FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

THIERRY SALMON

Presença da proteína Indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO) na interface materno-fetal de *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758)

São Paulo
2015

THIERRY SALMON

Presença da proteína Indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO) na interface materno-fetal de *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758)

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

São Paulo

2015

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3200
FMVZ

Salmon, Thierry
Presença da proteína Indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO) na interface materno-fetal
de *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) / Thierry Salmon. -- 2015.
45 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior.

1. Indoleamina 2,3 dioxigenase. 2. Placenta. 3. Tubarão-azul. 4. Gestação.
5. Tolerância materno-fetal. 6. Viviparidade. I. Título.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2014

CEUA N 3307271113

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a): José Roberto Kfoury Júnior
Executante: Thierry Salmon
Depto/Disc: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres
José Roberto Kfoury Júnior (orientador)

Título do projeto: "Presença da proteína Indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO) na interface materno-fetal de *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) Elasmobranchii, Carcharhiniformes. ".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma proteína típica de mamíferos nos quais participa, além de outras funções, da tolerância materno-fetal, sendo também encontrada em peixes ósseos, porém sem exercer tal função. Somado a isto, o desenvolvimento placentário de *Prionace glauca* favorece a hipótese da presença de IDO e de sua atuação como mecanismo da tolerância materno-fetal nestes organismos. Assim, a proposta deste trabalho é de verificar a expressão da IDO na interface materno-fetal destes tubarões (15 animais) e discutir o seu papel na tolerância do embrião pelo sistema imunitário materno.

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 04/12/2013, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SALMON, Thierry

Titulo: Presença da proteína Indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO) na interface materno-fetal de *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758)

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos trabalhadores do mar e a todos os pós-graduandos, pela coragem e pelo belo trabalho que realizam.

Equipe do Marbella I durante cruzeiro de pesca no arquipélago de Trindade e Martim Vaz, 2014.

AGRADECIMENTOS

A produção intelectual é vital para o desenvolvimento da nossa sociedade, ela traz respostas para questionamentos e geralmente ainda mais perguntas a serem respondidas.

Este trabalho não teria sido, sem apoio.

Os meus pais **Auguste Régis Salmon** e **Elisabeth M. K. Salmon** que me ensinaram o amor pela biologia e que me apoiaram naquilo que puderam e no que não puderam, mas conseguiram.

O **Carlos Eduardo Malavasi Bruno** me incentivou a largar mão de ficar acomodado e procurar crescer em espírito e na academia.

Ao Professor **José Roberto Kfoury Jr** que me acolheu em seu laboratório (LTIAM), forneceu material, contatos e principalmente o embarque onde obtivemos nosso material e tantas outras experiências profissionais e pessoais.

Ao Professor **Alberto Ferreira Amorim**, pois nos ensina a amar o mar, a pesca. Nos deu a oportunidade de participarmos da vida acadêmica, dando palestras e publicando artigos. Nos levou e trouxe de expedições embarcados. Encontrou financiamento quando mais precisamos. Obrigado por esse apoio de pai.

A **Christina Amorim**, que mostrou o lado humano da pesca. A **Sarah Moreno Carrião** pelas altas parcerias no trabalho e na vida enquanto estivemos juntos;)

Agradeço a **Kowalsky** Comércio e Indústria de Pescados LTDA. por abrir as portas da empresa para a parceria com a pesquisa.

Agradeço ao Patrão de Pesca **Heriberto Solino** Mestre (na época) da embarcação Marbella I por me receber a bordo e me fornecer alimento, dados de pesca, ensinamentos sobre a pesca e o mar.

Aos pescadores, incansáveis “Trabalhadores do Mar”, trazendo a comida que pomos na nossa mesa. **Aurélío, Ramos, Sr Severo, Barriga, Ricardo, Fábio, Tenório, Lázaro, Marcelo “Squalicida”, Carlinho “Bigode”, Miro**. Obrigado pela evisceração realizada com excelência que deixaria muitos taxidermistas impressionados.

Ao **Thomas J.G. Gallois** pois sem os momentos de descontração cercado garrafas de heineken geladas no “barraco” (bem como muitas outras passagens que não cabem aqui), o mundo não teria feito o mesmo sentido. A **Cristiane Cagnoni Ramos**, temos nossas histórias, te amo muito muito. Ao **Patrick Riviere**, cujo carisma e bom humor sempre traz final alegria, amigos de 3 gerações não se encontram em qualquer esquina. Você é importante.

“Quand le croque morts vous emportera qu’il vous conduise a travers ciel au pere éternel”.

À minha parceirinha **Mariana Frias de Campos**, eu sei que um ideal leva amor.

À grade – **Paula Kasten e Deborah Gallo** - que me cedeu espaço e acesso à internet, conforto e sossego na hora de escrever.

A **Fernanda “Colega” Cardoso**, que teve experiências prévias com IDO2, Western Blot nas quais me baseei. Ao **André “Bianor” Conrado**, que me ensinou as bases do trabalho de laboratório no LAMIH do **Professor Francisco Jabier Blásquez**. A **Leticia Pinto** por inúmeros cafézinhos e mais, ao **William Reina** pela bobeira, hahahah.

Ao Doutor **Ralf Britz**, pois deu o curso mais interessante que eu já fiz.

O Professor **William Hamlett**, que estudou a placenta de tubarão a fundo e que por telephone inspirou as viagens de atuneiro da equipe.

A **Monica Cassel** no laboratório da Professora **Maria Inês Borella** que me deu apoio enquanto matava as minhas imuno-histoquímicas que deram trabalho.

Ao apoio recebido do Professor **José Roberto Machado Cunha da Silva**, que sentou do meu lado ao microscópio pra dar mais uma opinião sobre minhas Imunohistoquímicas.

Professora **Mariz Vainzof** por ceder espaço e material e a **Renata Ishiba** por me ensinar a cortar no criostato e que fez comigo e a **Martinha** o Western Blot.

À Professora **Mariana Matera Veras** bem como a Professora **Estela Bevilacqua**, sem quem os resultados não teriam sido escritos.

Toda a equipe de trabalhadores do departamento de anatomia de animais domésticos e silvestres que deram uma boa força na hora que precisou.

RESUMO

SALMON, T. **Presença da proteína Indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO) na interface materno-fetal de *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758).**

[Presence of the protein Indoleamine 2,3- dioxigenase on the materno-fetal interface of *Prionace glauca*]. 2015. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O tubarão-azul (*Prionace glauca*) é uma espécie que apresenta desenvolvimento vivíparo placentário em que o saco vitelino se desenvolve ao longo da gestação tornando-se uma placenta que executa função matrotrófica. A Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma proteína encontrada em mamíferos nos quais participa, além de outras funções, da tolerância materno-fetal, sendo também encontrada em peixes ósseos. Assim, a proposta deste trabalho foi verificar a expressão da IDO na interface materno-fetal de *Prionace glauca* e descrever sua localização. Para tanto, material placentário/uterino e embriológico de três fases distintas da gestação (pré-placenta, meia gestação e fim da gestação) de fêmeas de *P. glauca* foram coletados e processados para a imuno-histoquímica. Os resultados mostraram a presença da IDO ao longo do desenvolvimento do saco vitelino/placenta, na ectoderme nas três fases e na endoderme apenas nas duas primeiras fases. No epitélio uterino observou-se a marcação da IDO nas duas últimas fases. Esses tecidos de interface seriam locais de maior contato entre a mãe e o conceito, fato que poderia levar à indução de uma resposta imunológica contra o conceito semi-alógeno. A soma destes fatores poderia contribuir como um indício de uma possível atuação da IDO como mecanismo da tolerância materno-fetal na interface placentária de Chondrichthyes, como relatado em mamíferos eutérios.

Palavras-chave: Indoleamina 2,3 dioxigenase; Placenta. Tubarão-azul. Gestação. Tolerância materno-fetal. Viviparidade.

