MARIA LETÍCIA BAPTISTA SALVADORI

Avaliação da influência de hormônios e citocinas na expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase, em cultivo celular de placenta e embrião murino e de ratas Wistar pela citometria de fluxo

São Paulo

2011

MARIA LETÍCIA BAPTISTA SALVADORI

Avaliação da influência de hormônios e citocinas na expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase, em cultivo celular de placenta e embrião murino e de ratas Wistar pela citometria de fluxo

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

Departamento:

Departamento de Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

São Paulo

2011

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

15/6/11

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2451
FMVZ

Salvadori, Maria Letícia Baptista

Avaliação da influência de hormônios e citocinas na expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase, em cultivo celular de placenta e embrião murino e de ratas Wistar pela citometria de fluxo / Maria Letícia Baptista Salvadori. -- 2011.
70 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2011.

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

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior.

1. Indoleamina 2,3-dioxigenase. 2. Tolerância materno-fetal. 3. Placenta.
4. Embrião. 5. Citometria de Fluxo. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da influência de hormônios e citocinas na expressão da Indoleamina 2,3-dioxigenase em cultivo celular de placenta murina e de ratas *Wistar* pela citometria de fluxo", protocolado sob o nº1742/2009, utilizando 05 (cinco) camundongos e 05 (cinco) ratas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Roberto Kfoury, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética para uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 25 de novembro de 2009.

We certify that the Research "Evaluation of the influence of hormones and cytokines on expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, in cell culture of murine placenta and *Wistar* rats by flow cytometry", utilizing 05 (five) mice and 05 (five) rats, protocol number 1742/2009, under the responsibility Prof. Dr. José Roberto Kfoury, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/25/09.

São Paulo, 30 de novembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SALVADORI, Maria Letícia Baptista

Título: Avaliação da influência de hormônios e citocinas na expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase, em cultivo celular de placenta e embrião murino e de ratas Wistar pela citometria de fluxo

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

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Assinatura: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Assinatura: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____

Assinatura: _____ **Julgamento:** _____

Dedicatórias

Dedico esta dissertação

*À minha filha **Isabel Quintino Salvadori**,*

por suportar minha ausência, falta de carinho e atenção.

Você é o grande AMOR da minha vida.

*Ao meu amado pai **João Luiz Marques Salvadori** (in memoriam)*

*e a minha amada mãe **Maria Baptista Salvadori**, por sempre estarem ao*

meu lado, mesmo quando não deveriam.

*À minha segunda mãe, **Maria Leni Ferreira**,*

por sempre cuidar de mim e da minha filha.

*Aos meus sobrinhos, **Ian e Núria Cavallaro Salvadori**.*

Amo muito todos vocês!!!

Agradecimentos

Aos professores do programa de pós graduação do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela acolhida e por todo ensinamento passado.

Ao Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior pela confiança, dedicação, orientação e amizade.

À minha amiga, comadre e “irmã”, Renata Avancini Fernandes pelos anos de amizade, dedicação e paciência, te amo muito.

Ao meu amigo e compadre Marcio Ferreira Santos, por todos os anos de carinho e amor.

Ao Prof. Dr. Francisco Gacek, que sempre foi e sempre será o meu espelho de honestidade, ética, conhecimento e docência.

Ao Prof. Dr. Bário Raymundo Cirne, por todo carinho, atenção e ajuda que me concede desde a graduação.

Ao Prof. Dr. Antônio Fernandes Filho, por suas sábias palavras.

À Profa. Dra. Ana Rita de Lima, pela amizade construída em tão pouco tempo, por toda ajuda, companheirismo, disponibilidade e carinho para comigo e para minha família. Tenho muito orgulho em ser sua Amiga, muito obrigada por tudo.

À amiga Thaís Martins Chucri por todo companheirismo, torcida e principalmente por todo carinho. Muito obrigada por você fazer parte da minha vida e da minha família.

À minha mais nova amiga Graziela Menck, meu braço direito e esquerdo nesta pós graduação. Este trabalho não estaria concluído sem a sua ajuda. Você é muito especial,

À Janaína Munuera Monteiro por me ensinar e ajudar na execução deste projeto.

À Lillian de Jesus Oliveira, uma das pessoas mais inteligentes que conheci. Sua ajuda foi de fundamental importância neste projeto.

À amiga Dra. Bernadete de Lourdes Liphhaus pela amizade, confiança, dedicação, disponibilidade e por cuidar com muito carinho do meu bem mais precioso.

À Fúlvia Regatieri e ao seu marido Mauro Soares Viana Jr., por terem me ajudado na parte estatística deste projeto e por toda amizade e carinho.

À Rosemary Viola Bosch por sempre estar à disposição para me ajudar, seja neste projeto ou na minha vida pessoal.

Ao Dr. Francisco Marziona pela amizade, disponibilidade e por sempre cuidar de mim e da minha família.

À amiga Profa. Dra. Sílvia da Silva Carramão por sempre cuidar da minha saúde física e mental.

Aos funcionários do programa de pós graduação do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Ao Maicon Barbosa da Silva, um amigo como poucos.

À Fabiana Azevedo Fernandes, que se fossemos irmãs, não seríamos tão parecidas.

À Jaqueline Martins de Santana, por sempre me ajudar prontamente em tudo o que precisei.

À Sílvia Amélia Ferreira Lima que sempre trabalhou duro e me ajudou prontamente na execução deste projeto.

Ao IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), na pessoa de Maria Neide Ferreira Mascarenhas, pelo fornecimento dos animais, para a execução deste projeto.

À Thaís Borges Lessa, por sempre me divertir muito e aos colegas de pós graduação.

RESUMO

SALVADORI, M. L. B. Avaliação da influência de hormônios e citocinas na expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase, em cultivo celular de placenta e embrião murino e de ratas Wistar pela citometria de fluxo. [Evaluation of the influence of hormones and cytokines on expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, in cell culture of placenta and embryo from mice and Wistar rats by flow cytometry]. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima, produzida pelas células trofoblásticas e, por sua capacidade de catabolizar o triptofano, inibe a proliferação das células T maternas, participando desta forma como importante mecanismo da tolerância materno-fetal. Contudo, pouco se sabe se a ação da IDO é influenciada por outras substâncias presentes no micro-ambiente uterino e, por esta razão, formulou-se a hipótese de que esta enzima poderia ter sua ação alterada nesse contexto e, desta forma, avaliou-se o comportamento da expressão da IDO frente à adição de alguns desses componentes presentes no útero gestante. Neste trabalho, células uterinas, de placentas e de embriões de ratas e camundongos fêmeas prenhes e não prenhes foram mantidas em cultivo e a elas adicionadas estradiol, progesterona, interferon γ , triptofano e 1-metil-D- triptofano, avaliando-se a expressão da IDO pela técnica de citometria de fluxo nos períodos de 4, 24 e 48 horas. Os resultados demonstraram que as diferenças mais significativas na expressão da IDO entre as ratas prenhes e não prenhes, foram observadas após a adição de progesterona (19,24%), interferon γ (11,22%) e triptofano (23,53%), nas ratas prenhes. Já nos camundongos fêmeas prenhes e não prenhes, as maiores expressões de IDO foram observadas no primeiro grupo pela adição de progesterona (11,33%), estradiol (9,98%) e interferon γ (21,78%). Considerando esses resultados, podemos concluir que a expressão da IDO pelas células uterinas, placentárias e embrionárias em cultivo sofre influência dos fatores testados, o que permite novas hipóteses para melhor compreensão da participação dessa enzima na tolerância materno-fetal, particularmente em relação a sua interação com hormônios e citocinas presentes no útero gestante. Além disso, poderá colaborar na elaboração de possíveis tratamentos de enfermidades, relacionadas à manutenção e sucesso da gestação onde haja envolvimento do sistema imunológico materno e dos mecanismos de tolerância.

Palavras-chave: Indoleamina 2,3-dioxigenase. Tolerância materno-fetal. Placenta. Embrião. Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

SALVADORI, M. L. B. Evaluation of the influence of hormones and cytokines on expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, in cell culture of placenta and embryo from mice and Wistar rats by flow cytometry. [Avaliação da influência de hormônios e citocinas na expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase, em cultivo celular de placenta e embrião murino e de ratas Wistar pela citometria de fluxo]. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is an enzyme produced by trophoblast cells and due to its ability to catabolize tryptophan, inhibits the proliferation of maternal T cells, thus playing an important role as one of the mechanisms of maternal-fetal tolerance. However, little is known whether the action of IDO is influenced by substances present in the pregnant uterine microenvironment. This study evaluated the behavior of the IDO expression in cultured placental and embryonic cells from mice and rats in face of the addition of estradiol, progesterone, γ interferon, tryptophan and 1-methyl-D-tryptophan, by flow cytometry, at 4, 24 and 48 hours periods. The results showed that high expressions of IDO were observed in pregnant rats cells after the addition of progesterone (19.24%), γ interferon (11.22%) and tryptophan (23.53%). In mice, high expressions of IDO were observed in the pregnant group cells by the addition of progesterone (11.33%), estradiol (9.98%) and interferon- γ (21.78%). Considering these results, we may conclude that the expression of IDO by cultured placental and embryonic cells from mice and Wistar rats is indeed influenced by factors present in pregnant uterus, which provides additional information to better understand IDO role in the maternal-fetal tolerance, particularly on its interactions with reproductive hormones and cytokines. Additionally, it may contribute to the establishment of possible treatments for pregnancy-losses related to the maternal immune system response and mechanisms of tolerance.

Keywords: Indoleamine 2,3-dioxygenase. Maternal–fetal tolerance. Placenta. Embryo. Flow cytometry.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVO	16
2.1	GERAL	16
2.1	ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	PLACENTA: RATO E CAMUNDONGO.....	17
3.2	TOLERÂNCIA MATERNO-FETAL.....	18
3.3	INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE	19
3.4	HORMÔNIOS	22
3.4.1	Progesterona	22
3.4.2	Estradiol.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	MATERIAL	26
4.2	MÉTODOS	26
4.2.1	Cultivo Celular.....	27
4.2.2	Citometria de Fluxo	29
5	RESULTADOS	30
5.1	RATAS.....	30
5.1.1	Estradiol	41
5.1.2	Progesterona.....	41
5.1.3	Interferon γ	42
5.1.4	Triptofano	42
5.1.5	1- Metil - D - Triptofano + Triptofano	42

5.2	CAMUNDONGOS FÊMEAS.....	43
5.2.1	Estradiol	54
5.2.2	Progesterona.....	54
5.2.3	Interferon γ	55
5.2.4	Triptofano.....	55
5.2.5	1 – Metil – D – Triptofano + Triptofano	55
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

A gestação confere um estado imunológico altamente complexo, pois apresenta potencial para expressar antígenos paternos que são estranhos à mãe, podendo desta forma, estimular reações imunológicas como acontece em tecidos transplantados, mas isso geralmente não ocorre (BOUMA et al., 1996).

