LILIAN DE JESUS OLIVEIRA

Degradação de triptofano na placenta bovina em gestações normais e de clones: evidência da atividade da *indoleamina 2,3-dioxigenase* ?

São Paulo
2005

LILIAN DE JESUS OLIVEIRA

Degradação de triptofano na placenta bovina em gestações normais e de clones: evidência da atividade da *indoleamina 2,3-dioxigenase* ?

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 Júnior

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.1488
FMVZ

Oliveira, Lilian de Jesus

Degradação de triptofano na placenta bovina em gestações normais e de clones: evidência da atividade da indoleamina 2,3-dioxigenase? / Lilian de Jesus Oliveira. – São Paulo : L. J. Oliveira, 2005.

91 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2005.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior.

1. Triptofano. 2. Indoleamina 2,3 – dioxigenase. 3. Placenta. 4. Bovinos. 5. Tolerância materno-fetal. I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Linhas	Onde se lê	Leia-se
13	1	4	86 f.	91 f.
15	1	4	2,3 dioxigenase? 2005. 86 f.	2,3 dioxigenase?]. 2005. 91 f.

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

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Degradação de triptofano na placenta bovina em gestações normais e de clones: evidência da atividade da *indoleamina* 2,3 *dioxigenase*", protocolo nº447/2004, utilizando 30 placentas de bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Degradation of tryptophan in bovine placenta in normal and cloned pregnancy: is this an evidence of indoleamine 2,3-dioxygenase activity" protocol number 447/2004, utilizing 30 bovines placentas, under the responsibility of Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 01 de março de 2005

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

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-000 - Cid. Univ. "Armando de Salles Oliveira"
Fones: (011) 3091-7671/3091-7676 Fax: (011) 3032-2224

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Lilian de Jesus

Título: Degradação de triptofano na placenta bovina em gestações normais e de clones: evidência da atividade da *indoleamina 2,3-dioxigenase* ?

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: _____

O principal valor da vida é a dignidade;

A principal felicidade na vida é a alegria espiritual;

A principal esperança na vida é a paz

A principal devoção na vida é beneficiar os seres.

Autor Desconhecido

Aos meus pais Luiz Manoel de Jesus e Maria Aparecida de Jesus dedico este trabalho, hoje sei que as minhas maiores heranças são o amor que recebo todos os dias, e o exemplo de honestidade e respeito que vocês são! Agradeço por me proporcionarem este momento, pois ninguém mais do que vocês lutaram para que eu pudesse realizar mais este sonho! Amo vocês!

Aos meus irmãos Rodolfo Manoel e Luciana de Jesus Oliveira dedico este trabalho, vocês são os meu tesouros! Sempre me auxiliam e sonham comigo os meus sonhos! O tempo e distância só aumentará o meu amor por vocês!

Ao Robson Fortes Giglio agradeço por todo carinho, companheirismo e dedicação nesses últimos dois anos! Você é muito especial e agradeço a Deus todos os dias por poder compartilhar minha vida com você!

AGRADECIMENTOS

- ***Agradeço a Deus que sempre me permitiu sonhar, me deu forças para lutar e realizá-los da maneira mais produtiva.***
- ***Á Universidade de São Paulo que me acolheu e proporcionou as melhores oportunidades.***
- ***Ao Prof José Roberto Kfoury Júnior (JR Jr), pela amizade e a oportunidade de crescer profissionalmente e pessoalmente! Acredito que crescemos juntos e nossa amizade será duradoura!***
- ***A Profa. Bernadete Miranda dos Santos por acreditar em mim e me ensinar como se faz ciência e principalmente como fazê-la com responsabilidade.***
- ***Ao Prof José Antônio Visintin e Profa Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assunpção pela acolhida em um momento turbulento da minha vida e por oferecerem sua amizade incondicionalmente!***
- ***Aos Prof. José Bento de Stermann Ferraz e Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles pela amizade e pelo aprendizado durante esses anos de convivência. Muito Obrigada!***
- ***A minha família Laudisio (Geraldo, Nidivalda, Elaine, Edlaine, Fabrício e Camille) por todo amor e amizade!***
- ***À Priscila Coutinho Barreto e Alex, vocês são meus irmãos de coração!***
- ***À amiga Cristina Caldas, nunca vou conseguir te agradecer pela amizade sincera que recebo sempre! Muito Obrigada por compartilhar sua vida comigo!***
- ***À amiga irmã caçula do coração Ana Rita, você é uma pessoa iluminada, seu apoio, amizade, carinho, dedicação e compreensão foram fundamentais neste período! Um simples amigo espera que você sempre esteja por perto***

quando ele precisar. Um verdadeiro amigo espera estar sempre por perto quando você precisar dele.

- ***À Janaína e Patrícia não tenho como agradecer toda dedicação, sinceridade e amizade nesses dois anos, como diz uma amiga nossa "amizade se conquista" vocês conquistaram a minha! Muito Obrigada!***
- ***Às amigas Kátia Haipek e Daniela (Poliana), não tenho o que falar, vocês são um dos maiores presentes que a USP me deu! A amizade é eterna!***
- ***Aos amigos, Felipe e Flávia pelo companheirismo de todas as horas!***
- ***Às amigas Karina, Naiane só tenho a dizer que a nossa amizade não começou neste ciclo de vida e estou certa que não acabará facilmente! Muito Obrigada por tudo!***
- ***Às amigas Liliam, Alecssandra, Vera por todo apoio e amizade desde meu primeiro ano na USP. Amo vocês!***
- ***À Janaína, Patrícia, Moniquinha, Gustavo, Renata, Rose e Anna Paula o trabalho em equipe, a compreensão, a amizade os fazem muito especiais na minha vida, vocês me auxiliaram a crescer profissional e espiritualmente, muito obrigada!***
- ***À minha querida mãezinha da USP Vera por cuidar de mim em todos os sentidos todos esses anos! E as meninas da secretaria da graduação pela paciência e apoio todo esses anos.***
- ***À família "Fortes Giglio" (Beatriz, Haroldo, Marcelo, vô Haroldo, vó Maria, tia Mô, Ti Gá e vó Ignêz) pela acolhida, amizade, e o carinho!***
- ***Aos meus amigos da UFV Priscila, Carla, Tatiana Ilana, Fernando, Eduardo (Percevejo), Flaviana, Ana Maria, Lucinda e Luiz Márcio pela amizade que resiste ao tempo e à distância.***

- ***À Profa. Dra. Verônica P.C.V. Coelho pela amizade e pelo exemplo que é de pesquisadora e de uma das pessoas mais justas e bondosas que eu conheço, você é um modelo de vida para mim!***
- ***Aos Prof. Dr. Momtchilo Russo e a Profa Dra Ana Campa por me auxiliarem na realização deste trabalho.***
- ***À Maria Rita e Sabrina da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP por todo trabalho que tiveram e pela compreensão! Este trabalho é nosso!***
- ***À amiga Silvia Oloris pelo companheirismo e amizade, muito obrigada!***
- ***Aos amigos da turma de pós-graduação Carolina (Carol), Priscilla (Perê), Rafael (Rafinha), André (Casas), Ryan (Micuim), Alexandre (Shima), Ziláh, Vanessa (Vanessinha P.), Hildebrando, Emerson, Marina, Gisele, Roselaine, Karina Valle, Wilker, Cristiane, Juliana, Vanessa, Carlos Eduardo (Caduzinho), Fernanda (Fê), Ricardo, Adriana (Drica), Érica, Vivian (Neusa), Assis, Lucas, Adriana (Uberlândia), Roseâmely (Nega), Carlos Eduardo (Caju), Daniele, Danila, Eduardo (Mm's), Arley pela amizade e por compartilhar muitos momentos importantes neste período.***
- ***Aos meus amigos do Instituto do coração pela amizade e carinho recebidos no curto que permaneci, principalmente Ernesto, Moniquinha, Ione e Idania do grupo transplante.***
- ***Aos Professores e pesquisadores do Instituto do coração pela acolhida e a oportunidade de aprender que me foi oferecida.***
- ***Á dona Sílvia, Iraílton, Luiz, Belau e Taís pela amizade! Muito Obrigada!***
- ***A todos os Professores do Departamento de Cirurgia desta faculdade, principalmente Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, ao Prof. Dr. Franscisco Javier Blaquez, à Profa. Dra. Silvia Cortopassi, à Profa. Dra. Denise Fantoni,***

ao Prof. Dr. Franklin de Almeida Stermann, à Profa. Dra. Júlia Maria Matera, ao Prof. Dr. Antônio Augusto Coppi Maciel Ribeiro pela amizade e ensinamentos durante todos esses anos.