ABSTRACT

SALMON, T. **Presence of the protein Indoleamine 2,3- dioxygenase on the materno-fetal interface of *Prionace glauca***. [Presença da proteína Indoleamina 2, 3-dioxygenase (IDO) na interface materno-fetal de *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758)]. 2015. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The blue shark (*Prionace glauca*) is a viviparous placental species in which the yolk sac develops along pregnancy turning into a placenta with a matrotrophic role. The indoleamine 2 3-dioxygenase (IDO) is a protein usually described in mammals, which, among other functions, participates on the maternal-fetal tolerance process. Although it has also been reported in bony fish, no information is available regarding its function. Therefore, the purpose of this study was to investigate the expression of IDO in blue shark maternal-fetal interface and describe its distribution. Thus, placental / uterine and embryonic materials from three different stages (pre-placenta, middle and late gestation) of pregnant *P. glauca* females were processed for immunohistochemistry. The results showed IDO labelling during the yolk sac / placenta development in ectoderm along the three development phases and at endoderm only at phases I and II. In uterine epithelium, IDO was observed in the last two phases. These interface tissues are major contact areas between the mother and the conceptus, that would induce an immunological response against the semiallogeneic conceptus. The sum of these factors may contribute as an indication to the possible IDO role as a mechanism of maternal-fetal tolerance in Chondrichthyes placental interface, as described in eutherian mammals.

Keywords: Indoleamine 2,3 dioxygenase; Placenta. Blue shark. Gestation. Maternal-fetal tolerance. Viviparity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	<i>PRIONACE GLAUCA</i> (ELASMOBRANCHII, CARCHARHINIDAE) E A VIVIPARIDADE PLACENTÁRIA	13
2.2	O SURGIMENTO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA COMBINADA OU ADAPTATIVA	16
2.3	INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE	17
2.4	EVOLUÇÃO DA INDOLEAMINA NOS VERTEBRADOS	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVOS GERAIS	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	22
4.2	PROCESSAMENTO DO MATERIAL	25
4.3	IMUNO-HISTOQUÍMICA	25
4.4	ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-IDO 1	26
5	RESULTADOS	28
5.1	TESTE DE ESPECIFICIDADE	28
5.2	HISTOLOGIA	29
5.3	IMUNOHISTOQUÍMICA	31
6	DISCUSSÃO	32
7	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Os padrões de reprodução em tubarões incluem diversos tipos: oviparidade, viviparidade aplacentária e viviparidade placentária (HAMLETT; WOURMS, 1984). O *Prionace glauca*, comumente conhecido por tubarão-azul ou guelha, é um tubarão da família Carcharhinidae amplamente distribuído em todos os oceanos que pode ser encontrado nas zonas profundas dos oceanos, em águas temperadas e tropicais (COMPAGNO et al., 2005).

Esta espécie é muito capturada para abastecer o mercado de pescados e sua carne é geralmente encontrada com o nome de cação. Sua gestação é vivípara placentária e sabe-se que cada indivíduo se encontra protegido por uma fina capsula fibrosa e que o embrião, uma vez fixado à parede uterina, permanece ligado a mãe por um cordão umbilical e uma placenta derivada do saco vitelino composta de duas porções, uma porção proximal lisa e outra distal rugosa que participa efetivamente das transferências entre o feto e a mãe (HAMLETT, 1999).

Com o estabelecimento de uma conexão tão íntima entre os tecidos fetais e o útero materno, se faz necessário que o organismo deste conceito semi-alogenêico encontre uma maneira de evadir a resposta imunológica materna evitando que haja rejeição do mesmo e que a gestação seja bem-sucedida. Em mamíferos o complexo sistema de tolerância materno-fetal é constituído de diversos processos e muitas moléculas, dentre as quais a indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), enzima que participa do catabolismo do aminoácido triptofano. Este aminoácido é essencial para a proliferação de células T e, portanto, torna-se um fator limitante da resposta imunológica. Em mamíferos, foi constatado que a região de interface entre o feto e a mãe possui uma alta expressão de IDO (THOMAS; STOCKER, 1999).

A presença de moléculas homólogas à IDO tem sido relatada em outras espécies filogeneticamente mais antigas incluindo fungos e bactérias, contudo com funções aparentemente restritas ao metabolismo do triptofano para obtenção de energia (YUASA et al., 2007).

Em peixes, uma IDO paráloga (Proto-IDO ou IDO2) foi encontrada na espécie *Danio rerio* (um teleósteo com fecundação e desenvolvimento externos), mas sua função ainda não é bem esclarecida (YUASA et al., 2007). O sistema imunológico

nos peixes sofreu uma grande evolução e diversificação, culminando no estabelecimento de mecanismos, alguns deles, próximos aos encontrados nos mamíferos (CARRIER et al., 2004).

Apesar dos tubarões pertencerem a um ramo filogenético mais antigo que os teleósteos, já possuem capacidade, por exemplo, de uma resposta imunológica celular (BOEHM et al., 2012). Aliado a isso, o desenvolvimento de uma placenta à semelhança dos mamíferos eutérios, poderia proporcionar um ambiente propício para o aparecimento de mecanismos de tolerância materno-fetal, incluindo a expressão da IDO. A confirmação dessa expressão poderia ser um forte indicativo desse processo nessa espécie animal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *PRIONACE GLAUCA* (ELASMOBRANCHII, CARCHARHINIDAE) E A VIVIPARIDADE PLACENTÁRIA

O tubarão azul (*Prionace glauca*) é uma das espécies mais abundantes e produtivas do ambiente epipelágico (COMPAGNO, 1984; DOMINGO et al., 2002; QUAGGIO et al., 2008). Está amplamente distribuído em todos os oceanos do mundo e é a espécie mais comumente capturada na pesca de espinhel de superfície, tipo americano – mais usada no Brasil - (HAZIN et al., 2000; QUAGGIO et al., 2008). Vive além da plataforma continental em águas que variam, preferencialmente entre 12 e 20° C e a profundidades entre 0 e 350m ou até mais profundo em regiões de águas mais quentes. Possuem comportamento migratório importante relacionado à disponibilidade de alimento e ao ciclo reprodutivo. Segregados por idade, são encontrados em áreas distintas para juvenis, sub-adultos, machos adultos e fêmeas prenhes (COMPAGNO et al., 2005).

Sua alimentação, na costa do Brasil, é composta por diversos elementos, tais como Teleósteos, Misticetos (ocasionalmente encontrados mortos na superfície no caso das altas latitudes), cefalópodes e até aves marinhas (VASKE et al., 2009). Sua reprodução é vivípara placentária dando à luz, em média 15-30 filhotes (COMPAGNO et al., 2005; NAKANO; STEVENS, 2008) mas podendo variar de 4 a 135. Nascem com comprimento total (CT) entre 35 e 44 cm após um período de 9 a 12 meses de gestação e alcançam a maturidade sexual entre 182 e 281 cm para machos e 220 cm aproximadamente para fêmeas (COMPAGNO et al., 2005). A maior parte dos tubarões é ovípara, mas em alguns casos (10% segundo Compagno, 2005 e 30% aproximadamente, segundo HAINES, 2006), apresentam viviparidade placentária, como no caso das famílias Sphyrnidae e Carcharhinidae (COMPAGNO et al., 2005; CARTER et al., 2007).

As placentas melhor estudadas são as dos mamíferos, no entanto, todas devem cumprir um papel semelhante: a nutrição do embrião pela mãe, acomodando diferenças antigênicas entre a mãe e o embrião (POLLUX et al., 2009). Entre os

peixes, primeiros vertebrados em que aparece o desenvolvimento placentário (LONG et al., 2008), há diversos modelos de placentação, cada qual estruturalmente muito diferente um dos outros. Atualmente, a placentação é uma característica encontrada em diversos peixes ósseos e cartilagosos (HAMLETT, 1999; POLLUX, et al., 2009). Há duas hipóteses para o surgimento da placentação em peixes, na primeira, em matrotóficos (nutrição fornecida ao longo da gestação), a alocação ao longo da gravidez teria um peso positivo na natação, portanto se associado a um investimento energético médio menor na reprodução, proveria uma vantagem durante os primeiros estágios da gravidez. Na segunda, lecitotrofia, a vantagem seria a habilidade de aumentar a fecundidade quando a disponibilidade de recursos fosse maior, ou seja, na matrotrofia, o tamanho da prole poderia ser aumentado se houvesse recursos nutricionais abundantes até completar o ciclo de desenvolvimento, enquanto que na lecitotrofia, o tamanho seria limitado no momento da fertilização do ovo (POLLUX et al., 2009).

