Positivo sg 3T - HSP60 sg 3T	0.8400	-6.696	8.376
Positivo sg 3T - Controle 1T	2.310	-5.830	10.450
Positivo sg 3T - Positivo 1T	-6.940	-15.080	1.200
Positivo sg 3T - HSP60 1T	-7.740	-15.880	0.4000
Positivo sg 3T - Controle 2T	-4.370	-11.519	2.779
Positivo sg 3T - Positivo 2T	-0.09000	-7.239	7.059
Positivo sg 3T - HSP60 2T	-1.260	-8.409	5.889
Positivo sg 3T - Controle 3T	1.970	-4.710	8.650
Positivo sg 3T - Positivo 3T	-2.800	-9.480	3.880
Positivo sg 3T - HSP60 3T	-3.300	-9.980	3.380
HSP60 sg 3T - Controle 1T	1.470	-6.670	9.610
HSP60 sg 3T - Positivo 1T	-7.780	-15.920	0.3600
HSP60 sg 3T - HSP60 1T	-8.580	-16.720	-0.4400
HSP60 sg 3T - Controle 2T	-5.210	-12.359	1.939
HSP60 sg 3T - Positivo 2T	-0.9300	-8.079	6.219
HSP60 sg 3T - HSP60 2T	-2.100	-9.249	5.049
HSP60 sg 3T - Controle 3T	1.130	-5.550	7.810
HSP60 sg 3T - Positivo 3T	-3.640	-10.320	3.040
HSP60 sg 3T - HSP60 3T	-4.140	-10.820	2.540
Controle 1T - Positivo 1T	-9.250	-17.952	-0.5480
Controle 1T - HSP60 1T	-10.050	-18.752	-1.348
Controle 1T - Controle 2T	-6.680	-14.463	1.103
Controle 1T - Positivo 2T	-2.400	-10.183	5.383
Controle 1T - HSP60 2T	-3.570	-11.353	4.213
Controle 1T - Controle 3T	-0.3400	-7.695	7.015
Controle 1T - Positivo 3T	-5.110	-12.465	2.245

Controle 1T - Positivo 3T	-5.110	-12.465	2.245
Controle 1T - HSP60 3T	-5.610	-12.965	1.745
Positivo 1T - HSP60 1T	-0.8000	-9.502	7.902
Positivo 1T - Controle 2T	2.570	-5.213	10.353
Positivo 1T - Positivo 2T	6.850	-0.9333	14.633
Positivo 1T - HSP60 2T	5.680	-2.103	13.463
Positivo 1T - Controle 3T	8.910	1.555	16.265
Positivo 1T - Positivo 3T	4.140	-3.215	11.495
Positivo 1T - HSP60 3T	3.640	-3.715	10.995
HSP60 1T - Controle 2T	3.370	-4.413	11.153
HSP60 1T - Positivo 2T	7.650	-0.1333	15.433
HSP60 1T - HSP60 2T	6.480	-1.303	14.263
HSP60 1T - Controle 3T	9.710	2.355	17.065
HSP60 1T - Positivo 3T	4.940	-2.415	12.295
HSP60 1T - HSP60 3T	4.440	-2.915	11.795
Controle 2T - Positivo 2T	4.280	-2.461	11.021
Controle 2T - HSP60 2T	3.110	-3.631	9.851
Controle 2T - Controle 3T	6.340	0.09946	12.581
Controle 2T - Positivo 3T	1.570	-4.671	7.811
Controle 2T - HSP60 3T	1.070	-5.171	7.311
Positivo 2T - HSP60 2T	-1.170	-7.911	5.571
Positivo 2T - Controle 3T	2.060	-4.181	8.301
Positivo 2T - Positivo 3T	-2.710	-8.951	3.531
Positivo 2T - HSP60 3T	-3.210	-9.451	3.031
HSP60 2T - Controle 3T	3.230	-3.011	9.471
HSP60 2T - Positivo 3T	-1.540	-7.781	4.701
HSP60 2T - HSP60 3T	-2.040	-8.281	4.201
Controle 3T - Positivo 3T	-4.770	-10.467	0.9268
Controle 3T - HSP60 3T	-5.270	-10.967	0.4268
Positivo 3T - HSP60 3T	-0.5000	-6.197	5.197

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle sg 1T			Too few values to test.
Positivo sg 1T			Too few values to test.
HSP60 sg 1T			Too few values to test.
Controle sg 2t			Normality test requires raw data.
Positivo sg 2T			Normality test requires raw data.
HSP60 sg 2T			Too few values to test.
Controle sg 3T			Too few values to test.
Positivo sg 3T			Too few values to test.
HSP60 sg 3T			Too few values to test.
Controle 1T			Too few values to test.
Positivo 1T			Too few values to test.
HSP60 1T			Too few values to test.
Controle 2T			Normality test requires raw data.
Positivo 2T			Normality test requires raw data.
HSP60 2T			Normality test requires raw data.
Controle 3T			Normality test requires raw data.
Positivo 3T			Normality test requires raw data.
HSP60 3T			Normality test requires raw data.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	17	580.09	34.123
Residuals (within columns)	57	484.31	8.497
Total	74	1064.4	

