JANAINA MUNUERA MONTEIRO

**Imunolocalização das *Heat Shock Proteins* (HSPs) 60 e 70
na placenta bovina**

SÃO PAULO

2005

JANAINA MUNUERA MONTEIRO

**Imunolocalização das *Heat Shock Proteins* (HSPs) 60 e 70
na placenta bovina**

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

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior

SÃO PAULO

2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1526 FMVZ	<p>Monteiro, Janaina Munuera Imunolocalização da <i>Heat shock proteins</i> (HSPs) 60 e 70 na placenta bovina / Janaina Munuera Monteiro. – São Paulo : J. M. Monteiro, 2005. 80 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2005.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior.</p> <p>1. Placenta. 2. Bovinos. 3. Imuno-istoquímica. 4. Imunomicroscopia eletrônica de transmissão. 5. HSP60. HSP70. I. Título.</p>
----------------	---

ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
56	6	2	a serem testados (sobrenadante dos hibridomas positivos)	anti-HSP 60 anti HSP 70 (Stressgen®)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Imunolocalização das heat shock proteins (HSPs) 60 e 70 na placenta bovina", protocolo nº563/2004, no qual foram utilizados 30 placentas de bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Roberto Kfoury, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Immunolocalization of heat shock proteins (HSPs) 60 and 70 in bovine placenta", protocol number 563/2004, utilizing 30 bovines (placenta), under the responsibility of Prof. Dr. José Roberto Kfoury agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting).

São Paulo, 09 de novembro de 2004

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MONTEIRO, Janaína Munuera

Título: Imunolocalização das *Heat Shock Proteins* (HSPs) 60 e 70 na placenta bovina

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

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

**Ao querido Silvio,
obrigada pelo
companheirismo,
lealdade e amor durante
todo o tempo em que
estamos juntos.
Eu te amo...**

**A minha mãe Tânia,
por ser meu exemplo
de força, garra e
determinação.**

Obrigada por ter me ensinado a viver...

**A minha irmã Tatiana
pelo apoio e
incentivo nos
momentos mais
difíceis ao longo
das caminhadas.**

Agradecimentos

A DEUS por ter me dado a graça de viver.

Ao Departamento de Anatomia da Universidade de São Paulo por ter me recebido de braços abertos.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Dr. José Roberto Kfoury Jr, pela oportunidade e confiança de trabalhar no laboratório e pelo aprendizado durante esse tempo.

A Lilian, pelo apoio, pelo conhecimento e grande amizade firmados durante o decorrer desta jornada. Muuuuito obrigada!

Aos meus amigos: Carol, Patrícia, Moniquinha, Rosinha, Gustavo, Ana Rita, Naianne, Zilahzinha, Karina, Cristiane, Felipe, Flávia, Lucas, Emerson, Hill, Wanessinha, André, Alexandre, Robson, Priscilla, Fernanda, Thaís, Ricardo. Danila, Karina do Valle, Mariana, Eduardo, Nega, Adriana, Rosane, Ana Paula Vidotti, Arlei, Érika, Rosa, Vivian. Valeu pessoal!!!

A equipe do laboratório (LTIAM): Rose, Moniquinha, Renata, Anna Paula, Gustavo, Patrícia, Arlei, Lilian. Não consigo encontrar palavras pra agradecer...OBRIGADA!!!

A minha amiga de graduação Karina por ter me mostrado o "caminho". Adoro você!

A família Monteiro, em especial Dna Ignês e Sr. Francisco por terem me acolhido como filha em sua casa, AMO vocês...

Ao meu primo Carlos Fernando e minha tia Maria pelo exemplo de recomeçar uma nova vida. Vocês são especiais...

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

Aos meus professores de graduação Dr. Ricardo Calil e Dr. Ari Ajzental por terem me incentivado a fazer pesquisa.

Aos meus vizinhos Renata e Adriano pela nova amizade.

A todos os funcionários do frigorífico Mantiqueira, pelas amostras cedidas e pela ajuda nos dias de coleta.

Ao professor Francisco por ceder seu laboratório e seus materiais quando necessários.

A amiga Silvinha do Departamento de Patologia pelos esclarecimentos e auxílio nos protocolos. Um grande beijo!

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

Aos secretários do departamento: Maicon e Jaqueline pelo apoio nas horas de sufoco.

As secretárias da pós-graduação: Deise e Cláudia. Obrigada por tudo!!! Vocês são demais!!!

A todos os funcionários deste departamento: Graça, João, Raimundo, Aninha e Eliete.

A todos que participara direta ou indiretamente deste trabalho. Obrigada.

RESUMO

MONTEIRO, J. M. **Imunolocalização das *Heat Shock Proteins* (HSPs) 60 e 70 na placenta bovina.** [Immunolocalization of Heat Shock Proteins (HSPs) 60 e 70 in bovine placenta]. 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

As *Heat Shock Proteins* (HSPs) ou proteínas do choque térmico são encontradas em todas as células e são classificadas de acordo com seu peso molecular. Dentre elas encontram-se as de 27, 60, 70, 90 e 110 kDa, sendo as mais estudadas no contexto da reprodução as da família 60 e 70. Essas proteínas são ditas como chaperoninas, em razão do seu importante papel no dobramento e desdobramento de outras proteínas celulares sem alterar sua conformação final, e são expressas frente a qualquer tipo de estresse como calor, vírus, bactéria, hormônios, diferenciação celular, etc, e influenciam nas respostas imune inata e adquirida. A placenta também expressa essas proteínas, uma vez que é um órgão de intenso estresse e diferenciação celular durante toda a gestação. Nesse estudo, busca-se avaliar a expressão ou não dessas proteínas na placenta bovina e para isso foram utilizadas 30 amostras de diferentes animais em estágios distintos de gestação, fixadas em formol tamponado a 10% e processadas pela técnica de imuno-istoquímica. O mesmo número de amostras foi também processado para a análise de imuno-microscopia eletrônica de transmissão pelas técnicas de “freeze-substitution” e marcação por pós-embebição. Na imuno-istoquímica, as HSPs 60 e 70 foram localizadas nos trofoblastos, epitélio materno e células binucleadas. A expressão da HSP 60 foi maior no início declinando no segundo e terceiro terço. Já a expressão da HSP 70 manteve-se praticamente constante, evidenciando a forte expressão dessa proteína durante todo o período. Na análise de imuno-microscopia eletrônica

de transmissão, ambas as famílias foram localizadas nas células binucleadas (núcleo, citoplasma e vesículas) e epitélio materno (núcleo e citoplasma) em todos os terços gestacionais. O perfil das proteínas estudadas na placenta bovina foi diferente quando comparada à placenta humana, pois nesta última, a intensidade da expressão para a HSP 70 diminuiu com o decorrer da gestação enquanto para a HSP 60 foi constante durante toda a gestação. Provavelmente essas diferenças podem estar relacionadas ao fato dessas amostras terem sido coletadas de mulheres com gravidez interrompidas e também pelo tipo de placentação distinta. A bovinocultura de corte é de extrema importância para a economia para o Brasil e se faz necessário o conhecimento de fatores que possam melhorar suas características reprodutivas. Dessa forma os resultados obtidos nesse estudo contribuirão certamente de subsídio para experimentos futuros sobre o papel das *Heat Shock Proteins* na placenta bovina.

Palavras-chave: Placenta. Bovinos. Imuno-istoquímica. Imuno-microscopia eletrônica de transmissão. HSP 60. HSP 70.

ABSTRACT

MONTEIRO, J. M. **Immunolocalization of Heat Shock Proteins (HSPs) 60 e 70 in bovine placenta** [Imunolocalização das *Heat Shock Proteins* (HSPs) 60 e 70 na placenta bovina]. 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Heat shock proteins (HSP) can be found in any kind of cell. These proteins are classified according to their molecular weight and their known families include the HSP 27, 60, 70, 90 and 110 kDa. Among these, HSP 60 and 70 are the ones of interest in reproduction. They were known as chaperonines because of their capacity to fold and unfold other proteins into the cell, without changing their own conformation. They are expressed during several stress conditions likes virus and bacteria infections, hormones, heat, cellular differentiation, etc, and also take part signaling for innate and acquired immune responses. Heat shock proteins are expressed in several tissues and organs, including the placenta. In this study we have evaluated the expression of these proteins in the bovine placenta, using thirty samples from different animals with distinct gestational periods, fixed in 10% formalin and processed for immunohistochemistry. The same numbers of samples were processed for immunoelectron microscopy using freeze-substitution and post embedding labeling techniques. The immunohistochemistry results show the expression of HSP 60 and 70 in trophoblasts, maternal epithelia and binucleated cells. The HSP 60 expression was higher in the beginning of gestation, becoming lower during the second and third trimester. Heat shock protein 70 expression were practically constant throughout the gestation. The immunoelectron microscopy analysis revealed that both HSP 60 and 70 were located in the cytoplasm and nuclei

of binucleated cells and maternal epithelia from the beginning to the end of pregnancy. The immunolocalization of HSP 60 and 70 in the bovine placenta were distinct from the ones found in studies on women, probably due to the differences of the placentation type and to the fact that those samples were collected from abnormal or discontinuous pregnancy. Beef production in Brazil is an important economical activity and studies to improve the bovine reproductive characteristics are necessary and must be expended, therefore our results certainly contributes for further studies on HSP function during pregnancy in this species.

Key-words: Placenta. Bovine. Immunohistochemistry. Immunoelectron microscopy. HSP 60. HSP 70.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imunolocalização das HSPs 60 e 70 no primeiro terço gestacional. (A, B) HSP 60 e (C, D) HSP 70 intensamente marcadas no trofoblasto (TF), epitélio materno (EM) e células binucleadas (seta). Não houve marcação em estroma (ES) e mesênquima (M). Controle negativo (E). (A, C, E) escala da barra = 50 μm ; (B, D) escala da barra = 20 μm 64
- Figura 2 - Imunolocalização das HSPs 60 e 70 no segundo terço gestacional. (A, B). Notar a fraca marcação da HSP 60 em relação a HSP 70 com intensa marcação nas regiões de trofoblasto (TF), epitélio materno (EM) e células binucleadas (seta). Não há marcação no estroma (ES) e mesênquima (M). Controle negativo (E). (A, C, E) escala da barra = 50 μm ; (B, D) escala da barra = 20 μm 65
- Figura 3 - Imunolocalização das HSPs 60 e 70 no último terço gestacional. (A, B) Notar a fraca marcação da HSP 60 em relação à marcação forte da HSP 70 nas regiões de trofoblasto (T), epitélio materno (EM) e células binucleadas (seta). Estroma (ES) e mesênquima (M) não houve marcação. Controle negativo (E). (A, C) escala da barra = 50 μm ; (B, D, E) escala da barra = 20 μm 66
- Figura 4 - Imunomicroscopia eletrônica de transmissão da HSP 60 presente no epitélio materno (A) (escala da barra = 1 μm , em detalhe, notar a marcação da proteína no núcleo (seta tracejada) e citoplasma (seta contínua)(B)(escala da barra = 200 nm)..... 67
- Figura 5 - Localização da HSP 60 em uma célula binucleada (C) (escala da barra = 2 μm , notar a presença em maior aumento no citoplasma (seta contínua), vesícula (seta pontilhada) e núcleo (seta tracejada) (D) (escala da barra = 200 nm)..... 67
- Figura 6 – Imunolocalização da HSP 70 presente na célula binucleada (A) (escala da barra = 2 μm) , em detalhe, notar a marcação da proteína no núcleo (seta tracejada) e citoplasma (seta contínua) (B) (escala da barra = 200 nm)..... 69