- ***A todos os professores, funcionários e amigos do Departamento de Reprodução Animal desta faculdade pela amizade e companheirismo.***
- ***Aos amigos da graduação da USP das turmas 61, 62, 63 e 65 principalmente Renata (Tieta), Marie, Mônica, Suzana, Patrícia Koga, Daniela (Poliana), Kátia Haipek, Vinícius, Ryan (Micuim), Mônica (Nika), Priscila (Dot), Dani, Silvia (Grude) pela acolhida e amizade.***
- ***Aos meus amigos da secretaria do setor de Anatomia Jaqueline, Maicon, Kazue,Patrícia, Graça e Cauê pela amizade e agradável convivência! Muito Obrigada!***
- ***Aos funcionários e amigos do setor Diogo, Edinaldo (Índio), Ronaldo pela amizade por tudo que aprendi com vocês esses anos.***
- ***Ao Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Jr e à amiga Daniela pela amizade e auxílio em todos os momentos!***
- ***Às funcionárias da secretaria da pós-graduação, biblioteca e do biotério pela convivência e colaboração.***
- ***À todos os amigos do programa de pós-graduação da Anatomia dos Animais Domésticos e Slivestres pela convivência durante este período.***
- ***Ao senhor André Luiz Nogueira proprietário do Frigorífico Mantiqueira LTDA que viabilizou a coleta dos materiais.***
- ***À todos os funcionários do Frigorífico Mantiqueira LTDA que muito me auxiliaram na realização deste trabalho.***

RESUMO

OLIVEIRA, L. J. Degradação de triptofano na placenta bovina em gestações normais e de clones: evidência da atividade da *indoleamina 2,3-dioxigenase* ? [Degradation of tryptophan in bovine placenta in normal and cloned pregnancy: Is this an evidence of *indoleamine 2,3-dioxygenase* activity ?]. 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

A tolerância materno-fetal continua a ser um intrigante enigma imunológico. Algumas teorias têm sido propostas sobre o estabelecimento deste estado, tais como a produção de moléculas solúveis como HLA-G (na gestação humana) por células fetais que inibiriam a atividade de células do sistema imune inato. Além da secreção de hormônios; liberação de citocinas e de alguns fatores pelo trofoblasto que induziriam alterações no micro-ambiente placentário favorecendo o sucesso da gestação. A tolerãncia materno-fetal parece ser resultar da interação de eventos específicos ou não da gestação. Neste contexto, a *indoleamina 2,3-dioxigenase* (IDO), uma enzima com transcrição induzida pelo INF-γ, tem sua atividade relacionada com o estabelecimento de estado de tolerância materno frente a antígenos fetais em mulheres e em camundongas. A IDO catabolisa o triptofano, um aminoácido essencial, do micro-ambiente placentário. Desta forma, células T ativadas no tecido placentário não conseguem proliferar estacionando na fase G1 do ciclo celular, ma forma de regulação da resposta imune materna. O presente trabalho teve por objetivo analisar as concentrações de triptofano e seus produtos de catabolismo no tecido placentário bovino em gestações normais e de fetos clonados. Homogenatos de tecidos placentários provenientes de gestações normais (n=29) e de fetos clonados (n=5) foram analisados por cromatrografia líquida de alta performance (HPLC). O níveis de triptofano e quinurenina aumentaram com o avanço da idade gestacional; TRIPTOFANO: 479,33μM/L ±53,04ep; 745,87μM/L

±72,71ep; 983,39μM/L ±196,37ep no primeiro, segundo e terceiro trimestre da prenhez respectivamente; QUINURENINA: 15,13μM/L ±2,97ep; 25,26μM/L ±3,72ep; 52,77μM/L ±17,75ep no primeiro, segundo e terceiro trimestre da prenhez respectivamente. A razão quinurenina/triptofano (razão Q/T) não alterou durante a gestação (0.038 ±0.011ep, 0.035 ±0.005ep and 0.056 ±0,020ep; no primeiro, segundo e terceiro trimestre da prenhez respectivamente). Quando esses valores foram comparados à placentas provenientes de fetos clonados apresentaram-se menores, contudo sem diferenças estatísticas significantes. (0,031 ±0.003ep). Os valores de triptofano foram menores na gestação de clones (811,34μM/L ±232,14ep) bem como os encontrados de quinurenina (22,85μM/L ±4,09ep). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o terceiro trimestre gestacional de fetos normais quando comparados à gestação de clones neste contexto. O catabolismo de triptofano parece aumentar com o avanço da idade gestacional devido o aumento da concentração do aminoácido e de seus metabólitos (quinurenina), no entanto a razão Q/T não se alterou, sugerindo um aumento da atividade de IDO na placenta bovina para manutenção dos níveis de triptofano no micro-ambiente placentário. A presença de quinurenina na placenta bovina é um indicador da atividade da IDO neste tecido.

Palavras-chave: Triptofano. Indoleamina 2,3 dioxigenase. Placenta. Bovina, Tolerância materno-fetal

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. J. Degradation of tryptophan in bovine placenta in normal and cloned pregnancy: Is this an evidence of *indoleamine 2,3-dioxygenase* activity ? [Degradação de triptofano na placenta bovina em gestações normais e de clones: evidência da atividade da *indoleamina 2,3-dioxigenase* ? 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Maternal-fetal tolerance continues to be an intriguing immunological enigma. Some theories have been proposed about these phenomena such as the production of soluble molecules like HLA-G by fetal cells that would block some cells of the innate immune system and the secretion of cytokines, hormones and some factors by trophoblast cells that would induce changes in the placental microenvironment. Maternal tolerance is probably the consequence of a wide panel of mechanisms that may be or not pregnancy-specific. In this context, indoleamine 2, 3 dioxygenase (IDO), an inducible INFγ enzyme, is a candidate protein to be involved in placental tolerance, as suggested in some reports on women pregnancy. IDO seems to catabolise the tryptophan, an essential amino acid necessary to cell proliferation. This way, activated T-cells in placental tissue cannot proliferate due to starvation of tryptophan in milieu and these cells undergo apoptosis. This change may be one of the ways maternal-fetal tolerance occurs. Our aim was to evaluate the levels of tryptophan and its degradation products in normal and cloned bovine pregnancy, observing possible changes in tryptophan catabolism during this period. Homogenates from normal placental tissue from cows with normal (n=29) and cloned pregnancy (n=5) were analyzed by high performance liquid chromatograph. Levels of tryptophan and kinurenine reached their highest levels through of time of pregnancy; TRIPTOPHAN: 479,33µM/L ±53,04ste; 745,87µM/L ±72,71ste; 983,39µM/L ±196,37ste early. middle and late pregnancy respectively; KINURENINE: 15,13µM/L ±2,97ste; 25,26µM/L ±3,72ste; 52,77µM/L ±17,75ste early. middle and late

pregnancy respectively. The ratios of kynurenine to tryptophan does not increased during pregnancy (0.038 ±0.011ste, 0.035 ±0.005ste and 0.056 ±0,020ste; early, middle and late pregnancy respectively). When these values were compared to cloned pregnancy they showed lower values in these animals, however they were not statiscally significant (0,031 ±0.003ste). Tryptophan values were lower in cloned pregnancy (811,34μM/L ±232,14ste) as well kinurenine (22,85μM/L ±4,09stde). There was no statiscal difference between normal late pregnancy and cloned pregnancy in this mater. The presence of kinurenine in bovine placental tissue is one indicator that IDO could be expressed in bovine placenta and indicate an IDO activity in this site.