A placenta dos tubarões poderia ser considerada análoga à placenta dos mamíferos, ou seja, desempenha o mesmo papel, mas tem origem embriológica diferente e foi o primeiro passo do desenvolvimento placentário entre os vertebrados (HAMLETT; WOURMS, 1984). Nesse grupo, a placenta consiste de um saco vitelino modificado pelo qual os filhotes são nutridos através do útero materno. Durante a gravidez cada embrião fica contido individualmente em uma capsula membranosa (“egg envelope”) produzida pela glândula oviducal. O desenvolvimento consiste de duas fases distintas, o período de pré-implantação e o período implantado (JONES; HAMLETT, 2004). No início, os filhotes são dependentes da nutrição apenas do saco vitelínico e não estão ligados ao útero. À medida que o suprimento de vitelo vai diminuindo, o saco vitelino passa por uma modificação morfogênética e adquire duas porções distintas, a porção distal (que adquire uma textura rugosa), a placenta rugosa e uma porção proximal (que se mantém lisa), a placenta lisa. A placenta então adquire uma função de trocas gasosas e transferências hematotróficas (HAINES et al., 2005; HAMLETT; WOURMS, 1984).

A placentação dos tubarões é considerada epiteliocorial, mesmo assim, existem diversas particularidades entre as espécies: em *Carcharhinus falciformis*, por exemplo, a placentação ocorre por aposição dos tecidos materno e fetal e não há interdigitação, a ooteca é observada em alguns trechos da placenta (GILBERT; SCHLERNITZAUER, 1966). Em *Rizoprionodon terranova* observam-se vilosidades

(interdigitação) entre os tecidos materno e fetal bem como a presença contínua da ooteca ao longo da interface materno fetal (HAINES; FLAJNIK; WOURMS, 2006). *Mustelus canis* apresenta também vilosidades e a presença da ooteca (JONES; HAMLETT, 2004). Otake e Mizue (1985) encontraram vilosidades entre os tecidos e não havia presença da ooteca. Essas particularidades também podem ser observadas na análise microscópica dessas estruturas. Os tecidos que compõe a placenta parecem ser os mesmos, no entanto, a disposição dos tecidos varia bastante não apenas entre espécies, mas também ao longo da gestação. O saco vitelino em *Squalus acanthias* tem função nutritiva e respiratória nos primeiros estágios e apenas nutritiva a partir do meio da gestação. Estudos relativos ao número de camadas desse anexo embrionário tem divergido entre 5: epitélio da ectoderme, uma zona de fibras reticulares, capilares vitelinos, células endodérmicas e o citoplasma vitelino periférico (JOLLIE; JOLLIE, 1967) e 6: ectoderme somática, mesoderme somática, celoma extraembrionário, mesodermo esplâncnico, endoderma e a cavidade vitelina (HAMLETT; WOURMS, 1984).

Em estudos com *Rhizoprionodon terraenovae*, Hainnes et al. (2006) descrevem o epitélio da ectoderme da placenta recém implantada como uma bicamada pseudo-estratificada ou colunar baixa e a endoderme do saco vitelino como escamoso cuboide; nos tecidos placentários durante a fase gestacional intermediária, os vilos se intensificam e são irregulares e a ectoderme parece estar muito aderida à ooteca, a vascularização se torna mais intensificada e há presença de muitas células binucleadas; Nos tecidos placentários na fase final da gestação, a ectoderme se apresenta como uma camada única e escamosa com vascularização logo abaixo, também se encontram menos células binucleadas. Hamlett e Koob (1999) descrevem uma mucosa transportadora em que as células superficiais contêm vesículas abundantes que exportam seu conteúdo para o exterior. Abaixo desta, há uma lâmina basal altamente vascularizada um endotélio contínuo. Ultraestruturalmente, a porção proximal da placenta, apresenta características de tecido produtor de hormônios. A porção distal é composta por uma bicamada epitelial escamosa, lâmina basal e a rede vascular (HAMLETT, 1999).

2.2 O SURGIMENTO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA COMBINADA OU ADAPTATIVA

O sistema linfoide e as respostas imunes estão presentes desde os vertebrados mais basais em formas relativamente simples. A complexidade dessas estruturas aumentou ao longo da história evolutiva, gerando uma alta especialização de suas funções e se refletiu na ampla gama de respostas imunes observada nos animais mais derivados, como os mamíferos (GOOD et al., 1967).

O sistema imune inato é filogeneticamente muito antigo, anterior aos vertebrados, e é a primeira defesa do organismo contra patógenos. Esse sistema é mediado principalmente por fagócitos, incluindo macrófagos e células dendríticas, além da produção de compostos antimicrobianos, como determinados peptídeos (HOFFMAN et al., 1999; AKIRA et al., 2006; LIESCHKE; TREDE, 2009). A resposta imunológica adaptativa existe em todos os vertebrados desde os ciclóstomos, em que podemos encontrar células mononucleadas semelhantes aos linfócitos (SAHA et al., 2010) e é caracterizada por uma resposta secundária às infecções, muito mais rápida e eficiente que a resposta da imunidade inata (BOEHM et al., 2012).

Apesar do subfilo dos vertebrados ser o único a apresentar resposta imunológica combinada, por muito tempo ciclóstomos foram considerados animais desprovidos de sistema imune adaptativo (GOOD et al., 1967; MARCHALONIS et al., 1998). Todavia, além da presença de tais células semelhantes a linfócitos em tecidos hematopoiéticos, outras estruturas relacionadas a esse sistema foram identificadas em lampreias como: receptores de linfócitos, timo linfoide e um primitivo baço linfoide. Tais arcabouços combinados a habilidades como produção de imunoglobulina e anticorpos, desenvolvimento de certas reações alérgicas e expressão de memória imunológica, sugerem a existência de respostas imunes adaptativas nesse grupo (GOOD et al., 1967; LIESCHKE; TREDE, 2009).

Em elasmobrânquios, um timo com organização cortical e medular é encontrado. O baço possui um foco linfático bem desenvolvido além de diferenciação aparente entre as polpas vermelha e branca. Ao longo do trato gastrointestinal são encontrados focos hematopoiéticos (órgão de Leydig). Além da presença de imunoglobulinas de cadeia leve e pesada, são bem estabelecidas as respostas imunes secundárias e a memória imunológica tanto nas respostas do tipo

celular quanto humoral. A diversidade de células sanguíneas em elasmobrânquios se aproxima em complexidade daquela encontrada em mamíferos (GOOD et al., 1967; MARCHALONIS et al., 1998; ANDERSON et al., 2004; CARRIER et al., 2004). Além disso, surgem os RAGs (*Recombinase-Activating Genes*), ativadores de recombinação gênica das Igs e TCR, MHC (complexo principal de histocompatibilidade) relacionadas à apresentação de antígenos aos linfócitos T, assim como receptores de células T rearranjados. Ao longo da história evolutiva dos Gnathostomata a estrutura do complexo de receptor de célula T permanece virtualmente constante (GOOD et al., 1967; MARCHALONIS et al., 1998; LIESCHKE; TREDE, 2009). Por outro lado, alguns dos órgãos linfoides de elasmobrânquios são distintos daqueles encontrados nos mamíferos, de forma que são encontrados o órgão de Leydig e o órgão epigonal, também apresentando função hematopoiética, produzindo células sanguíneas entre as quais aquelas que participam da resposta imunológica adaptativa (RAUTA et al., 2012).

2.3 INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE

A antigenicidade é a premissa para que um organismo dê início a uma resposta imunológica, no entanto, muitas vezes isso não é suficiente. Desvendar e manipular os mecanismos de supressão ou aumento dessas respostas é essencial para compreensão de processos inflamatórios como câncer, distúrbios autoimunes e a tolerância materno-fetal (MELLOR; MUNN, 2004). Nesse aspecto, durante a gestação ocorre um paradoxo imunológico para que o conceito semi-alogenêico não seja rejeitado e, dentre os mecanismos que promovem a tolerância materno fetal, observa-se a ação da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) na supressão da ação das células T da mãe sobre o feto (MUNN et al., 1998).

A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma hemoxigenase monomérica com peso molecular que varia entre 40 e 43 kDa e tem função oxidativa, sendo que utiliza o superóxido (O_2^-) ao invés de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou oxigênio (O_2), tal como a triptofano 2,3-deoxigenase (TDO) ou outras oxigenases e é responsável pela via de metabolização do L-triptofano-quinurenina em tecidos extra-hepáticos (THOMAS; STOCKER, 1999).