O comportamento biológico no período gestacional agrega a modulação de células maternas que intercedem nas respostas imunológicas, além de outros fatores que promovem com que não haja resposta aos linfócitos T (KOLB; CHAOUAT; CHASSOUX, 1984; CROY; WOOD; KING, 1987) e um mecanismo de controle entre imuno-regulação e imuno-estimulação, no qual as células T regulatórias juntamente com a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) permitem a tolerância materna ao feto semi-alógeno (SAITO et al., 2007).

A IDO é produzida pelas células trofoblásticas (MUNN et al., 1998) e atua como um mecanismo de feedback, contra-regulando a atividade imunológica (MUNN, 2006), é encontrada em altos níveis em mulheres gestantes (STREHLOW; SEEGER; FRICK, 1993), o que sugere seu envolvimento na imuno-regulação, inibindo a proliferação das células T maternas. A atividade enzimática da IDO reduz a concentração de triptofano e desta forma as células do sistema imunológico ativadas não conseguem proliferar e entram em apoptose devido a este estado de carência no micro ambiente placentário (MELLOR; MUNN, 2001; TAKIKAWA, 2005). O aumento na degradação de triptofano é observado em pacientes com ativação de células imunes (WIRLEITNER et al., 2003).

O aminoácido triptofano caracteriza-se unicamente por relacionar seu metabolismo a processos imunológicos. Vários estudos têm demonstrado que o catabolismo do triptofano ocorre em sítios de inflamação, e a expressão de IDO pode vincular-se à resposta antiinflamatória por reduzir os danos nos tecidos e seus sítios (LIANG et al., 2006; MELLOR; MUNN, 2004).

Provou-se pela primeira vez que a enzima IDO tem ampla ação antiinflamatória em investigações realizadas em biopsias de lesões de pacientes com doença inflamatória e também demonstrado que o T helper 1 (Th-1), IFN- γ e o fator de necrose tumoral (TNF- α) são potentes indutores da expressão de IDO (WOLF; WOLF; RUMPOLD, 2004).

O Interferon- γ estimula uma forte atividade bioquímica e funcional da IDO, pois induzem a expressão dos genes que codificam esta enzima (KUDO et al., 2004), estimulando deste modo a IDO a degradar o triptofano em quinurenina (YOSHIDA et al., 1981; YASUI et al., 1986; YOSHIDA et al., 1986; RUBIN et al., 1991; FROLOVA et al., 1993; FLECKNER et al., 1995; TOLSTRUP et al., 1995; WIRLEITNER et al., 2003; KUDO et al., 2004; BOASO et al., 2005; SUGIMOTO et al., 2006).

Defeitos no mecanismo imunomodulador iniciado pela IDO podem estar envolvidos no desenvolvimento de condições autoimunes, como a esclerose múltipla e o diabetes autoimune (SAKURAI et al., 2002; GROHMANN; FALLARINO; PUCETTI, 2003); rejeição de fetos alogênicos (KAMIMURA et al., 1991; MUNN et al., 1998; KUDO; BOYD, 2000; MELLOR; MUNN, 2001; MELLOR et al., 2003).

O 1-metil-triptofano (1MT), demonstrou ter capacidade significativa para inibir a atividade da IDO e coopera com a quimioterapia na regressão de tumores em modelos murinos (MULLER et al., 2005). O efeito do 1MT estava perdido em hospedeiros imunodeficientes, indicando que o efeito antitumoral do 1MT era imune mediado. Os efeitos do 1MT incluem resposta das células T contra os antígenos do tumor *in vitro* e *in vivo* (GROHMANN; FALLARINO; BIANCHI, 2001; GROHMANN; FALLARINO; SILLA, 2001), juntamente com a inibição da produção de catabólitos do triptofano, como a Kyn (MUNN et al., 1999; HWU et al., 2000; MELLOR et al., 2003).

A gestação é uma condição fisiológica na qual ocorrem várias mudanças imunoendócrinas com a finalidade de facilitar a imunossupressão e a tolerância aos antígenos paternos e fetais (PEREIRA et al., 2005). Nos mamíferos é caracterizada por um aumento de progesterona, estradiol e prolactina, além de vários hormônios placentários (BAXTER; SMYTH, 2002).

A Progesterona é um hormônio que atua como importante fator na manutenção da gestação em humanos e animais, tendo estudos demonstrando que há uma baixa resposta imunológica durante o período gestacional (STECKEL et al., 2003). Em 1977, Siiteri; Febres & Clemens, propuseram que esse hormônio seja responsável por proteger o conceito do ataque do sistema imune materno por inibição de células T.

O estradiol é um hormônio que possui atividade biológica em vários órgãos e sistemas incluindo o imune, cardiovascular, sistema nervoso central e reprodutivo (XIAO; LIU; LINK, 2004), durante o período gestacional ocorre o predomínio de estradiol que está associado ao perfil de citocinas Th2, que é essencial para a tolerância materno fetal e para a manutenção da gravidez (PELTIER, 2003).

Outro papel desempenhado pelo estradiol é o aumento da expressão de IDO mRNA pelas células dendríticas comandando a supressão das funções das células T via IDO (PHAN; YANG; SHERRY, 2003).

Considerando que a IDO apresenta níveis elevados em mulheres grávidas (STREHLOW; SEEGER; FRICK, 1993) e que células dendríticas IDO+ possuem um importante papel na inibição das funções das células T (MUNN et al., 1999; ITO et al., 2002), estudamos a atuação do triptofano, interferon γ , progesterona e estradiol na indução da regulação ascendente da IDO e sua inibição na presença do 1-metil-D-triptofano.

2 OBJETIVO

2.1 GERAL

Buscar compreender a interação da ação de hormônios da reprodução e citocinas na expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase , em células uterinas, de placentas e de embriões de ratas e camundongos fêmeas em cultivo.

2.1 ESPECÍFICOS

Células uterinas, placentárias e embrionárias de ratas e camundongos fêmeas em cultivo receberam os fatores abaixo listados e a expressão da IDO nessas células foram analisados pela citometria de fluxo.

1. Estradiol;
2. Progesterona;
3. Triptofano;
4. Interferon γ ;
5. 1-Metil-D-Triptofano.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A literatura consultada para embasamento científico é discriminada neste capítulo e está dividida em itens.

3.1 PLACENTA: RATO E CAMUNDONGO

Realdus Columbus (1516-1559) introduziu o termo “placenta” ao descrever as estruturas liberadas após o parto, em mulheres, como uma fusão de material residual em forma de bolo circular. Atualmente, o termo placenta possui um significado mais amplo, não se referindo apenas às estruturas discoidais encontradas em mulheres, coelhos, ratos, camundongos e cobaias, mas a todas as estruturas, não importando a forma, que permitiam uma aposição, ou fusão, entre as membranas fetais e a mucosa uterina, de maneira que ocorram as trocas fisiológicas (ATKINSON; KING; AMOROSO, 1984; ENDERS et al., 1998).

A placenta é um órgão transitório, formado pela interação de tecidos fetais e maternos, e apresenta como funções gerais: intercâmbio de nutrientes e gases, e também atua como um órgão endócrino responsável pela produção de hormônios que garantem a continuidade da prenhez (SOARES et al., 1996). Em roedores, a placenta é constituída pela porção materna, a decídua, além de apresentar duas regiões distintas em sua porção fetal: a zona juncional e a zona do labirinto. A zona juncional está localizada próxima à decídua materna e ambas as regiões possuem funções endócrinas (GIBORI, 1994; SOARES et al., 1996), sendo irrigadas apenas pelo sangue materno. A zona do labirinto recebe tanto sangue materno quanto sangue fetal, constituindo a principal região de trocas metabólicas da placenta (FERRO, 1991). Em roedores, a barreira placentária é constituída por camadas trofoblásticas mais o endotélio fetal.

As camadas trofoblásticas de roedores se organizam em três camadas, sendo a placenta classificada como hemotricorial (ENDERS, 1965). Em ratos e camundongos estas camadas se organizam da seguinte maneira: 1) Camada I, onde células individualizadas estão em contato com o sangue materno. Parte destas células são gigantes e apresentam funções endócrinas (SOARES et al., 1996) além da ocorrência de fenestrações na camada (TAKATA; FUJIKURA; SHIN, 1997); 2) Camada II ou intermediária, onde células sinciciais apresentam função essencialmente endocítica, contendo vesículas cobertas por clatrina (TAKATA;

FUJIKURA; SHIN, 1997); 3) Camada III, também sincicial e apresenta uma importante função seletiva por servir como barreira às macromoléculas (ENDERS et al., 1998). Junções comunicativas estão presentes entre as camadas trofoblásticas II e III (TAKATA; FUJIKURA; SHIN, 1997).

A placenta ainda apresenta uma importante função imunológica, no que se refere à transferência de imunoglobulinas, à tolerância imunológica, à liberação de citocinas e às funções efectoras e citotóxicas dos linfócitos. Esta transferência de anticorpos da mãe para o feto está relacionada com o número de camadas de barreira placentária. O mecanismo de transferência de placentas endoteliais e hemocorial, é facilitada em comparação com outras placentas. (HUNT et al., 2006, CHUCRI et al., 2010).

3.2 TOLERÂNCIA MATERNO-FETAL

A gestação confere um estado imunológico altamente complexo, pois apresenta potencial para expressar antígenos paternos que são estranhos à mãe, podendo desta forma, estimular reações imunológicas como acontece em tecidos transplantados, mas isso geralmente não ocorre (BOUMA et al., 1996). Sugeriu-se que a gravidez exigisse uma imunossupressão materna geral. Entretanto, o status imune das mulheres grávidas bem como sua resposta aos vários estímulos mostrou que a resposta imune das mulheres grávidas não é reduzida significativamente quando em comparação com mulheres não-grávidas (THELLIN et al., 2000).

Numerosas hipóteses têm sido descritas para explicar o sucesso na gestação de fetos semi-alogênicos de mamíferos em mães imunocompetentes. A modulação de células maternas que medeiam respostas imunes contribui diretamente para a sobrevivência celular. Além da possível ausência de linfócitos T na decídua, inclui-se uma variedade de agentes responsáveis pela redução dos linfócitos responsivos às células alogênicas, os próprios tecidos embrionários e os fatores derivados de células fetais e deciduais (KOLB; CHAOUAT; CHASSOUX, 1984; CROY; WOOD; KING, 1987).

O sistema imunológico é bem controlado pelo balanço entre imunoestimulação e imunoregulação. CD4+, CD25+ (células T regulatórias) e a IDO mediam a tolerância materna ao feto alogênico (SAITO et al., 2007).