Key words: Triptophan. Indoleamine 2,3 dioxigenase. Bovine. Placenta. Tolerance maternal-fetal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo do catabolismo de triptofano via indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e via triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) 50

Figura 2 – Modelo hipotético gráfico proposto da atividade da indoleamine 2,3-dioxigenase no tecido placentário bovino..... 56

Figura 3 – Cromatogramas representativos das amostras de homogenatosplacentários avaliados através do HPLC..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Valores encontrados de triptofano, de quinurenina e da razão quinurenina/triptofano (Razão Q/T) e idade gestacional aproximada dos animais estudados 64

Tabela 2 – Valores encontrados de triptofano, de quinurenina e da razão quinurenina/triptofano (Razão Q/T) e idade gestacional aproximada dos animais estudados 66

Tabela 3 – Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), erros padrões (E.P.), mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os valores de quinurenina (µM /L), no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional..... 66

Tabela 4 – Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), erros padrões (E.P.), mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os valores da razão quinurenina/triptofano, no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional 66

Tabela 5 – Médias de quadrados mínimos para as variáveis triptofano (µM /L), quinurenina (µM /L) e razão quinurenina/triptofano (Razão Q/T) no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional 68

Tabela 6 – Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), erros padrões (E.P.), mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os valores de triptofano, no tecido placentário bovino proveniente de gestações normais e de clones no terceiro trimestre gestacional..... 70

Tabela 7 – Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), erros padrões (E.P.), mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os de valores quinurenina, no tecido placentário bovino proveniente de gestações normais e de clones no terceiro trimestre gestacional..... 70

Tabela 8 – Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), erros padrões (E.P.), mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os valores da razão quinurenina/triptofano, no tecido placentário bovino provenientes de gestações normais e de clones no terceiro trimestre gestacional 71

Tabela 9 – Médias de quadrados mínimos para as variáveis triptofano (µM /L), quinurenina (µM /L) e razão quinurenina/triptofano (Razão Q/T) no tecido placentário bovino provenientes de gestações normais e de clones no terceiro trimestre gestacional 72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Representação das estimativas médias e erros padrão para os valores de triptofano (µM /L), no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional 69

Gráfico 2 – Representação das estimativas médias e erros padrão para os valores de quinurenina (µM /L), no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional 69

Gráfico 3 – Representação das estimativas médias e erros padrão para razão quinurenina/triptofano (Razão Q/T), no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional 69

Gráfico 4 – Representação das estimativas médias e erros padrão para os valores triptofano (µM /L), no tecido placentário bovino de gestações normais e de clones, no terceiro trimestre gestacional 73

Gráfico 5 – Representação das estimativas médias e erros padrão para os valores quinurenina (µM /L), no tecido placentário bovino de gestações normais e de clones, no terceiro trimestre gestacional 73

Gráfico 6 – Representação das estimativas médias e erros padrão para razão quinurenina/triptofano (Razão Q/T), no tecido placentário bovino de gestações normais e de clones, no terceiro trimestre gestacional 73

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT - Alanina amino transferase

APO-2 - Proteína anti-apoptótica-2

APO-4 - Proteína anti-apoptótica-4

B7 - Molécula co-estimuladora

bcl-2 - Gene anti-apoptótico

C3 - Molécula do sistema complemento

C3d - Molécula do sistema complemento

C4 - Molécula do sistema complemento

C5 - Molécula do sistema complemento

C8 - Molécula do sistema complemento

C9 - Molécula do sistema complemento

CBA - Linhagem de camundongo consangüíneo

CD3 - Proteína de membrana de células T e timócitos

CD8 - Proteína de membrana de células T citotóxicas

CD14 - Proteína de membrana de monócitos

CD25 - Proteína de membrana de células T, B e monócitos ativados.

CD44 - Proteína de membrana de células leucócitos media a adesão de leucócitos.

CD45 - Proteína de membrana de células de células hematopoéticas

CD46 - Proteína co-fator de membrana

CD55 - "Decay accelerating factor" ou DAF

CD 56 ^{bright} - Proteína de membrana de células de células *Natural Killer*

CD59 - Complexo inibidor da formação de MAC

CD86 - Ligante de CD28 e CTLA-4

CD 95 - Fas-L – receptor indutor da apoptose

COX-2 - Ciclo-oxigenase – 2

Crry - Receptor do complemento realcionado ao gene Y

CSF-1 - fator de crescimento de macrófagos-1

CTLA-4 - Antígeno citolítico associado ao linfócito-4

DAF - Decay accelerating factor ou CD55

DcR1 - Receptor de TRAIL – função pró-apoptótica

DcR2 - Receptor de TRAIL – função pró-apoptótica

DR4 - Receptor de TRAIL – função anti-apoptótica

DR5 - Receptor de TRAIL – função anti-apoptótica

Fas - Ácido graxo sintase (fatty acid sintase)

Fas-L - Ácido graxo sintase ligante(fatty acid sintase ligand)

GK - Camundongo transgênico para antígenos histocompatibilidade

GM-CSF - Fator estimulador de colônia de macrófagos

HLA-G - Antígeno leucocitário humano

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance

IAP - Proteínas inibidoras da apoptose

iC3b - Fragmento de C3

IL-1 - Interleucina-1

IL-2 - Interleucina-2

IL-4 - Interleucina-4

IL-6 - Interleucina-6

IL-10 - Interleucina-10

IL-12 - Interleucina-12

IL-18 - Interleucina-18

IL-27 - Interleucina-27

INF-γ - Interferon gama

INF-τ -	Interferon-tau
KC -	Fator de crescimento derivado de plaquetas - quimiocina
LIF -	Fator inibidor de leucemia
LPS -	Lipopolissacarídeo
MAC -	Complexo de ataque de membrana (sistema complemento)
MHC -	Complexo de histocompatibilidade principal
MIP-1 -	proteína quimiotática de monócitos-1
MIC-1 -	citocina inibidora de macrófagos-1
mRNA -	Ácido ribonucléico mensageiro
NK -	Células *Natural Killer*
Proteína S -	Proteína de ativação do sistema complemento
RT-PC -	Transcrição reversa combinada ‘a reação em cadeia da polimerase
sHLA-G -	Antígeno leucocitário humano-G solúvel
Tγδ -	Células T gama delta
TGF-β -	Fator de crescimento tumoral-β
Th1 -	Resposta inflamatória celular
Th2 -	Resposta inflamatória humoral
TNF -	Fator de necrose tumoral
TNF-α -	Fator de necrose tumoral-α
TRAIL -	TNF-related apoptosis-inducing ligand
uNK -	Célula *Natural Killer* uterina

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 26

2 **OBJETIVO** 29

3 **REVISÃO DA LITERATURA** 31

3.1 BOVINOCULTURA NO BRASIL 31

3.2 PLACENTA E PLACENTAÇÃO EM BOVINOS 32

3.3 ASPECTOS PERTINENTES A IMUNOLOGIA DA REPRODUÇÃO E À TOLERÂNCIA MATERNO-FETAL 34

3.4 INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE 47

3.5 IDO E TOLERÂNCIA MATERNO-FETAL 51

4 **MATERIAL E MÉTODO** 59

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS 59

4.2 PREPARAÇÃO DO HOMOGENATO DO TECIDO PLACENTÁRIO 60

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRIPTOFANO E SEUS METABÓLITOS 60

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 61

5 **RESULTADOS** 64

5.1 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS ESTIMATIVAS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS ANALISADAS. 64

5.2 ESTIMATIVAS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS TRIPTOFANO, QUINURENINA E DA RAZÃO QUINURENINA:TRIPTOFANO NO TECIDO PLACENTÁRIO BOVINO NORMAL NO PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO TRIMESTRE GESTACIONAL. 65

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS VARIÁVEIS TRIPTOFANO, QUINURENINA E RAZÃO QUINURENINA/TRIPTOFANO NO TECIDO PLACENTÁRIO BOVINO NO PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO TRIMESTRE GESTACIONAL. 67

5.4 ESTIMATIVAS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS TRIPTOFANO, QUINURENINA E DA RAZÃO QUINURENINA:TRIPTOFANO NO TECIDO PLACENTÁRIO BOVINO PROVENIENTES DE GESTAÇÕES NORMAIS E DE CLONES NO TERCEIRO TRIMESTRE GESTACIONAL. 70

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS VARIÁVEIS TRIPTOFANO, QUINURENINA E RAZÃO QUINURENINA/TRIPTOFANO NO TECIDO PLACENTÁRIO BOVINO DE GESTAÇÕES NORMAIS E DE CLONES, NO TERCEIRO TRIMESTRE GESTACIONAL. 71

6 **DISCUSSÃO** 75

7 **CONCLUSÕES** 81

REFERENCIAS 83

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A placenta tem sido eleita como um modelo fisiológico de tolerância, visto que o sistema imune materno tem sua ativação modulada frente aos aloantígenos fetais durante o período da gestação e imediatamente após o parto recupera sua capacidade de responder prontamente a esses antígenos.

Meddawar et al. (1953) propuseram hipóteses sobre os mecanismos envolvidos no estabelecimento da tolerância materno-fetal tais como: o concepto não seria imunogênico; haveria uma diminuição da resposta imune durante a gestação; o útero seria um sítio imuno-privilegiado e a placenta constituiria uma barreira entre o sistema imune materno e o enxerto fetal. Dentre estas hipóteses, as três primeiras foram contestadas e o fato da placenta ser a barreira imunológica entre a mãe e o feto é a única hipótese aceita entre os imunologistas.