O triptofano, aminoácido essencial e menos abundante das proteínas celulares, quando em diminuição em microambientes, pode causar a supressão da proliferação celular e, dessa forma, atuar sobre a imunorregulação, por exemplo (THOMAS; STOCKER, 1999). A homeostase dos níveis de triptofano é controlada principalmente pela triptofano 2,3-desoxigenase (TDO) nos tecidos hepáticos, no entanto, essa enzima não parece responder aos estímulos imunológicos. Ao contrário, a IDO é altamente sensível a esses estímulos em diversos tipos celulares (TAYLOR; FANG, 1991). Sua expressão pode ser induzida a partir da ação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e, por sua vez, a IDO catalisa a clivagem oxidativa da dupla ligação 2,3 do anel indólico do triptofano, convertendo-o em N-formil-quinurenina, a qual poderá ser convertida em diversos outros metabólitos (STONE; DARLINGTON, 2002; GROHMANN; PUC CETTI, 2003; MELLOR; MUNN, 2004). Dessa forma, catabolização do triptofano age sobre as células T, principalmente por ação de seus metabólitos com potenciais apoptóticos, que , que levam à interrupção de seu ciclo celular na fase G1 (MELLOR; MUNN, 1999; MUNN et al., 1999; TERNESS et al., 2002; FALLARINO et al., 2003).

Assim, a IDO atua em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, dentre os quais, antitumoral, onde ocorre a aceleração do catabolismo de triptofano e inibição do aumento das células tumorais (*in vitro*) (THOMAS; STOCKER, 1999); previne infecções bacterianas e virais (DAI e ZHU, 2010), além da imunorregulação (MUNN et al., 1999; THOMAS; STOCKER, 1999; HEMMATI et al., 2009). Por esse mesmo mecanismo, sua presença na interface materno fetal inibe proliferação dos linfócitos T da mãe, inibindo respostas imunológicas e promovendo a proteção do conceito semi-alogenêico da rejeição do organismo materno em ratos e humanos (MUNN et al., 1998; MELLOR; MUNN, 2001).

Esse processo seguramente não é o único mecanismo imunorregulatório que ocorre e o sistema imunológico parece dispor de compensações a longo prazo em casos de mal funcionamento da atuação da IDO. Todavia, já foi demonstrado que cessar a atividade da IDO de forma aguda é desastroso para a manutenção da gestação, por exemplo (MUNN et al., 1998; MELLOR; MUNN, 2004).

A IDO foi inicialmente isolada e identificada do intestino de coelhos (YAMAMOTO; HAYAISHI, 1967) e determinada como enzima de mamíferos da defesa contra infecções virais e bacterianas. A proteína foi posteriormente isolada de diversos outros órgãos, como intestinos, pulmão, estômago, baço e cérebro de

coelhos, em contraste à TDO, tipicamente encontrada no fígado (HIRATA; HAYAISHI, 1975). Em camundongos a IDO aparece expressa em diversos tecidos. Nas células da placenta marcações foram observadas principalmente no citoplasma do sinciotrofoblasto (HEMMATI et al., 2009; DAI; ZHU, 2010). Ainda em camundongos, observou-se a presença da IDO em ambos os lados da placenta (materno e fetal) ao longo de toda a gravidez em que os tecidos epiteliais foram proeminentes. Foi observada também a presença da proteína em populações isoladas do estroma endometrial. Nas células sinciciais e no trofoblasto (células gigantes e zonas de junção) a marcação ocorreu na região perinuclear (HEMMATI et al., 2009). Em humanos observou-se uma distribuição irregular da IDO em placenta a termo, no cerne do mesênquima e em áreas do sinciotrofoblasto. Em placenta do primeiro trimestre de gravidez, não se observou a presença de IDO nos vilos placentários, porém houve marcação no epitélio glandular da decídua, no tecido conjuntivo com presença de agrupamentos de linfócitos. A IDO também foi observada no endotélio de vasos (SEDLMAYR et al., 2002). Kudo et al. (2004) identificaram a presença da IDO no sinciotrofoblasto, no citotrofoblasto extraviloso e em macrófagos do estroma viloso das membranas fetais.

2.4 EVOLUÇÃO DA INDOLEAMINA NOS VERTEBRADOS

O aparecimento do gene que codifica a IDO é basal na filogenia da vida na terra e, portanto, provavelmente muito antigo. Encontrou-se evidências de genes putativos da IDO em bactérias, porém estes não expressam a atividade enzimática típica (YUASA et al., 2011).

A IDO foi encontrada em fungos e leveduras tendo participação distinta daquela dos mamíferos. Ela é responsável por suprir NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) na via da quinurenina (YUASA; BALL, 2012).

Em pesquisas com moluscos, um tipo de molécula relacionada a IDO também foi encontrada, porém não apresentando a atividade enzimática típica que se encontra em mamíferos e sendo relacionada apenas a uma função de mioglobina (Mb) (YUASA et al., 2007).

Além dos mamíferos, a IDO foi encontrada em outros vertebrados, como aves, répteis, anfíbios e diversos peixes teleósteos. A família IDO encontra-se atualmente dividida em dois grupos distintos, a proto-IDO e a IDO, sendo esta última, considerada como a mais derivada e sua separação ocorreu antes da divergência dos vertebrados (YUASA et al., 2015). A molécula chamada proto-IDO, encontrada em peixes, *Danio rerio*, anfíbios, *Xenopus*, e também em mamíferos é considerada uma enzima de baixa atividade enzimática em relação a IDO e restam dúvidas sobre a sua função fisiológica (YUASA et al., 2007; YUASA et al., 2015). Em 2007, diversos estudos encontraram uma molécula paróloga a IDO, chamada IDO2 ou proto-IDO, não apenas em mamíferos, mas também em vertebrados filogeneticamente mais antigos (BALL et al., 2007; METZ et al., 2007; YUASA et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Verificar a expressão da IDO nas interfaces materno-fetal (útero e embrião) de *Prionace glauca* (Elasmobranchii, Carcharhinidae).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a presença da proteína IDO pela imunomarcagem nas regiões de interface materno-fetal do útero e placenta em três momentos distintos da gestação (I) inicial, onde o feto ainda não se encontrava em contato direto com o útero materno, mas apenas com seu saco vitelínico, (II) intermediária, em que a placenta já se encontrava fixada e (III) final, na qual o embrião permanecia fixo via placentária e não havia mais a presença de vitelo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Cerca de 06 fêmeas prenhes de *P. glauca*, de tamanhos variando de 1,70m a 2,10m, capturadas entre junho de 2013 e maio de 2014 por frota atuneira de espinhel, foram utilizadas neste projeto. Após o abate, cerca de 06 úteros gravídicos (Figura 1 e 2) foram coletados e a região de interface materno-fetal junto com os embriões.

Foram coletadas 4 amostras oriundas de cada uma de três fases específicas do desenvolvimento embrionário de *P. glauca*: (I) inicial (Figura 3), onde o feto ainda não se encontrava em contato direto com o útero materno, mas apenas com seu saco vitelínico, (II) intermediária (Figura 4), em que a placenta já se encontrava fixada e (III) final (Figura 5), na qual o embrião permanecia fixo via placentária e não havia mais a presença de vitelo.

Todas as amostras coletadas foram doadas pela empresa Kowalsky Comércio e Indústria de Pescados, Itajaí- SC e todos os procedimentos de coleta e processamento deste projeto tiveram autorização do Ministério do Meio Ambiente, ICMBio – SISBIO n. 47691-1 e da CEUA-FMVZ-USP n. 3307271113.

Figura 1- sistema reprodutor de *P. glauca* fixado em formol

Figura 2- Útero de *P. glauca* contendo diversos embriões fixados à placenta

Figura 3- Embrião de *P. glauca* em fase I. SV: saco vitelino.

Figura 4- Embrião de *P. glauca* em fase II. PL- Porção lisa da placenta; PR- Porção rugosa da placenta.

Figura 5- Embrião de *P. glauca* em fase III. PC- placenta.

Fonte: (SALMON, 2014)

4.2 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Os tecidos coletados dos úteros gravídicos foram recortados em tamanhos de aproximadamente 3cm³ fixados em paraformaldeído 4%, e mantidos a temperatura ambiente até o momento do desembarque.

As amostras foram então desidratadas em bateria de graduação GL crescente de álcool etílico, 70, 90% e absoluto (90 minutos) e álcool etílico/xilol (1:1) por 53 minutos. Em seguida passaram por processo de inclusão em paraplast (Erv-Plast, Easypat, Brasil), começando com imersão em xilol (15 minutos) e em seguida em paraplast (120 minutos) (Erv-Plast, Easypat, Brasil). As amostras foram dispostas em molde e emblocadas com paraplast (Erv-Plast, Easypat, Brasil).