A produção de IDO pelas células trofoblásticas representa um pré-requisito para a tolerância do feto semi-alógeno, já que as células fetais não sendo idênticas às da mãe podem ser passíveis a ocorrência de reação imune (MUNN et al., 1998). Estudos com células humanas indicam que altas concentrações dos metabólitos do triptofano inibem a proliferação de células T (FRUMENTO et al., 2002; MUNN; SHARMA; LEE, 2002; TERNESS et al., 2002).

3.3 INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE

As oxigenases são metais contendo enzimas que catalisam a incorporação de uma molécula de oxigênio (O_2) dentro do substrato, e isso leva a um modelo no metabolismo e síntese de uma variedade de substâncias biológicas. Dois tipos de oxigenases são conhecidos: monooxigenases e dioxigenases (MELLOR; MUNN, 2001).

Estudos realizados nas décadas de 50 e 60 descrevem que dois hemes contendo dioxigenases - indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e triptofano 2,3-dioxigenase (TDO), catalisam o L-triptofano (L-Trp) em quinurenina (Kyn). O aumento nos níveis de Kyn, metabólitos do ácido quinolínico e 3-hidroxiquinurenina (3 OHKyn) podem ser observados em um número de desordens psiquiátricas ou neurológicas. O L-Trp serve como precursor na síntese do neurotransmissor serotonina e do hormônio melatonina. A IDO exibe um substrato de especificidade mais amplo que o TDO, pois esta forma pode degradar indoleaminas, incluindo o L-Trp, o D-Trp, a serotonina, a melatonina e a triptamina (MELLOR; MUNN, 2001).

A IDO está envolvida no sistema de imunoregulação. A supressão de células T dependente de IDO e a indução por células dendríticas sugerem que o catabolismo do L-Trp tem efeitos profundos na proliferação e diferenciação das células T que implicam em manipulações imuno-terapêuticas de pacientes com câncer e doenças infecciosas crônicas. Sugere-se que a atividade da IDO reduziria a concentração de triptofano e desta forma as células do sistema imunológico ativadas não conseguiriam proliferar e entrariam em apoptose devido a este estado de carência no micro ambiente placentário (MELLOR; MUNN, 2001; TAKIKAWA, 2005).

A modulação, ativação, proliferação e mesmo a indução de processos apoptóticos em células T tem sido demonstrada como secundários a ação da IDO, cuja expressão foi

observada em macrófagos, células dendríticas, células gigantes trofoblásticas em camundongos, no trofoblasto extraviloso e viloso em humanos (MUNN et al., 1999; MELLOR; BABAN; CHANDLER, 2003; MUNN; SHARMA; MELLOR, 2004; HAINZ; OBEXER; WINKLER, 2005) e, pelos catabólitos da degradação do triptofano (FALLARINO; GROHMANN, VACCA, 2002; LEE et al., 2002). O aumento na degradação de triptofano é observado em pacientes com ativação de células imunes (WIRLEITNER et al., 2003).

O Interferon- γ estimula uma forte atividade bioquímica e funcional da IDO, pois induzem a expressão dos genes que codificam esta enzima (KUDO et al., 2004), estimulando deste modo a IDO a degradar o triptofano em quinurenina (YOSHIDA et al., 1981; YASUI et al., 1986; YOSHIDA et al., 1986; RUBIN et al., 1991; FROLOVA et al., 1993; FLECKNER et al., 1995; TOLSTRUP et al., 1995; WIRLEITNER et al., 2003; KUDO et al., 2004; BOASO et al., 2005; SUGIMOTO et al., 2006). A atividade da IDO pode ser estimada pela razão quinurenina/triptofano (kyn/trp). A deprivação do triptofano via IDO também suprime células T responsivas, que podem ser importantes na indução da tolerância (MUNN et al., 1999; LIANG et al., 2006).

Verifica-se alta expressão de IDO pelo sincício trofoblasto em placentas humanas principalmente nos estágios evolutivos fetais do primeiro e segundo terços, crescendo-se também sua expressão no epitélio glandular e estroma da decídua com seis semanas de gestação (MEISEL et al., 2004).

A atividade da IDO durante a gestação foi observada em camundongos do 5,5 ao 18,5 dias após a cópula. Sua atividade foi muito baixa no 5,5 dias após a cópula, mas um dia depois, no 6,5 dias, a atividade aumentou muito e atingiu o nível máximo. Do 7,5 dias aos 14,5 dias, sua atividade baixou gradualmente, tanto no concepto, como na placenta. No dia 16,5 após a cópula, nenhuma atividade foi detectada na placenta, nem no feto (SUZUKI et al., 2001).

Defeitos no mecanismo imunomodulador iniciado pela IDO podem estar envolvidos no desenvolvimento de condições autoimunes, como a esclerose múltipla e o diabetes autoimune (SAKURAI et al., 2002; GROHMANN; FALLARINO; PUC CETTI, 2003); rejeição de fetos alogênicos (KAMIMURA et al., 1991; MUNN et al., 1998; KUDO; BOYD, 2000; MELLOR; MUNN, 2001; MELLOR et al., 2003).

O aminoácido triptofano caracteriza-se unicamente por relacionar seu metabolismo a processos imunes. Vários estudos têm demonstrado que o catabolismo do triptofano ocorre em sítios de inflamação, e a expressão de IDO pode vincular-se à resposta antiinflamatória

por reduzir os danos nos tecidos e seus sítios (MELLOR; MUNN, 2004; LIANG et al., 2006). Além disso, sugere-se que as células produtoras de IDO possuam um papel na prevenção do início de desordens auto-imunes (LIANG et al., 2006). Alguns mediadores de inflamação incluindo o mais potente, interferon ($\text{IFN-}\gamma$) induz a produção de IDO. Provou-se pela primeira vez que a enzima IDO tem ampla ação antiinflamatória em investigações realizadas em biópsias de lesões de pacientes com doença inflamatória e também demonstrado que o T helper 1 (Th-1), $\text{IFN-}\gamma$ e o fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) são potentes indutores da expressão de IDO (WOLF; WOLF; RUMPOLD, 2004).

A atividade da IDO que está presente em células da linhagem dos monócitos e macrófagos pode privar os patógenos do acesso ao triptofano e expor os mesmos a metabólitos tóxicos do triptofano e, deste modo ajudar a acabar com infecções. Recentes estudos têm dirigido os efeitos imunomodulatórios da IDO em muitos aspectos, incluindo alergia, imunologia de tumores, autoimunidade e infecção por HIV (FUCHS; FORSMAN; HAGBERG, 1990; MELLOR et al., 2003; VON BUBNOFF; KOCH; BIEBER, 2003; MURRAY, 2003; MULLER et al., 2005). No contexto apropriado, a IDO pode contribuir para limitar os mecanismos imunes efetores e prevenir a atividade imune exagerada, ou em circunstâncias de atividade sustentada, gerar um estado de imunossupressão. Desta forma a atividade da IDO é considerada como tendo um potencial ambivalente podendo atuar em benefício ou detrimento do hospedeiro. A atividade imunológica da IDO pode ser vista como um mecanismo de feedback que contra regula a ativação imune (MUNN, 2006). A expressão e atividade da IDO podem ser induzidas pelos mesmos mecanismos e moléculas que iniciam a ativação imune (HAENZ; OBEXER; WINKLER, 2005).

O 1-metil-triptofano (1MT), demonstrou ter capacidade significativa para inibir a atividade da IDO e coopera com a quimioterapia na regressão de tumores em modelos murinos (MULLER et al., 2005). O efeito do 1MT estava perdido em hospedeiros imunodeficientes, indicando que o efeito antitumoral do 1MT era imune mediado. Os efeitos do 1MT incluem resposta das células T contra os antígenos do tumor *in vitro* e *in vivo* (GROHMANN; FALLARINO; BIANCHI, 2001; GROHMANN, FALLARINO, SILLA, 2001), juntamente com a inibição da produção de catabólitos do triptofano, como a Kyn (MUNN et al., 1999; HWU et al., 2000; MELLOR et al., 2003). Um desafio para a imunoterapia é desenvolver estratégias que possam efetivamente superar a imunossupressão induzida pelos tumores, aumentando assim, respostas antitumorais. Um fármaco que bloqueie a IDO, pode ser clinicamente útil na reversão desta imunossupressão (UYTTENHOVE;

PILOTTE; THEATE, 2003; SARKHOSH et al., 2004; MELLOR; MUNN 2004; MULLER et al., 2005; POTULA et al., 2005; RUTELLA et al., 2006).

Segundo Gutiérrez et al. (2003), observaram que ao suplementar com 1 μ M de 1MT + 1M de triptofano culturas de células placentárias humanas a termo, que a suplementação não impediu a supressão de células T, sugerindo que a atividade de IDO não parece estar relacionada com o mecanismo supressor do 1 MT. Esses dados levam a crer que as células T, são inibidas pelo catabolismo do triptofano e à rejeição ao feto pode ocorrer quando acontece falha neste mecanismo.

3.4 HORMÔNIOS

A gestação é uma condição fisiológica na qual ocorrem várias mudanças imunoendócrinas com a finalidade de facilitar a imunossupressão e a tolerância aos antígenos paternos e fetais (PEREIRA et al., 2005). Nos mamíferos é caracterizada por um aumento de progesterona, estradiol e prolactina, além de vários hormônios placentários (BAXTER; SMYTH, 2002).

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

3.4.1 Progesterona

A Progesterona é um hormônio que atua como importante fator na manutenção da gestação em humanos e animais, tendo estudos demonstrando que há uma baixa resposta imunológica durante o período gestacional, o que hipoteticamente, pode explicar a tolerância fetal (STECKEL et al., 2003). Em 1977, Siiteri; Febres & Clemens, propuseram que esse hormônio seja responsável por proteger o conceito do ataque do sistema imune materno por inibição de células T.

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

Alguns estudos também foram desenvolvidos atentando para o papel regulatório da progesterona na biologia de linfócitos uterinos, pois a mesma apresenta efeito inibitório direto ou indireto na proliferação de linfócitos para induzir a tolerância de fetos geneticamente incompatíveis pelo sistema imunológico materno. A progesterona inibe a resposta imunológica e mantém a gestação, produzindo células dendríticas (DCs imaturas), pois estas células expressam baixos níveis de receptores de células T que ativam as funções imunológicas de DCs, que também são responsáveis pela formação de células T reguladoras, que são capazes de silenciar as células T efectoras e isso seria uma ferramenta valiosa para se entender a tolerância materno-fetal e também uma nova perspectiva para o tratamento de doenças autoimunes, ou alérgicas (LIANG et al., 2006).

3.4.2 Estradiol

O estradiol é um hormônio que possui atividade biológica em vários órgãos e sistemas incluindo o imune, cardiovascular, sistema nervoso central e reprodutivo (XIAO; LIU; LINK, 2004), durante o período gestacional ocorre o predomínio de estradiol que está associado ao perfil de citocinas Th2, que é essencial para a tolerância materno fetal e para a manutenção da gravidez (PELTIER, 2003).