Figura 7 – Imunomicroscopia eletrônica de transmissão da HSP 70 presente no epitélio materno, notar o quadrado em detalhe (C) (escala da barra = 2 μm). Em maior aumento, verificar a marcação da proteína no epitélio (seta contínua) (D) (escala da barra = 1 μm).69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa da idade gestacional segundo Noden e Lahunta (1990).....	52
--	----

Tabela 2 - Variação da expressão das <i>Heat Shock Proteins</i> 60 e 70 na placenta bovina nos três trimestres gestacionais.	61
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	24
3.2 IMUNOLOGIA DA INTERFACE MATERNO-FETAL	25
3.3 <i>HEAT SHOCK PROTEINS</i> (HSPs)	29
3.3.1 Família HSP	30
3.3.2 Função fisiológica das HSPs	31
3.3.3 HSP 70	32
3.3.4 HSP 60	33
3.3.5 HSP e a apresentação do processamento antigênico	33
3.3.6 A participação das HSP nas respostas do sistema imune	36
3.3.7 HSP e auto-imunidade	39
3.3.8 HSP e transplantes	41
3.4 PLACENTA DOS BOVINOS	42
3.5 HSP NA REPRODUÇÃO	44
3.5.1 Interação entre as HSP e a placenta	45
4 MATERIAL E MÉTODO	50
4.1 COLETA DOS ANIMAIS	50
4.2 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS	51
4.3 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS	52
4.4 IMUNO-ISTOQUÍMICA	53
4.5 IMUNO-MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	55
5 RESULTADOS	59
5.1 IMUNO-ISTOQUÍMICA	59

5.2 IMUNO-MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	65
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	74
_REFERÊNCIAS.....	75

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos mundiais existentes e de maior potencialidade para o desenvolvimento da pecuária bovina (SANTIAGO, 1970). As raças zebuínas destacam-se pela rusticidade, adaptadas às condições de clima e vegetação do nosso país, são raças consideradas alicerces do rebanho nacional.

Tendo em vista a importância da bovinocultura do país, fazem-se necessárias pesquisas relacionadas à medicina preventiva, criação e reprodução desses animais, e os fatores que podem interferir nos produtos finais devem ser estudados e conseqüentemente minimizados. Sob estes contextos, iremos enfatizar a questão relacionada à reprodução, focando a importância da imunologia relacionada à mãe, placenta e feto.

Durante o período gestacional, tem-se a implantação do embrião com a formação da placenta entre outras estruturas. A placenta é um órgão transitório de grande importância imunológica presente somente durante a prenhez. Tem sido muito utilizada como modelo de estudo no que se refere a transplantes, pois o feto se apresenta como um tecido semi-alogenêico, ou seja, possui parte da genética materna e parte da paterna.

O termo “reconhecimento materno da gestação” refere-se a detecção de antígenos fetais por células do sistema imune da mãe, e se porventura houver alguma falha nessa resposta imune, poderá haver, como conseqüência, a rejeição do embrião (HANSEN, 1997).

Sendo a placenta um órgão de alta metabolização celular e conseqüente estresse durante a prenhez, sugere-se que existam vários fatores de regulação e expressão de diferentes proteínas, dentre elas as *Heat Shock Proteins* (HSP).

As proteínas do estresse térmico ou, como são chamadas no inglês *Heat Shock Proteins* (HSPs), pertencem a várias famílias classificadas de acordo com seu peso molecular e, devido à homologia de suas seqüências com algumas bactérias, são consideradas como as proteínas mais conservadas filogeneticamente (POCKLEY et al., 1999).

As HSPs possuem várias funções: fazem o transporte de peptídeos; previnem a agregação protéica e auxiliam na proteção quando induzidas pelo estresse; e como chaperonas auxiliam no dobramento e desdobramento de outras proteínas, sem alterar sua conformação final. (VAN ÉDEN, 2000; NEUER et al., 1998).

A participação das HSPs nas respostas do sistema imune dá-se através de sua expressão no tecido injuriado, juntamente com as células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais e as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) sinalizando e amplificando esse sinal para as células T e para se tornar uma célula efetora, sua ativação é feita por proteínas conhecidas como citocinas (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000; WALLIN et al., 2002).

Analisando o feto como um enxerto no útero materno, o sistema imune da mãe se organiza de forma a tolerar os antígenos fetais. No meio ambiente uterino o aumento da expressão de várias moléculas e o equilíbrio entre elas determinam o sucesso da gestação. Dentro desse contexto, encontram-se as citocinas pró e antiinflamatórias as quais contribuem para a manutenção entre a imunidade celular (Th1) para o feto, e a imunidade humoral (Th2) favorecendo a prenhez (COSTEAS et al., 2004).

Em humanos, as HSPs também são estudadas no trato reprodutivo de machos e fêmeas. Essas proteínas foram expressas em tecidos como endométrio, células decíduais (primeiro trimestre da gestação) (NEUER et al., 1998), placenta

(SHAH et al., 1998), cordão umbilical (LI et al., 1996) e também em algumas alterações fisiológicas como nascimento prematuro, aborto (DIVERS et al., 1995), restrição do crescimento fetal uterino (WATABA, 2004) e nas espermatogôneas (NEUER et al., 2000).

Devido ao tipo de placenta dos bovinos ser impermeável às imunoglobulinas da mãe e a importância das proteínas do choque térmico relacionados ao estresse e ao sistema imune materno, convém à observação e a localização das mesmas nesse tecido, pois este estudo poderá contribuir para a compreensão do papel que estas desempenham no processo reprodutivo desses animais.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Esse trabalho tem o objetivo de verificar e localizar a expressão das *Heat Shock Proteins* (HSPs) 60 e 70 na placenta de vacas no primeiro, segundo e terceiro terço de gestação, pelas análises de imuno-istoquímica e imuno-microscopia eletrônica de transmissão.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão procura apresentar sucintamente, dentro do estudo da imunologia da placenta, o envolvimento das proteínas *Heat Shock Proteins* (HSPs) com o sistema imune e sua importância nos bovinos.

3.1 IMPORTÂNCIA DA BOVINOCULTURA NO BRASIL

O agronegócio brasileiro é responsável por 33% do Produto Interno Bruto (PIB) com a representação de 9% neste contexto, encontra-se a pecuária (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 2005). De 1990 a 2003, a produção de carne bovina aumentou 85,2% - ou 6,1% ao ano - passando de 4,1 milhões para 7,6 milhões de toneladas. Segundo o IBGE/SECEX/MDIC de 1999, o rebanho brasileiro é composto por aproximadamente 171 milhões de cabeças, sendo que 85% são de raças zebuínas.

A cadeia produtiva da carne brasileira caracteriza-se pela sua alta diversidade de raças, sistemas de criação, condições sanitárias de abate e formas de comercialização. Devido às características genéticas, a rusticidade e aos cruzamentos, as raças zebuínas foram as que mais se adaptaram as condições climáticas, sendo a região do Brasil Central a maior região criadora, correspondendo a 50% do rebanho bovino efetivo.

O mercado de carnes também investe em pesquisa, por intermédio do melhoramento genético, e na certificação de origem do produto. Tudo para oferecer aos consumidores alimentos seguros e de alta qualidade.

O Brasil é considerado pelo Comitê Veterinário da União Européia como "área de risco desprezível" para a ocorrência da "vaca louca" e mais de 83% das suas 183 milhões de cabeças encontram-se em áreas livres da febre aftosa, refletindo assim no aumento da exportação de carne brasileira ao mundo. Dados do ano de 2001 mostraram que a exportação brasileira de carne bovina foi de 789 mil toneladas equivalente-carcaças, ou US\$ 990,9 milhões, um ganho de 6,42% em relação ao ano anterior (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, 2005).

A importância da criação desses animais não reflete apenas nos números da exportação, pois também movimenta cerca de US\$ 15 bilhões ao ano e mais de 2,5 milhões de pessoas empregadas neste mercado que compreende desde o insumo até o produto final.

3.2 IMUNOLOGIA DA INTERFACE MATERNO-FETAL

O sistema imune é compreendido pela imunidade inata (não específica) a qual possui quatro barreiras: anatômica (pele e mucosas); fisiológica (temperatura, pH e mediadores químicos); fagocítica (macrófagos, monócitos, neutrófilos) e inflamatória (vasodilatação, aumento da permeabilidade celular, penetração de células fagocitárias); e imunidade adaptativa (específica) atribuindo características

de especificidade antigênica, diversidade, memória imunológica e reconhecimento de que é próprio e não próprio (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

Na resposta adaptativa existem dois tipos de populações celulares os linfócitos B (imunidade humoral) e linfócitos T (imunidade celular).

A imunidade celular é regulada por subgrupos distintos de células T-helper. A primeira resposta é gerada por células de perfil Th1, as quais produzem IL-2 (interleucina-2), IFN- γ (interferon- γ), TNF- α (fator de necrose tumoral- α), TNF- β (fator de necrose tumoral- β), ativadores de macrófagos e posteriormente controlada por células Th2, as quais liberam IL-4 (interleucina-4), IL-5 (interleucina-5), IL-6 (interleucina-6), IL-10 (interleucina-10) e IL-13 (interleucina-13) ativadoras para a produção de anticorpos (IWAKABE, 1998; RAGHUPATHY, 2001).

Em uma resposta imune, depois que uma célula T helper reconhece e interage com um complexo molecular de MHC-II (complexo de histocompatibilidade principal de classe II) presente na superfície de uma APC (células apresentadora de antígenos) ela se torna uma célula efetora, secretando citocinas. Estas têm importante papel na ativação de células B, células T citotóxicas, macrófagos e outras células participantes do sistema imune (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

Durante a gestação ocorrem diversas alterações no útero, dentre elas a modificação do endométrio pela implantação do blastocisto através de suas células trofoblásticas, criando um meio ambiente que envolve diversas citocinas, hormônios e fatores de crescimento, para o desenvolvimento do embrião e para sua tolerância ao sistema imune materno (DUC-GOIRAN et al., 1999).

Na interface materno-fetal existem moduladores para o equilíbrio imunológico entre mãe e feto os quais incluem: alterações nas respostas Th1 (células T helper do tipo 1)/Th2 (células T helper do tipo 2), alterações no metabolismo do triptofano,

alterações na secreção de peptídeos específicos do embrião (fatores de pré-implantação), leucócitos inibidores da protease e efeitos que modulam o sistema imune de hormônios reprodutivos (HUDDLESTON et al., 2004).

Uma grande diversidade de citocinas estão presentes nesse meio como IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e TGF- β (WEETMAN, 1999), mas a predominância de citocinas do tipo Th2 parece ser essencial na manutenção da gestação segundo experimentos feitos em ratos e evidências clínicas em humanos (SAITO, 2000).

As citocinas parecem ser responsáveis pela regulação de dois sistemas ligados à gestação, o endócrino e o imune. Esse mecanismo se dá pela indução das células trofoblásticas por citocinas IL-4 e IL-6 a liberarem hCG (gonadotrofina coriônica humana) o qual induz a produção de progesterona e conseqüentemente estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias com a redução de citocinas pró-inflamatórias (SAITO, 2000).