Cortes de 3 µm foram realizados e postos sobre lâminas silanizadas para melhor aderência.

4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

As lâminas com o material foram desparafinadas em banhos de xilol por 20 minutos por duas vezes e em soluções de etanol progressivamente mais diluídas, 100, 90 e 70% por 10 minutos cada. A seguir, foram lavadas em solução tampão de TBS pH 7,2 por 10 minutos. Passou-se a uma recuperação antigênica em solução tampão citrato por 20 minutos em banho maria em temperatura de 98°C. O entorno das secções nas lâminas foi seco e um círculo feito com caneta hidrofóbica (Kyota-K600) foi realizado ao redor dos cortes para limitar a área exposta à reação. Usou-se para este experimento o kit reveal SPRING® (US) (código de catálogo SPD-125).

Após recuperação antigênica, o material foi submetido ao bloqueio da peroxidase interna com solução bloqueadora de peróxido de hidrogênio, durante 30 minutos, lavado em solução TBS 5 min, submetido ao bloqueio das reações inespecíficas com Protein block durante 120 min.

Em seguida, o material foi exposto a 100µl/lâmina de solução contendo anticorpo primário anti-IDO1 (IM- 0402, Imuny, Brasil) diluído a 1/400 em TBS, incubado “*overnight*” em câmara escura refrigerada a 4°C.

Após incubação de anticorpo primário, foi realizada lavagem de 5 min com TBS. Em seguida, realizou-se tratamento indicado nas especificações do kit reveal SPRING ® (US) com Complement (10 minutos) e HRP Conjugate (15 minutos).

Posteriormente, o material foi corado com 100µl/lâmina de 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloro (Cromógeno DAB) (Reveal SPRING-US) diluído 1:50 (20µl/100µl) durante tempo determinado por análise visual (por volta de 10 segundos para cada lâmina) e lavado em solução PBS, 3 vezes de 5 min cada.

A seguir a lâmina foi corada com hematoxilina para obter o contraste e em seguida mergulhada rapidamente em solução saturada de carbonato de lítio e passada para uma bateria de álcoois (etanol) 70, 90, 80% (apenas um mergulho) e duas vezes de 2 minutos etanol absoluto e depois em xilol por 5 minutos. As lamínulas foram coladas com bálsamo e em seguida analisadas ao microscópio de luz. Os locais que apresentavam marcações específicas para a reação com IDO foram fotografadas em aumentos de 10, 20, 40 e 100 vezes.

Controles negativos para ligações inespecíficas do anticorpos secundário, e positivos com amostras que já reconhecidamente expressam a IDO foram realizados para validação dos resultados.

A análise microscópica, as leituras das lâminas foram realizadas em microscópio de luz Nikon Eclipse E-800.

4.4 ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO PRIMÁRIO ANTI-IDO 1

A especificidade do anticorpo anti-IDO utilizado foi testada em tecidos fixados do P. glauca pela técnica de western blot, descrita a seguir:

O material das fases I, II e III (I- 1,2,3 e 4 A; II- 1,2,3 e 4 B; III- 1,2,3 e 4 C), uma amostra de placenta humana e uma amostra de placenta bovina foram macerados separadamente e colocados em Eppendorf de 1,5 ml. O material foi fervido com solução de extração (5 ml solução de extração + 50 µl DTT), colocados 200 µl no Eppendorf e em seguida na água fervente, e agitado em vortex. Após isso,

foi centrifugado por 15 minutos e o sobrenadante dividido em alíquotas. A solução inicial concentrada foi armazenada a -70°C .

Para a eletroforese, ferveram-se os extratos por 2 min, que foram então centrifugados e aplicados no gel de poliacrilamida 6%, com stacking gel de 4% e corrido a 100V com 500 ml de tampão reserva (Reservoir Buffer) diluído 10 vezes . Posteriormente o gel foi transferido para a membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (100 ml de tampão, 800 ml com água destilada e 200 ml de álcool metílico)

Homogeneizou-se a membrana de nitrocelulose com tampão de transferência no agitador e montou-se o aparato para o blot: que foi feito por aproximadamente 60 min a 250-300 mA. Terminada a transferência, a membrana foi deixada para secar 37°C overnight e depois lavada 3 vezes em água destilada.

Para a revelação adicionou--se skim milk 5% por 60 min. Acrescentou-se então o anticorpo primário overnight, em skim milk 1%. Então, lavou-se 3 vezes com TTBS. Adicionou-se então o anticorpo secundário, com skim milk 1% + anticorpo 1:500 ul. Lavou-se 3 vezes com TTBS. Na presença da Fosfatase Alcalina, colocou-se os blots em 30ml tampão AP + 300ul NBT + 300ul BCIP, por 30 segundos até o aparecimento das bandas de marcação específica. Peroxidase: Colocou-se os blots em 30ml tampão AEC + 1,5ml AEC + 15ul H_2O_2 10% (5ul H_2O_2 30%).

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE ESPECIFICIDADE

O teste de especificidade do anticorpo foi realizado usando-se uma amostra de placenta humana (controle positivo), bem como amostras da interface materno fetal de *Prionace glauca*. Os resultados do WB , demonstraram a especificidade do anticorpo anti-IDO1 (IM- 0402, Imuny, Brasil) a uma proteína de 45 kDa, como pode ser observado na figura 6.

Figura 6 - Western blot dos fragmentos das fases I, II e III do desenvolvimento da placenta de *Prionace glauca*.

Fonte: (SALMON, 2014)

A homologia entre a IDO humana e a IDO de *Callorhinchus milii*, espécime com parentesco mais próximo com dados disponíveis no BLAST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, foi de 47% de identidade com a IDO2.

A sequência de aminoácidos em que o anticorpo primário anti-IDO1 (IM- 0402, Imuny, Brasil) se liga na proteína foi comparada com a sequência dos aminoácidos do trecho mais próximo na proteína de *Callorhinchus milii* e observou-se que dentre

os 20 aminoácidos da sequência, 14 são idênticos, 2 têm função parecida e 4 são diferentes (Figura 7).

Figura 7 - Comparativo entre os trechos da sequência de aminoácidos do número 127 ao 147 da proteína IDO1- humana (Query) e IDO2- *callorhinchus milii* (Subject).
COMP- Sequência de aminoácidos correspondente em que (“+” aminoácido de função parecida e “-” sem correspondência)

Query- 127	ADCVLANWKKKDPNKPLTYE
COMP-	ADCVLANWKKKDPN -+ - + - -
Subject- 127	ADCVLANWKKKDPNGSMEFG

5.2 HISTOLOGIA

A interface materno-fetal de *Prionace glauca* se apresentou rica em vilosidades e muito vascularizada. Pôde-se observar vasos de maior porte em ambos os tecidos (materno e fetal). Não foi observada a presença da ooteca separando os tecidos materno e fetal.

Os embriões da fase I mediam entre 6 e 8 centímetros, todos apresentavam filamentos branquiais externos (Figura 1). Na análise do saco vitelino destes embriões foram observadas três camadas (Figura 10): (1) ectoderme, com uma camada de células colunares e uma camada germinativa apoiadas sobre uma rede vascularizada de capilares; (2) uma ampla camada de tecido conjuntivo; (3) uma camada do endotélio em que se observa um epitélio cuboide apoiado sobre uma camada germinativa vascularizada por capilares. Dentro dessas três camadas principais pode-se ver plaquetas de vitelo. Vasos de maior calibre (Figura 11) podem ser observados na porção interna do saco vitelino, recobertos pelo mesmo epitélio cúbico da endoderme.

Os embriões da fase II mediam entre 15 e 18 centímetros e ainda apresentavam filamentos branquiais externos (Figura 2), nenhuma pigmentação, a porção lisa da placenta contendo vitelo e a porção rugosa da placenta. Na histologia

do local em que a placenta se encontra implantada (Figura 15) na parede do útero, pode-se observar um espaço entre os tecidos maternos e fetais. Os tecidos fetais compostos por: (1) ectoderme, um epitélio colunar com alguns núcleos difusos sugerindo alta atividade celular e uma camada germinativa logo abaixo na qual os núcleos se apresentavam densos sobre uma ampla rede de capilares; (2) Tecido conjuntivo as vezes apresentando vasos sanguíneos de maior calibre (Figura 13); (3) endoderme do saco vitelino, composta por um epitélio perfeitamente cúbico com núcleos dispersos, uma camada germinativa abaixo e alta vascularização. Dentro do saco vitelino ainda havia presença de plaquetas de vitelo e de vasos sanguíneos de maior calibre recobertos pelo epitélio da endoderme. O lado materno: (1) um epitélio cúbico com núcleo disperso provavelmente em atividade (uma camada germinativa pode ser observada em alguns trechos); (2) capilares embebidos em tecido conjuntivo (Figura 16).