Segundo Østensen (1999), o estradiol estimula a secreção de prolactina. Esta, por sua vez, é um hormônio polipeptídico secretado pela hipófise e que tem seus níveis elevados durante a

gestação e no período da lactação, apresentando efeito sobre as células B e células T (LEAÑOS-MIRANDA et al., 2001), estando envolvida também na proliferação e diferenciação celular, tendo múltiplos efeitos sobre o sistema imune (PEREIRA et al., 2005).

O estradiol modula múltiplos aspectos imunológicos (STEFANO et al., 2000; VEGETO et al., 2001) apresenta efeitos específicos em células imunes e pode atuar como estímulo pró-inflamatório e antiinflamatório de acordo com o ambiente, e é dependente da ativação dos receptores de Estradiol (ER) (BRUCE-KELLER et al., 2000; VEGETO et al., 2001).

Esses efeitos imunomodulatórios do estradiol têm sido demonstrados em observações clínicas e experimentais. Estudos *in vitro* indicam que a exposição das células dendríticas a esse hormônio, pode inibir a habilidade destas células em estimular a proliferação e apoptose de células T (PHAN; YANG; SHERRY, 2003; YANG; HU; HOU, 2006).

As células apresentadoras de antígenos e as células dendríticas do baço podem ser ativadas e podem induzir as células T a secretarem citocinas, que podem regular a resposta imune celular e humoral. Quando ativadas, as células dendríticas por si só podem produzir muitas citocinas como IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α (HOCHREIN et al., 2001; STOBER; SCHIRMBECK; REINNMAN, 2001; BERTHIER et al., 2003). Devido a esses efeitos, o estradiol também aumenta a expressão intracelular de IL-6 e IL-10, porém não aparecem alterações evidentes em IL-12 e TNF- α (HOCHREIN et al., 2001; STOBER; SCHIRMBECK; REINNMAN, 2001; BERTHIER et al., 2003).

Ietta et al. (2010) comprovaram em um estudo sobre o efeito do estrógeno sobre a produção de Fator Inibidor de Macrófagos, que os níveis hormonais sofrem uma elevação após 4 horas do tratamento, indicando assim que o efeito hormonal inicia-se à partir desse período.

Outro papel desempenhado pelo estradiol é o aumento da expressão de IDO mRNA pelas células dendríticas comandando a supressão das funções das células T via IDO (PHAN; YANG; SHERRY, 2003).

Considerando que a IDO apresenta níveis elevados em mulheres grávidas (STREHLOW; SEEGER; FRICK, 1993) e que células dendríticas IDO+ possuem um importante papel na inibição das funções das células T (MUNN et al., 1999; ITO et al., 2002), foi estudada a atuação do estradiol na indução da regulação ascendente da IDO por células dendríticas. Em ratos, a utilização de estradiol não afetou a expressão de MHC-classe II, CD 80 e CD86 pelas células dendríticas, mas inibiu a habilidade destas células em estimular a proliferação de células T e produção de citocinas (Th1 e Th2), levando em consideração o aumento da apoptose de células T.

A regulação ascendente da IDO promovida pelo estradiol pode limitar a resposta das células T. Os efeitos da exposição das células dendríticas ao estradiol na proliferação e apoptose foram parcialmente abolidos com a adição de um inibidor da IDO, o 1-metil-D-triptofano (1-MT), indicando que a exposição das células dendríticas ao estrógeno, induz a supressão de células T dependentes da IDO (TERNESS et al., 2002; XIAO; LIU; LINK, 2004; LIANG et al., 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

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

4.1 MATERIAL

Os tecidos uterinos, as placentas e os embriões de 6,5 dias (SUZUKI et al., 2001) utilizados, foram de ratas adultas Wistar e camundongos fêmeas adultas Balb-c, obtidas no biotério do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), da Universidade de São Paulo - USP. Os animais foram eutanasiados, por overdose de anestésico (Cloridrato de Cetamina 10% + Cloridrato de Xilazina 2%), intra-peritonal. O controle foi realizado com amostras de tecidos uterino de ratas adultas Wistar e camundongos fêmeas adultas Balb-c, obtidas no biotério do IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), da Universidade de São Paulo - USP. Foram utilizados 6 (seis) pools e cada um contendo 5 (cinco) animais de cada espécie estudada, pois com um útero gravídico (embriões + placenta) de 6,5 dias após cópula foi obtido uma média de células de $3,8 \times 10^6$ células/ml e o número alcançado quando feito o “pool” de cinco animais foi em média de $2,0 \times 10^7$ células/ml, suficientes para ser colocado 1×10^6 células por poço da placa de 24 *wells*, sendo seis testes e controles feitos em duplicata, totalizando 72 poços.

O projeto foi desenvolvido com aprovação da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), sob o protocolo nº 1742/2009.

4.2 MÉTODOS

Os métodos utilizados estão descritos no item que se segue.

4.2.1 Cultivo Celular

Os tecidos uterinos, as placentas e os embriões de 6,5 dias foram retirados dos animais após eutanásia. O material coletado foi colocado sobre uma placa de Petri para a retirada do excesso de tecido adiposo com o uso de pinça e tesoura estéreis. Os tecidos uterinos, as placentas e os embriões de 6,5 dias foram seccionados e submetidos à técnica de separação mecânica, na qual os fragmentos foram colocados sobre uma malha de aço com 150 mesh de diâmetro e com o auxílio de uma seringa de 1ml e meio de cultura (D-MEM) com 10% de soro fetal bovino e antibiótico, os fragmentos foram pressionados contra a malha para a separação celular.

As células separadas foram colocadas em tubos de 50 ml e submetidas à centrifugação (1200 rpm, por 5 minutos à 20°C). Após a centrifugação o meio foi removido e as células foram suspensas em 30 ml de meio de cultura. O passo seguinte foi a contagem das células em câmara de Neubauer com o uso do corante Azul de Tripán, onde uma alíquota das células foi coletada e misturada com o corante e as células viáveis foram contadas. Uma concentração de 1×10^6 células foi colocada em placas de cultura contendo 24 *wells* com área de 1,76 cm² e estas células foram mantidas por 2 (dois) dias para a realização das análises nos dias propostos (D0- 4h, D1-24h e D2-48h). As placas foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ com 2 ml de D-MEM. Os fatores foram colocados 24 horas após o início do cultivo.

As concentrações dos hormônios e das citocinas foram previamente testadas, e foi observada uma maior expressão de IDO quando adicionado uma menor concentração dos fatores (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação das quantidades de hormônios e citocinas e a expressão de IDO

	Expressão de IDO [↓]	Expressão de IDO [↑]
Controle (D-MEM)	1,0 µl/ 0,19 %	10µl / 0,15%
Estrógeno¹	1,0 µl/ 0,55%	10µl / 0,02%
Progesterona²	0,08µl/ 10,2%	0,8µl/ 0,51%
Interferon γ³	1,0 µl/ 9,03%	10µl / 1,23%
Triptofano⁴	1,0 µl/ 15,16%	10µl / 3,47%
1 - Metil – D – Triptofano + Triptofano⁵	1,0 µl/ 3,28%	10µl / 2,14%

¹E.C.P.® - Cipionato de Estradiol (2mg/ml)

²Promone-E®- Acetato de medroxiprogesterona (50mg/ml)

³Interferon γ (1mg/ml)

⁴L-triptofano (10mg/ml)

⁵1- metil – D – triptofano (1 mg/ml) + triptofano (10mg/ml)

As condições experimentais foram:

- Meio de cultura (D-MEM);
- Meio de cultura com Progesterona (Imunossupressor durante a gestação) (0,08µl Acetato de medroxiprogesterona Promone-E® 50mg/ml);
- Meio de cultura com Estradiol (1µl E.C.P.® Cipionato de Estradiol 2mg/ml)(XIAO; LIU; LINK, 2004);
- Meio de cultura com L-triptofano (10mg/ml) (substrato para proliferação de linfócitos T) (1µl) (MUNN; SHARMA; MELLOR, 2004);
- Meio de cultura com inibidor da IDO (1- metil – D - triptofano 1 mg/ml) (1µl) (BOASO et al., 2005) mais triptofano (10mg/ml) (substrato para proliferação de linfócitos T) (1µl) (MUNN; SHARMA; MELLOR, 2004);
- Meio de cultura com Interferon γ (1mg/ml) (1µl) (GROHMANN; FALLARINO; PUCCETTI, 2003; HEIKKINEM et al., 2003).

4.2.2 Citometria de Fluxo

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

As células foram incubadas com 1 µl anticorpo primário anti-IDO humano e camundongo (mouse monoclonal IgG - Millipore, USA), por 30 min. Após esse período, as células foram lavadas com PBS 0,1M e incubadas com 1 µl anticorpo secundário goat anti-mouse marcado com FITC por 30 min protegido da luz. As células foram lavadas em PBS 0,1M e depois analisadas em citômetro de fluxo (BD FACScalibur). Controles para auto-fluorescência e marcação cruzada pelo anticorpo secundário foram realizados com grupos contendo somente células e grupos contendo somente células e o anticorpo secundário, respectivamente.

5 RESULTADOS

Os resultados encontrados nesta pesquisa seguem separados por espécie animal.

5.1 RATAS

As células obtidas dos tecidos uterinos, das placentas e dos embriões de 6,5 dias de ratas adultas Wistar foram analisadas quanto à expressão da indoleamina 2,3- dioxigenase por Citometria de fluxo.

A média da viabilidade celular encontrada no pool das ratas prenhes foi de aproximadamente 70% e das ratas não prenhes de aproximadamente 68%. E os valores obtidos das células que expressam IDO em ratas não prenhes estão descritos na tabela 2 e de ratas prenhes na tabela 3.

Os valores médios (%) e o desvio padrão obtidos pela citometria de fluxo analisando a quantidade de células dos pools de ratas não prenhes que expressam IDO são apresentados no gráfico 1 e para os pools de ratas prenhes no gráfico 2.

As células que foram analisadas pela citometria de fluxo nos tempos determinados, não foram permeabilizadas e demonstraram expressão específica ao anticorpo anti-IDO humano e camundongo (Figura 1 a 6).

Exemplos das aquisições em dot-plot da IDO das células uterinas, placentárias e embrionárias de ratas com a adição ou não de fatores nos períodos de 4, 24 e 48h após a adição de fatores, são mostrados nas figuras 1 a 6.