Várias evidências têm sido encontradas para explicar a tolerância materno-fetal, como a expressão de moléculas solúveis de MHC classe Ib pelo feto que inibiria a atividade das células da imunidade inata; a produção de fatores inibitórios tal como o fator inibitório da leucemia (LIF) pela decídua e por sub-populações de células com perfil Th2 que induziriam o crescimento e a diferenciação das células trofoblásticas, a presença de macrófagos e células dendríticas supressoras, bem como a expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) por células placentárias e do sistema imune local que atuariam no estabelecimento e manutenção do balanço da resposta Th1/Th2 no micro-ambiente placentário

A IDO é uma enzima responsável pela via tripofano:quinurenina nos tecidos extra-hepáticos, sendo primeiramente relacionada à tolerância materno-fetal por Mellor e Munn (1998). Sugere-se que a atividade da IDO reduziria a concentração de

triptofano e desta forma as células do sistema imune ativadas não conseguiriam proliferar devido à este estado de carência no micro-ambiente placentário.

Atualmente, com a vasta utilização de biotécnicas da reprodução no manejo animal, muitos dos fatores que induzem ao estabelecimento pleno do reconhecimento materno são eliminados. A utilização de biotécnicas mais simples desde a sincronização de cio e/ou inseminação artificial até os processos mais sofisticados como a clonagem, pode ser sua eficiência comprometida por omissão desses fatores. Portanto o esclarecimento das vias de interação entre mãe e feto como ferramentas para otimização das técnicas já estabelecida e conseqüente melhoria da eficiência reprodutiva na criação animal se faz necessário. Desta forma, averiguação da atividade da IDO na placenta bovina poderia acrescentar valiosas informações nesse contexto.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

Este estudo tem por objetivo investigar a atividade da indoleamina 2,3-dioxigenase na placenta de vacas prenhes normais nos três trimestres gestacionais e nas placentas de vacas prenhes de fetos clonados a termo, pela mensuração da concentração de triptofano e de seus metabólitos (N-formil-quinurenina e Quinurenina) em homogenatos placentários.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura consultada neste trabalho segue abaixo.

3.1 BOVINOCULTURA NO BRASIL

O Brasil, devido a sua grande extensão territorial e ao clima tropical, tem um grande potencial agropecuário. Contudo, durante muito tempo não aproveitou essa capacidade e manteve uma produção aquém de suas reais possibilidades. Nos últimos anos, graças a uma combinação de fatores envolvendo desde a implantação de tecnologia na bovinocultura até a quebra da produção de carne de países como Canadá e Inglaterra pela encefalopatia espongiforme bovina, alcançou o posto de maior exportador de carne bovina.

O Brasil é um dos poucos países capazes de produzir o “Boi Verde”, ou seja, a produção de carne somente com o uso das pastagens sem a adição de complementos alimentares a exemplo dos probióticos. Esse tipo de carne tem grande aceitação na economia mundial devido aos seus aspectos éticos e sanitários de produção para o consumidor.

A análise dos dados de produção no período de 1992 a 2002 demonstra um aumento de 16% do rebanho brasileiro de bovinos de 155 milhões para 185 milhões de cabeças. As regiões de maior expressão na produção de bovino de corte são a Centro-Oeste onde se destacam os estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul,

a região Sudeste com destaque para o estado de Minas Gerais com mais da metade do rebanho da região e a região Norte em terceiro lugar, porém com um crescimento acelerado de 17 milhões de cabeças em um período de 12 anos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2005).

O abate de bovinos no terceiro trimestre do ano de 2004 foi 7,75% maior sobre o segundo trimestre e 30,85% maior sobre o mesmo período do ano anterior. No período referido foram abatidos 6,924 milhões de animais da espécie bovina. Analisando essa categoria comparativamente ao terceiro trimestre de 2003 observam-se aumentos de 20,78% de bois; 46,15% para vacas e 35,51% para novilhos. A única categoria a registrar queda foi a de vitelos (-15,44%) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2005).

Ainda relativamente ao mesmo período de 2003, todas as categorias apresentaram aumentos no peso total das carcaças (bois 21,54%; vacas 46,19%; novilhos 35,37%) com exceção de vitelos que teve queda de 6,57% (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2005).

Os Estados que mais abatem bovinos são pela ordem: São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás. Na região Norte, destaque para o estado do Pará (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2005).

3.2 PLACENTA E PLACENTAÇÃO EM BOVINOS

A vaca apresenta um ciclo estral de 21 dias e o período gestacional varia entre 270 a 285 dias de acordo com as raças envolvidas no cruzamento.

Após a fertilização, o embrião bovino atinge o estágio de mórula em aproximadamente 96 horas quando adentra a cavidade endometrial. No dia 8-9 pós-fecundação, o embrião perde a zona pelúcida e começa a se expandir atingindo o estágio de blastocisto, no dia 14 começa a se alongar tornando-se tubular e emite finas projeções de origem trofoblástica em direção ao endométrio. O embrião se alinha com a mucosa uterina e a implantação ocorre no dia 19-20 pós-fecundação, por justaposição do embrioblasto e o trofoblasto na parede uterina (KING et al.,1982). Em seguida, os tecidos de origem trofoblástica espalham-se a partir do ponto de implantação do embrioblasto, inclusive para as regiões intercarunculares. Inicia-se o processo de formação dos placentônios os quais são resultantes da junção dos cotilédones (cório frondoso, que penetra nas criptas formadas pelo endométrio) com as carúnculas, separadas por regiões intercotiledonárias, onde o córion apresenta-se como uma fina estrutura membranosa (BJÖRKMAN, 1954). Essas estruturas apresentam formas, tamanho e composição histológica diferentes como, por exemplo, de acordo com sua localização (dorso fetal, corno uterino gravídico ou não), ou a idade gestacional.

A placenta bovina é classificada como multicotiledonária, zonária; indecídua epitéliocorial inicialmente e tornando-se sinepiteliocorial funcionalmente com o avanço da prenhez, devido à fusão de células binucleadas fetais com o epitélio uterino formando áreas de aspecto simplásmico (LEISER; KAUFMANN, 1994). A migração das células gigantes binucleadas inicia-se entre os dias 18 a 20 da gestação e continua durante todo o período gestacional, sua exata função ainda é motivo de estudos, especula-se que a fusão das células fetais no epitélio materno seja necessária para o transporte de substâncias de difícil difusão (WOODING; WATHES, 1980).

O fluxo sangüíneo materno-fetal da placenta bovina é inicialmente multiviloso e tende a tornar-se contra-corrente, o que o diferencia da placenta humana em que as células trofoblásticas ficam diretamente em contato com o sangue materno (LEISER; KAUFMANN, 1994).

Todo esse complexo dos anexos embrionários chamado **placenta** é essencial para a manutenção da prenhez e da homeostase entre mãe e feto, principalmente nos aspectos nutricionais, metabólicos e imunológicos.

Alguns trabalhos provaram que a placentação de embriões clonados parece ser ineficiente. Muitas alterações são encontradas, tais como estruturas cotiledonárias reduzidas ou ausentes (DINNYÉS et al., 2002), hidropsia das membranas fetais (HEYMAN et al., 2002) principalmente no terceiro trimestre gestacional e um número reduzido de placentônios (VERECHIA et al., 2003).

3.3 ASPECTOS PERTINENTES A IMUNOLOGIA DA REPRODUÇÃO E À TOLERÂNCIA MATERNO-FETAL

A imunologia da reprodução é um novo ramo da ciência que apresentou crescimento acelerado a partir do desenvolvimento e das biotécnicas aplicadas à reprodução. No homem, o histórico de casais inférteis clinicamente saudáveis, abortamentos recorrentes e as taxas de sucesso na aplicação das técnicas de reprodução assistida mostraram uma lacuna entre os conhecimentos de imunologia e reprodução que une as duas ciências. Muitas das estratégias empregadas no processo de concepção e estabelecimento da prenhez foram drasticamente

reduzidas pela reprodução assistida. Essas tecnologias foram também aplicadas à produção animal e um exemplo clássico é a transferência de embrião bovino a fresco em uma central de reprodução que apresenta baixa taxa de prenhez a termo (em média de 40%), considerando que o principal pré-requisito é a utilização de vacas receptoras com um excelente quadro clínico e sanitário geral.