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

Na placenta humana existem poucas células T no sítio de implantação do embrião (KABAWA et al., 1985). Em bovinos, estudos revelaram que a distribuição de linfócitos foi menor em carúnculas gestantes quando comparadas a fêmeas não gestantes e na região intercaruncular (GOGOLIN-EWENS, 1989).

Em relação às outras células do sistema imune na interface materno-fetal, pesquisas indicaram a presença de um grande número de macrófagos localizados

no parênquima das carúnculas bovinas durante toda a gestação, sendo que logo após o parto, quando sua atividade fagocítica estava diminuída, ocorrera a retenção placentária. Essas células também produzem citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), as quais respondem ao sistema imune inato, levando a ativação das células de perfil Th1 (MIYOSHI; SAWAMUKAI, 2004). Quando os macrófagos são ativados, eles expressam MHC-II, exercendo seu papel de célula apresentadora de antígeno (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

O MHC de classe I é importante na apresentação antigênica para células T citotóxicas e células NK (“natural killer”) e estão presentes em todas as células do corpo, exceto nas células trofoblásticas fetais (HUDDLESTON; SCHUST, 2004). Em ovelhas essa molécula foi mais expressa nas células estromais de placentônios (dia 19) e foi menor na camada sincicial nos estágios mais avançados da gestação. O contrário ocorreu com o MHC classe II, que esteve presente em toda gestação sendo mais evidente no início da prenhez (GOGOLIN-EWENS et al., 1989).

A apresentação de peptídeos fetais ao MHC-I materno pode provocar o início de uma resposta de linfócitos T citotóxicos da mãe. Mas se não houver o reconhecimento ou a não expressão dessa molécula nas criptas e células epiteliais endoteliais, essa poderá representar um importante mecanismo de proteção do feto frente a uma rejeição. Segundo Davies et al. (2004), em bovinos o reconhecimento do sistema imune materno ao MHC classe Ib fetal expressado por células trofoblásticas ativa uma resposta imune inflamatória que contribui para a separação da placenta após o parto, evitando a retenção placentária.

Thellin Et al. (2000) propuseram a existência de dez fatores que fazem do enxerto fetal ser tolerado pela mãe: HLA-G (antígenos leucocitários humanos) expresso nos trofoblastos (ligam-se a receptores de células NK inibindo a toxicidade

dessas células), LIF (“leukemia inhibitory factor” - promotor do crescimento e diferenciação de trofoblastos), IDO (indoleamina 2,3-dioxigenase), equilíbrio Th1 (gera resposta pró-inflamatória) e Th 2 (resposta antiinflamatória), macrófagos supressores (exercem influência antiinflamatória), hormônios (ex. progesterona, produz a síntese de LIF e o desequilíbrio entre Th1 e Th2), CD 95 e CD95L (o ligante é capaz de promover a morte celular do CD 95 ativado nas células sanguíneas que entram em contato com o feto), anexina II (inibe parcialmente a proliferação de IgG e IgM secretadas pelo sistema imune materno), diminuição da atividade do sistema complemento (reduz sua ativação quando esse sistema reconhece os antígenos fetais paternos) e antígenos trofoblásticos ocultos (através do bloqueio do anticorpo pelo antígeno fetal).

O envolvimento de algumas células do sistema imune e o equilíbrio entre elas está diretamente ligado com a manutenção da gestação e, conseqüentemente, com o sucesso do nascimento do feto.

3.3 HEAT SHOCK PROTEINS (HSPs)

No estudo feito por Ritosa (1962) em cromossomos politêmicos da glândula salivar de larvas de *Drosophila melanogaster* observou-se que o aumento da temperatura de incubação dessas larvas levava a uma mudança no padrão desses cromossomos e a alteração dos genes devido ao choque térmico. Futuramente, esses genes expressos diferentemente devido à mudança de calor foram clonados e

seus produtos protéicos denominados de proteínas do choque térmico (TISSIÈRS et al., 1974)

As *Heat shock proteins* ou HSPs estão presentes em todas as células tanto de eucariontes como de procariontes, auxiliando outras proteínas na sua conformação final. Mas hoje, é notável sua participação de forma intensa em qualquer tipo de estresse como também mediante o auxílio para as respostas imunes.

3.3.1 Família HSP

As proteínas do choque térmico, ou do inglês *Heat shock proteins* (HSP) podem ser induzidas por uma variedade de estímulos como os de meio ambiente (choque térmico, radiação ultravioleta, metais pesados), patológicos (vírus, bactérias, infecções parasitárias, febre, inflamação, auto-imunidade) ou estímulos fisiológicos (fatores de crescimento, diferenciação celular, estimulação hormonal ou desenvolvimento tecidual) (ASEA et al., 2000).

As HSPs são classificadas de acordo com seus diferentes pesos moleculares mensurados em kilodalton (kDa). Estas famílias são 27, 60, 70 e 90 kDa. (NEUER et al., 2000), dentre outras.

3.3.2 Função fisiológica das HSPs

As HSPs são chaperoninas e também ajudam a manter o equilíbrio celular, ligando-se a outras proteínas intracelulares auxiliando na síntese protéica e no transporte entre compartimentos celulares (VAN EDEN et al., 1998), e auxiliam também na proteção celular de “perigos” induzidos pelo estresse (VAN EDEN, 2000).

O termo “chaperona molecular” foi descrito devido à função especializada de uma proteína nuclear denominada nucleoplasmina, a qual promove a união da cromatina (HARTL, 1996).

As HSPs são altamente conservadas filogeneticamente. A HSP 60 humana tem 50% da sua sequência idêntica com a da micobactéria, sendo mais de 20% de substituições conservativas, causando agravantes em áreas moleculares do homem por ser inteiramente idêntica à proteína bacteriana (VAN EDEN et al., 1998). Devido a esse grau de conservação evolucionária as HSP são conhecidas como imunogênicas (VAN EDEN et al., 2003).

Segundo Basu et al. (2000), as HSP são as moléculas intracelulares mais abundantes e solúveis e sua função no meio extracelular seria de um mensageiro, alertando as células apresentadoras de antígenos (APCs) para os perigos físicos de células vizinhas, como conseqüências de infecções virais, bacterianas ou injúrias mecânicas.

Recentemente estudos revelaram interesses nas propriedades imunomodulatórias das HSP extracelulares, em particular de seus efeitos pró-

inflamatórios, em oposição aos seus efeitos de chaperoninas intracelulares (KILMARTIN e REEN, 2004).

3.3.3 HSP 70

A HSP 70 é uma estrutura tridimensional subdividida em três partes: um domínio N-terminal ATPase de 45K, o qual é seguido por uma parte que serve de ligação com peptídeos, de aproximadamente 18K e um segmento variante de 10K (HARTL, 1996).

Essa proteína demonstra de 60-78% de sua homologia idêntica a muitas células eucariontes e 40-60% de identidade a *Escherichia coli* DnaK (similar a HSP 70) (KIANG; TSOKOS, 1998).

A HSP 70 localiza-se no citoplasma em diferentes compartimentos celulares como núcleo e citoplasma (HSc), mitocôndria (GRP 75) e no retículo endoplasmático (GRP 78) (KIANG; TSOKOS, 1998). Acredita-se atuar como parte do sistema de degradação proteica e no auxílio da apresentação antigênica através do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) classe I (TODRYK; GOUGH; POCKLEY, 2003).

Essa família está envolvida em duas funções: a primeira seria carrear proteínas recentemente sintetizadas ainda sem a sua conformação terciária para a família da HSP 60, a qual as levaria a essa condição; e a segunda estaria relacionada ao transporte de proteínas para a translocação dentro de diferentes compartimentos celulares (KIANG; TSOKOS, 1998).

3.3.4 HSP 60

Tem a conformação de um complexo cilíndrico com aproximadamente 150 Å de altura e de 140 Å de largura cercado uma cavidade central de 50 Å de extensão, onde se encontra um sítio de polipeptídeo ligante (HARTL, 1996).

A HSP 60 está no meio intracelular principalmente nas organelas (mitocôndrias) e cloroplastos (BOHDAN; GUPTA, 1997; KIANG; TSOKOS, 1998) e pode também estar na superfície das células de mamíferos (BOHDAN; GUPTA, 1997).

3.3.5 HSP e a apresentação do processamento antigênico

Os MHC de classe I ou o de classe II são capazes de apresentar peptídeos antigênicos processados às células T. A união e o dobramento dos antígenos é feito por ambas e tem início no retículo endoplasmático (RE). O MHC-I juntamente com peptídeos derivados de proteínas presentes no citosol (vírus, bactéria, antígenos próprios) são carregados e transportados através do RE com o auxílio da TAP (transportador associado ao antígeno processado). As moléculas do MHC-II são ligadas a peptídeos exógenos internalizados por células fagocíticas e processadas no compartimento endosomal (ZÜGEL; KAUFMANN, 1999).

Sob qualquer tipo de estresse, injúria tecidual ou qualquer outro tipo de “perigo”, essas células processam epítomos de HSP nas moléculas de MHC e estas

as apresentam para as células T, amplificando assim a sinalização (VAN EDEN et al., 2003).

Sugere-se que os complexos de HSP com peptídeos são imunogênicos, pois os peptídeos ligados as HSP do citosol (HSP 70, 90 e 110) e do retículo endoplasmático (gp 96 e CRT-calcireticulina) auxiliam as etapas de processamento celular das moléculas de MHC classe I; e os peptídeos ligados as HSP expostos na superfície da célula ou liberados por elas, devido ao estresse ou morte celular, são capturadas pelas APCs (células apresentadoras de antígenos) circulantes, resultando na re-apresentação destes pelas MHC-I para as células profissionais (LI, MENORET; SRIVASTAVA, 2002).

Conforme mencionado acima, as HSP são potentes ativadoras do sistema imune inato capaz de induzir citocinas pró-inflamatórias pela ativação de APCs (macrófagos e células dendríticas). O efeito dessas é mediado pela transdução de sinal via TLR ("toll-like receptor"), similar ao da LPS (lipopolissacarídeo) (via TLR4) e lipoproteínas bacterianas (via TLR2). Contudo, existem evidências em que os efeitos das citocinas gerados pelo auxílio da HSP podem resultar em contaminação de moléculas associadas ao LPS ou ao próprio LPS (TSAN; GAO, 2004).

As HSPs liberadas de tecidos necróticos estimulam macrófagos a liberarem citocinas e estimulam parcialmente a maturação de células dendríticas, mas esse estímulo é feito com menor intensidade quando comparado ao LPS. As proteínas do choque térmico interagem com as APC através da transdução de sinal do NF- κ B (BASU et al., 2000).

Para comprovar o envolvimento da endocitose mediada pelo receptor (*receptor-mediated endocytosis* -RME) das HSPs nas APCs através da utilização de uma linhagem de macrófagos e DCs, Arnold-Schild et al. (1999), verificaram a

internalização aparentemente espontânea e contínua do MHC-I junto com o receptor ligante da gp96 nas estruturas multivesiculares endosomais, sugerindo que pode haver uma transferência de HSP com peptídeos associados dentro do MHC-I.

As HSPs participam de um processo conhecido como reapresentação ou apresentação cruzada. Este mecanismo ocorre quando proteínas endógenas apresentadas as APCs não profissionais são processadas no citosol resultando em peptídeos que serão chaperonados pelas HSPs. Estes são então liberados para o transporte através da TAP dentro do RE onde novamente serão processados por outras HSPs e carregados para o MHC-I na superfície da célula. Em condições de estresse ou morte celular, essas moléculas são liberadas para o meio extracelular onde encontrarão as APCs as quais expressam receptores específicos como o CD 91. Essa interação leva a endocitose para o processamento antigênico pelo MHC-I e re-apresentando novamente a superfície celular desencadeando assim resposta imune por células T (LI; MENORET; SRIVASTAVA, 2002).