Tabela 2 – Valores (%) obtidos pela Citometria de Fluxo analisando a quantidade de células do pool de ratas não prenhes que expressam IDO

	Pool 1			Pool 2			Pool 3			Pool 4			Pool 5			Pool 6		
	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h
Controle (D-MEM)	0,21	0,00	0,05	0,02	0,01	0,08	1,22	0,01	0,05	0,21	0,00	0,05	0,00	0,00	0,06	1,86	0,01	0,06
Estrógeno	0,54	0,06	0,71	0,57	1,09	0,86	0,48	0,08	0,73	0,54	0,06	0,71	0,52	0,50	0,77	0,52	0,66	0,81
Progesterona	0,03	2,13	0,33	0,08	2,58	0,37	0,07	2,58	0,37	0,03	2,13	0,33	0,05	2,32	0,34	0,09	2,83	0,39
Interferon γ	0,38	1,73	0,31	0,51	2,05	0,39	0,41	1,78	0,34	0,38	1,73	0,31	0,44	1,87	0,34	0,47	1,95	0,38
Triptofano	1,20	5,13	1,20	0,78	3,79	0,61	0,83	4,43	0,64	1,20	5,13	1,20	0,55	3,11	0,27	1,05	5,01	0,97
1- Metil – D - Triptofano + Triptofano	1,99	3,80	1,70	1,63	2,45	0,49	1,99	2,57	0,53	1,99	3,80	1,70	1,42	1,70	0,00	2,19	3,31	1,21

Tabela 3 – Valores (%) obtidos pela Citometria de Fluxo analisando a quantidade de células do pool de ratas prenhes que expressam IDO

	Pool 1			Pool 2			Pool 3			Pool 4			Pool 5			Pool 6		
	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h
Controle (D-MEM)	0,21	0,00	0,05	0,02	0,01	0,08	1,22	0,01	0,05	0,21	0,00	0,05	0,00	0,00	0,06	1,86	0,01	0,06
Estrógeno	0,54	0,06	0,71	0,57	1,09	0,86	0,48	0,08	0,73	0,54	0,06	0,71	0,52	0,50	0,77	0,52	0,66	0,81
Progesterona	0,03	2,13	0,33	0,08	2,58	0,37	0,07	2,58	0,37	0,03	2,13	0,33	0,05	2,32	0,34	0,09	2,83	0,39
Interferon γ	0,38	1,73	0,31	0,51	2,05	0,39	0,41	1,78	0,34	0,38	1,73	0,31	0,44	1,87	0,34	0,47	1,95	0,38
Triptofano	1,20	5,13	1,20	0,78	3,79	0,61	0,83	4,43	0,64	1,20	5,13	1,20	0,55	3,11	0,27	1,05	5,01	0,97
1- Metil – D - Triptofano + Triptofano	1,99	3,80	1,70	1,63	2,45	0,49	1,99	2,57	0,53	1,99	3,80	1,70	1,42	1,70	0,00	2,19	3,31	1,21

Gráfico 1 – Valores médios e respectivos desvios-padrões da expressão da IDO (%) em células uterinas de ratas não prenhes (seis “pools” de 5 animais) em cultura no período de 4, 24 e 48hs após a adição de hormônios e citocinas

Gráfico 2 – Valores médios e respectivos desvios-padrões da expressão da IDO (%) em células placentárias e embrionárias de ratas prenhes (seis “pools” de 5 animais) em cultura no período de 4, 24 e 48hs após a adição de hormônios e citocinas

Figura 1 – Exemplos de aquisições em dot plot da expressão da IDO (%) em células uterinas de ratas não prenhes em cultura no período de 4h após a adição de hormônios e citocinas. **A:** somente células sem a adição de fatores; **B:** células + estrógeno; **C:** células + progesterona; **D:** células + interferon γ ; **E:** células + triptofano; **F:** células + 1- metil – D - triptofano + triptofano

Figura 2 – Exemplos de aquisições em dot plot da expressão da IDO (%) em células uterinas de ratas não prenhes em cultura no período de 24h após a adição de hormônios e citocinas. **A:** somente células sem a adição de fatores; **B:** células + estrógeno; **C:** células + progesterona; **D:** células + interferon γ ; **E:** células + triptofano; **F:** células + 1- metil - D - triptofano + triptofano

Figura 3 – Exemplos de aquisições em dot plot da expressão da IDO (%) em células uterinas de ratas não prenhes em cultura no período de 48h após a adição de hormônios e citocinas. **A:** somente células sem a adição de fatores; **B:** células + estrógeno; **C:** células + progesterona; **D:** células + interferon γ ; **E:** células + triptofano; **F:** células + 1- metil - D - triptofano + triptofano

Figura 4 – Exemplos de aquisições em dot plot da expressão da IDO (%) em células uterinas, células placentárias e de embriões de ratas prenhes em cultura no período de 4h após a adição de hormônios e citocinas. **A:** somente células sem a adição de fatores; **B:** células + estrógeno; **C:** células + progesterona; **D:** células + interferon γ ; **E:** células + triptofano; **F:** 1- metil – D - triptofano + triptofano

Figura 5 – Exemplos de aquisições em dot plot da expressão da IDO (%) em células uterinas, células placentárias e de embriões de ratas prenhes em cultura no período de 24h após a adição de hormônios e citocinas. **A:** somente células sem a adição de fatores; **B:** células + estrógeno; **C:** células + progesterona; **D:** células + interferon γ ; **E:** células + triptofano; **F:** células + 1- metil - D - triptofano + triptofano

Figura 6 – Exemplos de aquisições em dot plot da expressão da IDO (%) em células uterinas, células placentárias e de embriões de ratas prenhes em cultura no período de 48h após a adição de hormônios e citocinas. **A:** somente células sem a adição de fatores; **B:** células + estrógeno; **C:** células + progesterona; **D:** células + interferon γ ; **E:** células + triptofano; **F:** células + 1- metil - D - triptofano + triptofano

5.1.1 Controle

A média da expressão de IDO em células uterinas de ratas não prenhes sem a adição de nenhum fator, nos períodos de 4, 24 e 48hs, foram respectivamente $0,59 \pm 0,77\%$, $0,01 \pm 0,01\%$ e $0,06 \pm 0,01\%$. Das células uterinas, placentárias e embrionárias de ratas prenhes foi nos períodos de 4, 24 e 48hs, respectivamente $0 \pm 0\%$, $0,01 \pm 0\%$ e $0,01 \pm 0\%$.

5.1.2 Estradiol

A média da expressão de IDO em células uterinas de ratas não prenhes com a adição de estradiol, nos períodos de 4, 24 e 48hs, foram respectivamente $0,53 \pm 0,03\%$, $0,41 \pm 0,42\%$ e $0,77 \pm 0,06\%$. Das células uterinas, placentárias e embrionárias ratas prenhes foi nos períodos de 4, 24 e 48hs, respectivamente $1,99 \pm 0,03\%$, $0,49 \pm 0,07\%$ e $0,73 \pm 0,04\%$. Comparando todos os tempos com o grupo controle, podemos observar que a expressão de IDO nas ratas prenhes nos tempos de 4 e 24 horas foi maior e no tempo de 48 horas foi menor do que nas ratas não prenhes.

5.1.3 Progesterona

A média da expressão de IDO em células uterinas de ratas não prenhes com a adição de progesterona, nos períodos de 4, 24 e 48hs, foram respectivamente $0,06 \pm 0,03\%$, $2,43 \pm 0,28\%$ e $0,36 \pm 0,02\%$. Das células uterinas, placentárias e embrionárias ratas prenhes foi nos períodos de 4, 24 e 48hs, respectivamente $19,24 \pm 5,17\%$ ($p < 0,01$), $1,55 \pm 0,52\%$ e $0,47 \pm 0,15\%$. Comparando todos os tempos com o grupo controle, podemos observar que a expressão de IDO nas ratas prenhes foi maior do que nas ratas não prenhes. O tempo de 4 horas das ratas prenhes, expressou quase 20% e essa expressão foi diminuindo substancialmente nos tempos subsequentes. Já nas ratas não prenhes, foi no tempo de 24 horas que houve uma pequena expressão de IDO, declinando novamente no tempo de 48 horas.

5.1.4 Interferon γ

A média da expressão de IDO em células uterinas de ratas não prenhes com a adição de interferon γ , nos períodos de 4, 24 e 48hs, foram respectivamente $0,43 \pm 0,05\%$, $1,85 \pm 0,13\%$ e $0,35 \pm 0,03\%$. Das células uterinas, placentárias e embrionárias ratas prenhes foi nos períodos de 4, 24 e 48hs, respectivamente $0,03 \pm 0,03\%$, $9,36 \pm 1,28\%$ ($p < 0,05$) e $0,70 \pm 0,04\%$. Comparando todos os tempos com o grupo controle, podemos observar que a expressão de IDO nas ratas prenhes no tempo de 4 horas foi menor e nos tempos de 24 e 48 horas foi maior do que nas ratas não prenhes.

5.1.5 Triptofano

A média da expressão de IDO em células uterinas de ratas não prenhes com a adição de triptofano, nos períodos de 4, 24 e 48hs, foram respectivamente $0,94 \pm 0,26\%$, $4,45 \pm 0,84\%$ e $0,82 \pm 0,37\%$. Das células uterinas, placentárias e embrionárias ratas prenhes foi nos períodos de 4, 24 e 48hs, respectivamente $4,90 \pm 0,65\%$, $23,53 \pm 9,00\%$ ($p < 0,01$) e $0,60 \pm 0,13\%$. Comparando todos os tempos com o grupo controle, podemos observar que a expressão de IDO nas ratas prenhes no tempo de 4 e 24 horas foi maior e no tempo de 48 horas foi menor do que nas ratas não prenhes.

5.1.6 1- Metil – D - Triptofano + Triptofano

A média da expressão de IDO em células uterinas de ratas não prenhes com a adição de 1- metil – D – triptofano + triptofano, nos períodos de 4, 24 e 48hs, foram respectivamente $1,87 \pm 0,28\%$, $2,94 \pm 0,84\%$ e $0,94 \pm 0,70\%$. Das células uterinas, placentárias e embrionárias ratas prenhes foi nos períodos de 4, 24 e 48hs, respectivamente $2,26 \pm 0,28\%$, $2,52 \pm 0,20\%$ e $0,67 \pm 0,05\%$. Comparando todos os tempos com o grupo controle, podemos observar que a expressão de IDO nas ratas prenhes nos tempos de 4 horas foi menor e nos tempos de 24 e 48 horas foi maior do que nas ratas não prenhes.

5.2 CAMUNDONGOS FÊMEAS

As células obtidas dos tecidos uterinos, das placentas e dos embriões de 6,5 dias de camundongos fêmeas adultas Balb-c foram analisadas quanto à expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase por Citometria de fluxo.

A média da viabilidade celular encontrada no pool dos camundongos fêmeas prenhes foi de aproximadamente 64% e dos camundongos fêmeas não prenhes de aproximadamente 53%. E os valores obtidos das células que expressam IDO em camundongos fêmeas não prenhes estão descritos na tabela 4 e de camundongos fêmeas prenhes na tabela 5.