Os embriões da fase III (Figura 3) mediam entre 43 e 45 centímetros e apresentavam dentes armados e coloração (foram considerados a termo) bem como uma placenta completamente desenvolvida sem presença de vitelo. A histologia da interface materno-fetal apresentou na porção embrionária da placenta: (1) ectoderme composta por um epitélio de células bastante grandes (por volta de 50 μm) formando uma espessa parede epitelial, no entanto em alguns trechos, apresentava estreitamentos deste epitélio. Neste tecido em alguns trechos não parecia haver divisão entre essas células epiteliais. Sob e as vezes entre as células epiteliais mais externas há alguns agrupamentos de células menores, variando entre 5 e 10 μm derivados da camada germinativa. Observou-se capilares sanguíneos associados a ectoderme, mas a vascularização de capilares associada a ectoderme não era mais tão aparente e em raras ocasiões se observou eritrócitos, possivelmente em fase de degradação; (2) a camada de tecido conjuntiva muito diminuída; (3) o tecido endotelial bastante reduzido por sua vez, composto por células achatadas alinhadas em uma banda. Observou-se vasos sanguíneos de maior calibre associados a endoderme. O lado materno é composto por: (1) uma camada epitelial cúbico- com núcleos difusos sobre uma rede de capilares contendo eritrócitos; (2) estroma uterino com forte presença de capilares e vasos maiores contendo eritrócitos (Figura 19).

5.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

A presença da IDO foi observada nas mesmas células ao longo do desenvolvimento: nas camadas epiteliais do ectoderme e no epitélio do endoderme no lado fetal e no epitélio uterino no lado materno.

Na porção distal do saco vitelino do embrião da fase I, observou-se uma intensa imuno-reatividade a IDO na porção apical do citoplasma das células do epitélio da ectoderme células (Figura 11). O epitélio da endoderme apresenta marcação apesar da baixa reatividade (Figura 12). Os capilares, hemácias, tecido conjuntivo, bem como as camadas germinativas da ecto- e endoderme não apresentam marcação relevante.

Os embriões da fase II, nos quais já existe um contato íntimo entre os tecidos materno e fetal, observou-se uma marcação muito intensa para a IDO. Do lado do embrião, mais uma vez, o epitélio da ectoderme aparece fortemente marcado em todo o citoplasma ao longo de todo o epitélio inclusive em algumas células da camada germinativa (Figura 17). Alguns núcleos mais difusos parecem apresentar reatividade também. No endotélio, apenas a camada de células maduras disposta externamente apresenta marcação (Figura 16). O citoplasma ao longo de toda a ectoderme aparece fortemente corado, assim como alguns núcleos. Capilares, hemácias e o tecido conjuntivo não apresentaram marcações. Do lado materno, apenas a ectoderme do útero apareceu fortemente corada. Os vasos e o estroma uterino não apresentaram reatividade (Figura 17).

Nos tecidos do embrião da fase III, observou-se marcação nas células do epitélio da ectoderme do lado embrionário da placenta (Figura 19). Em alguns pontos a marcação era muito intensa e em outros havia uma marcação mais tênue. A marcação não é apenas citoplasmática, mas também nuclear, os núcleos se apresentavam bastante difusos (Figura 20). Nos agrupamentos celulares a marcação é nuclear, ao redor do nucléolo. O endotélio composto por um tecido de células achatadas apresentou marcação eventual (Figura 19). No epitélio materno as marcações do epitélio uterino ocorreram em algumas regiões, mais intensamente no núcleo, ao redor do nucléolo e, em outros, apenas no citoplasma o estroma uterino não apresentava marcação (Figura 19).

Figura 8- Controle negativo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO no saco vitelino (fase I) do embrião de *P. glauca* aumento.

Figura 9- Teste positivo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO no saco vitelino (fase I) do embrião de *P. glauca* aumento.

Fonte: (SALMON, 2014)

Figura 10- Controle negativo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO do saco vitelino (fase I) de embrião de *P. glauca*. EcF- epitélio fetal; EnF- endoderme fetal; CF- capilar fetal; PV- plaqueta de vitelo

Figura 11- Teste positivo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO saco vitelino (fase I) de embrião de *P. glauca*. EnF- endoderme fetal; TC- tecido conjuntivo; EcF- ectoderme fetal; VF- Vaso fetal.

Figura 12- Teste positivo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO saco vitelino (fase I) de embrião de *P. glauca*. EcF- ectoderme fetal; CF- capilar fetal; Cmi- Célula mitótica

Fonte: (SALMON, 2014)

Figura 13- Controle negativo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO da porção placentária do saco vitelino (fase II) do embrião de *P. glauca* aumento.

Figura 14- Teste positivo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO na porção placentária do saco vitelino (fase II) do embrião de *P. glauca* aumento.

Fonte: (SALMON, 2014)

Figura 15- Controle negativo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO da porção placentária do saco vitelino (fase II) do embrião de *P. glauca*. EnF- endoderme fetal; TC- tecido conjuntivo; EcF- ectoderme fetal; EU- Epitélio uterino; SU- estroma uterino.

Figura 16- Teste positivo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO do saco vitelino (fase II) do embrião de *P. glauca*. EnF- endoderme fetal; TC- tecido conjuntivo; EcF- ectoderme fetal; CF- Capilar fetal; EU- Epitélio uterino; SU- estroma uterino CM- Capilar materno.

Figura 17- Teste positivo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO do saco vitelino (fase II) do embrião de *P. glauca*. EcF- ectoderme fetal; EU- Epitélio uterino;

Fonte: (SALMON, 2014)

Figura 18- Controle negativo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO da placenta (fase III) do embrião de *P. glauca* aumento 10x.

Figura 19- Teste positivo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO da placenta (fase III) do embrião de *P. glauca* aumento 10x. EcF- epitélio fetal; TC- tecido conjuntivo; EnF- endotélio fetal; EU- epitélio uterino; CM- capilares maternos; SU- estroma uterino.

Figura 20- Teste positivo para reação de imuno-histoquímica para marcação da IDO da placenta (fase III) do embrião de *P. glauca* aumento 10x. EcF- epitélio fetal; EnF- endotélio fetal;

Fonte: (SALMON, 2014)

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi possível evidenciar a presença da proteína IDO nos tecidos de interface materno-fetal durante a gestação em *Prionace glauca*.

As placentas de tubarão foram descritas em apenas uma ordem de tubarões, os Carcharhiniformes e apresentam morfologias bastante diversas para cada espécie. Observou-se pelos resultados desse trabalho, que a placenta de *Prionace glauca* apresenta uma estrutura muito próxima daquela descrita por Otake e Mizue (1985) que analisaram a estrutura de embriões entre 26 e 38 cm, uma fase intermediária as fases II e III do presente estudo. Foram encontradas células grandes com núcleo central, apoiadas sobre uma camada de células achatadas e a placenta não apresentava ooteca entre os tecidos materno e fetal.

Scolidon laticaudus (fase média tardia da gestação) possui uma placenta lisa, sem vilosidades e com um epitélio de contato com a mãe bastante fino (WOURMS, 1993). Em *Rhizoprionodon terraenovae* observa-se a ectoderme sendo um tecido colunar baixo (na fase média da gestação) e escamoso ao final da gestação, bem como presença da ooteca entre os tecidos materno e fetal (HAINES et al., 2006). A placenta de *Carcharhinus falciformis* ao final da gestação (62,2-66,0 centímetros) apresenta um epitélio da ectoderme com células reduzidas e extremamente achatadas e o epitélio da endoderme bastante achatado e escamoso. Em *Mustelus canis*, Jones e Hamlett (2004), encontraram, ao final da gestação, um epitélio da ectoderme escamoso e atenuado com presença da ooteca. O desenvolvimento da morfologia do saco vitelino e da interface materno-fetal verificado em *Prionace glauca* no presente trabalho condiz bastante com os resultados já apresentados em outros trabalhos: um saco vitelino de 3 camadas na fase I; na fase II onde se observa a sobreposição dos tecidos fetais e maternos e a manutenção das três camadas, a alta irrigação fornecida por capilares associados a ectoderme e a endoderme, no entanto a ectoderme apresenta uma espessura homogênea ao longo de todo o tecido, contrariando a noção de que há um achatamento dos tecidos epiteliais para a aproximação entre os vasos sanguíneos maternos e fetais. Esta

característica que influencia na passagem de nutrientes se mostra mais evidente na fase III em algumas regiões da interface materno-fetal, no entanto as células epiteliais mantém a sua espessura e a aproximação se dá na intersecção entre algumas dessas células.