Isso demonstra claramente a participação das HSP juntamente com o MHC-I para a apresentação das APCs. O que ainda não está bem esclarecido é a participação dessas proteínas com o MHC-II. Tobian et al. (2004) estudaram a expressão das HSP bacterianas de *E. coli* DnaK e *Micobacterium tuberculosis* HSP 70 as quais liberam peptídeos para o processamento e apresentação para um epítipo constituinte do MHC-II. Sugeriram que essas HSPs liberam peptídeos antígenos chaperonados estimulando a resposta de células T CD4⁺, e as APCs associadas a essas HSPs fazem o seu processamento no meio ambiente fagossomal onde são degradados os antígenos pela apresentação do MHC-II.

O envolvimento das HSPs juntamente com o MHC para a apresentação antigênica reflete uma outra dúvida em relação a ligação dessas proteínas com as

APCs. Será que essas células profissionais possuem receptores para as proteínas do choque térmico?

Para o esclarecimento dessa questão, recentemente foram identificados diferentes tipos de receptores para as HSP nas APCs como CD14, TLR (“toll-like receptors”) e CD91. Este possui um receptor α 2-macroglobulina expressado em muitas APCs incluindo as células dendríticas (DC) e, os “toll-like receptors” foram associados as respostas imunes inatas contra infecções bacterianas com indução de respostas pró-inflamatórias (VAN EDEN et al., 2003).

A HSP 60 liga-se aos receptores TLR2 e TLR4 estimulando TNF- α ou NO (óxido nítrico) (OHASHI et al., 2000) e as HSP 70, gp 96 e HSP90 com receptores CD91 e TLR4, através da ligação com macrófagos afetando a secreção de citocinas e a capacidade na apresentação antigênica (ZANIN-ZHOROV et al., 2003). Além disso, os macrófagos produzem IL-6 através da indução da HSP 60 com receptor CD 14, promovendo juntamente com o LPS ou qualquer outro produto bacteriano, o início de uma resposta imune inata e participando de um processo inflamatório (KOL et al., 2000).

Sugere-se que estes receptores possuam vários ligantes dentro dos quais estão as famílias das HSP (VAN EDEN et al., 2003).

3.3.6 A participação das HSP nas respostas do sistema imune

A resposta imune é desencadeada quando os antígenos ao serem apresentados pelas APC profissionais (como as células dendríticas, macrófagos e células B), juntamente com o MHC-II sinalizam para as células T a fim de serem

completamente ativadas. Para que isso ocorra, é necessária uma co-estimulação (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000; WALLIN et al., 2002), a qual é feita por milhares de citocinas inflamatórias e outras proteínas, dentre elas as HSP, atuantes no tecido injuriado (MOSELEY, 2000).

Dentre as APCs profissionais, as DCs têm mostrado características peculiares ao sistema imune. Essas células estão imaturas nos órgãos não linfóides, mas eficientes na apreensão de antígenos. Após capturar antígenos, migram e tornam-se maduras até chegarem aos tecidos linfóides onde ativam potencialmente uma resposta de células T. Segundo estudo feito por Flohé et al. (2003), a HSP 60 humana induziu a maturação de DC mais rapidamente que o LPS, através da regulação do MHC-II, de moléculas co-estimulatórias e secreção de citocinas tipo Th1. A HSP 70 também se liga a DC imaturas estimulando sua maturação e promovendo um aumento na capacidade para apresentação antigênica. A HSP 70 não se ligou com as DC maduras (KUPPNER et al., 2001).

Essa proteína também induziu macrófagos e monócitos, a ativarem citocinas TNF- α e NO bem como a expressão de IL-12 e IL-15, sugerindo que a HSP 60 promoveria uma resposta imune inata preparando o sistema imune para uma resposta adaptativa (BRELOER et al., 2001; CHEN et al., 1999), bem como a ativação de células T citotóxicas (MOREÉ; BRELOER; BONIN, 2001).

A HSP 60 também demonstrou que é capaz de induzir a tolerância em monócitos para repetidas exposições à própria proteína, diminuindo a capacidade pró-inflamatória dessas células bem como nas respostas de células T antígeno-específicas, como também à tolerância cruzada a estimulação do LPS (KILMARTIN; REEN, 2004).

As HSP são moléculas intracelulares com a função de chaperona, mas essas proteínas no meio extracelular exercem o papel de citocinas no auxílio de uma resposta pró-inflamatória. A exemplo dessa função, foi verificado que a HSP 70 possuía uma alta afinidade na ligação com a membrana de monócitos e a indução de citocinas pró-inflamatórias liberadas por ele foram igualmente comparadas ao LPS. Essa ligação foi constituída por dois caminhos para a transdução do sinal. Um foi dependente do receptor CD14 e do cálcio intracelular, resultando na liberação de IL-1 β , IL-6 e TNF- α e o outro dependeu somente o cálcio., liberando somente TNF- α (ASEA et al., 2000).

A estimulação da resposta de TNF- α (fator de necrose tumoral- α) ou óxido nítrico por uma HSP humana foi encontrada dependente da presença de TLR4 ("toll-like receptors-4"). Então, o mesmo receptor de sinalização transmembrana pareceu mediar a resposta imune inata para HSP 60 e LPS (OHASHI et al., 2000).

As distintas funções de chaperonas e citocinas ajudam a elucidar recentes achados que indicam as HSP como potentes adjuvantes desencadeando respostas imunes e na imunidade anti-tumoral (ASEA et al., 2000).

Inúmeros trabalhos sugerem um grande número de moléculas endógenas como as HSP 60, 70 e gp96 (HSP 90 do retículo endoplasmático) ativadoras do sistema imune inato, as quais são capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12 e de liberarem óxido nítrico (NO) e quimiocinas C-C através de monócitos, macrófagos e células dendríticas. Atuam também na ativação e maturação dessas células pela regulação de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior classe I e II e moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86 (TSAN; GAO, 2004).

Segundo a observação nos níveis de citocinas feita por Basu et al. (2000), pela estimulação da HSP, quando liberados por macrófagos ou pela indução na maturação de marcadores de células dendríticas, foi demonstrado que essa proteína estimula pouco as APCs quando comparada com o estímulo conferido pelos LPS (lipopolissacarídeos).

3.3.7 HSP e auto-imunidade

No início do século, Paul Ehrlich, denominou o termo “horror autotoxicus” para a ativação do sistema imune contra os próprios antígenos e não para antígenos estranhos. Hoje se sabe que a tolerância do que é próprio, normalmente protege o indivíduo de uma resposta reativa dos linfócitos e a falha ou resposta inapropriada do sistema imune contra o próprio é conhecido como auto-imunidade (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002).

A seleção tímica é feita quando as células T imaturas chegam no timo de onde são feitas sua seleção, desenvolvimento e proliferação. A seleção positiva permite que as células T reconheçam os TCRs (receptor de células T) nos MHC próprios. A seleção negativa elimina células que se ligam fortemente com os próprios MHCs sozinhos ou associados a peptídeos próprios (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002).

Trabalhos clássicos em doenças auto-imunes como artrites e diabetes vêm sendo feitos e aperfeiçoados para elucidar a participação das proteínas do choque térmico nessas injúrias, sugerindo que sua imunogenicidade e a sua homologia iniciariam uma resposta aos auto-antígenos.

Experimentos feitos com ratos NOD que desenvolvem espontaneamente o diabetes mellitus dependente de insulina (IDDM “insulin-dependent diabetes mellitus”) possuem células T auto-ímmunes para epítomos de HSP 60. Foi retirado esse peptídeo nomeado de p277 que causa imunidade do diabetes. Ratos pré-diabéticos ou naïve foram imunizados com esse peptídeo associado ao BSA (“bovine serum albumin”) onde ocorreu o desenvolvimento da doença. Sugerindo então que a auto-imunidade das células T reativas a epítomos de HSP 60 própria, podem ser a causa do diabetes. Quando esse experimento foi feito novamente sem a conjugação da proteína carreadora, houve a indução da cura para o diabetes. Uma doença auto-imune pode ser controlada sem que haja necessidade do bloqueio dos linfócitos auto-ímmunes, mas pela ativação de uma resposta alternativa do sistema imune (COHEN,1996).

Cohen (1997) também sugeriu que o tratamento com o p277 promovia uma alteração no perfil de citocinas de Th 1 para uma reatividade de células Th2 as quais suprimem a reatividade das citocinas pró-inflamatórias.

Nas artrites a HSP 60 é expressa no tecido sinovial de pessoas acometidas. Segundo Van Éden et al. (2003), existem três mecanismos para a indução de células T anti-inflamatórias promovidas pelas HSPs: a HSP microbiana reativa a célula T que percebe a HSP como um agonista parcial e desenvolve um fenótipo regulatório; a célula T reativa a HSP reconhece a HSP microbiana na mucosa do intestino que já está tolerizada, mas quando esta encontra uma HSP própria expressada no organismo, ela ativa essa tolerância; quando antígenos não ativados são apresentados a HSP próprias na ausência de uma coestimulação, causa uma anergia. Essa anergia de células T pode exercer uma atividade regulatória quando ocorre o encontro com APC ativado apresentada pela HSP própria.

3.3.8 HSP e transplantes

Uma questão intrigante para os imunologistas é porque ocorre a rejeição em transplantes de órgãos alogênéticos? Uma das várias respostas envolvidas nesse contexto são as proteínas do choque térmico.

Hammerer-Lercher et al. (2001) estudaram o efeito da hipóxia e do calor na expressão das HSP 60, 72 e 73 em vasos, como a artéria mamária interna e a veia safena usadas para o enxerto de artérias coronárias humanas. E seus resultados sugeriram o aumento da expressão dessas proteínas nas veias as quais foram maiores do que nas artérias. O tratamento desses vasos em condições de hipóxia, foi observado um aumento na expressão de todas as HSPs, o que não ocorreu com a HSP 60 sobre o estresse do calor.

Trieb et al. (2001) estudaram as mesmas HSPs em rins de pacientes transplantados e observaram que as HSP 60 e 72 estavam presentes nos túbulos contorcidos distais, alça de Henle e ductos coletores, e que a HSP 73 estava presente em todas as porções e compartimentos (incluindo camada muscular, e endotélio de vasos sanguíneos). Com o processo de inflamação local no rim transplantado, as HSPs expressadas são reconhecidas pelas células T ativadas previamente, promovendo uma amplificação nessa resposta e levando ao prolongamento no processo de rejeição.

Em transplante de pele feito em diferentes ratos, observou-se que a autoimunidade da HSP 60 modula as respostas para a rejeição do transplante, resultando no aumento da expressão da HSP 60 no tecido enxertado. E a vacinação feita com peptídeos de HSP 60 de ratos pode alterar o tipo de resposta de células T especificamente para HSP 60 própria para a resposta Th2. (BIRK et al., 1999).