Os valores médios (%) e o desvio padrão obtidos pela Citometria de Fluxo analisando a quantidade de células dos pools de camundongos fêmeas não prenhes que expressam IDO são apresentados no gráfico 3 e os valores médios (%) e o desvio padrão obtidos pela Citometria de Fluxo analisando a quantidade de células dos pools de camundongos fêmeas prenhes que expressam IDO são apresentados no gráfico 4.

Exemplos das aquisições em dot-plot da IDO das células uterinas, placentárias e embrionárias de camundongos fêmeas com a adição ou não de fatores nos períodos de 4, 24 e 48h após a adição de fatores, são mostrados nas figuras 7 a 12.

Tabela 4 – Valores (%) obtidos pela Citometria de Fluxo analisando a quantidade de células do pool de camundongos fêmeas não prenhes que expressam IDO

	Pool 1			Pool 2			Pool 3			Pool 4			Pool 5			Pool 6		
	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h
Controle (D-MEM)	0,00	0,21	1,29	0,01	0,30	1,66	0,78	0,31	1,67	0,77	0,22	1,30	0,00	0,20	1,28	0,76	0,29	1,65
Estrógeno	1,00	2,68	1,50	0,03	4,42	1,70	0,06	4,84	1,76	0,05	3,10	1,56	0,97	2,26	1,44	0,00	4,00	1,64
Progesterona	1,11	1,25	1,99	1,15	2,35	2,41	1,18	2,63	2,44	1,14	1,53	2,02	1,08	0,97	1,96	1,12	2,07	2,38
Interferon γ	0,94	0,16	1,95	1,06	0,35	2,02	1,11	0,48	2,05	0,99	0,29	1,98	0,89	0,03	1,92	1,01	0,22	1,99
Triptofano	3,09	0,27	0,95	3,31	0,58	1,73	3,57	1,42	2,10	3,35	1,11	1,32	2,83	0,57	0,58	3,05	0,26	1,36
1- Metil – D - Triptofano + Triptofano	0,59	0,33	1,11	0,93	0,42	1,59	1,22	1,26	2,30	0,88	1,17	1,82	0,30	0,00	0,40	0,64	0,42	0,88

Tabela 5 – Valores (%) obtidos pela Citometria de Fluxo analisando a quantidade de células do pool de camundongos fêmeas prenhes que expressam IDO

	Pool 1			Pool 2			Pool 3			Pool 4			Pool 5			Pool 6		
	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h
Controle (D-MEM)	0,00	0,00	2,57	0,00	0,04	2,83	0,00	0,00	2,57	0,00	0,04	2,83	0,00	0,00	2,57	0,00	0,04	2,83
Estrógeno	3,03	0,96	10,15	3,84	1,62	9,80	3,06	1,03	10,19	3,87	1,69	9,84	3,00	0,89	10,11	3,81	1,55	9,76
Progesterona	2,85	0,45	10,68	4,77	0,64	11,98	8,02	0,97	10,83	9,94	1,16	12,13	6,89	0,07	10,53	7,04	1,12	11,83
Interferon γ	2,85	0,65	21,66	3,85	0,77	21,90	2,88	1,93	21,70	3,88	2,05	21,94	2,82	0,00	21,62	3,82	0,52	21,86
Triptofano	5,19	0,74	10,64	5,69	0,99	10,80	5,84	9,74	10,77	6,34	9,99	10,93	4,54	8,26	10,51	5,04	8,01	10,67
1- Metil – D - Triptofano + Triptofano	1,39	0,27	18,68	2,13	1,64	19,47	1,67	0,47	18,73	2,41	1,84	19,52	1,11	0,07	18,63	1,85	1,44	19,42

Gráfico 3 – Valores médios e respectivos desvios-padrões da expressão da IDO (%) em células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes (seis “pools” de 5 animais) em cultura no período de 4, 24 e 48hs após a adição de hormônios e citocinas

Gráfico 4 – Valores médios e respectivos desvios-padrões da expressão da IDO (%) em células placentárias e embrionárias de camundongos fêmeas prenhes (seis “pools” de 5 animais) em cultura no período de 4, 24 e 48hs após a adição de hormônios e citocinas

Figura 7 – Exemplos de aquisições em dot plot da expressão da IDO (%) em células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes em cultura no período de 4h após a adição de hormônios e citocinas. **A:** somente células sem a adição de fatores; **B:** células + estrógeno; **C:** células + progesterona; **D:** células + interferon γ ; **E:** células + triptofano; **F:** células + 1-metil – D - triptofano + triptofano

Figura 8 – Exemplos de aquisições em dot plot da expressão da IDO (%) em células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes em cultura no período de 24h após a adição de hormônios e citocinas. **A:** somente células sem a adição de fatores; **B:** células + estrógeno; **C:** células + progesterona; **D:** células + interferon γ ; **E:** células + triptofano; **F:** células + 1- metil – D - triptofano + triptofano

Figura 9 – Exemplos de aquisições em dot plot da expressão da IDO (%) em células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes em cultura no período de 48h após a adição de hormônios e citocinas. **A:** somente células sem a adição de fatores; **B:** células + estrógeno; **C:** células + progesterona; **D:** células + interferon γ ; **E:** células + triptofano; **F:** células + 1- metil – D - triptofano + triptofano

Figura 10 – Exemplos de aquisições em dot plot da expressão da IDO (%) em células uterinas, células placentárias e de embriões de camundongos fêmeas prenhes em cultura no período de 4h após a adição de hormônios e citocinas. **A:** somente células sem a adição de fatores; **B:** células + estrógeno; **C:** células + progesterona; **D:** células + interferon γ ; **E:** células + triptofano; **F:** células + 1- metil – D -triptofano + triptofano

Figura 11 – Exemplos de aquisições em dot plot da expressão da IDO (%) em células uterinas, células placentárias e de embriões de camundongos fêmeas prenhes em cultura no período de 24h após a adição de hormônios e citocinas. **A:** somente células sem a adição de fatores; **B:** células + estrógeno; **C:** células + progesterona; **D:** células + interferon γ ; **E:** células + triptofano; **F:** células + 1- metil - D - triptofano + triptofano

Figura 12 – Exemplos de aquisições em dot plot da expressão da IDO (%) em células uterinas, células placentárias e de embriões de camundongos fêmeas prenhes em cultura no período de 48h após a adição de hormônios e citocinas. **A:** somente células sem a adição de fatores; **B:** células + estrógeno; **C:** células + progesterona; **D:** células + interferon γ ; **E:** células + triptofano; **F:** células + 1- metil – D - triptofano + triptofano

5.2.1 Controle

A média da expressão de IDO em células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes sem a adição de nenhum fator, nos períodos de 4, 24 e 48hs, foram respectivamente $0,39\pm0,38\%$, $0,26\pm0,04\%$ e $1,48\pm0,18\%$. Das células uterinas, placentárias e embrionárias de camundongos fêmeas prenhes foi nos períodos de 4, 24 e 48hs, respectivamente $0\pm0\%$, $0,02\pm0,02\%$ e $2,70\pm0,13\%$.

5.2.2 Estradiol

A média da expressão de IDO em células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes com a adição de estradiol, nos períodos de 4, 24 e 48hs, foram respectivamente $0,35\pm0,45\%$, $3,55\pm0,93\%$ e $1,60\pm0,11\%$. Das células uterinas, placentárias e embrionárias de camundongos fêmeas prenhes foi nos períodos de 4, 24 e 48hs, respectivamente $3,44\pm0,40\%$, $1,29\pm0,33\%$ e $9,98\pm0,18\%$ ($p<0,05$). Comparando todos os tempos com o grupo controle, podemos observar que a expressão de IDO nos camundongos fêmeas prenhes nos tempos de 4 e 48 horas foi maior e no tempo de 24 horas foi menor do que nos camundongos fêmeas não prenhes.

5.2.3 Progesterona

A média da expressão de IDO em células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes com a adição de progesterona, nos períodos de 4, 24 e 48hs, foram respectivamente $1,13\pm0,03\%$, $1,80\pm0,60\%$ e $2,20\pm0,21\%$. Das células uterinas, placentárias e embrionárias de camundongos fêmeas prenhes foi nos períodos de 4, 24 e 48hs, respectivamente $6,65\pm2,28\%$, $0,84\pm0,26\%$ e $11,33\pm0,66\%$ ($p<0,01$). Comparando todos os tempos com o grupo controle, podemos observar que a expressão de IDO nos camundongos fêmeas prenhes nos tempos de 4

e 48 horas foi maior e no tempo de 24 horas foi menor do que nos camundongos fêmeas não prenhes.

5.2.4 Interferon γ

A média da expressão de IDO em células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes com a adição de interferon γ , nos períodos de 4, 24 e 48hs, foram respectivamente $1,00 \pm 0,07\%$, $0,26 \pm 0,14\%$ e $1,99 \pm 0,04\%$. Das células uterinas, placentárias e embrionárias de camundongos fêmeas prenhes foi nos períodos de 4, 24 e 48hs, respectivamente $3,35 \pm 0,50\%$, $0,99 \pm 0,75\%$ e $21,78 \pm 0,12\%$ ($p < 0,01$). Comparando todos os tempos com o grupo controle, podemos observar que a expressão de IDO nos camundongos fêmeas prenhes foi maior em todos os tempos do que nos camundongos fêmeas não prenhes.

5.2.5 Triptofano

A média da expressão de IDO em células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes com a adição de triptofano, nos períodos de 4, 24 e 48hs, foram respectivamente $3,20 \pm 0,24\%$, $0,70 \pm 0,43\%$ e $1,34 \pm 0,49\%$. Das células uterinas, placentárias e embrionárias de camundongos fêmeas prenhes foi nos períodos de 4, 24 e 48hs, respectivamente $5,44 \pm 0,59\%$, $6,29 \pm 3,90\%$ e $10,72 \pm 0,13\%$. Comparando todos os tempos com o grupo controle, podemos observar que a expressão de IDO nos camundongos fêmeas prenhes foi maior em todos os tempos do que nos camundongos fêmeas não prenhes.

5.2.6 1- Metil – D - Triptofano + Triptofano

A média da expressão de IDO em células uterinas de camundongos fêmeas não prenhes com a adição de 1- metil – D - triptofano + triptofano, nos períodos de 4, 24 e 48hs, foram

respectivamente $0,76 \pm 0,29\%$, $0,60 \pm 0,46\%$ e $1,35 \pm 0,62\%$. Das células uterinas, placentárias e embrionárias de camundongos fêmeas prenhes foi nos períodos de 4, 24 e 48hs, respectivamente $1,76 \pm 0,43\%$, $0,96 \pm 0,70\%$ e $19,08 \pm 0,40\%$ ($p < 0,01$). Comparando todos os tempos com o grupo controle, podemos observar que a expressão de IDO nos camundongos fêmeas prenhes foi maior em todos os tempos do que nos camundongos fêmeas não prenhes.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

6 DISCUSSÃO

Os resultados descritos anteriormente serão discutidos abaixo.