$$F = 4.016 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle sg 1T	2	1.500	0.03000	0.02121	Unknown
Positivo sg 1T	2	6.690	1.950	1.379	Unknown
HSP60 sg 1T	2	3.500	0.5400	0.3818	Unknown
Controle sg 2t	5	1.880	0.2600	0.1163	Unknown
Positivo sg 2T	5	4.680	1.400	0.6261	Unknown
HSP60 sg 2T	2	3.420	2.730	1.930	Unknown
Controle sg 3T	4	1.950	0.2700	0.1350	Unknown
Positivo sg 3T	4	3.710	0.9100	0.4550	Unknown
HSP60 sg 3T	4	2.870	1.690	0.8450	Unknown
HSP60 sg 3T	4	2.870	1.690	0.8450	Unknown
Controle 1T	3	1.400	0.2400	0.1386	Unknown
Positivo 1T	3	10.650	5.650	3.262	Unknown
HSP60 1T	3	11.450	7.290	4.209	Unknown
Controle 2T	5	8.080	4.990	2.232	Unknown
Positivo 2T	5	3.800	1.100	0.4919	Unknown
HSP60 2T	5	4.970	2.620	1.172	Unknown
Controle 3T	7	1.740	0.1700	0.06425	Unknown
Positivo 3T	7	6.510	3.400	1.285	Unknown
HSP60 3T	7	7.010	3.690	1.395	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle sg 1T	Unknown	Unknown	1.230	1.770
Positivo sg 1T	Unknown	Unknown	-10.830	24.210
HSP60 sg 1T	Unknown	Unknown	-1.352	8.352
Controle sg 2t	Unknown	Unknown	1.557	2.203
Positivo sg 2T	Unknown	Unknown	2.942	6.418
HSP60 sg 2T	Unknown	Unknown	-21.108	27.948
Controle sg 3T	Unknown	Unknown	1.520	2.380
Positivo sg 3T	Unknown	Unknown	2.262	5.158
HSP60 sg 3T	Unknown	Unknown	0.1812	5.559
Controle 1T	Unknown	Unknown	0.8038	1.996
Positivo 1T	Unknown	Unknown	-3.387	24.687
HSP60 1T	Unknown	Unknown	-6.661	29.561
Controle 2T	Unknown	Unknown	1.885	14.275
Positivo 2T	Unknown	Unknown	2.434	5.166
HSP60 2T	Unknown	Unknown	1.717	8.223
Controle 3T	Unknown	Unknown	1.583	1.897
Positivo 3T	Unknown	Unknown	3.365	9.655
HSP60 3T	Unknown	Unknown	3.597	10.423

FAGOCITOSE PLACENTA

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0018, considered very significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.669 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
Controle 1T vs Positivo 1T	-9.250	4.515	ns	P>0.05
Controle 1T vs HSP60 1T	-10.050	4.905	*	P<0.05
Controle 1T vs Controle 2T	-6.680	3.645	ns	P>0.05
Controle 1T vs Positivo 2T	-2.400	1.310	ns	P>0.05
Controle 1T vs HSP60 2T	-3.570	1.948	ns	P>0.05
Controle 1T vs Controle 3T	-0.3400	0.1963	ns	P>0.05
Controle 1T vs Positivo 3T	-5.110	2.951	ns	P>0.05
Controle 1T vs HSP60 3T	-5.610	3.240	ns	P>0.05

Controle 1T vs HSP60 3T	-5.610	3.240	ns	P>0.05
Positivo 1T vs HSP60 1T	-0.8000	0.3905	ns	P>0.05
Positivo 1T vs Controle 2T	2.570	1.402	ns	P>0.05
Positivo 1T vs Positivo 2T	6.850	3.738	ns	P>0.05
Positivo 1T vs HSP60 2T	5.680	3.099	ns	P>0.05
Positivo 1T vs Controle 3T	8.910	5.145	*	P<0.05
Positivo 1T vs Positivo 3T	4.140	2.391	ns	P>0.05
Positivo 1T vs HSP60 3T	3.640	2.102	ns	P>0.05
HSP60 1T vs Controle 2T	3.370	1.839	ns	P>0.05
HSP60 1T vs Positivo 2T	7.650	4.174	ns	P>0.05
HSP60 1T vs HSP60 2T	6.480	3.536	ns	P>0.05
HSP60 1T vs Controle 3T	9.710	5.607	**	P<0.01
HSP60 1T vs Positivo 3T	4.940	2.853	ns	P>0.05
HSP60 1T vs HSP60 3T	4.440	2.564	ns	P>0.05
Controle 2T vs Positivo 2T	4.280	2.697	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 2T	3.110	1.960	ns	P>0.05
Controle 2T vs Controle 3T	6.340	4.315	ns	P>0.05
Controle 2T vs Positivo 3T	1.570	1.069	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 3T	1.070	0.7282	ns	P>0.05
Positivo 2T vs HSP60 2T	-1.170	0.7372	ns	P>0.05
Positivo 2T vs Controle 3T	2.060	1.402	ns	P>0.05
Positivo 2T vs Positivo 3T	-2.710	1.844	ns	P>0.05
Positivo 2T vs HSP60 3T	-3.210	2.185	ns	P>0.05
HSP60 2T vs Controle 3T	3.230	2.198	ns	P>0.05
HSP60 2T vs Positivo 3T	-1.540	1.048	ns	P>0.05
HSP60 2T vs HSP60 3T	-2.040	1.388	ns	P>0.05
Controle 3T vs Positivo 3T	-4.770	3.556	ns	P>0.05
Controle 3T vs HSP60 3T	-5.270	3.929	ns	P>0.05
Positivo 3T vs HSP60 3T	-0.5000	0.3728	ns	P>0.05