É relevante ressaltar que o feto no útero materno é um enxerto semi-alogeneico, visto que o embrião carreia genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) materno e paterno. Nos processos de clonagem e na transferência de embriões (a fresco ou provenientes de fecundação *in vitro*) o embrião passa a ser totalmente alogeneico, normalmente sem alguma compatibilidade com a mãe, provavelmente a resposta do sistema imune materno frente ao concepto estará alterada.

O útero, quando exposto às infecções no momento do coito e do parto, é capaz de estabelecer uma resposta imune clássica. O sistema imune uterino tem a capacidade de responder contra enxertos (HANSEN et al., 1986) e recrutar fagócitos (ASBURY et al., 1987) quando há necessidade.

Meddawar[1] (1953) *apud* Weetman (1999) sugeriu alguns mecanismos imunológicos que contribuiriam no sucesso da prenhez: o feto não seria capaz de iniciar a resposta imune; o sistema imune materno seria suprimido; o útero seria um sítio imuno-privilegiado e a placenta seria a barreira entre os sistemas imune materno e fetal. Esta foi uma das primeiras publicações ligando a imunologia com a reprodução.

Durante todo o ciclo estral, o útero é preparado para a concepção. Uma série de alterações no perfil de células do sistema imune no endométrio, no micro-ambiente uterino entre outros viabilizam a concepção (HAFEZ et al., 2004).

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.

Durante o coito, uma carga de sêmen é desprezada na porção anterior da vagina da vaca que é direcionada para o interior do útero. Muitos estudos foram conduzidos sobre os fatores existentes no plasma seminal sugerindo que estes representam o primeiro estímulo para a indução do estado de tolerância uterina durante a concepção e no início da gestação (HAFEZ et al., 2004).

O espermatozóide apresenta uma supressão na expressão das proteínas de MHC de classe I. Na ausência do plasma seminal, espermatozóides são capazes do ativar resposta inflamatória contra antígenos paternos (BEER; BILLINGHAM., 1974). Em camundongos, a exposição ao sêmen induz uma resposta inflamatória na mucosa da cérvix e o fator de crescimento tumoral-β (TGF-β) presente no plasma seminal inicia uma série de eventos pró-inflamatórios como recrutamento de populações de células do sistema imune (macrófagos, células dendríticas entre outras), e também estimula a expressão de quimiocinas e de citocinas, aparentemente em resposta aos antígenos paternos (ROBERTSON et al., 2002).

A inseminação pode ativar uma seqüência de eventos resultando na indução de tolerância aos antígenos paternos, semelhante a outros mecanismos encontrados em outras mucosas por meio de ativação de populações reguladoras ou indução de uma resposta imune do tipo Th2 (JOHANSSON et al., 2004). Sugere-se que a exposição ao sêmen provoca um estado de hipo-responsividade de linfócitos T aos antígenos paternos em reposta ao processo inflamatório contra proteínas de MHC de classe I solúveis presentes no plasma seminal (ROBERTSON et al., 2002), e estas células com perfil regulador gerariam um micro-ambiente favorável a implantação e ao crescimento placentário (ROBERTSON et al., 2002).

O`Leary et al. (2004), verificaram que tratamento com plasma seminal induziu a formação de um infiltrado inflamatório no período pré-ovulatório e induziu a

expressão de fator estimulador de formação de colônia de macrófagos (GM-CSF), interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos-1 (MIP-1) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2), que resultou no aumento da taxa de implantação e na melhora do desenvolvimento e da viabilidade embrionária após o tratamento. Com o desenvolvimento da inseminação artificial na medicina humana como na medicina veterinária eliminou -se esta etapa que iniciaria a modulação do sistema imune materno.

Após a implantação, o embrião continua a se desenvolver junto à mucosa uterina (BJÖRKMAN, 1954) e conseqüentemente a exposição de seus antígenos ao sistema imune materno aumenta. Em razão disso, o trofoblasto desenvolve estratégias para “driblar” a resposta contra o enxerto fetal.

Evidências encontradas indicam que as células trofoblásticas são capazes de sintetizar fatores que parecem auxiliar na regulação do sistema imune materno, além de expressar proteínas em sua membrana que as mantêm responsivas às alterações do micro-ambiente placentário.

A expressão de proteínas anti-apoptóticas pelo trofoblasto é uma forma de controle do sistema imune materno. Já foi descrita a presença de Fas-ligante ou CD 95-L no epitélio glandular, na decídua e no trofoblasto (HUNT et al., 1997). Células trofoblásticas em cultura foram capazes de induzir a apoptose de linfócitos ($CD3^+$) em cultura via CD95-L (COUMANS et al.,1999).

Recentemente descrito na decídua, no sincício trofoblasto e no citotrofoblasto em humanos, um gene da superfamília fator de necrose tumoral (TNF), APO-2 ou TRAIL parece cooperar na regulação da apoptose placentária juntamente com CD95. Essa molécula pode favorecer ou inibir a apoptose de acordo com o receptor de ligação. Foram descritos 4 receptores para TRAIL (DR4, DR5, DcR1 e DcR2),

sendo os dois primeiros com ação pró-apoptótica e os dois últimos com ação anti-apoptótica. Ensaios de cultura, com uma linhagem macrofágica, demonstraram que há regulação da atividade pró e anti-apoptótica de TRAIL com alteração do micro-ambiente de cultivo por adição de interferon gama (INF-γ), apresentando um aumento do mensageiro de DR4 e uma pequena diminuição de DcR2 (PHILLIPS et al., 1999). Sugere-se que a população de macrófagos residentes na placenta conseguiria modular a proliferação trofoblástica e ou eliminar células neoplásicas via DR5.

A expressão de survivina ou APO-4 da superfamília das proteínas inibidoras da apoptose (IAP) na placenta de humanos no início da gestação, a termo, na mola hidatidosa e no coriocarcinoma (SHIOZAKI et al., 2003) atuaria conjuntamente com a expressão de bcl-2 (ação anti-apoptótica) na manutenção da homeostase das células trofoblásticas durante a gestação (UCKAN et al., 1997).

Portanto, o balanço entre proliferação e a morte celular a é crucial para a manutenção da homeostase nos tecidos normais, e pode ser muito importante para o desenvolvimento placentário. Distúrbios na morte programada das células placentárias parecem estar associados a problemas durante a gestação (HALPERIN et al., 2000; JERZAK, 2002).

O sistema complemento parece também estar ativamente regulado durante a prenhez. Proteínas inibidoras da fixação do complemento foram descritas na interface materno-fetal, principalmente nas espécies humana e murina.

Wells et al. (1987), por meio de estudos eletroimunomicroscópicos da distribuição das proteínas do sistema complemento nas artérias espirais uterinas em gestações humanas normais de 4 a 40 semanas, demonstraram que há deposição dos componentes desse sistema sugerindo a fixação através da via clássica, essa

reatividade se estendeu para a camada trofoblástica próxima aos vasos e os componentes C3d e C9 apresentaram reatividade mais intensa. Outros estudos focados na distribuição das proteínas envolvidas na ativação do sistema complemento como a proteína S, C3 e C9 em placentas normais e com pré-eclâmpsia concluíram que a diferença entre os grupos foi essencialmente quantitativa (TEDESCO et al., 1990) comprovando a ativação do sistema complemento tanto na doença quanto na normalidade.

A expressão de proteínas de membrana com função específica de regulação da ativação do sistema complemento pelos trofoblastos, como “decay accelerating factor“ (D55 ou DAF) (XU et al., 2000) e a proteína cofatora de membrana (CD 46 ou MCP) que clivam reversívelmente a C3 convertase responsável pela conversão de C3 em C3b, evitando o início da cascata do complemento (HOLERS et al., 1992, KIM et al., 1995).

A expressão de CD59 (fator inibidor do complexo de ataque de membrana-MAC) regula a ativação do complemento por meio da interação específica com C8 e C9, nas células que o expressam. CD55, CD46 e CD59 são expressas a partir da sexta semana de gestação. A expressão anormal dessas proteínas resultaria em alterações no quadro de tolerância imunológica durante a gestação, e conseqüentemente em desordens gestacionais (HOLMES; SIMPSON, 1992).