Essa grande variação nas placentas condiz com a hipótese de Wourms e Lombardi (1992) que a placenta em condictes teria evoluído diversas vezes.

Existem diversas evidências fósseis de viviparidade. Grogan e Lund (2011) encontraram embriões bastante desenvolvidos no interior de um condicte do Carbonífero, mostrando que a viviparidade surgiu há muito tempo. Outra evidência que suporta esta ideia é a antiguidade do surgimento do desenvolvimento placentário. Long et al. (2008) observa a presença de fósseis com placenta em pacodermes do devoniano.

Os tubarões, bem como outros condictes, incluindo o *Prionace glauca* apresentam uma complexidade de células sanguíneas comparável à dos mamíferos e também resposta imune adquirida (CARRIER et al., 2004). A citotoxicidade das células T em peixes foi verificada em teste por Nakanishi et al. (2002) em eritrócitos alogênicos e células infectadas por vírus. Haines et al. (2006) descrevem ter encontrado células na parede uterina de *Rhizoprionodon terraenovae* que se parecem com “natural killers”, melanomacrófagos de vertebrados basais, bem como agregados de linfócitos. À medida que a placenta se forma ao longo do desenvolvimento embrionário de *Prionace glauca*, há uma aproximação entre os vasos sanguíneos fetais e maternos. A estratégia de reprodução placentária observada em mamíferos e em tubarões (bem como em diversos outros grupos) implica na presença de um tecido alogênico no organismo materno e requer um sistema de controle e regulação do sistema imunológico e dos linfócitos T citotóxicos ao longo da gestação. Entre as estratégias de controle do sistema imunológico em mamíferos destaca-se a indoleamina 2,3-dioxigenase (através da depleção do aminoácido triptofano na via da quinurenina) com um amplo papel. Destacam-se as funções de homeostase e modulação do sistema imunológico, prevenção de respostas hiperinflamatórias e autotolerância (no caso da tolerância do sistema imune a células carcinogênicas) (PALLOTTA et al., 2011) e a tolerância aos tecidos alogênicos da placenta do embrião prevenindo assim a rejeição do conceito (MUNN et al., 1998; HEMMATI et al., 2009; ALIJOTAS-REIG et al., 2014). Estes fatores são

importantes e grandes influenciadores da presença de IDO presente na interface materno-fetal.

A expressão da IDO em camundongos é observada em regiões de maior contato entre os tecidos materno e fetal, por exemplo no sinciciotrofoblasto, no trofoblasto e em macrófagos (HEMMATI et al., 2009; MUNN et al., 1998). Em *Prionace glauca* os resultados apresentam a IDO sendo expressa também na região de contato entre o embrião e a mãe. Diferentemente da placenta humana e de camundongo (hemocorial, placenta invasiva em que o sangue materno entra em contato direto com as células placentárias fetais) (WOODING; BURTON, 2008), a placenta do saco vitelino dos tubarões é epiteliocorial e há apenas sobreposição dos tecidos e as trocas passam pelos epitélios uterino e fetal (sem o contato direto entre o sangue). A ectoderme fetal é, portanto, o tecido da placenta mais intimamente ligado a parede uterina materna e a primeira que estaria sujeita ao ataque pelo sistema imunológico materno.

Ao realizar a coleta dos embriões da fase I pôde-se observar que entre o saco vitelino do embrião e o útero materno havia uma fraca conexão estabelecida que cedeu ao se remover os embriões do útero. A análise histológica apresenta apenas tecidos fetais do saco vitelino de três camadas. As marcações de IDO da fase I encontradas sugerem que os estágios em que se começa a estabelecer o contato entre os tecidos fetais e maternos poderiam induzir uma resposta imunológica e teriam o potencial para desencadear o sistema de tolerância materno-fetal, mais especificamente pela ação da IDO.

A análise histológica da fase II revelou um espessamento da ectoderme fetal da placenta e tecidos maternos e fetais intimamente associados em inúmeras vilosidades. A imunomarcagem apresenta um padrão parecido com o estágio anterior em que a IDO aparece na região de contato entre os epitélios da ectoderme fetal e o útero materno. A marcação do epitélio fetal é principalmente citoplasmática, apesar de aparecer no núcleo (bastante difuso e certamente em grande atividade), mas isso pode ser devido a sobreposição de tecidos. A IDO também está presente no epitélio da endoderme fetal mostrando que está difundida em diversas regiões da placenta.

Durante a fase III pôde-se observar uma outra mudança no epitélio da ectoderme, com células superficiais maiores e mais largas e em alguns trechos parecia haver sincicialização. Associado a ectoderme fetal, encontrou-se alguns

capilares, mas estes pareciam não ter a mesma tonicidade das fases anteriores. Nenhum eritrócito foi visto nessa região, sugerindo que o tecido estava em fase de degradação, hipótese suportada pelo estágio avançado de desenvolvimento em que se apresentavam os embriões.

Os núcleos das células epiteliais da ectoderme fetal e materna nas três fases bem como endoderme fetal nas fases I e II apresentaram características de alta atividade, provavelmente devido à intensa atividade de transmissão e recepção de substâncias entre o embrião em desenvolvimento e a mãe e, de maneira geral, nas três fases estudadas, os tecidos que apresentaram marcação de IDO, foram o epitélio da ectoderme da porção fetal da placenta e o epitélio uterino, ou seja, os tecidos que estão em contato mais direto.

As marcações verificadas nas análises histológicas nas três fases analisadas no presente trabalho, apoiadas pelo teste de especificidade realizado com o western blot, mostram a presença da IDO na interface materno-fetal de *Prionace glauca*. Estes tecidos que executam função matrotrófica estão em uma região sujeita a uma resposta imunológica materna. Estas evidências sugerem que a IDO poderia apresentar uma função de tolerância do conceito semi-alogenêico pelo sistema imunológico materno nos Chondrichtyes similar à dos mamíferos. Outros estudos específicos são necessários para comprovar a ação da enzima nesta região, além de elucidar outras possíveis funções fisiológicas da IDO presente em Chondrichtyes.

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho apresenta evidências da presença da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) na interface materno-fetal de *Prionace glauca* nos três estágios analisados. A expressão da IDO pôde ser observada desde os primeiros contatos do saco vitelino no útero até a placenta completamente desenvolvida.

REFERÊNCIAS

- ALIJOTAS-REIG, J.; LLURBA, E.; GRIS, J. M. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: A new challenging role for regulatory T cells. **Placenta**, v. 35, p. 241-248, 2014.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.
- ANDERSON, M. K.; PANT, R.; MIRACLE, A. L.; SUN, X.; LUER, C. A.; WALSH, C. J.; TELFER, J. C.; LITMAN, J. W.; ROTHEMBERG, E. V. Evolutionary origins of lymphocytes: ensembles of t cell and b cell transcriptional regulators in a cartilaginous fish. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 5851-5860, 2004.
- BALL, H. J.; SANCHEZ-PEREZ, A.; WEISER, S.; AUSTIN, C. J. D.; ASTELBAUER, F.; MIU, J.; McQUILLIAN, J. A.; STOCKER, R.; JERMIIN, J. S.; HUNT, N. mH. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. **Gene**, v. 1, n.396, p. 203-213, 2007.
- BALL, H. J.; YUASA, H. J.; AUSTIN, C. J. D.; WEISER, S.; HUNT, N. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 3, n. 41, p.467-471, 2009.
- BOEHM, T.; IWANAMI, N.; HESS, I. Evolution of the immune system in lower vertebrates. Annual Review of Genomics and Human Genetics. V.13, p. 127-149, 2012.
- CARTER, A. M.; CROY, B. A.; DANTZER, V.; ENDERS, A. C.; HAYAKAWA, S.; MESS, A.; SOMA, H. Comparative aspects of placental evolution: A workshop report. **Placenta** **28**, v. 21, p. 129-132, 2007. Supplement A,
- CARRIER, J. C.; MUSICK, J. A. HEITHAUS, M. R. **Biology of sharks and their relatives**. Florida: Boca Raton, 2004.
- DAI, X.; ZHU, B. T. Indoleamine 2,3-dioxygenase tissue distribution and cellularlocalization in mice: Implications for its biological functions. **Journal ofhistochemistry and Cytochemistry**, v. 58, p.17-28, 2010.
- GOOD, R. A.; FINSTAD, J.; GEWURZ, H.; COOPER, M. D.; POLLARA, B. The development of immunological capacity in phylogenetic perspective. **American Journal of Diseases of Children**. v. 114, n. 5, p. 477-497, 1967.
- FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; HWANG, K. W.; ORABONA, C.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; BELLADONNA, M. L.; FIORETTI, M. C.; ALEGRE, M. L.; PUC CETTI, P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. **Nature immunology**, v.4, n.12, p.1206-1212, 2003.