A resposta celular anti-HSP humana em pacientes normais e com transplante renal, foi verificado a existência de células T reativas as HSP 60 e 70, para respostas pró-inflamatórias e reguladoras. Houve uma proliferação de células T reativas as HSP próprias durante o período de pré-transplante e rejeição, sugerindo que as células T possuem atividade contra as HSP auto-reativas. Em contraste a essa resposta, houve a produção de IL-4 (pela HSP 60) foi associada a rejeição do enxerto, sugerindo uma atividade reguladora de populações de células T reativas a algumas HSP próprias. Também se observou um predomínio de células Th2 no período pós-transplante tardio (0-6 meses), a qual teria participação na regulação da resposta inflamatória (GRANJA et al. 2004).

3.4 PLACENTA DOS BOVINOS

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

Em ruminantes é classificada como policotiledonária onde existe a carúncula e o cotilédone. Com o avanço da gestação, ocorre a invaginação do tecido fetal (trofoblastos) em direção ao tecido da mãe, formando unidades placentárias denominadas de placentônio (CHIKASHI et al., 1987); em relação as camadas de tecidos que separam a mãe do feto, no início a placenta é epiteliocorial tornando-se

sinepiteliocorial com o avanço da gestação, devido à migração de células binucleadas (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Nos bovinos a placenta é impermeável às imunoglobulinas, sendo assim, não há possibilidade de transferência de imunidade durante a gestação (GRUNERT, 1982), pois existem seis camadas de tecidos na interface materno-fetal: endotélio materno, tecido conectivo e epitélio uterino e trofoblasto, mesênquima e endotélio (JOOSTEN; HENSEN, 1992).

Os placentônios possuem dois tipos de células trofoblásticas de acordo com sua morfologia e sua função: as células mononucleares, presentes na interface envolvidas nas trocas de nutrientes; e as células binucleadas, que são células de síntese, produtoras de hormônios como a progesterona (DAVIES; FISHER; SCHLAFFER, 2000). Há evidências que essas células, quando maduras, migram em direção a interface e fundem-se com o epitélio materno liberando o conteúdo de seus grânulos (WOODING, 1992).

As células binucleadas constituem cerca de 15 a 20% das células trofoblásticas. Sugere-se então que essas células podem ser derivadas de qualquer célula uninuclear do trofoblasto, sofrendo divisões celulares e, ao se tornarem maduras seus grânulos ocupam mais de 50% do volume. Esses grânulos contêm várias proteínas e hormônios como o lactogênio (WOODING, 1992), e a progesterona (WOODING, 1992; SCHLAFFER, 2000).

As células do sistema imune estão presentes ativamente na placenta, e a função que estas representam, adicionadas a invasão do tecido fetal, evidenciam o placentônio bovino como um modelo de estudo para esse contexto (GOGOLIN-EWENS, 1989).

Existem proteínas celulares constitutivas que participam intensivamente dos processos fisiológicos e das injúrias teciduais. Estão presentes neste grupo, as *Heat shock proteins* (HSP). Como a placenta é um órgão de intenso metabolismo e, com significativa participação do organismo materno torna-se, dessa forma, susceptível a vários fatores como estresse, hipóxia, inflamação por ação de microrganismos, produção de esteróides etc. Durante a prenhez as HSP são altamente expressadas nas células que sofrem diferenciações celulares.

3.5 HSP NA REPRODUÇÃO

No contexto da reprodução, as HSP mais importantes são as das famílias 60 e 70 (NEUER et al., 2000).

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

No âmbito da fertilidade masculina, o estudo do estresse e das HSP são importantes, pois fatores intrínsecos e extrínsecos podem causar danos à proteína de DNA, interromper a síntese protéica, interrupção do ciclo celular e apoptose, resultando numa espermatogênese anormal (FENG; SANDLOW; SPARKS, 2001).

Estudando a qualidade do sêmen de varrões quanto a sazonalidade, Huang et al. (2000) observaram a diminuição dos níveis de HSP 70 em relação à qualidade do sêmen em épocas quentes do ano.

A HSP 70 é o único dos antígenos espermáticos de importância na fertilização e na interação entre o espermatozóide e óvulo e a inibição desta levou a diminuição no desenvolvimento blastocístico, evidenciando a ação protetora da proteína no embrião (MATWEE et al., 2001).

Isso pode ser devido a persistência da resposta inflamatória induzida pelas HSP, ou talvez estas proteínas serviriam como alvos antigênicos para o sistema imune, ou a homologia de aminoácidos entre as HSP humanas e as HSP microbianas resultariam em auto-imunidade, podendo mediar falhas reprodutivas (NEUER et al., 2000).

3.5.1 Interação entre as HSP e a placenta

O sistema imune é atuante desde o início, quando o espermatozóide fecunda o óvulo até o nascimento do feto. E para esse sucesso, os mecanismos imunológicos envolvidos na manutenção da gestação são: o feto não induz resposta imune; a resposta imune materna é suprimida; o útero é um sítio privilegiado imunologicamente; e a placenta é uma barreira entre a mãe e o feto (MEDDAWAR¹ 1953 *apud* WEETMAN, 1999).

Um dos fatores envolvidos nesse processo está a expressão de *Heat Shock Proteins*, que tende a estar aumentada em condições de rápido crescimento ou diferenciação celular, ou exposição ao estresse do ambiente como inflamações,

1.MEDDAWAR, P.B. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. **Symposium of Society of Experimental Biology**. v. 7, p. 320-328, 1953.

febres ou agentes tóxicos (NEUER et al., 1998). A região de decídua e da placenta são áreas de alta atividade metabólica e por isso um lugar em potencial para os elevados níveis de expressão das HSP (SHAH et al., 1998).

Vários estudos foram feitos relacionando as diferentes famílias de HSP ao aparelho reprodutor feminino, ao embrião, ao período gestacional e às enfermidades relacionadas a mulheres.

Os autores Shah et al. (1998) verificaram que na placenta humana as HSP 90, 70 e 60 foram expressas durante o terceiro trimestre da gestação e observaram a variação da intensidade da marcação para a HSP 70 e 90 no trofoblasto intermediário e decídua diminuindo com o avanço gestacional, e no endotélio variando de forte a moderada, o que não ocorreu com a HSP 27 e 60 onde nenhuma alteração foi verificada. Wataba et al. (2004), incluindo a família da HSP 27, demonstram a fundamental importância dessas para a viabilidade e função celular placentárias. Essas mesmas proteínas foram expressas no endométrio humano durante diferentes fases do ciclo menstrual (CIOCCA et al., 1996; TABIBZADEH et al., 1996), na decídua durante a fase de gestação inicial (NEUER et al., 1998), e também no cordão umbilical (LI et al., 1996).

Divers et al. (1995) sugeriram que as HSP 60, 70 e 90 não estão associadas ao parto prematuro, pois verificaram que a expressão foi constante no terceiro trimestre para as gestações a termo e que não houve alteração destas proteínas em partos de diferentes idades gestacionais. Ziegert et al. (1999) sugeriram o oposto ao estudarem a relação da gestação e a expressão das HSP e os complexos de anticorpos-HSP para as HSP 60, 70 e 90 no tecido placentário e na circulação. Eles acreditam que a ligação desses complexos anticorpo-HSP podem ser indicador do parto prematuro. Sotiriou et al. (2004), através da análise diferença qualitativa e

quantitativa da expressão das famílias de HSP 70 e 90 nos vilos coriônicos dessas placentas, inferiu que a expressão dessas proteínas em mulheres que sofreram aborto foi muito forte em relação a mulheres com parto normal.

A suposição de que as HSP estariam envolvidas na regulação de hormônios esteróides no endométrio de mulheres levou Tabibzadeh et al. (1996) estudarem a expressão dessas proteínas durante o ciclo menstrual. Foi verificado que as HSP aumentam na fase secretória do ciclo e que são expressadas no estroma e no epitélio endometrial.

Sendo assim, certas HSP associadas à função dos receptores hormonais nos tecidos reprodutivos indicaram que essas proteínas exercem um papel durante a implantação, decidualização e placentação. Em ratas, as HSP 25 e 70 não são necessárias para a proliferação celular no desenvolvimento do oviduto e a expressão dessas proteínas inicia quando as células desses tecidos tornam-se diferenciadas. Essas pesquisas sugerem que a HSP 70 protegeria o oviduto durante a implantação do blastocisto, enquanto a HSP 25 facilitaria a implantação no endométrio (MARIANI et al., 2000).

Matwee et al. (2001) estudaram os efeitos das HSP 70 *in vitro* em embrião bovino, seu desenvolvimento, a interação espermatozóide-oócito e fertilização, sugerindo que essas HSP participariam da proteção do desenvolvimento embrionário, pois a redução no desenvolvimento do embrião em resposta a inibição da HSP 70 está associada com o aumento da apoptose.

Alterações da gestação associadas com as HSP sugerem que, apesar da constante expressão dessas proteínas no terceiro trimestre de gestação, idade gestacional ou nascimento, estas não estariam aparentemente associadas ao parto prematuro (DIVERS et al., 1995). Já a expressão das HSP 70 e 90 nos vilos

coriônicos foi muito intensa no grupo de placentas decorrentes de abortos quando comparadas as normais (SOTIRIOU et al., 2004).

Segundo estudo feito por Ziegert et al. (1999), não houve diferença quanto a expressão das HSPs. Sua presença ou ausência foi insignificante para os nascimentos prematuros. A imunidade para epítomos de HSP 60 sugere-se que esteja associada com gestações anormais.

Outra enfermidade relacionada às mulheres grávidas é a pré-eclampsia, causada por uma ativação da resposta inflamatória materna. Achados de Livingston et al. (2002) sugeriram que a expressão da HSP 70 não é induzida e suas concentrações não se alteram em achados inflamatórios nessas mulheres.

O diagnóstico para nascimentos prematuros e pré-eclampsia através da detecção dos níveis de HSP 70 no soro de mulheres grávidas foi avaliado por Fukushima et al. (2005). Os estudos demonstraram altos níveis de HSP 70 no soro do sangue periférico dessas gestantes quando comparado ao de mulheres com gestação normal. Contudo, ainda são necessárias outras pesquisas para o diagnóstico preciso dessas enfermidades, já que a HSP 70 sozinha seria insuficiente para predizer essas alterações.

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

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

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

4.1 COLETA DOS ANIMAIS

As amostras foram coletadas no matadouro “Mantiqueira” situado na cidade de São José dos Campos (SP), de vacas prenhes em cada um dos três trimestres da gestação de dez placentônios diferentes, totalizando 30 amostras.

O período de gestação foi estimado conforme as medidas estabelecidas conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1- Estimativa da idade gestacional segundo Noden e Lahunta (1990)

<u>Idade (dias)</u>	<u>Crow-rump (cm)</u>
40-60	1-5
60-80	6-10
80-100	11-15
100-110	16-20
110-125	21-25
125-140	26-30
140-150	31-35
150-160	36-40
160-170	41-45
170-180	46-50
180-190	51-55
190-200	56-60
200-210	61-65
210-225	66-70
225-230	71-75
230-240	76-80
240-260	81-85
260-270	86-90
270-280	91-95

4.2 PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

Os placentônios foram retirados dos animais abatidos após a evisceração, e em seguida foram realizados recortes horizontais e longitudinais formando pequenos fragmentos para sua fixação, cuidando para não ocorrer à desconexão mecânica da interface materno-fetal. Esses fragmentos foram colocados em recipientes âmbar

contendo Formol tamponado 10%, adicionando o dobro de volume do fixador em relação às amostras. Esses tecidos após chegarem ao laboratório eram pós-fixados, ou seja, os fragmentos eram novamente aparados e o fixador era trocado, sempre mantendo o volume adequado (nove vezes o tamanho do fragmento).