Nishikori et al., (1993) conduziram estudos em placentas de 18 mulheres gestantes submetidas ao abortamento artificial da quinta à décima semana de gestação. Constataram a expressão de CD46 até a oitava semana de gestação no citotrofoblasto; CD59 apresentou uma expressão variada no citotrofoblasto viloso até a sétima ou oitava semana, porém com grande variação individual, um mesmo indivíduo demonstrou células do citotrofoblasto marcado e células não marcadas

provavelmente relacionado ao grau de maturação de cada célula e CD59 foi observado na superfície do sincíciotrofoblasto na porção materna e nas células trofoblásticas extravilosas, sua expressão não demonstrou alterar com o avanço da gestação.

Em um experimento com cruzamentos de linhagens *Crry-/-* com linhagens deficientes em fator B, C4, e C5 concluiu-se que o papel do C3 e seus fragmentos ativados são essenciais para a rejeição fetal por meio da ativação do sistema complemento. C3a é uma potente molécula inflamatória que aumenta a permeabilidade vascular e promove o recrutamento de células inflamatórias, ativa e induz expressão de moléculas de adesão. C3b e iC3b aumentam a fagocitose por meio da interação do receptor de complemento 1 e 3 na superfície de células inflamatórias (MAO et al., 2003). Contudo, Holers et al., (2002) demonstraram uma leve coloração de C3 nos tecidos extra embrionários aos 9,5 e 10,5 dia pós coito em camundongos, sugerindo a ativação do sistema complemento mesmo em gestações normais. Esse achado indica que a alteração na ativação desse sistema pode estar relacionada com o desequilíbrio da expressão de moléculas de ativação e regulação do sistema complemento.

A expressão trofoblástica de proteínas do complexo MHC, cuja função principal é discriminar “o próprio do não próprio”, é alvo de estudo em várias espécies.

As células trofoblásticas apresentam fraca expressão de MHC de classe I (HUDDLESTON; SCHUST, 2004). O feto, visto como um enxerto semi-alogeneico, seria prontamente rejeitado por via direta ou indireta de ativação da resposta imune adaptativa (JANEWAY et al., 2001), como ocorre no contexto do transplante. O fato do feto não expressar MHC de classe I mimetiza um quadro infeccioso, no qual

células hospedeiras têm sua expressão inibida, e caso não existissem outras vias de regulação, as células ***Natural Killer*** uterinas (uNK) se ativariam contra o trofoblasto (MOFFET-KING, 2002). Para tanto as células fetais têm a capacidade de secretar uma isoforma de MHC, o MHC não clássico Ib também chamado de antígeno leucocitário humano – G (HLA-G) que teria importante função na regulação da atividade das uNK (HUDDLESTON; SCHUST, 2004).

O HLA-G é expresso em duas isoformas: uma como proteína de membrana e outra solúvel (sHLA-G) na interface materno-fetal. Está presente principalmente na membrana coriônica e nos citotrofoblastos extra vilosos derivados do cório (KOVATS et al., 1990) e trofoblastos extra vilosos parecem produzir grande quantidade da proteína HLA-G (HUNT et al., 2000a).

A principal hipótese levantada sobre a função do HLA-G na tolerância materno-fetal é de que expressado nas células trofoblásticas em migração poderia estimular ou inibir a função de qualquer célula do sistema imune, como macrófagos e células NK que fossem encontradas na sua trajetória através do interstício. A interação da molécula de HLA-G com receptores inibidores da atividade das NK é uma via proposta de regulação da resposta imune (HUNT et al., 2000a).

A isoforma solúvel do HLA-G é capaz de interagir com as mesmas populações de leucócitos não só de forma local, mas também sistêmica. Entretanto estudos detectaram níveis três vezes mais elevados de sHLA-G em amostras de soro de mulheres grávidas em comparação às não-grávidas sem que houvesse alteração da resposta imune frente a antígenos HLA (HUNT et al., 2000b), reforçando a hipótese que HLA-G seria capaz de interagir com leucócitos e modular suas funções, caracterizando seu envolvimento com a ativação do sistema imune local.

Em bovinos, estudos imunoistoquímicos realizados em placentas de segundo e terceiro trimestre gestacional demonstraram a expressão de moléculas de MHC de classe I nos trofoblastos das regiões interplacentomais em ambas fases gestacionais (LOW et al., 1990). Davies et al. (2000) demonstraram que durante a segunda metade da gestação as regiões intercotiledonárias e a arcada trofoblástica expressam MHC de classe I, contudo nas criptas e nos vilos, trofoblastos e epitélio endometrial não expressam as moléculas de MHC. Ao comparar placentas de 5 a 8 semanas de gestação provenientes de fetos clonados, Hill et al. (2002) verificaram uma expressão alterada do MHC de classe I pelos trofoblastos variando de 17 a 56% de células positivas. Corroborando com os dados de Joosten et al. (1991), sugeriram que a alta compatibilidade do MHC de classe I materno e fetal aumentaria o risco de retenção das membranas fetais e que a expressão inadequada das moléculas desses complexos por trofoblastos dos vilos ou pelas células do epitélio materno poderia desencadear um processo de rejeição da placenta e conseqüentemente abortamento do feto.

Quanto a celularidade do sistema imune no útero durante a prenhez, estudos demonstraram que em ovelhas, os linfócitos estão limitados principalmente ao lúmen epitelial e glândulas endometriais bem como no estroma adjacente (GOGOLIN-EWENS, et al., 1989; GOTTSHALI et al., 1992; LEE, et al., 1988). Existem 3 tipos predominantes de células T (LEE et al., 1992). Cerca da metade das células do sistema imune em ovelhas vazias possuem o fenótipo $CD8^+$, $CD45R^-$. As populações remanescentes são $CD8^+$, $CD45R^+$ e $T\gamma\delta^-$, e CD8+, $CD45R^+$ e células $T\gamma\delta^+$. Estão presentes na população de células epiteliais e do estroma, células MHC classe II, presumidamente da linhagem macrofágica (GOGOLIN-EWENS et al., 1989; GOTTSHALI et al., 1992).

Os linfócitos são mais abundantes na região do epitélio glandular do que no placentônio, mas sua concentração diminui com o avanço da prenhez. Em paralelo, há um aumento do número de linfócitos no epitélio uterino após o dia 50 da gestação devido ao aumento de células Tγδ (LEE et al., 1992; MEEUSEN et al., 1993). Estas células apresentam sinais de ativação como aumento da sua granulosidade (LEE et al., 1992; MEEUSEN et al., 1993) e da expressão de marcadores como CD25 e CD44 (LIU et al., 1997) na segunda metade da gestação. Em ovelhas prenhes unilateralmente o aumento em número de células Tγδ ocorreu em ambos os cornos, demonstrando os efeitos sistêmicos da prenhez. Elas parecem ter uma função similar à das células Tγδ intraepiteliais supressoras, já descritas no útero de mulheres e camundongas prenhes (SUZUKI et al., 1995).

No início da gestação humana há um aumento de células CD8+ CD11+ e células NK CD16+ CD54-, essas alterações parecem ter regulação hormonal (WEETMAN, 1999).

As células NK uterinas estão envolvidas no processo de decidualização na placenta hemocorial. Compõem uma sub-população recrutada dos órgãos linfóides secundários que apresentam marcadores específicos como $CD56^{bright}$ e lectina. A ativação destas coincide com a chegada ao útero, onde se proliferam e produzem citocinas como IL-18 , IL-27 e IFN-γ. Os eventos ocorridos no processo de ativação das células uNK por ação do IFN-γ ainda não estão esclarecidos, porém o IFN-γ produzido pelas uNK contribui para as modificações vasculares necessárias para a decidualizaçao (CROY et al., 2002). Com o avançar da gestação sua concentração diminui, indicando que as células uNK e IFN-γ induzem importantes alterações na placenta materna na primeira metade do período gestacional (CROY et al., 2003).

Após o isolamento e cultivo de células $CD14^{+}$, Heikkinen et al. (2003) demonstraram que os macrófagos da decídua humana produzem IL-10 em altas concentrações e apresentam menor concentração de moléculas co-estimuladoras como CD86 quando comparados aos isolados do sangue periférico. Os macrófagos da decídua sob a influência de IL-4 +GM-CSF *in vitro* não se diferenciam em células dendríticas e expressam ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) para indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), sugerindo um papel supressivo dessas células durante a prenhez.

Em bovinos, os macrófagos (CD14+) estão localizados no parênquima das carúnculas, sua concentração aumenta com o avanço da gestação, apresentando reatividade à fosfatase ácida entre o quinto e o sexto mês da gestação permanecendo reativo até o parto (MIYOSHI et al., 2004). Em casos de retenção de membranas fetais há a diminuição dessa atividade, que poderia indicar uma redução da atividade fagocítica (MIYOSHI et al., 2002).