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
Controle 1T - Positivo 1T	-9.250	-18.816	0.3162
Controle 1T - HSP60 1T	-10.050	-19.616	-0.4838
Controle 1T - Controle 2T	-6.680	-15.236	1.876
Controle 1T - Positivo 2T	-2.400	-10.956	6.156
Controle 1T - HSP60 2T	-3.570	-12.126	4.986
Controle 1T - Controle 3T	-0.3400	-8.425	7.745
Controle 1T - Positivo 3T	-5.110	-13.195	2.975
Controle 1T - HSP60 3T	-5.610	-13.695	2.475
Positivo 1T - HSP60 1T	-0.8000	-10.366	8.766
Positivo 1T - Controle 2T	2.570	-5.986	11.126
Positivo 1T - Positivo 2T	6.850	-1.706	15.406
Positivo 1T - HSP60 2T	5.680	-2.876	14.236
Positivo 1T - Controle 3T	8.910	0.8250	16.995
Positivo 1T - Positivo 3T	4.140	-3.945	12.225
Positivo 1T - HSP60 3T	3.640	-4.445	11.725
HSP60 1T - Controle 2T	3.370	-5.186	11.926
HSP60 1T - Positivo 2T	7.650	-0.9063	16.206
HSP60 1T - HSP60 2T	6.480	-2.076	15.036
HSP60 1T - Controle 3T	9.710	1.625	17.795

HSP60 1T - Controle 3T	9.710	1.625	17.795
HSP60 1T - Positivo 3T	4.940	-3.145	13.025
HSP60 1T - HSP60 3T	4.440	-3.645	12.525
Controle 2T - Positivo 2T	4.280	-3.130	11.690
Controle 2T - HSP60 2T	3.110	-4.300	10.520
Controle 2T - Controle 3T	6.340	-0.5203	13.200
Controle 2T - Positivo 3T	1.570	-5.290	8.430
Controle 2T - HSP60 3T	1.070	-5.790	7.930
Positivo 2T - HSP60 2T	-1.170	-8.580	6.240
Positivo 2T - Controle 3T	2.060	-4.800	8.920
Positivo 2T - Positivo 3T	-2.710	-9.570	4.150
Positivo 2T - HSP60 3T	-3.210	-10.070	3.650
HSP60 2T - Controle 3T	3.230	-3.630	10.090
HSP60 2T - Positivo 3T	-1.540	-8.400	5.320
HSP60 2T - HSP60 3T	-2.040	-8.900	4.820
Controle 3T - Positivo 3T	-4.770	-11.033	1.493
Controle 3T - HSP60 3T	-5.270	-11.533	0.9926
Positivo 3T - HSP60 3T	-0.5000	-6.763	5.763

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle 1T	Too few values to test.		
Positivo 1T	Too few values to test.		
HSP60 1T	Too few values to test.		
Controle 2T	Normality test requires raw data.		
Positivo 2T	Normality test requires raw data.		
HSP60 2T	Normality test requires raw data.		
Controle 3T	Normality test requires raw data.		
Positivo 3T	Normality test requires raw data.		
HSP60 3T	Normality test requires raw data.		

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle 1T	Too few values	to test.	
Positivo 1T	Too few values	to test.	
HSP60 1T	Too few values	to test.	
Controle 2T	Normality test	requires raw data.	
Positivo 2T	Normality test	requires raw data.	
HSP60 2T	Normality test	requires raw data.	
Controle 3T	Normality test	requires raw data.	
Positivo 3T	Normality test	requires raw data.	
HSP60 3T	Normality test	requires raw data.	

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	8	403.01	50.376
Residuals (within columns)	36	453.38	12.594
Total	44	856.38	

$$F = 4.000 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle 1T	3	1.400	0.2400	0.1386	Unknown
Positivo 1T	3	10.650	5.650	3.262	Unknown
HSP60 1T	3	11.450	7.290	4.209	Unknown
Controle 2T	5	8.080	4.990	2.232	Unknown
Positivo 2T	5	3.800	1.100	0.4919	Unknown
HSP60 2T	5	4.970	2.620	1.172	Unknown
Controle 3T	7	1.740	0.1700	0.06425	Unknown
Positivo 3T	7	6.510	3.400	1.285	Unknown
HSP60 3T	7	7.010	3.690	1.395	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle 1T	Unknown	Unknown	0.8038	1.996
Positivo 1T	Unknown	Unknown	-3.387	24.687
HSP60 1T	Unknown	Unknown	-6.661	29.561
Controle 2T	Unknown	Unknown	1.885	14.275
Positivo 2T	Unknown	Unknown	2.434	5.166
HSP60 2T	Unknown	Unknown	1.717	8.223
Controle 3T	Unknown	Unknown	1.583	1.897

Positivo 1T	3	10.650	5.650	3.262	Unknown
HSP60 1T	3	11.450	7.290	4.209	Unknown
Controle 2T	5	8.080	4.990	2.232	Unknown
Positivo 2T	5	3.800	1.100	0.4919	Unknown
HSP60 2T	5	4.970	2.620	1.172	Unknown
Controle 3T	7	1.740	0.1700	0.06425	Unknown
Positivo 3T	7	6.510	3.400	1.285	Unknown
HSP60 3T	7	7.010	3.690	1.395	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle 1T	Unknown	Unknown	0.8038	1.996
Positivo 1T	Unknown	Unknown	-3.387	24.687
HSP60 1T	Unknown	Unknown	-6.661	29.561
Controle 2T	Unknown	Unknown	1.885	14.275
Positivo 2T	Unknown	Unknown	2.434	5.166
HSP60 2T	Unknown	Unknown	1.717	8.223
Controle 3T	Unknown	Unknown	1.583	1.897
Positivo 3T	Unknown	Unknown	3.365	9.655
HSP60 3T	Unknown	Unknown	3.597	10.423

BANGUE

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0219, considered significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.874 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
Controle 1T vs Positivo 1T	-6.860	5.094	* P<0.05
Controle 1T vs HSP60 1T	-2.000	1.485	ns P>0.05
Controle 1T vs Controle 2T	-0.3800	0.3372	ns P>0.05
Controle 1T vs Positivo 2T	-3.180	2.822	ns P>0.05
Controle 1T vs HSP60 2T	-1.920	1.426	ns P>0.05
Controle 1T vs controle 3T	-0.4500	0.3858	ns P>0.05
Controle 1T vs Positivo 3T	-2.210	1.895	ns P>0.05
Controle 1T vs HSP60 3T	-1.370	1.175	ns P>0.05