GROGAN, E. D.; LUNG, R. Superfoetative viviparity in a Carboniferous chondrichthyan and reproduction in early gnathostomes. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 3, p. 587-594, 2011.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; PUC CETTI, P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. **Trends in immunology**, v. 24, n. 5, p. 242-248, 2003.

HAINES, A. N.; FLAJNIK, M. F.; WOURMS, J. P. Histology and immunology of the placenta in the atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. **Placenta**, v. 27, p. 1114-1123, 2006.

HAMLETT, W. C.; WOURMS, J. P. Ultrastructure of the pre-implantation shark yolk sac placenta. **Tissue and Cell**, v.16, n. 4, p. 613-625, 1984.

HAMLETT, W. C. **Sharks skates and rays, the biology of elasmobranch fishes**. [S.l.]: John Hopkins University Press. 1999.

HAZIN, F. H. V.; PINHEIRO, P. B.; BROADHURST, M. K. Further notes on the reproduction of the blue shark, *Prionace glauca*, and a postulated migratory pattern in the South Atlantic Ocean. **Ciência e Cultura**, v. 2, n. 52, p. 114-120, 2000

HEMMATI, S.; JEDDI-TEHRANI, M.; TORKABADI, E.; GHASSEMI, J.; KAZEMI SEFAT, G. E.; DANESH, P.; BARZEGAR, Y. L.; AKHONDI, M. M.; ZARNANI, A. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is expressed at feto-placental unit throughout mouse gestation: An immunohistochemical study. **Journal of Reproduction and Infertility**, v. 10, n.3, p. 177-183, 2009.

HIRATA, F.; HAYAISHI, O. Studies on Indoleamine 2,3-dioxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 15, p. 5960-5966, 1975.

HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY, C. A.; EZEKOWITZ, R. A. B. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v. 284, n. 5418, p.1313-1318, 1999.

JONES, C. J. P.; HAMLETT, W. C. Structure and glycolysation of the term yolk sac placenta and uterine attachment site in the viviparous shark *Mustelus canis*. **Placenta**, v. 25, p. 820-828, 2004.

KUDO, Y.; BOYD, C. A.; SPIROPOULOU, I.; REDMAN, C. W.; 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, n. 2, p. 87-98, 2004.

LIESCHKE, G. J.; TREDE, N. S. Fish immunology. **Current Biology**, v. 19, n. 16, p. 678-682, 2009.

MARCHALONIS, J. J.; SCHLUTER, S. F.; BERNSTEIN, R. M.; HOHMAN, V. S. Antibodies of shark, revolution and evolution. **Immunological Reviews**, v. 166, p. 103-122, 1998.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? **Immunology Today**, v. 20, p. 469-473, 1999.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal anti-fetal immune responses. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 52, n. 1, p. 5-13, 2001.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 10, p. 762-774, 2004.

METZ, R.; DUHADAWAY, J. B.; KAMASANI, U.; LAURY-KLEINTOP, L.; MULLER, A. J.; PRENDERGAST, C. J. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1 methyl-tryptophan. **Cancer Research**, v.67 , n. 15, p. 7082-7088, 2007.

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

MUNN, D. H.; SHAFIZADEH, E.; ATTWOOD, J. T.; BORDANEV, I.; PASHINE, A.; MELLOR, L. A. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 9, p. 1363-1372, 1999.

NAKANISHI, T.; FISHER, U.; DIJKSTRA, J. M.; HASEGAWA, S.; SOMAMOTO, T.; OKAMOTO, N.; OTOTAKE, M. Citotoxic T cell function in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, n. 2, p. 131-139, 2002.

PALLOTTA, M.T.; ORABONA, C.; VOLPI, C.; VACCA, C.; BELLADONNA, M. L.; BIANCHI, R.; SERVILLO, G.; BRUNACCI, C.; CALVITTI, M.; BICCIATO, S.; MAZZA, E. M. C.; BOOM, L.; GRASSI, F.; FIORETTI, M. C.; FALLARINO, F.; PUC CETTI, P.; GROHMAN, U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nature Immunology**. n. 12, p. 870-878, 2011.

NAKANO, H.; STEVENS, J. D. The biology and ecology of the blue shark, *prionace glauca* In: CAMHI, M. D.; PIKITCH, E. K.; BABCOCK, E. A. **Sharks of the open ocean, fisheries and conservation**. [S.l.]: Blackwell publishing, 2008. p. 140-151.

QUAGGIO, A. L. C.; KOTAS, J. E.; HOSTIM, M. As capturas do tubarão-azul, *Prionace glauca* Linnaeus (Elasmobranchii, Carcharhinidae), na pescaria de espinhel-de-superfície (monofilamento), sediada em Itajaí (SC), Brasil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 3, n. 1, p. 61-74, 2008.

RAUTA, P. R.; NAYAK, B.; DAS, S. Immune system and immune responses in fish and teyr role in comparative immunity stydy: A model for higher organisms. **Immunology Letters**, v. 148, p. 23-33, 2012.

SAHA, N. R.; SMITH, J.; AMEMIYA, C. T. Evolution of adaptive immune recognition in jawless vertebrates. **Seminars in Immunology**. v. 22, n. 1, p. 25-33, 2010.

SEDLMAYR, P.; BLASCHITZ, A.; WINTERSTEIGER, R.; SMELITSCH, M.; HAMMER, A.; MacKENZIE, C. R.; WALCHER, W.; REICH, O.; TAKIKAWA, O.; DOHR, G. Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in human female reproductive organs and the placenta. **Molecular Human Reproduction**. V.8, N.4, p. 385-391, 2002.

STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 8, p. 609-620, 2002.

TAYLOR, M. W.; FENG, G. S. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2, 3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 11, p. 2516-2522, 1991.

TERNESS, 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. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 4, p. 447-457, 2002.

THOMAS, S. R.; STOCKER, R. Redox reactions related to indoleamine 2,3 dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. **Redox report**, v. 4, n. 5, p. 199-220 , 1999.

VASKE, JR. T.; LESSA, R. P.; GADIG, O. B. F. Feeding habits of the blue shark (*Prionace glauca*) off the coast of Brazil. **Biota Neotropical**, v. 9, n. 3, p. 55-60, 2009.

WOODING, P.; BURTON, G. **Comparative placentation, structures, function and evolution**. [S.l.]: Springer. 2008.

WOURMS, J. P. Maximization of evolutionary trends for placental viviparity in the spadenose shark, *Scoliodon laticaudus*. **Environmental Biology of Fishes**, v. 38, p. 269-294, 1993.

YAMAMOTO, S.; HAYASHI, O. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine: D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 22, p. 5260-5266, 1967

YUASA, H. J.; TAKUBO, M.; HASEGAWA, A.; NOMA, H.; SUZUKI, T. Evolution of vertebrate indoleamine 2,3-dioxygenases. **Journal of Molecular Evolution**, v. 65, n. 6, p. 705-714, 2007.

YUASA, H.; USHIGOE, A.; BALL, H. J. Molecular evolution of bacterial indoleamine 2,3-dioxygenase. **Gene**, v. 485, n. 1, p. 22-31, 2011.

YUASA, H.; BALL, H. J. The evolution of three types of indoleamine 2,3 dioxygenases in fungi with distinct molecular and biochemical characteristics. **Gene**, v. 504, n. 1, p. 64-74, 2012.

YUASA, H.; KEIKO, M.; BALL, H. J. Low efficiency IDO2 enzymes are conserved in lower vertebrates, whereas higher efficiency IDO1 enzymes are dispensable. **Journal of Experimental Zoology**, v. 282, p. 2735-2745, 2015.