Piccinni et al. (2002) após compilarem dados existentes sobre o envolvimento de citocinas e células T no processo de fertilização concluiu que o painel de citocinas liberadas em cada fase do ciclo reprodutivo humano promove um micro-ambiente adequado para o desenvolvimento embrionário pré-implantação e para a manutenção da gestação. Sugerem ainda que as células T, células decíduas e células do cumulus interagem entre si formando uma complexa rede de citocinas, hormônios e células em prol do sucesso da gestação. Essa rede promove um perfil regulador passando de uma reposta imune celular Th1 (pró-inflamatória) para uma resposta imune humoral Th2 (antiinflamatória).

Citocinas são substâncias reguladoras que desempenham papel pleiotrópico em vários sistemas orgânicos (peptídeos ou glicoproteínas), produzidas por qualquer tipo de células nucleadas presentes no organismo (SAITO, 2000).

Na tolerância materno-fetal, o perfil de citocinas é de extrema importância para a manutenção do equilíbrio Th1/Th2 no micro-ambiente uterino, como por exemplo, a IL-10, uma citocina do perfil Th2, que induz a expressão de HLA-G por trofoblastos e monócitos *in vitro* (MOREAU et al., 1999). O desequilíbrio do balanço Th1/Th2 no micro-ambiente placentário está relacionado à abortamentos recorrentes em humanos (DUC-GOIRAN et al., 1999).

Interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α) estão presentes no micro-ambiente uterino no momento da implantação (DE et al., 1993). Cross et al. (1994) demonstraram que alterações na concentração de IL-1 interferem neste processo.

Outra família de citocinas pró-inflamatória, a dos interferons, possui papel importante no processo de manutenção da gestação. Nas espécies com placentação não invasiva a expressão de interferon tem sido demonstrada no período de implantação. Em ruminantes, devido à fusão de células fetais às maternas, Interferon-tau (INF-τ) é expressado durante a fase de expansão e alongamento do blastocisto que diminui com à adesão do blastocisto ao endométrio. O INF-τ tem como função primária inibir a luteólise, mas apresenta também papéis imunorreguladores como inibição da proliferação de linfócitos e modulação da atvidade das uNK (TEKIN et al., 2000).

Waldvolgel et al. (2000), ao estudarem a expressão de mRNA de IFN-γ e IL-4 em grupos de vacas prenhes e não prenhes soro positivas para o vírus da diarréia bovina, não encontraram diferenças na expressão das citocinas alvo, e sugeriram

que mais estudos são necessários para caracterizar o balaço Th1/Th2 durante a gestação bovina.

CSF-1 (fator de crescimento de macrófagos-1) é sintetizado em altas concentrações na unidade útero-placentária de várias espécies, regula via receptor a síntese de fatores quimiotáticos de neutrófilos como KC (BOZIC et al., 1995) e MIP-2 (DRISCOLL et al., 1995) pelos trofoblastos. Sua produção é regulada por esteróides ovarianos e IL-2 (JOKHI et al., 1995). O trofoblasto, desta forma, atua no sistema imune inato durante a prenhez regulando a resposta à infecções enquanto previne a rejeição do aloenxerto fetal (GULERIA; POLLARD, 2000).

Outra citocina, MIC-1 (citocina inibidora de macrófagos-1) presente nos tecidos fetais, tem sua expressão aumentada com o avanço da gestação no tecido fetal e na circulação sistêmica. Sugere–se que MIC-1 induz a redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias que facilitariam o processo de implantação do embrião (MARJONO et al., 2003).

O tecido endometrial sintetiza e secreta fator inibidor de leucemia (LIF) e o embrião expressa receptores para LIF (LIF-R), que parece ser essencial para a implantação. Durante a gestação em humanos, LIF é produzido pelas células da decídua e por linfócitos Th2, e o sincíciotrofoblasto expressa LIF-R. Sua exata função é pouco conhecida, mas sugere-se que LIF auxilie a proliferação e diferenciação dos trofoblastos e desempenhe algum papel na manutenção do equilíbrio Th1/Th2.

Citocinas de perfil Th1,como IL-12, IFN-α e IFN-γ reduzem a expressão de LIF e aumenta a expressão de IL-4. As células da decídua também produzem IL-4 e IL-10, concomitantemente com LIF (PICCINNI et al., 1998).

3.4 INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASE

A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma hemeoxigenase, monomérica com peso molecular entre 40 a 43 kDa que possui grande quantidade de aminoácidos. A IDO tem função oxidativa, utiliza superóxido (O_2^-) ao invés de oxigênio (O_2) ou H_2O_2 como as outras oxigenases ou peroxidases o que a diferencia da triptofano 2,3-dioxigenase (TDO) que utiliza apenas O_2 no processo oxidativo. É responsável pela via l-triptofano-quinurenina nos tecidos extra-hepáticos dos mamíferos (Figura 1) (THOMAS et al., 1999).

A concentração local de radicais livres é diminuída pela atividade da IDO no micro-ambiente onde é expressa. A inibição de sua atividade ocorre na presença de isômeros de triptofano como 1-metil-l-triptofano e/ou com o excesso de superóxido (HIRATA; HAYAISHI, 1975).

A cinética do catabolismo de triptofano foi estudada por Kudo e Boyd (2001a) em experimentos de cultura de vilos placentários.Neste verificaram que a taxa de entrada de triptofano na célula é fator limitante da atividade da IDO e a ação de IFN-γ não interfere nesse processo. Complementando estes dados, Kudo et al. (2001b) concluíram que em meio condicionado de cultura de vilos placentários há redução da concentração de triptofano que é incrementada sob a influência de IFN-γ. A proliferação de células mononucleares do sangue periférico foi inibida neste meio condicionado e este efeito pode ser revertido com adição de triptofano às culturas.

Ao contrário da TDO que possui expressão predominantemente hepática e mais recentemente descrita no concepto de camundongos de 5.5 a 10.5 dias pós-coito (SUZUKI et al., 2001), a IDO é expressa em vários tecidos, incluindo os tecidos

cerebral, pulmonar, cardíaco, renal e intestinal, sendo neste último primariamente purificada (TAKIKAWA et al., 1986). Kai et al. (2003), por meio da transcrição reversa combinada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), demonstraram a presença de mRNA de IDO em células T, B e NK e que sua atividade está relacionada ao estabelecimento da tolerância materno-fetal (MUNN et al., 1998).

Foram descritas duas vias de inibição da atividade de IDO na presença de óxido nítrico (NO) que é uma citocina pró-inflamatória. NO possui alta afinidade com o ferro do grupo heme de IDO, e essa ligação interfere na redução de ferro férrico para ferro ferroso necessária para a atividade da enzima. Outra forma ocorre por meio da reação do NO com o superóxido formando peróxidonitrito ($ONOO^-$); essa reação leva à depleção de O_2^- e o acúmulo de ONOO (THOMAS et al., 1994; THOMAS; STOCKER, 1999). A expressão gênica de NO sintase induzida (iNOS) e da IDO são coordenadas pela ação de IFN-γ e outras citocinas pró-inflamatórias. A interação entre essas duas vias de ativação e/ou regulação da resposta imune pode promover um sutil controle da responsividade das sub-populações de células T *in vivo* em resposta ao micro-ambiente (MELLOR; MUNN, 1999).

A indução da expressão gênica da IDO foi descrita em células sob ação do IFN-γ (TAKIKAWA et al., 1986). Entretanto, o efeito antiproliferativo das células tumorais e os patógenos intracelulares resultante da ação de IFN-γ parece relacionar-se à depleção de triptofano, pela ativação da expressão da enzima em células regionais ao sítio de estimulação antigênica (MUNN et al., 1998; MUNN et al., 1999). Contudo, recentes estudos em camundongos *knockout* para IFN-γ, demonstraram a existência de uma via IFN-γ independente da indução de IDO, sob ação de lipolissacarídeos (LPS) que atuaria conjuntamente com a via IFN-γ dependente sendo TNF-α melhor indutor de IDO que IFN-γ (FUJIGAKI et al., 2001).

Portanto, o mecanismo pelo qual a IDO tem sua atividade aumentada é complexo e pouco compreendido e a via de indução de IDO estaria relacionada ao tipo antigênico desencadeante da reposta imune.