Controle 1T vs Positivo 2T	-3.180	2.822	ns	P>0.05
Controle 1T vs HSP60 2T	-1.920	1.426	ns	P>0.05
Controle 1T vs controle 3T	-0.4500	0.3858	ns	P>0.05
Controle 1T vs Positivo 3T	-2.210	1.895	ns	P>0.05
Controle 1T vs HSP60 3T	-1.370	1.175	ns	P>0.05
Positivo 1T vs HSP60 1T	4.860	3.609	ns	P>0.05
Positivo 1T vs Controle 2T	6.480	5.751	*	P<0.05
Positivo 1T vs Positivo 2T	3.680	3.266	ns	P>0.05
Positivo 1T vs HSP60 2T	4.940	3.668	ns	P>0.05
Positivo 1T vs controle 3T	6.410	5.496	*	P<0.05
Positivo 1T vs Positivo 3T	4.650	3.987	ns	P>0.05
Positivo 1T vs HSP60 3T	5.490	4.707	ns	P>0.05
HSP60 1T vs Controle 2T	1.620	1.438	ns	P>0.05
HSP60 1T vs Positivo 2T	-1.180	1.047	ns	P>0.05
HSP60 1T vs HSP60 2T	0.08000	0.05940	ns	P>0.05
HSP60 1T vs controle 3T	1.550	1.329	ns	P>0.05
HSP60 1T vs Positivo 3T	-0.2100	0.1800	ns	P>0.05
HSP60 1T vs HSP60 3T	0.6300	0.5401	ns	P>0.05
Controle 2T vs Positivo 2T	-2.800	3.287	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 2T	-1.540	1.367	ns	P>0.05
Controle 2T vs controle 3T	-0.07000	0.07748	ns	P>0.05
Controle 2T vs Positivo 3T	-1.830	2.026	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 3T	-0.9900	1.096	ns	P>0.05
Positivo 2T vs HSP60 2T	1.260	1.118	ns	P>0.05
Positivo 2T vs controle 3T	2.730	3.022	ns	P>0.05
Positivo 2T vs Positivo 3T	0.9700	1.074	ns	P>0.05
Positivo 2T vs HSP60 3T	1.810	2.003	ns	P>0.05
HSP60 2T vs controle 3T	1.470	1.260	ns	P>0.05
HSP60 2T vs Positivo 3T	-0.2900	0.2486	ns	P>0.05
HSP60 2T vs HSP60 3T	0.5500	0.4716	ns	P>0.05
controle 3T vs Positivo 3T	-1.760	1.848	ns	P>0.05
controle 3T vs HSP60 3T	-0.9200	0.9661	ns	P>0.05
Positivo 3T vs HSP60 3T	0.8400	0.8820	ns	P>0.05

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
Controle 1T - Positivo 1T	-6.860	-13.424	-0.2961
Controle 1T - HSP60 1T	-2.000	-8.564	4.564
Controle 1T - Controle 2T	-0.3800	-5.872	5.112
Controle 1T - Positivo 2T	-3.180	-8.672	2.312
Controle 1T - HSP60 2T	-1.920	-8.484	4.644
Controle 1T - controle 3T	-0.4500	-6.135	5.235
Controle 1T - Positivo 3T	-2.210	-7.895	3.475
Controle 1T - HSP60 3T	-1.370	-7.055	4.315
Positivo 1T - HSP60 1T	4.860	-1.704	11.424
Positivo 1T - Controle 2T	6.480	0.9882	11.972
Positivo 1T - Positivo 2T	3.680	-1.812	9.172
Positivo 1T - HSP60 2T	4.940	-1.624	11.504
Positivo 1T - controle 3T	6.410	0.7255	12.095
Positivo 1T - Positivo 3T	4.650	-1.035	10.335
Positivo 1T - HSP60 3T	5.490	-0.1945	11.175

HSP60 1T - Controle 2T	1.620	-3.872	7.112
HSP60 1T - Positivo 2T	-1.180	-6.672	4.312
HSP60 1T - HSP60 2T	0.08000	-6.484	6.644
HSP60 1T - controle 3T	1.550	-4.135	7.235
HSP60 1T - Positivo 3T	-0.2100	-5.895	5.475
HSP60 1T - HSP60 3T	0.6300	-5.055	6.315
Controle 2T - Positivo 2T	-2.800	-6.951	1.351
Controle 2T - HSP60 2T	-1.540	-7.032	3.952
Controle 2T - controle 3T	-0.07000	-4.473	4.333
Controle 2T - Positivo 3T	-1.830	-6.233	2.573
Controle 2T - HSP60 3T	-0.9900	-5.393	3.413
Positivo 2T - HSP60 2T	1.260	-4.232	6.752
Positivo 2T - controle 3T	2.730	-1.673	7.133
Positivo 2T - Positivo 3T	0.9700	-3.433	5.373
Positivo 2T - HSP60 3T	1.810	-2.593	6.213
HSP60 2T - controle 3T	1.470	-4.215	7.155
HSP60 2T - Positivo 3T	-0.2900	-5.975	5.395
HSP60 2T - HSP60 3T	0.5500	-5.135	6.235
controle 3T - Positivo 3T	-1.760	-6.401	2.881
controle 3T - HSP60 3T	-0.9200	-5.561	3.721
Positivo 3T - HSP60 3T	0.8400	-3.801	5.481

assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle 1T	Too few values	to test.	
Positivo 1T	Too few values	to test.	
HSP60 1T	Too few values	to test.	
Controle 2T	Normality test	requires raw data.	
Positivo 2T	Normality test	requires raw data.	
HSP60 2T	Too few values	to test.	
controle 3T	Too few values	to test.	
Positivo 3T	Too few values	to test.	
HSP60 3T	Too few values	to test.	