O presente trabalho foi bem sucedido em demonstrar que a expressão da IDO pelas células placentárias e embrionárias é influenciada pela presença de hormônios da reprodução e por algumas citocinas.

A estruturação dos experimentos desse trabalho levou em conta diversas características inerentes aos modelos animais utilizados. O período gestacional escolhido representa a fase de maior expressão de IDO nesses animais (SUZUKI et al, 2001) e, devido às diminutas dimensões dos embriões e respectivas placentas, essas foram analisadas em conjunto com o embrião, uma vez que não foi possível separá-los com precisão, então embriões e placentas foram processados juntamente com o tecido uterino. Além disso, devido ao escasso número de células placentárias e embrionárias possíveis de serem obtidas individualmente, optou-se pelo “pool” dos animais.

Os períodos de análise dos efeitos dos fatores aplicados foram estabelecidos segundo a literatura. O tempo de 4 horas foi instituído de acordo com Ietta et al. (2010) que comprovaram em estudo sobre o efeito do estrógeno na produção de fator inibidor de macrófagos, que os níveis hormonais sofrem uma elevação após 4 horas do tratamento, indicando assim que o efeito hormonal inicia-se à partir desse período. Dessa forma utilizamos esse valor como tempo mínimo para a observação dos efeitos dos fatores. Os demais tempos de observação (24 e 48 horas) foram determinados para avaliar um efeito em longo prazo desses fatores nas células uterinas, placentárias e de embriões. Porém acredita-se que o efeito principal se dá no período entre 4 e 24 horas, provavelmente estando relacionados à meia vida dos fatores. A meia-vida do cipionato de estradiol (ECP®) é longa, variando entre 10 a 12 dias, do acetato de medroxiprogesterona (Promone-E®) é de aproximadamente 17 horas, do interferon γ , do 1-metil-D-triptofano e do triptofano, não estão descritos na literatura.

A expressão de IDO com a adição do estradiol, nas ratas prenhes nos tempos de 4 e 24 horas foi maior do que nas ratas não prenhes e o tempo de 48 horas foi menor, corroborando com os achados de Strehlow; Seegert & Frick (1993) e de Phan; Yang & Sherry (2003), que

dizem que a IDO apresenta níveis elevados em mulheres grávidas e que o estradiol aumenta a expressão de IDO mRNA pelas células dendríticas comandando a supressão das funções das células T via IDO. O grupo de camundongos fêmeas não prenhes e prenhes, a expressão de IDO foi inversamente proporcional, sendo que no grupo de camundongos fêmeas não prenhes a expressão ocorreu no tempo de 24 horas, este aumento sugere que seja em decorrência de seus efeitos nas células do sistema imune, associado com o perfil de citocinas Th2, e que as células dendríticas quando ativadas, por si só podem produzir muitas citocinas como IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α , havendo um estímulo pró-inflamatório e antiinflamatório das células uterinas (BRUCE – KELLER et al., 2000; HOCHREIN et al., 2001; STOBER; SCHIRMBECK; REINMAN, 2001; VEGETO et al., 2001; BERTHIER et al., 2003; PELTIER, 2003). No grupo de camundongos fêmeas prenhes, essa expressão ocorreu nos tempos de 4 e 48 horas.

A progesterona é um hormônio atuante na manutenção da gestação em humanos e animais (STECKEL et al., 2003), ela regula os linfócitos uterinos, pois apresenta efeitos inibitórios diretos ou indiretos na proliferação de linfócitos para indução da tolerância de fetos geneticamente incompatíveis pelo sistema imunológico materno, inibindo a resposta imunológica materna e com isso mantendo a gestação pela produção de células dendríticas (DCs imaturas), que expressam baixos níveis de receptores de células T, que ativam as funções imunológicas de DCs, que também são responsáveis pela formação de células T reguladoras, que são capazes de silenciar as células T efectoras (LIANG et al., 2006). Observa-se que a progesterona atua diretamente na desestimulação da resposta imuno-endócrina pela sua interação com diversos receptores de membrana responsáveis pelo aumento da resposta imune, como o aumento da proliferação de linfócito T (dependente de triptofano), em adição, observa-se a diminuição da resposta imune em presença de níveis de IDO que interfere sobre o triptofano circulante (PELTIER, 2003), demonstrado desta forma nos resultados obtidos uma significativa expressão de IDO em ratas e camundongos fêmeas prenhes, o que já não aconteceu com o grupo de ratas e camundongos fêmeas não prenhes por não estarem em período gestacional.

O interferon- γ estimula uma forte atividade bioquímica e funcional da IDO, pois induzem a expressão dos genes que codificam esta enzima (KUDO et al., 2004), corroborando assim com os resultados, onde em ambos os grupos de ratas, observou-se aumento da expressão de IDO apenas no período de 24 horas e no grupo de camundongos fêmeas não prenhes a

expressão de IDO foi baixa em todos os tempos. No grupo de camundongos fêmeas prenhes, observou-se um aumento significativo no tempo de 48 horas.

Com a adição do triptofano, principal substrato da IDO (MEELOR; MUNN, 2001; TAKIKAWA, 2005), em ambos os grupos de ratas, foi observado um aumento na expressão de IDO apenas no tempo de 24 horas, sugere-se que a atividade da IDO reduziria a concentração de triptofano e desta forma as células do sistema imunológico ativadas não conseguiriam proliferar e a diminuição desta expressão no tempo de 48 horas, pode ser explicada pela redução na quantidade de substrato, fazendo com que as células entrassem em apoptose devido a este estado de carência de triptofano, mimetizando o que acontece no ambiente uterino gestante. Acredita-se também que isso também aconteceu nos grupos de camundongos fêmeas prenhes, nos quais observou-se uma pequena expressão de IDO em relação ao grupo das ratas (MEELOR; MUNN, 2001; TAKIKAWA, 2005).

A adição do inibidor competitivo da IDO, 1-metil D triptofano, levou a uma expressiva diminuição da expressão da mesma pelas células placentárias e embrionárias em cultivo do grupo das ratas prenhes, Muller et al. (2005) demonstrou que o 1MT tem capacidade significativa para inibir a atividade da IDO e coopera com a quimioterapia na regressão de tumores em modelos murinos. Contudo, tal efeito não foi observado no grupo de camundongos fêmeas prenhe no tempo de 48 horas, onde houve uma expressão significativa, o que sugere que houve redução na quantidade de substrato (1MT).

Considerando os resultados obtidos, podemos concluir que a expressão da IDO pelas células uterinas, placentárias e embrionárias em cultivo sofre influência dos fatores testados, o que permite novas hipóteses para melhor compreensão da participação dessa enzima na tolerância materno-fetal, particularmente em relação a sua interação com hormônios e citocinas presentes no útero gestante. A expressão da IDO já havia sido reportada em camundongos e em humanos, cuja expressão foi observada em macrófagos, células dendríticas, células gigantes trofoblásticas, no trofoblasto extraviloso e viloso (MUNN et al., 1999; MELLOR; BABAN; CHANDLER, 2003; MUNN; SHARMA; MELLOR, 2004; HAINZ; OBEXER; WINKLER, 2005), mas ainda não se tinha informações sobre a expressão de IDO em ratas.

Este trabalho também poderá colaborar na elaboração de possíveis tratamentos de enfermidades, relacionadas à manutenção e sucesso da gestação onde haja envolvimento do sistema imunológico materno e dos mecanismos de tolerância. Além disso, abre algumas

perspectivas sobre medidas terapêuticas para algumas patologias frente a rejeição e tolerância imunológica, pois a atividade da IDO que está presente em células da linhagem dos monócitos e macrófagos pode privar os patógenos do acesso ao triptofano e expor os mesmos a metabólitos tóxicos do triptofano e, deste modo ajudar a acabar com infecções. Recentes estudos têm dirigido os efeitos imunomodulatórios da IDO em muitos aspectos, incluindo alergia, imunologia de tumores, autoimunidade e infecção por HIV (FUCHS; FORSMAN; HAGBERG, 1990; MELLOR et al., 2003; VON BUBNOFF; KOCH; BIEBER, 2003; MURRAY, 2003; MULLER et al., 2005).

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Este trabalho evidenciou a expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase em células placentárias e embrionárias de ratas Wistar;
- Foi possível observar a expressão de IDO nas células uterinas, placentárias e embrionárias (ratas e camundongos fêmeas prenhes) em cultivo, as quais se mostraram sensíveis aos fatores (estradiol, progesterona, interferon γ , triptofano e 1- metil – D - triptofano + triptofano).

REFERÊNCIAS

ATKINSON, B. A.; KING, G. J.; AMOROSO, E. C. Development of caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 30, p.763-774, 1984.

BAXTER, A. G.; SMYTH, M. J. The role of NK cells in autoimmune disease. **Autoimmunity**, v. 35, p. 1-14, 2002.

BERTHIER, R.; RIZZITELLI, A.; MARTINON-EGO, C.; LAHARIE, A. M.; COLLIN, V.; CHESNE, S.; MARCHE, P.. N. Fibroblasts inhibit the production of interleukin-12 P70 by murine dendritic cells. **Journal of Immunology**. v.108, p. 391–400, 2003.

BOASSO, A.; HERBEUVAL, J. P.; HARDY, A. W.; WINKLER, C.; SHEARER, G. M. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4⁺ T cells. **Blood**, v. 105, p. 1574-1581, 2005.

BOUMA, G. S.; VAN CAUBER, G. H. P.; VAN BREE, S. P.; CASTELLI-VISSER, R. M.; WITVLIET, M. D.; VAN DER MEER-PRINS, E. M.; VAN ROOD, J. J.; CLAAS, F. H. Pregnancy can induce priming of cytotoxic T lymphocytes specific for paternal HLA antigens that is associated with antibody formation. **Transplantation**, v. 62, p. 672-678, 1996.

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

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

CROY, B. A.; WOOD, W.; KING, G. J. Evaluation of Intrauterine Immune Suppression During Pregnancy in a Species with Epitheliochorial Placentation. **The Journal of Immunology**, v. 139, n. 4, p. 1088-1095, 1987.

ENDERS, A. C. A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas. **The American Journal of Anatomy**, v. 116, n. 1, p. 29-68, 1965.

ENDERS, A. C.; BLANKENSHIP, T. N.; LANTZ, K. C.; ENDERS, S. Morphological variation in the areas of chorioallantoic placenta. **Trophoblast Research**, v. 12, n. 1, p. 1-19, 1998.

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

FERRO, E. A. V. **Estudo da interface materno-embrionária em etapas iniciais da implantação em *Calomys callosus***. 1991. 130f. Dissertação (Mestrado em Histologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

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

FROLOVA, L. Y.; GRIGORIEVA, A. Y.; SUDOMOINA, M. A.; KISSELEV, L. L. The human gene encoding tryptophanyl-tRNA synthetase: Interferon γ -response elements and exon-intron organization. **Gene**, v. 128, p. 237-245, 1993.