Após 12 horas de fixação, os fragmentos foram colocados em pequenos recipientes e lavados com PBS deixando-os por mais 8 horas para posteriormente passarem por uma bateria consecutiva de álcoois e xilóis, em intervalos de uma hora cada um, iniciando com álcool 70°, álcool 95°, álcool 100° I, álcool 100° II, álcool-xilol, xilol I, xilol II, parafina I e parafina II fundidas a 56-58°C (parafina 850 g, cera de abelha 250g e estearina 50g). Após essa desidratação, os fragmentos foram colocados no fundo de formas montadas com barras de ferro em formato de “L”, preenchidas com parafina até a borda e identificados. Os blocos foram deixados esfriar por completo.

4.3 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

As lâminas foram preparadas através de lavagens com solução sulfocrômica (100 mL de água destilada, 100 g de bicromato de potássio e 1L de ácido sulfúrico), enxaguadas em abundância em água corrente, secadas em estufa a 60°C e desengorduradas com solução de 50% álcool e 50% éter. Após secagem as lâminas foram silanizadas (solução de silano: 200 mL de acetona e 8 mL de Silano - Sigma®), passaram por três banhos: o primeiro contendo silano a 4% em acetona PA por um minuto, retirando o excesso; o segundo contendo acetona PA por um

minuto e em seguida em água destilada fazendo rapidamente quatro mergulhos, e deixadas secar a temperatura de 37°C .

4.4 IMUNO-ISTOQUÍMICA

A localização das *Heat Shock Proteins* 60 e 70 foi feita por meio do ensaio imuno-istoquímico de acordo com o seguinte: as amostras de tecidos placentários inclusos em parafina foram seccionados em cortes de 4 µm, colocadas sobre lâminas silanizadas e em seguida incubadas em estufa a 60°C em posição horizontal “overnight”. Após esse período, as amostras foram desparafinizadas em uma bateria de banho que se iniciou com xilol I aquecido na estufa a 58° durante 15, passando novamente em xilol II por 10 minutos, álcool-xilol por 5 minutos, álcool 100° duas vezes por 5 minutos cada um, álcool 95° por 5 minutos, álcool 70° por 5 minutos e em água destilada pelo mesmo período.

Em seguida foi feito o bloqueio da Peroxidase Endógena (80 mL de álcool metílico e 20 mL de peróxido de hidrogênio 30%) por imersão dessas lâminas durante 30 minutos ao abrigo da luz. Em seguida foram feitas três lavagens com PBS (Na_2HPO_4 10,61 g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,89 g ou $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,20 g; NaCl 8,5 g e água destilada qsp 1000 mL – solução estoque 10 x) por 5 minutos cada uma.

Após o bloqueio, as lâminas foram submetidas ao processo de desmascaramento antigênico feito com tampão citrato (160 mL de citrato de sódio 0,1 M e 40 mL de ácido cítrico 0,1 M completando para 2000 mL de água destilada

em pH 6,0) por 15 minutos no microondas em potência máxima e deixadas esfriar a temperatura ambiente.

As lâminas foram secas com lenço de papel e sobre os tecidos foram colocados 50 μ L do anticorpo primário anti-HSP 60 e 70 (Stressgen® mouse anti-HSP 60 monoclonal SPA-807 e anti-HSP 70 monoclonal SPA-810) diluídos em uma solução contendo 125 μ L de BSA (albumina bovina fração V) com 250 μ L de azida sódica em 6 mL de PBS. As lâminas foram incubadas em câmara úmida “overnight” a temperatura de 4°C.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS e secas com papel, logo em seguida foram colocados 50 μ L do anticorpo secundário (Dako LSAB®+System) para cada corte e incubados durante uma hora. Duas lavagens com PBS foram realizadas. As lâminas foram novamente lavadas com PBS e secas com papel para a adição de 50 μ L de estreptovidina (Streptavidin, HRP- Dako LSAB®+HRP) por uma hora. A lavagem decorrente com PBS foi feita e as lâminas foram secas com papel e conseqüentemente preparadas para a revelação.

Cerca de 2 mL do cromógeno DAB (diaminobenzidina) (Sigma® um tablete de DAB foi dissolvido em 20 mL de água destilada), adicionados a 1,5 μ L de peróxido de hidrogênio 30% e colocados sobre os cortes (cobrindo-os por completo) durante 5 minutos e lavados imediatamente em água destilada.

As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina durante 20 segundos e rapidamente lavadas com água corrente, seguidas pela bateria de re-hidratação iniciando com álcool 70°, álcool 95°, álcool 100° I, álcool 100° II, álcool-xilol, xilol I, xilol II. As lâminas foram novamente secas com lenço de papel, onde os cortes foram preparados com a resina de bálsamo do Canadá e receberam a cobertura de lamínulas.

Os cortes de tecidos placentários foram observados em microscópio de captura de imagem Zeiss.

O controle negativo foi processado da mesma maneira que as outras amostras, com exceção da incubação do anticorpo primário que não foi colocado sobre o tecido. Este somente foi incubado com solução tampão.

Como controle positivo utilizaram-se amostras de placenta humana, uma vez que os anticorpos primários anti-HSP foram originalmente produzidos para marcação dessas proteínas em humanos.

4.5 IMUNO-MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Utilizamos para a imuno-microscopia eletrônica a técnica de marcação pós-embebição e a preparação da amostra foi feita por “freeze-substitution”.

Amostras de cerca de 1cm X 0.5 cm² da região de interface materno-fetal de placentônios bovinos foram fixadas em uma solução de paraformaldeído a 4% e Glutaraldeído a 0,15% por 24 horas a 4°C. Posteriormente, essas amostras foram colocadas em solução de tampão de sacarose 7% por mais 24 horas a 4°C. O material foi então fatiado em secções de 400 µm utilizando um “Tissue Slicer “ (Electron Microscopy Sciences, PA. USA) e estas foram lavados em tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4). Os cortes foram lavados em PBS 0,1M, pH 7,4 por três vezes por 10 minutos.

Posteriormente seguiu-se o bloqueio antigênico inespecífico dos mesmos utilizando L-lisina (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) 1% em PBS 0,1M, pH 7,4, por 60 minutos.

A fim de se melhorar a preservação antigênica, todo o procedimento a seguir foi realizado a uma temperatura de - 20°C. Procedeu-se a desidratação em gradiente de dimetilformamida a 50, 70, 80, 95 e 100% (duas vezes) por 60 minutos em cada gradiente. Seguiu-se a infiltração dos cortes com uma solução de dimetilformamida a 100% + resina LR-White (Electron Microscopy Sciences, PA. USA) na proporção de 1:1 por 120 minutos.

Terminado o procedimento, os cortes foram infiltrados em resina LR-White 100% “overnight”. Em seguida, os cortes foram novamente infiltrados em resina LR-White 100% por 4 horas. Após esse período, os mesmos foram acomodados em cápsulas de embebição e estas preenchidas com a mesma resina. Seguiu-se a polimerização da mesma por raios ultra-violeta por um período de 48 horas.

Após completa a polimerização, os blocos foram cortados em ultramicrotomo em secções de cerca de 100nm e estas dispostas sobre telas de níquel de 300 mesh recobertas por uma película de “formvar” (Electron Microscopy Sciences, PA. USA).

A imuno-marcação foi realizada em seguida pelo seguinte protocolo: as telas de níquel contendo as amostras foram hidratadas em PBS 0,1M, pH 7,4 em três lavagens com intervalos de 5 minutos cada. Logo após realizou-se o bloqueio dos receptores antigênicos inespecíficos utilizando PBS 0,1M, pH 7,4 albumina sérica bovina a 1% (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) por 30 minutos.

Terminado esse período procedeu-se a incubação das amostras com os anticorpos primários por um período de 12 horas a temperatura ambiente. Em

seguida, as amostras foram lavadas sucessivamente em PBS 0,05M, pH 7,4 e incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo Imunoglobulina G+M conjugada com colóide de ouro de 15nm (AuroProbe™, GE Healthcare, NJ, USA) por 30 minutos.

Após esse período, as amostras foram novamente lavadas em PBS 0,05M, pH 7,4 e em água ultra-pura e depois postas a secar a temperatura ambiente.

Prosseguiu-se então a contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo e a observação em microscópio eletrônico de transmissão GEOL 1010 (Tokyo, Japan).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados das técnicas utilizadas neste trabalho estão descritos abaixo.

5.1 IMUNO-ISTOQUÍMICA

As HSP 60 e 70 foram localizadas nos três diferentes trimestres da gestação bovina e estão resumidas conforme a tabela 2.

A intensidade da marcação da expressão das HSP variou de forte (+++), moderada (++) a fraca (+), conforme o período gestacional e a família da proteína.

Nas duas famílias analisadas, as estruturas placentárias observadas quanto à marcação das HSP foram: o epitélio materno, o trofoblasto e as células binucleadas. E a expressão de ambas as famílias não foram observadas no estroma e nem no mesênquima. A localização de ambas foi constante durante todos os terços estudados.

A variação da intensidade da marcação das duas famílias de HSP nos diferentes períodos gestacionais para os animais analisados, está representada na tabela 2.

Tabela 2 - Variação da expressão das *Heat Shock Proteins* 60 e 70 na placenta bovina nos três trimestres gestacionais.

	HSP 60	HSP 70
Primeiro terço	+ / ++ / +++ (1) / (2) / (7)	+ / ++ / +++ (0) / (1) / (9)
Segundo terço	+ / ++ / +++ (8) / (1) / (1)	+ / ++ / +++ (1) / (5) / (4)
Terceiro terço	+ / ++ / +++ (8) / (0) / (2)	+ / ++ / +++ (0) / (1) / (9)

Sendo que () é a quantidade do número de animais analisados correspondente a marcação e a variação da intensidade da marcação das proteínas estudadas: forte (+++), moderada (++) e fraca (+).

HSP 60

A intensidade da marcação desta HSP foi forte e mais evidente no primeiro terço gestacional na maioria dos animais analisados durante esse período. No segundo e terceiro terço a expressão da proteína foi mínima, sendo predominante fraca na maioria das amostras observadas (Figuras 1-3).

HSP 70

Ao contrário do que ocorreu com a HSP 60, a intensidade da marcação para a HSP 70 foi praticamente constante durante os três trimestres. Apresentou intensa marcação na maioria das amostras no primeiro e terceiro terço gestacional e no segundo terço, apresentou um número equivalente de animais de marcação que variou de moderada a forte (Figuras 1-3).

Figura 1 – Imunolocalização das HSPs 60 e 70 no primeiro terço gestacional. (A, B) HSP 60 e (C, D) HSP 70 intensamente marcadas no trofoblasto (TF), epitélio materno (EM) e células binucleadas (seta). Não houve marcação em estroma (ES) e mesênquima (M). Controle negativo (E). (A, C, E) escala da barra = 50 μ m; (B, D) escala da barra = 20 μ m

Figura 2 – Imunolocalização das HSPs 60 e 70 no segundo terço gestacional.(A, B). Notar a fraca marcação da HSP 60 em relação a HSP 70 com intensa marcação nas regiões de trofoblasto (TF), epitélio materno (EM) e células binucleadas (seta). Não há marcação no estroma (ES) e mesênquima (M). Controle negativo (E). (A, C, E) escala da barra = 50 μ m; (B, D) escala da barra = 20 μ m

Figura 3 – Imunolocalização das HSPs 60 e 70 no último terço gestacional. (A, B) Notar a fraca marcação da HSP 60 em relação a marcação forte da HSP 70 nas regiões de trofoblasto (T), epitélio materno (EM) e células binucleadas (seta). Estroma (ES) e mesênquima (M) não houve marcação. Controle negativo (E). (A, C) escala da barra = 50μm; (B, D, E) escala da barra = 20 μm

5.2 IMUNO-MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A expressão da HSP 60 e da HSP 70 foi nitidamente verificada por meio da marcação com ouro nas células binucleadas (núcleo, citoplasma e vesículas) e no epitélio materno (núcleo e citoplasma) em todos os terços gestacionais analisados (Figuras 4-5).