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	8	86.029	10.754
Residuals (within columns)	21	76.182	3.628
Total	29	162.21	

$$F = 2.964 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle 1T	2	1.500	0.04900	0.03465	Unknown
Positivo 1T	2	8.360	2.760	1.952	Unknown
HSP60 1T	2	3.500	0.7700	0.5445	Unknown
Controle 2T	5	1.880	0.2600	0.1163	Unknown
Positivo 2T	5	4.680	1.400	0.6261	Unknown
HSP60 2T	2	3.420	6.970	4.929	Unknown
Positivo 1T	2	8.360	2.760	1.952	Unknown
HSP60 1T	2	3.500	0.7700	0.5445	Unknown
Controle 2T	5	1.880	0.2600	0.1163	Unknown
Positivo 2T	5	4.680	1.400	0.6261	Unknown
HSP60 2T	2	3.420	6.970	4.929	Unknown
controle 3T	4	1.950	0.2740	0.1370	Unknown
Positivo 3T	4	3.710	0.9100	0.4550	Unknown
HSP60 3T	4	2.870	1.690	0.8450	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle 1T	Unknown	Unknown	1.060	1.940
Positivo 1T	Unknown	Unknown	-16.437	33.157
HSP60 1T	Unknown	Unknown	-3.418	10.418
Controle 2T	Unknown	Unknown	1.557	2.203
Positivo 2T	Unknown	Unknown	2.942	6.418
HSP60 2T	Unknown	Unknown	-59.202	66.042
controle 3T	Unknown	Unknown	1.514	2.386
Positivo 3T	Unknown	Unknown	2.262	5.158
HSP60 3T	Unknown	Unknown	0.1812	5.559

BANGUE TERÇO 1

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0533, considered not quite significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle	Too few values to test.		
Positivo	Too few values to test.		
HSP60	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	49.786	24.893
Residuals (within columns)	3	8.212	2.737
Total	5	57.998	

$F = 9.094 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle	2	1.500	0.04000	0.02828	Unknown
Positivo	2	8.360	2.760	1.952	Unknown
HSP60	2	3.500	0.7700	0.5445	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval From	To
Controle	Unknown	Unknown	1.141	1.859
Positivo	Unknown	Unknown	-16.437	33.157
HSP60	Unknown	Unknown	-3.418	10.418

SANGUE TERÇO 2

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0254, considered significant.
 Variation among column means is significantly greater than expected
 by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.949 then the P value is less
 than 0.05.

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
Controle vs Positivo	-2.800	4.761	*	P<0.05
Controle vs HSP60	-1.540	1.980	ns	P>0.05
Positivo vs HSP60	1.260	1.620	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
Controle - Positivo	-2.800	-5.122	-0.4776

Controle - Positivo	-2.800	-5.122	-0.4776
Controle - HSP60	-1.540	-4.612	1.532
Positivo - HSP60	1.260	-1.812	4.332

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical
 SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has
 at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow
 Gaussian distributions. This assumption is tested using the method
 Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle			Normality test requires raw data.

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle			Normality test requires raw data.
Positivo			Normality test requires raw data.
HSP60			Too few values to test.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	19.633	9.816
Residuals (within columns)	9	15.563	1.729
Total	11	35.196	

$$F = 5.677 = (MStreatment/MSresidual)$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle	5	1.880	0.2600	0.1163	Unknown
Positivo	5	4.680	1.400	0.6261	Unknown
HSP60	2	3.420	2.730	1.930	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval From	To
Controle	Unknown	Unknown	1.557	2.203
Positivo	Unknown	Unknown	2.942	6.418
HSP60	Unknown	Unknown	-21.108	27.948

SANGUE TERÇO 3

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.1391, considered not significant.
 Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 6.357

The P value is 0.0416.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle	Too few values to test.		
Positivo	Too few values to test.		
HSP60	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	6.199	3.100
Residuals (within columns)	9	11.271	1.252
Total	11	17.471	

$F = 2.475 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

 Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle	4	1.950	0.2700	0.1350	Unknown
Positivo	4	3.710	0.9100	0.4550	Unknown
HSP60	4	2.870	1.690	0.8450	Unknown

Group	95% Confidence Interval			
	Minimum	Maximum	From	To
Controle	Unknown	Unknown	1.520	2.380
Positivo	Unknown	Unknown	2.262	5.158
HSP60	Unknown	Unknown	0.1812	5.559

PLACENTA TERÇO 1

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0971, considered not quite significant.
 Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle	Too few values to test.		
Positivo	Too few values to test.		
HSP60	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	197.10	98.552
Residuals (within columns)	6	167.64	27.940
Total	8	364.75	

$F = 3.527 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle	3	1.400	0.2400	0.1386	Unknown
Positivo	3	1.650	5.650	3.262	Unknown
HSP60	3	11.450	7.200	4.157	Unknown

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
Controle	Unknown	Unknown	0.8038	1.996
Positivo	Unknown	Unknown	-12.387	15.687
HSP60	Unknown	Unknown	-6.437	29.337

PLACENTA TERÇO 2

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.1506, considered not significant.
 Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 6.694

The P value is 0.0352.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle	Normality test requires raw data.		
Positivo	Normality test requires raw data.		
HSP60	Normality test requires raw data.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	48.932	24.466
Residuals (within columns)	12	131.90	10.991
Total	14	180.83	

$F = 2.226 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle	5	8.080	4.990	2.232	Unknown
Positivo	5	3.800	1.100	0.4919	Unknown
HSP60	5	4.970	2.620	1.172	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval From	95% Confidence Interval To
Controle	Unknown	Unknown	1.885	14.275
Positivo	Unknown	Unknown	2.434	5.166
HSP60	Unknown	Unknown	1.717	8.223