FRUMENTO, G.; ROTONDO, R.; TONETTI, M.; DAMONTE, G.; BENATTI, U.; FERRARA, G. B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 459–468, 2002.

FUCHS, D.; FORSMAN, A.; HAGBERG, L. Immune activation and decreased tryptophan in patients with HIV-1 infection. **Journal of Interferon γ Research**, v.10, p. 599, 1990.

GIBORI, G. The decidual hormones and their role in pregnancy recognition. In: GLASSER, S. R.; MULHOLLAND, J.; PSYCHOYOS, A. (Ed.). **Endocrinology of embryo-endometrium interactions**. New York: Plenum, 1994, p. 217-222.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; BIANCHI, R. IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8⁺ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Journal of Immunology**, v.167, p. 708–14, 2001.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; SILLA, S. CD40 ligation ablates the tolerogenic potential of lymphoid dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 277–83, 2001.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; PUC CETTI, P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. **Trends of Immunology**, v. 24, p. 242-248, 2003.

GUTIÉRREZ, G.; FITZGERALD, J. S.; POHLMANN, T.; HOPPE, I.; MARKERT, U. R. Comparative effects of l-Tryptophan and 1-methyl-Tryptophan on immunoregulation induced by sperm, human pre-implantation embryo and trophoblast supernatants. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.50, p. 309–315, 2003.

HAINZ, U.; OBEXER, P.; WINKLER, C. Monocyte-mediated T-cell suppression and augmented monocyte tryptophan catabolism after human hematopoietic stem-cell transplantation. **Blood**, v. 105, p. 4127, 2005.

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

HOCHREIN, H.; SHORTMAN, K.; VREMEC, D.; SCOTT, B.; HERTZOG, P.; O'KEEFFE, M. Differential production of IL-12, IFN- α and IFN- γ by mouse dendritic cell subsets. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 9, p. 5448-5455, 2001.

HUNT, J. S.; MCINTIRE, R. H.; PETROFF, M. G. Immunobiology of human pregnancy. In **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 3th ed. San Diego:Elsevier, 2006.

HWU, P.; DU, M. X.; LAPOINTE, R.; DO, M.; TAYLOR, M. W.; YOUNG, H. A. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T-cell proliferation. **Journal of Immunology**, v.164, p. 3596–3599, 2000.

IETTA, F.; BECHI N, R. R.; BHATTACHARJEE, J.; REALACCI M, D. M.; FERRETTI, C.; PAULESU, L. 17 β -Estradiol modulates the macrophage migration inhibitory factor secretory pathway by regulating ABCA1 expression in human first-trimester placenta. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v. 298, p. 411-418, 2010.

ITO, A.; BUENAFE, A. C.; MATEJUK, A.; ZAMORA, A.; SILVERMAN, M.; DWIER, J. Estrogen inhibits systemic T cell expression of TNF- α and recruitment of TNF- α (+) the cells and macrophages into the CNS of mice developing experimental encephalomyelitis. **Clinical Immunology**, v. 102, p. 275-282, 2002.

KAMIMURA, S.; EGUCHI, K.; YONEZAWA, M.; SEKIBA, K. Localization and developmental change of indoleamina 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. **Acta Medica of Okayama**, v.45, p. 135-139, 1991.

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

KUDO, Y.; BOYD, C. A. Human placental indoleamine 2,3-dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 1500, p. 119-124, 2000.

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

LEE, G. K.; PARK, H. J.; MACLEOD, M.; CHANDLER, P.; MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. **Immunology**, v. 107, p. 452-460, 2002.

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

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

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

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

MELLOR, A. L.; BABAN, B.; CHANDLER, P.; MARSHALL, B.; JHAVER, K.; HANSEN, A.; KONI, P. A.; IWASHIMA, M.; MUNN, D. H. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. **Journal of Immunology**, v. 171, p. 1652- 1655, 2003.

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

MULLER, A.J., DUHADAWAY, J.B., DONOVER, P.S., SUTANTO-WARD, E., PRENDERGAST, G.C. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. **Nature Medicine**, v. 11, p. 312–318, 2005.

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

MUNN, D. H.; SHAFIZADEH, E.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; PASHINE, A.; MELLOR, A. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 1363–1372, 1999.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; LEE, J. R. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Science**, v. 297, p. 1867-1870, 2002.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; MELLOR, A. L. Ligation of B7–1/B7–2 by human CD4(+) T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. **Journal of Immunology**, v.172, p. 4100-4110, 2004.

MUNN, D. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. **Current Opinion Immunology**, v.18, p. 220, 2006.

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

ØSTENSEN, M. Sex hormones and pregnancy in reumatoide arthritis and systemic lupus erythematosus. **Annual NY Academical Science**, v.22, p. 131-143, 1999.

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

PEREIRA, A. C.; RAMIRES DE JESÚS, N.; LAGE, L. V.; LEVY, R. A. Immunity in the Normal Pregnancy and in the Patient with Systemic Lupus Erythematosus (SLE). **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 45, n. 3, p. 134-40, 2005.

PHAN, G. Q.; YANG, J. C.; SHERRY, R. M. Cancer regression and auto immunity induced by cytotoxic T lymphocyte- associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proceedings National Academy Science USA.*, v. 100, p. 8372-8377, 2003.

POTULA, R.; POLUEKTOVA, L.; KNIPE, B.; CHRASTIL, J.; HEILMAN, D.; DOU, H.; TAKIKAWA, O.; MUNN, D. H.; GENDELMAN, H. E.; PERSIDSKY, Y. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enhances elimination of virus-infected macrophages in animal model of HIV-1 encephalitis. **Blood**, v. 106, p. 2382–2388, 2005.

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

RUTELLA, S.; BONANNO, G.; PROCOLI, A.; MARIOTTI, A.; DE RITIS, D.G.; CURTI, A.; DANESE, S.; PESSINA, G.; PANDOLFI, S.; NATONI, F.; DI FEBBO, A.; SCAMBIA, G.; MANFREDINI, R.; SALATI, S.; FERRARI, S.; PIERELLI, L.; LEONE, G.; LEMOLI, R.M. Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10⁺⁺IL-12^{low/neg} accessory cells with dendritic-cell features. **Blood**, v.108, p. 218–227, 2006.

SAITO, S.; SHIMA, T.; NAKASHIMA, A.; SHIOZAKI, A.; ITO, M.; SASAKI, Y. What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? **Journal of Assistant Reproduction Genetics**, v.24, p. 379–386, 2007.

SAKURAI, K.; ZOU, J. P.; TSCHETTER, J. R.; WARD, J. M.; SHEARER, G. M. Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 129, p. 186-196, 2002.

SARKHOSH, K.; TREDGET, E.E.; ULUDAG, H.; KILANI, R.T.; KARAMI, A.; LI, Y.; IWASHINA, T.; GHAHARY, A. Temperature-sensitive polymerconjugated IFN- γ induces the expression of IDO mRNA and activity by fibroblasts populated in collagen gel (FPCG) **Journal Cellular Physiology**, v.201, p. 146– 154, 2004.

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

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

STECKEL, N. K.; KUHN, U.; BEELEN, D. W.; ELMAAGACLI, A. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 57, p. 185–191, 2003.

STEFANO, G. B.; CADET, P.; BRETON, C.; GOUMON, Y.; PREVOT, V.; DESSAINT, J. P.; BEAUVILLAIN, J. C.; ROUMIER, A. S.; WELTERS, I.; SALZET, M. Estradiol stimulated nitric oxid release in human granulocytes is dependent on intracellular calcium transients evidence of a cell surface estrogen receptor. **Blood**, v. 95, n. 12, p. 3951-3958, 2000.

STOBER, D.; SCHIRMBECK, R.; REINNMANN, J. IL-12/IL-18- dependent IFN release by murine dendritic cells. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 2, p. 957-965, 2001.

STREHLOW, I.; SEEGER, D.; FRICK, C. The gene encoding IFP 53/tryptophanyl-tRNA synthetase is regulated by the gamma-Interferon γ activation factor. **Journal of Biology and Chemistry**, v.268, p. 590-595, 1993.

SUGIMOTO, H.; ODA, S. I.; OTSUKI, T.; HINO, T.; YOSHIDA, T.; SHIRO, Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. **PNAS**, v. 103, n. 8, p. 2611–2616, 2006.

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

TAKATA, K.; FUJIKURA, K.; SHIN, B. C. Ultrastructure of rodent placental labyrinth: a site of barrier and transport. **Journal of Reproductive Development**, v. 43, n. 1, p. 1-17, 1997.

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

TERNESSE, P.; BAUER, T. M.; ROSE, L.; DUFTER, C.; WATZLIK, A.; SIMON, H.; OPELZ, G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3- dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 447–457, 2002.

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

TOLSTRUP, A. B.; BEJDER, A.; FLECKNER, J.; JUSTESEN, J. Transcriptional regulation of the Interferon γ - inducible tryptophanyl-tRNA synthetase includes alternative splicing. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 270, p. 397-403, 1995.

UYTTENHOVE, C.; PILOTTE, L.; THEATE, I. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Natural Medicine**, v. 9, p. 1269, 2003.

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

VON BUBNOFF, D.; KOCH, S.; BIEBER, T. New jobs for an old enzyme: the revival of IDO. **Trends of Immunology**, v. 24, p. 296, 2003.

WIRLEITNER, B.; NEURAUTER, G.; SCHRÖCKSNADEL, K.; FRICK, B.; FUCHS, D. Interferon γ -induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects. **Current Medicine Chemical**, v. 10, p. 1581–1591, 2003.

WOLF, A. M.; WOLF, D.; RUMPOLD, H. Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human inflammatory bowel disease. **Clinical of Immunology**, v. 113, p. 47–55, 2004.

XIAO, B.; LIU, X.; LINK, H. Antigen-specific T cell functions are suppressed over the estrogen-dendritic cell-indoleamine 2,3-dioxygenase axis. **Steroids**, v. 69, p. 653–659, 2004.

YANG, L.; HU, Y.; HOU, Y. Effects of 17 β -estradiol on the maturation, nuclear factor kappa B p65 and functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. **Molecular Immunology**, n. 43, p. 357-366, 2006.

YASUI, H.; TAKAI, K.; YOSHIDA, R.; HAYAISHI, O. Interferon γ enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: it's possible occurrence in cancer patients. **Procedures Natl Acadical Science U S A.**, v. 83, p. 622-626, 1986.

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

YOSHIDA, R.; OKU, T.; IMANISHI, J.; KISHIDA, T.; HAYAISHI, O. Interferon γ : a mediator of indoleamine 2,3-dioxygenase induction by lipopolysaccharide, poly(I) X poly(C), and pokeweed mitogen in mouse lung. **Archives of Biochemical and Biophysic**, v. 249, p. 596-604, 1986.