Os tecidos materno e fetal estavam distintos apesar da técnica utilizada não preservar sua morfologia, características marcantes foram estudadas e observadas.

Os trofoblastos foram evidenciados por serem constituídos de um epitélio de células com núcleos densos e nucléolos bem marcados, tamanhos diferentes e com a maioria de células gigantes e células binucleadas. Essas últimas possuem características marcantes por serem células grandes, com escasso citoplasma e grandes núcleos duplos geminados onde inclusive foi verificada a presença da marcação nessas membranas nucleares. Outra identificação para as células fetais é a presença de uma quantidade exacerbada de vesículas presentes no citoplasma.

O epitélio materno foi verificado por possuir um epitélio do tipo colunar simples no início gestacional e tornando-se cubóide no final da prenhez. Suas células são menores quando comparadas às células fetais e seus núcleos possuem cromatina frouxa e seu citoplasma não apresentou a presença de nenhuma vesícula.

Uma pequena diferença foi observada nas famílias estudadas. A HSP 70 apresentou-se mais marcada, ou seja, presença de maior quantidade de marcação (pontos de ouro nas células) em relação a HSP 60.

Figura 4 – Imunomicroscopia eletrônica de transmissão da HSP 60 presente no epitélio materno (A) (escala da barra = 1 μm , em detalhe, notar a marcação da proteína no núcleo (seta tracejada) e citoplasma (seta contínua) (B) (escala da barra = 200 nm)

Figura 5 – Localização da HSP 60 em uma célula binucleada (C) (escala da barra = 2 μm , notar a presença em maior aumento no citoplasma (seta contínua), vesícula (seta pontilhada) e núcleo (seta tracejada) (D) (escala da barra = 200 nm)

Figura 6 – Immunolocalização da HSP 70 presente na célula binucleada (A) (escala da barra = 2 μm) , em detalhe, notar a marcação da proteína no núcleo (seta tracejada) e citoplasma (seta contínua) (B) (escala da barra = 200 nm)

Figura 7 – Immunomicroscopia eletrônica de transmissão da HSP 70 presente no epitélio materno, notar o quadrado em detalhe (C) (escala da barra = 2 μm). Em maior aumento, verificar a marcação da proteína no epitélio (seta contínua) (D) (escala da barra = 1 μm)

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As HSPs 60 e 70 foram localizadas na placenta bovina por meio do ensaio de imuno-istoquímica e confirmadas pela imuno-microscopia eletrônica de transmissão, na interface materno-fetal, mais especificamente nas estruturas placentárias de epitélio materno, trofoblasto e células binucleadas; componentes de um local de intensa diferenciação celular, fatores de crescimento, trocas de nutrientes e hormônios.

No teste de imuno-istoquímica, a expressão da HSP 70 foi praticamente constante nos três trimestres gestacionais, variando de moderada a intensa na maioria dos animais analisados. Shah et al. (1998) verificaram a localização dessa proteína na decídua, citotrofoblasto e sincíotrofoblasto na placenta humana. Contudo a expressão foi oposta a dos nossos achados, posto que em seus experimentos houve uma diminuição desta no sincíotrofoblasto e no citotrofoblasto, bem como na decídua e trofoblasto intermediário durante os três terços gestacionais.

Para a HSP 60 nossos resultados demonstraram uma forte expressão no primeiro terço, tornando-se fraca no segundo e terceiro terços, distintamente dos achados de Shah et al. (1998), onde verificaram que essa proteína não teve a expressão modificada durante toda a prenhez.

Em nosso estudo a expressão para ambas as proteínas na placenta bovina variou de fraca, moderada a intensa, enquanto nos estudos de Shah et al. (1998) em placentas humanas, essa variou somente de fraca a moderada.

Os diferentes resultados encontrados entre nosso trabalho e os de Shah et al. (1998) podem ser explicados por terem sido realizados com espécies distintas, além de fatores como a origem das amostras e o tipo de placentação.

Shah et al. (1998) utilizaram placentas oriundas de mulheres que sofreram abortamentos espontâneos no primeiro e segundo trimestre, e somente no terceiro período gestacional as amostras vieram de mulheres que apresentaram gestação sem complicações (nascimento a termo). Isso ressalta o trabalho feito por Sotiriou et al. (2004) que compararam a expressão da HSP 70 entre mulheres que sofreram abortamentos espontâneos e mulheres com gestações normais. Os resultados obtidos demonstraram que a expressão dessa proteína foi forte no sincitiotrofoblasto e no citotrofoblasto em placentas decorrentes de abortamentos (primeiro trimestre) e fraca em placenta de mulheres gestações a termo.

Dessa maneira sugere-se que a implicância da expressão dessas proteínas na placenta humana oriunda de mulheres que tiveram gestações naturalmente interrompidas foi mais expressa nesses casos.

A disponibilidade na aquisição das amostras de placenta bovina nas diferentes idades gestacionais, onde as vacas apresentaram gestação normal foram coletados de matadouro, o que torna diferente a realidade para a coleta de placentas humanas.

Quanto ao tipo de placentação, a vaca no início da gestação, apresenta placenta do tipo epiteliocorial, ou seja, possui seis camadas de tecido, por isso o estabelecimento da tolerância materna torna-se mais fácil devido à exposição aos antígenos fetais possivelmente ser menor. Com o avanço da gestação, essa placenta torna-se sinepiteliocorial, em razão da migração de células trofoblásticas gigante e binucleadas para porção materna (LEISER; KAUFAMNN, 1994), e a tolerância materno-fetal sugere-se já estar estabelecida. Na mulher a placenta é considerada hemocorial, onde a superfície coriônica fica exposta ao sangue materno, mantendo maior contato entre eles (LEISER; KAUFAMNN, 1994), tornando

dessa forma mais difícil o estabelecimento da tolerância, pois os antígenos fetais estão mais expostos à mãe no início da gestação.

É importante ressaltar que o perfil hormonal também pode influenciar no padrão de expressão das HSPs (DIVERS et al., 1995; CIOCCA et al., 1996; KIANG; TSOKOS, 1998; LIVINGSTON et al., 2002; MARIANI et al., 2000). Sugere-se então que a expressão das HSP nas células binucleadas está associada aos hormônios produzidos e liberada por essa célula, como lactogênio e progesterona (WOODING, 1992) e hCG por células trofoblásticas (SAITO, 2000) e que esse hormônio induziria a liberação de citocinas de perfil Th2, as quais favorecem a manutenção da gestação (RAGHUPATHY, 2001; COSTEAS et al., 2004; THELLIN et al., 2000).

A evidente diferença na expressão entre as famílias das proteínas estudadas foi verificada durante os três terços gestacionais, esta ocorreria em razão da HSP 70 ser uma proteína mais constitutiva do que as outras HSPs e estar localizada em diferentes organelas celulares (NEUER, et al., 2000; KIANG e TSOKOS, 1998). Também foi proposto que sua expressão seria modulada por hormônios como estrógeno e progesterona (MARIANI et al., 2000), o que justificaria sua presença durante toda a gestação.

Já a HSP 60 está presente somente nas mitocôndrias (BOHDAN e GUPTA, 1997; KIANG e TSOKOS, 1998) e na membrana plasmática (SOLTYS; GUPTA, 1997). O aumento da expressão da HSP 60 no primeiro terço de gestação pode sugerir seu envolvimento no estágio inicial do reconhecimento de antígenos fetais pelo sistema imune materno, dado sua ligação com receptores TLR 4 nas APCs frente aos antígenos fetais, iniciando uma resposta provavelmente pró-inflamatória. Com o avanço da gestação os peptídeos fetais ligados a HSP 60 seriam re-

apresentados ligados ao MHC-II para as APCs auxiliando a resposta imune materna, e conseqüente estabelecimento da tolerância.

KILMARTIN e REEN (2004) demonstraram em ensaios *in vitro* que à estimulação constante com LPS, monócitos humanos expressando HSP 60 teriam suas respostas moduladas, sugerindo a função imunomoduladora dessa proteína. Dessa forma o estímulo contínuo do sistema materno por antígenos fetais poderia modular a resposta de macrófagos expressando HSP 60, presentes na placenta bovina, para uma resposta mais tolerogênica, contribuindo assim na manutenção da tolerância materna.

Como na placenta existe um número elevado de macrófagos (HUNT, 1994; MIYOSHI; SAWAMUKAI, 2004; GURENVICH et al., 2003), sugere-se que as HSPs ligam-se a essas células por meio de receptores como o CD 14, CD 91 e TLR 2 e 4 (VAN ÉDEN et al., 2003; KOL et al., 2000 e ZANIN-ZHOROV et al., 2003) liberando citocinas pró-inflamatórias de perfil Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α). Ainda o avanço da gestação, citocinas perfil Th2 predominaria atuando no estabelecimento e manutenção da tolerância materno-fetal (SAITO, 2000).

Nossos resultados evidenciaram a localização da expressão das proteínas do choque térmico na interface materno-fetal da placenta bovina. Eles representam o início de estudos futuros para uma melhor compreensão da participação das HSPs no sistema imune tanto da mãe quanto do feto no estabelecimento da tolerância materno-fetal nessa espécie.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- A expressão das *Heat Shock Proteins* (HSPs) 60 e 70 foram observadas na placenta bovina nas regiões de trofoblastos, células binucleadas e epitélio materno;
- A expressão da HSP 70 foi constante durante toda a gestação;
- A expressão da HSP 60 foi mais intensa no primeiro terço e declinou no segundo e terceiro terço de gestação.