PLACENTA TERÇO 3

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0055, considered very significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.609 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
Controle vs Positivo	-4.770	4.354 *	P<0.05
Controle vs HSP60	-5.270	4.810 **	P<0.01
Positivo vs HSP60	-0.5000	0.4564 ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
Controle - Positivo	-4.770	-8.724	-0.8161
Controle - HSP60	-5.270	-9.224	-1.316
Positivo - HSP60	-0.5000	-4.454	3.454

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 27.207

The P value is < 0.0001.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is extremely significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle			Normality test requires raw data.
Positivo			Normality test requires raw data.
HSP60			Normality test requires raw data.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	118.48	59.238
Residuals (within columns)	18	151.23	8.402
Total	20	269.71	

F = 7.051 = (MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle	7	1.740	0.1700	0.06425	Unknown
Positivo	7	6.510	3.400	1.285	Unknown
HSP60	7	7.010	3.690	1.395	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle	Unknown	Unknown	1.583	1.897
Positivo	Unknown	Unknown	3.365	9.655
HSP60	Unknown	Unknown	3.597	10.423

FAGOCITOSE SANGUE HSP

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.2898, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle sg 1T			Too few values to test.
HSP60 sg 1T			Too few values to test.
Controle sg 2T			Normality test requires raw data.
HSP60 sg 2T			Too few values to test.
Controle sg 3T			Too few values to test.
HSP60 sg 3T			Too few values to test.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	9.166	1.833
Residuals (within columns)	13	17.106	1.316
Total	18	26.272	

F = 1.393 = (MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle sg 1T	2	1.500	0.04900	0.03465	Unknown
HSP60 sg 1T	2	3.500	0.7700	0.5445	Unknown
Controle sg 2T	5	1.880	0.2600	0.1163	Unknown
HSP60 sg 2T	2	3.420	2.730	1.930	Unknown
Controle sg 3T	4	1.950	0.2700	0.1350	Unknown
HSP60 sg 3T	4	2.870	1.690	0.8450	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle sg 1T	Unknown	Unknown	1.060	1.940
HSP60 sg 1T	Unknown	Unknown	-3.418	10.418
Controle sg 2T	Unknown	Unknown	1.557	2.203
HSP60 sg 2T	Unknown	Unknown	-21.108	27.948
Controle sg 3T	Unknown	Unknown	1.520	2.380
HSP60 sg 3T	Unknown	Unknown	0.1012	5.650

PHAGOCITOSE PLACENTA HSP

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0041, considered very significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

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

Comparison	Mean Difference	q	P value
Controle 1T vs HSP60 1T	-10.050	4.802	* P<0.05
Controle 1T vs Controle 2T	-6.680	3.569	ns P>0.05
Controle 1T vs HSP60 2T	-3.570	1.907	ns P>0.05
Controle 1T vs Controle 3T	-0.3400	0.1922	ns P>0.05
Controle 1T vs HSP60 3T	-5.610	3.172	ns P>0.05
HSP60 1T vs Controle 2T	3.370	1.800	ns P>0.05
HSP60 1T vs HSP60 2T	6.480	3.462	ns P>0.05
HSP60 1T vs Controle 3T	9.710	5.490	** P<0.01

HSP60 1T vs Controle 3T	9.710	5.490	**	P<0.01
HSP60 1T vs HSP60 3T	4.440	2.510	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 2T	3.110	1.919	ns	P>0.05
Controle 2T vs Controle 3T	6.340	4.224	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 3T	1.070	0.7130	ns	P>0.05
HSP60 2T vs Controle 3T	3.230	2.152	ns	P>0.05
HSP60 2T vs HSP60 3T	-2.040	1.359	ns	P>0.05
Controle 3T vs HSP60 3T	-5.270	3.847	ns	P>0.05

Difference	95% Confidence Interval		
	Mean Difference	From	To
Controle 1T - HSP60 1T	-10.050	-19.202	-0.8984
Controle 1T - Controle 2T	-6.680	-14.865	1.505
Controle 1T - HSP60 2T	-3.570	-11.755	4.615
Controle 1T - Controle 3T	-0.3400	-8.075	7.395
Controle 1T - HSP60 3T	-5.610	-13.345	2.125
HSP60 1T - Controle 2T	3.370	-4.815	11.555
HSP60 1T - HSP60 2T	6.480	-1.705	14.665
HSP60 1T - Controle 3T	9.710	1.975	17.445
HSP60 1T - HSP60 3T	4.440	-3.295	12.175
Controle 2T - HSP60 2T	3.110	-3.979	10.199
Controle 2T - Controle 3T	6.340	-0.2229	12.903
Controle 2T - HSP60 3T	1.070	-5.493	7.633
HSP60 2T - Controle 3T	3.230	-3.333	9.793
HSP60 2T - HSP60 3T	-2.040	-8.603	4.523

Controle 3T - HSP60 3T -5.270 -11.261 0.7211

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle 1T			Too few values to test.
HSP60 1T			Too few values to test.
Controle 2T			Normality test requires raw data.
HSP60 2T			Normality test requires raw data.