REFERÊNCIAS

- ASEA, A.; KRAEFT, S.; KURT-JONES, E. A.; STEVENSON, M. A.; CHEN, L. B.; FINBERG, R. W.; KOO, G. C.; CALDERWOOD, K. S. HSP 70 stimulates cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Nature Medicine**, v. 6, n. 4, p. 435-442, 2000.
- BASU, S.; INDER, R. J.; SUTO, R.; ANDERSON, K. M.; SRIVASTAVA, P. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. **International Immunology**, v. 12, n. 11, p. 1538-1546, 2000.
- BIRK, O. S.; GUR, S. L.; ELIAS, D.; MARGALIT, R.; MOR, F.; CARMELI, P.; BOCKOVA, J.; ALTMANN, D. M.; COHEN, I. R. The 60-kDa heat shock protein modulates allograft rejection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 5159-5163, 1999.
- BOHDAN, S. J.; GUPTA, R. S. Cell surface localization of the 60kDa heat shock chaperonin protein (HSP60) in mammalian cells. **Cell Biology International**, v. 21, n. 5, p.315-320, 1997.
- BRELOER, M.; DORNER, B.; MORÉ, S. H.; RODERIAN, T.; FLEISCHER, B.; VON BONIN, A. Heat shock proteins as “danger signals”: eukaryotic HSP60 enhances and accelerates antigen-specific IFN- γ production in T cells. **European Journal Immunology**, v. 31, p. 2051-2059, 2001.
- CHEN, W.; SYLDATH, U.; BELLMANN, K.; BURKART, V.; KOLB, H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. **The Journal of Immunology**, v. 162, p. 3212-3219, 1999.
- CHIKASSHI, T.; STRAUSS, J. F. Placenta *In: Atlas of Endocrine Organs Vertebrates and Invertebrates*. Springer-Verlag, 1987, 307p.
- CIOCCA, D.R.; STATI, A. O.; FANELLI, M. A.; GAESTEL, M. Expression of Heat Shock Protein 25 000 in rat uterus during pregnancy and pseudopregnancy. **Biology of Reproduction**, n. 54, p. 1326-1335, 1996.
- COHEN, I.R. Heat shock protein 60 and the regulation of autoimmunity, cap.5 In **Stress Proteins in Medicine**., Nova Iorque: ed. Marcel Dekker, 1996, p.102.
- COHEN, I. R. the Th1/Th2 dichotomy, hsp 60 autoimmunity, and type I diabetes. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 84, n. 2, p. 103-106, 1997.
- COSTEAS, P. A.; KOUMOULI, A.; GIANTSIOU-KYRIAKOU, A.; PAPALOIZOU, A.; KOUMAS, L. Th2/Th3 Cytokine genotypes are associated with pregnancy loss. **Human Immunology**, v. 65, p. 135-141, 2004.

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

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

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

DUC-GOIRAN, P.; MIGNOT, T. M.; BOURGEOIS, C. e FERRÉ, F. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. **European Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 83, p. 85-100, 1999.

FENG, H. L.; SANDLOW, J. I. E; SPARKS, A. E. T. Decreased expression of heat shock protein HSP 70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility. **Fertility and Sterility**, vo. 76, n. 6, Dec. 2001.

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

FUKUSHIMA, A.; KAWAHARA, H.; ISURUGI, C.; SYOJI, T.; OYAMA, R.; SUGIYAMA, T.; HORIUCHI, S. Changes in serum levels of heat shock protein 70 in preterm delivery and pré-eclampsia. **Journal Obstetric and Gynecology research**, v. 31, n. 1, p. 72-77, 2005.

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

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B. A. T-cell maturation, activaion and differentiatin In: FREEMAN, W. H. **Kuby immunology**. 4^o ed. New York: Company, 2000. 670 p.

GRANJA, C.; MOLITERNO, R. A.; FERREIRA, M. S.; FONSECA, J. A.; KALIL, J.; COELHO, V. T-cell autoreactivity to Hsp in human transplantation may involve both proinflammatory and regulatory functions. **Human Immunology**, v. 65, p. 124-134, 2004.

GRUNERT, E. **Obstetricia Veterinária**. Porto Alegre (RS): Editora Sulina. 1982. 323 p.

HAMMERER-LERCHER, A.; MAIR, J.; BONATTI, J.; WATZKA, S. B. C.; PUSCENDORF, B.; DIRMHOFER, S. Hypoxia induces heat shock protein expression

in human coronary artery bypass grafts. **Cardiovascular Research**, v. 50, p. 115-124, 2001.

HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, n. 13, p. 571-580, 1996.

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

IWAKABE, K.; SHIMADA, M.; OHTA, A.; YAHATA, T.; OHMI, Y.; HABU, S.; NISHIMURA, T. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. **Immunology Letters**, v. 62, p. 39-43, 1998.

KAUFMANN, S. H. E. Heat shock protein and the immune response. **Immunology Today**, v. 11, n. 4, p. 129-136, 1990.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. **Pharmacology**, v. 80, n. 2, p. 183-201, 1998.

KILMARTIN, B.; REEN, D. J. HSP 60 induces self-tolerance to repeated HSP60 stimulation and cross-tolerance to other pro-inflammatory stimuli. **European Journal Immunology**, v. 34, p. 2041-2051, 2004.

KUPPNER, M. C.; GASTPAR, R.; GELWE, S.; NÖSSNER, E.; OCHMANN, O.; SCHARNER, A.; ISSELS, R. D. The role of heat shock protein (HSP70) in dendritic cell maturation: HSP 70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. **European Journal Immunology**, v. 31, p. 1602-1609, 2001.

JOOSTEN, I.; HENSEN, E. J. Retained placenta: and immunological approach. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 451-461, 1992.

JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino, cap.22
In: **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 1999. p.512.

KOL, A.; LICHTMAN, A. H.; FINBERG, R. W.; LIBBY, P.; KURT-JONES, E. A. Cutting edge: Heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP 60 activation of mononuclear cells. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 13-17, 2000.

LI, D.; GORDON, C. B.; STAGG, C. A.; UDELSMAN, R. Heat shock protein expression in human placenta and umbilical cord. **Shock**, v. 5, n. 5, p. 320-323, 1996.

Li, Z.; MENORET, A.; SRIVASAVA, P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. **Current Opinion in Immunology**, v. 14, p. 45-51, 2002.

LIVINGSTON, J. C.; AHOKAS, R.; HADDAD, B.; SIBAI, B. M.; AWAADS, R. Heat shock proteins 70 is not increased in women with severe preeclampsia. **Hypertension in Pregnancy**, v. 21, n. 2, p. 123-126, 2002.

MARIANI, M. L.; SOUTO, M.; FANELLI, M. A.; CIOCCA, D. R. Constitutive expression of heat shock proteins hsp 25 and hsp70 in the rat oviduct during neonatal development, the oestrus cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 217-223, 2000.

MATWEE, C.; KAMARUDDIN, M.; BETTS, D. H.; BASRUR, P. K.; KING, W. A. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n° 9, p. 829-837, 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br> >. Acesso em: 26 jan. 2005.

MIRANDA, S.; GENTILE, T.; MARGNI, R. Enhancement of *in vitro* HSP 72 expression by placental IL-6. **American Journal of Reproduction Immunology**, v. 46, p. 358-365, 2001.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y. Specific localization of macrophages in pregnant bovine caruncles. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 39, p. 125-128, 2004.

MORÉ, S. H.; BRELOER, M. e VON BONIN, A. Eukaryotic heat shock proteins as molecular links in innate and adaptive immune responses: Hsp 60-mediated activation of cytotoxic T cells. **International immunology**, v. 13, n. 0, p.1121-1127, 2001.

MOSELEY, P. Stress proteins and the immune response. **Immunopharmacology**, v. 48, p. 299-302, 2000.

NEUER, A.; MELE, C.; ROSENWAKS, Z.; WITLIN, S. S. Monoclonal antibodies to mammalian heat shock proteins impair mouse embryo development *in vitro*. **Human Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 987-990, 1998.

NEUER, A.; SPANDORFER, S. D.; GIRALDO, P.; DIETERLE, S.; ROSENWAKS, Z.; WITKIN, S. S. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human Reproduction Update**, vol 6, n. 2, p. 149-159, 2000.

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

OOSTEN, I.; HENSEN, E.J. Retained placenta: an immunological approach. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 451-461, 1992.

POCKLEY, A. G. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 21 September, p. 1-22, 2001. Disponível em <<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>>. Acesso em: 14 abr. 2003.

POCKLEY, A. G.; BULMER, J.; HANKS, B. M.; WRIGHT, B. H. Identification of human heat shock protein 60 (HSP 60) and anti-HSP 60 antibodies in the peripheral circulation of normal individuals. **Cell Stress & Chaperones**, v. 4, n. 1, p. 29-35, 1999.

RAGHUPATHY, R. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. **Immunology**, v. 13, p. 219-227, 2001.

RITOSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experimentia**, v. 18, p. 571-573, 1962.

SAITO, S. Cytokine network at the feto-maternal interface. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 47, p. 87-103, 2000.

SANTIAGO, A. A. **Pecuária de Corte no Brasil Central**. Publicado pelo fundo de pesquisa do instituto de Zootecnia (Água Branca), Secretaria de Agricultura de São Paulo, 1970. 635p.

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

SOTIRIOU, S.; LIATSOS, K.; LADOPOULOS, I.; ARVANITIS, D. L. A comparison in concentration of heat shock proteins (HSP) 70 and 90 on chorionic villi of human placenta in normal pregnancies and in missed miscarriages. **Clinical Experience Obstetrics and Gynecology**, n. 3, p.185-190, 2004.

TABIBZADEH, S.; KONG, Q. F.; SATYASWARROP, P. G.; BABAKNI, A. Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Human Reproduction**, v. 11, n.3. p. 633-640, 1996.

TANAKA, S.; KIMURA, Y.; MITANI, A.; YAMANOTO, G.; NISHIMURA, H.; SPALLEK, R.; SINGH, M.; NOGUSHI, T.; YOSHIKAI, Y. Activation of T cells recognizing an epitope of heat shock protein 70 can protect against rat adjuvant arthritis. **The American Association of Immunology**, v. 163, p. 5560-5565, 1999.

THELLIN, O.; COUMANS, 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, n. 6, p. 731-737, 2000.

TISSIÈRES, A.; MITCHELL, H.; TRACY, U. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. **Journal Molecular and Biology**, v. 84, p. 389-398, 1974.

TODRYK, S. M. ;GOUGH, M. J.; POCKLEY, G. Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potencial. **Immunology**, v. 110, p. 1-9, 2003.

TRIEB, K.; DIRNHOFER, S.; KRUMBÖCK, N.; BLAHOVEC, H.; SGONG, R.; MARGREITER, R.; FEICHTINGER, H. Heat shock protein expression in the transplanted human kidney. **Transplant**, v. 14, p. 282-286, 2001.

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

UDON, H.; SRIVASTAVA, P. K. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. **Journal Experience and Medicine**, v. 178, p. 1391-1396, 1993.

VAN EDEN, W.; KOETS, A.; VAN KOOTEN, P.; PRAKEN, B.; VAN DER ZEE, R. Immunopotentiating heat shock proteins: negotiators between innate danger and control of autoimmunity. **Vaccine**, v. 21, p. 897-901, 2003.

VAN EDEN, W. Stress proteins as targets for anti-inflammatory therapies. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 3, p. 115-120, 2000.

VAN EDEN, W.; VAN DER ZEE, R.; PAUL, A. G. A.; PRAKKEN, B. J.; WENDLING, U. W.; ANDERTON, S. M. WAUBEN, M. H. M. Do heat shock proteins control the balance of t-cell regulation in inflammatory diseases? **Immunology Today**, v. 19, n. 7, p. 303-307, 1998.

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

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

ZÜGEL, U.; KAUFMANN, S. H. E. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, № 1, p. 19-39, 1999.

WALLIN, R. P. A.; LUNDQVIST, A.; MORE, S.H.; VON BONIN, A.; KIESSLING, R.; LUJUNGGREN, H. Heat shock proteins as activators of the innate immune system. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 3, 2002.

WATABA, K.; SAITO, T.; TAKEUCHI, M.; NAKAYAMA, M.; SUEHARA, N. E. KUDO, R. Changed expression of heat shock proteins in various pathological findings in placentas with intrauterine fetal growth restriction. **Medicine Electron Microscopy**, v. 37, p. 170-176, 2004.

WEETMAN, A. P. The immunology of pregnancy. **Thyroid**, v. 9, n. 7, p. 643-646, 1999.

WOODING, F. B. P. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusion and hormone production. **Placenta**, v. 13, p. 102-113, 1992.