Controle 2T Normality test requires raw data.
 HSP60 2T Normality test requires raw data.
 Controle 3T Normality test requires raw data.
 HSP60 3T Normality test requires raw data.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	306.25	61.250
Residuals (within columns)	24	315.33	13.139
Total	29	621.58	

F = 4.662 = (MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle 1T	3	1.400	0.2400	0.1386	Unknown
HSP60 1T	3	11.450	7.290	4.209	Unknown

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle 1T	3	1.400	0.2400	0.1386	Unknown
HSP60 1T	3	11.450	7.290	4.209	Unknown
Controle 2T	5	8.080	4.990	2.232	Unknown
HSP60 2T	5	4.970	2.620	1.172	Unknown
Controle 3T	7	1.740	0.1700	0.06425	Unknown
HSP60 3T	7	7.010	3.690	1.395	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle 1T	Unknown	Unknown	0.8038	1.996
HSP60 1T	Unknown	Unknown	-6.661	29.561
Controle 2T	Unknown	Unknown	1.885	14.275
HSP60 2T	Unknown	Unknown	1.717	8.223
Controle 3T	Unknown	Unknown	1.583	1.897
HSP60 3T	Unknown	Unknown	3.597	10.423

FAGOCITOSE SG 1T X PLACENTA 1T

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.1203, considered not significant.
Variation among column means is not significantly greater than expected
by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater
than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical
SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has
at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle sg 1T	Too few values to test.		
Positivo sg 1T	Too few values to test.		
HSP60 sg 1T	Too few values to test.		
Controle 1T	Too few values to test.		
Positivo 1T	Too few values to test.		
HSP60 1T	Too few values to test.		

Intermediate calculations. ANOVA table

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	270.40	54.081
Residuals (within columns)	9	203.06	22.562
Total	14	473.46	

$F = 2.397 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle sg 1T	2	1.500	0.04900	0.03465	Unknown
Positivo sg 1T	2	6.690	2.760	1.952	Unknown
HSP60 sg 1T	2	3.500	0.7700	0.5445	Unknown
Controle 1T	3	1.400	0.2400	0.1386	Unknown
Positivo 1T	3	10.650	6.650	3.839	Unknown
HSP60 1T	3	11.450	7.290	4.209	Unknown

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of	
				Mean	Median
Controle sg 1T	2	1.500	0.04900	0.03465	Unknown
Positivo sg 1T	2	6.690	2.760	1.952	Unknown
HSP60 sg 1T	2	3.500	0.7700	0.5445	Unknown
Controle 1T	3	1.400	0.2400	0.1386	Unknown
Positivo 1T	3	10.650	6.650	3.839	Unknown
HSP60 1T	3	11.450	7.290	4.209	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle sg 1T	Unknown	Unknown	1.060	1.940
Positivo sg 1T	Unknown	Unknown	-18.107	31.487
HSP60 sg 1T	Unknown	Unknown	-3.418	10.418
Controle 1T	Unknown	Unknown	0.8038	1.996
Positivo 1T	Unknown	Unknown	-5.871	27.171
HSP60 1T	Unknown	Unknown	-6.661	29.561

FAGOCITOSE SG 2T X PLACENTA 2T

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0351, considered significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.427 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
Controle sg 2T vs Positivo sg 2T	-2.800	2.363	ns	P>0.05
Controle sg 2T vs HSP60 sg 2T	-1.540	0.9823	ns	P>0.05
Controle sg 2T vs Controle 2T	-6.200	5.232	*	P<0.05
Controle sg 2T vs Positivo 2T	-1.920	1.620	ns	P>0.05
Controle sg 2T vs HSP60 2T	-3.090	2.607	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs HSP60 sg 2T	1.260	0.8037	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs Controle 2T	-3.400	2.869	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs Positivo 2T	0.8800	0.7426	ns	P>0.05

Positivo sg 2T vs HSP60 sg 2T	1.260	0.8037	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs Controle 2T	-3.400	2.869	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs Positivo 2T	0.8800	0.7426	ns	P>0.05
Positivo sg 2T vs HSP60 2T	-0.2900	0.2447	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs Controle 2T	-4.660	2.973	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs Positivo 2T	-0.3800	0.2424	ns	P>0.05
HSP60 sg 2T vs HSP60 2T	-1.550	0.9887	ns	P>0.05
Controle 2T vs Positivo 2T	4.280	3.612	ns	P>0.05
Controle 2T vs HSP60 2T	3.110	2.624	ns	P>0.05
Positivo 2T vs HSP60 2T	-1.170	0.9873	ns	P>0.05

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
Controle sg 2T - Positivo sg 2T	-2.800	-8.046	2.446
Controle sg 2T - HSP60 sg 2T	-1.540	-8.480	5.400
Controle sg 2T - Controle 2T	-6.200	-11.446	-0.9537
Controle sg 2T - Positivo 2T	-1.920	-7.166	3.326
Controle sg 2T - HSP60 2T	-3.090	-8.336	2.156
Positivo sg 2T - HSP60 sg 2T	1.260	-5.680	8.200
Positivo sg 2T - Controle 2T	-3.400	-8.646	1.846
Positivo sg 2T - Positivo 2T	0.8800	-4.366	6.126
Positivo sg 2T - HSP60 2T	-0.2900	-5.536	4.956
HSP60 sg 2T - Controle 2T	-4.660	-11.600	2.280
HSP60 sg 2T - Positivo 2T	-0.3800	-7.320	6.560
HSP60 sg 2T - HSP60 2T	-1.550	-8.490	5.390

HSP60 sg 2T - Controle 2T	-4.660	-11.600	2.280
HSP60 sg 2T - Positivo 2T	-0.3800	-7.320	6.560
HSP60 sg 2T - HSP60 2T	-1.550	-8.490	5.390
Controle 2T - Positivo 2T	4.280	-0.9663	9.526
Controle 2T - HSP60 2T	3.110	-2.136	8.356
Positivo 2T - HSP60 2T	-1.170	-6.416	4.076

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett's test can only be performed when every column has at least five values.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
-------	----	---------	------------------------

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle sg 2T			Normality test requires raw data.
Positivo sg 2T			Normality test requires raw data.
HSP60 sg 2T			Too few values to test.
Controle 2T			Normality test requires raw data.
Positivo 2T			Normality test requires raw data.
HSP60 2T			Normality test requires raw data.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	104.24	20.848
Residuals (within columns)	21	147.46	7.022
Total	26	251.70	

F = 2.969 = (MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle sg 2T	5	1.880	0.2600	0.1163	Unknown
Positivo sg 2T	5	4.680	1.400	0.6261	Unknown
HSP60 sg 2T	2	3.420	2.730	1.930	Unknown
Controle 2T	5	8.080	4.990	2.232	Unknown
Positivo 2T	5	3.800	1.100	0.4919	Unknown
HSP60 2T	5	4.970	2.620	1.172	Unknown

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval	
			From	To
Controle sg 2T	Unknown	Unknown	1.557	2.203
Positivo sg 2T	Unknown	Unknown	2.942	6.418
HSP60 sg 2T	Unknown	Unknown	-21.108	27.948
Controle 2T	Unknown	Unknown	1.885	14.275
Positivo 2T	Unknown	Unknown	2.434	5.166
HSP60 2T	Unknown	Unknown	1.717	8.223

 FAGOCITOSE SG 3T X PLACENTA 3T

 One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.0014, considered very significant.
 Variation among column means is significantly greater than expected
 by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.338 then the P value is less
 than 0.05.

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
Controle sg 3T vs Positivo sg 3T	-1.760	1.435	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs HSP60 sg 3T	-0.9200	0.7500	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs Controle 3T	0.2100	0.1931	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs Positivo 3T	-4.560	4.194	ns	P>0.05
Controle sg 3T vs HSP60 3T	-5.060	4.654	*	P<0.05
Positivo sg 3T vs HSP60 sg 3T	0.8400	0.6848	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs Controle 3T	1.970	1.812	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs Positivo 3T	-2.800	2.575	ns	P>0.05

Positivo sg 3T vs HSP60 sg 3T	0.8400	0.6848	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs Controle 3T	1.970	1.812	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs Positivo 3T	-2.800	2.575	ns	P>0.05
Positivo sg 3T vs HSP60 3T	-3.300	3.035	ns	P>0.05
HSP60 sg 3T vs Controle 3T	1.130	1.039	ns	P>0.05
HSP60 sg 3T vs Positivo 3T	-3.640	3.348	ns	P>0.05
HSP60 sg 3T vs HSP60 3T	-4.140	3.808	ns	P>0.05
Controle 3T vs Positivo 3T	-4.770	5.144	*	P<0.05
Controle 3T vs HSP60 3T	-5.270	5.683	**	P<0.01
Positivo 3T vs HSP60 3T	-0.5000	0.5392	ns	P>0.05

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval	
		From	To
Controle sg 3T - Positivo sg 3T	-1.760	-7.081	3.561
Controle sg 3T - HSP60 sg 3T	-0.9200	-6.241	4.401
Controle sg 3T - Controle 3T	0.2100	-4.506	4.926
Controle sg 3T - Positivo 3T	-4.560	-9.276	0.1562
Controle sg 3T - HSP60 3T	-5.060	-9.776	-0.3438
Positivo sg 3T - HSP60 sg 3T	0.8400	-4.481	6.161
Positivo sg 3T - Controle 3T	1.970	-2.746	6.686
Positivo sg 3T - Positivo 3T	-2.800	-7.516	1.916
Positivo sg 3T - HSP60 3T	-3.300	-8.016	1.416
HSP60 sg 3T - Controle 3T	1.130	-3.586	5.846
HSP60 sg 3T - Positivo 3T	-3.640	-8.356	1.076
HSP60 sg 3T - HSP60 3T	-4.140	-8.856	0.5762

Controle 3T - Positivo 3T	-4.770	-8.792	-0.7480
Controle 3T - HSP60 3T	-5.270	-9.292	-1.248
Positivo 3T - HSP60 3T	-0.5000	-4.522	3.522

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 40.678

The P value is < 0.0001.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is extremely significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
Controle sg 3T			Too few values to test.
Positivo sg 3T			Too few values to test.
HSP60 sg 3T			Too few values to test.
Controle 3T			Normality test requires raw data.
Positivo 3T			Normality test requires raw data.
HSP60 3T			Normality test requires raw data.

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	163.11	32.621
Residuals (within columns)	27	162.50	6.019
Total	32	325.61	

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	163.11	32.621
Residuals (within columns)	27	162.50	6.019
Total	32	325.61	

$$F = 5.420 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle sg 3T	4	1.950	0.2700	0.1350	Unknown
Positivo sg 3T	4	3.710	0.9100	0.4550	Unknown
HSP60 sg 3T	4	2.870	1.690	0.8450	Unknown
Controle 3T	7	1.740	0.1700	0.06425	Unknown
Positivo 3T	7	6.510	3.400	1.285	Unknown
HSP60 3T	7	7.010	3.690	1.395	Unknown

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
Controle sg 3T	4	1.950	0.2700	0.1350	Unknown
Positivo sg 3T	4	3.710	0.9100	0.4550	Unknown
HSP60 sg 3T	4	2.870	1.690	0.8450	Unknown
Controle 3T	7	1.740	0.1700	0.06425	Unknown
Positivo 3T	7	6.510	3.400	1.285	Unknown
HSP60 3T	7	7.010	3.690	1.395	Unknown

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
Controle sg 3T	Unknown	Unknown	1.520	2.380
Positivo sg 3T	Unknown	Unknown	2.262	5.158
HSP60 sg 3T	Unknown	Unknown	0.1812	5.559
Controle 3T	Unknown	Unknown	1.583	1.897
Positivo 3T	Unknown	Unknown	3.365	9.655
HSP60 3T	Unknown	Unknown	3.597	10.423