Monócitos expressando IDO foram capazes de suprimir a proliferação de células T *in vitro* pelo catabolismo rápido e seletivo de triptofano, e com sua depleção o ciclo celular estacionou na fase G1 (MUNN et al., 1999). Terness et al. (2002) sugeriram que células dendríticas (DC) IDO-positivas são capazes de suprimir a resposta de células T alogeneicas por meio da ação citotóxica tempo-dependente dos catabólitos de triptofano (quinurenina, 3-hidroxiquinurenina e ácido 3-hidroxiantranílico) principalmente em células T ativadas, mas também em células B e NK. Esses achados sugerem que a presença de um mecanismo pelo qual células apresentadoras de antígeno seriam capazes de regular a ativação de células T por meio do catabolismo de triptofano no micro-ambiente em que se encontram. Há indícios de que a capacidade citotóxica das células NK contra células neoplásicas é reduzida com a adição do inibidor de IDO (1-metil-l-triptofano) *in vitro* (KAI et al., 2003).

Frumento et al. (2001), após realizarem teste de proliferação de células T com adição de IDO purificada, verificaram que a supressão da proliferação não alterou o número de células em apoptose, apenas resultou no bloqueio do ciclo em G1 e que a N-formil-quinurenina e o ácido picolínico (catabólitos de triptofano) foram capazes de suprimir a proliferação celular *in vitro*. Dados estes sugerem que a atividade da IDO pode ter um grande potencial terapêutico no transplante alogeneico e no xenotransplante.

A expressão da IDO foi também demonstrada em enxertos alogeneicos de fígado em camundongos, especificamente localizada em macrófagos residentes e

em células de Kupfer que catabolizam o triptofano e previnem a proliferação celular (MIKI et al., 2001).

Subpopulações de células T $CD4^{+}CD25^{+}$, de perfil regulador (T_R) expressam CTLA-4 constitutivamente. O catabolismo de triptofano por células dendríticas murinas, por meio do mecanismo CTLA-4-dependente, requer a expressão de B7 e a produção de citocinas (FALLARINO et al., 2002). Em um modelo de transferência adotiva de células T, CTLA-4 bloqueou a expansão clonal, sendo esta propriedade IDO-dependente (MELLOR et al., 2003).

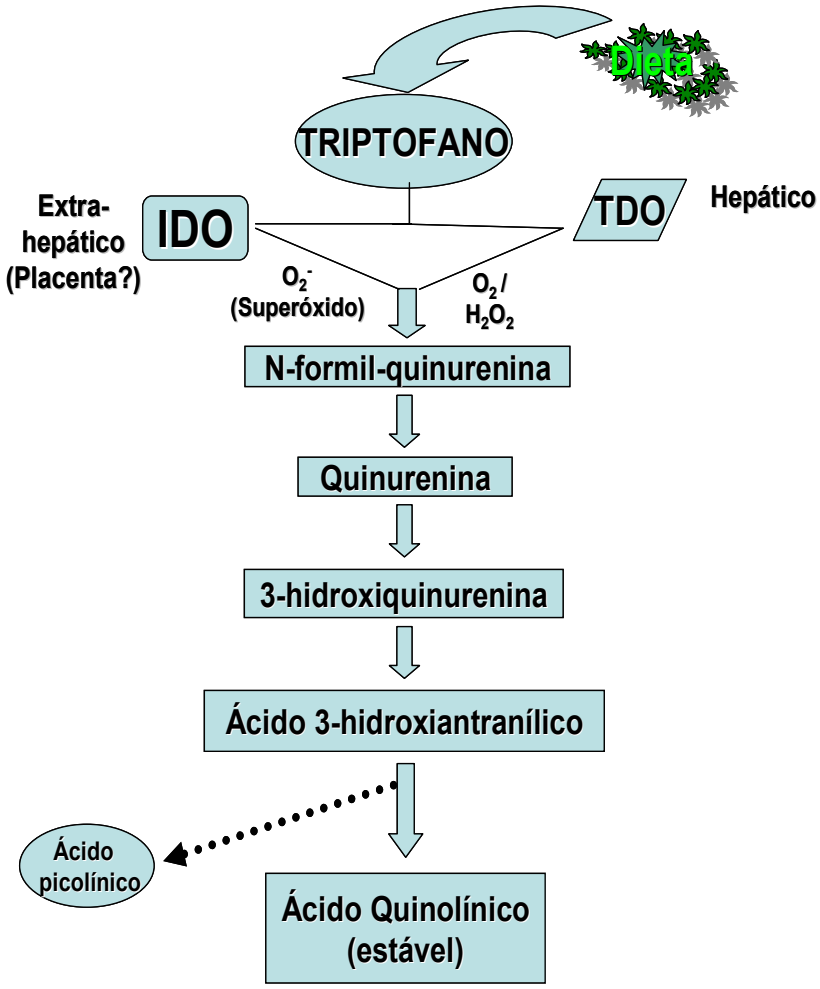

Figura 1 – Esquema representativo do catabolismo de triptofano via indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e via triptofano 2,3-dioxigenase (TDO)

3.5 IDO E TOLERÂNCIA MATERNO-FETAL

Meier e Wilson (1983) sugeriram que dietas ricas em triptofano - um aminoácido essencial - podem influenciar negativamente a gestação em mulheres.

A expressão da IDO na interface materno-fetal foi relatada pela primeira vez após Munn et al. (1998) verificarem que enxertos fetais alogeneicos foram sensíveis à exposição das fêmeas prenhes a 1-metil-l-triptofano, enquanto enxertos fetais singeneicos não foram afetados com a inibição da IDO.

Neste mesmo trabalho, Munn et al. (1998) verificaram que fêmeas geneticamente modificadas, sem linfócitos circulantes, expostas ao inibidor de IDO levaram a gestação a termo, confirmando o papel da IDO no estabelecimento da tolerância materno fetal. Observaram também o efeito dose-resposta do inibidor de IDO em cruzamentos alogeneicos, em que doses menores de IDO promoveram a diminuição do tamanho da ninhada (50%) quando comparado ao grupo controle e na administração de altas doses do inibidor todos os fetos foram rejeitados. No estudo histopatológico das placentas foi observada inflamação em torno de alguns fetos, com infiltrados inflamatórios e necrose hemorrágica nos animais tratados com baixas doses de inibidor. No grupo tratado com altas doses de inibidor foi encontrado processo inflamatório em torno de todos os conceptos. Neste mesmo estudo, constatou-se a capacidade da indoleamina 2,3-dioxigenase, presente em lisado placentário, em catabolisar *in vitro* substratos específicos (D-triptofano, 5-hidroxi-triptofano, triptamida e 5-hidroxi-triptamida), mostrando que a IDO expressada na junção materno-fetal tem franca atividade biológica.

Fêmeas CBA acasaladas com machos transgênicos GK (os quais possuem somente o antígeno de classe I diferente das fêmeas CBA) expostas ao inibidor de IDO apresentaram rejeição do enxerto fetal por ativação de células T maternas em resposta aos antígenos paternos (MELLOR et al., 1999b).

O envolvimento da atividade de IDO na regulação do sistema complemento na unidade útero placentária foi demonstrada pela deposição de C3 na interface materno-fetal em cruzamentos susceptíveis à indução da inibição da IDO, correlacionando o desenvolvimento da inflamação com a alta incompatibilidade tecidual e a baixa taxa de sucesso da gestação em camundongos. Com base nesses resultados, sugeriram que a IDO poderia suprimir as células T maternas, evitando o estabelecimento do processo inflamatório e conseqüentemente a ativação e deposição do sistema complemento nos tecidos fetais (MELLOR et al., 2001).

Quanto à localização da IDO no trato reprodutivo, Kudo e Boyd (2000), estudaram por meio de fracionamento celular a atividade da IDO, concluindo que a isoforma placentária de IDO localiza-se no citoplasma do trofoblasto e na membrana plasmática do sincíciotrofoblasto e que a degradação de triptofano é intracelular.

No concepto de camundongos a atividade da TDO foi inesperadamente encontrada do dia 5,5 ao dia 10,5 pós-coito, e a atividade da IDO foi detectada no período do dia 9,5 ao dia 12,5 pós-coito importante para o estabelecimento do quadro de tolerância inicial, sugerindo que esta tolerância estabelecida pela IDO se perpetuaria até o nascimento sem que houvesse a necessidade de privação de triptofano (SUZUKI et al., 2001).

Estudos imunoistoquímicos e moleculares demonstraram a presença da IDO no epitélio das glândulas endometriais e na superfície das células epiteliais, esta

expressão aumentou com o avanço do ciclo menstrual em mulheres, sugerindo ser esta uma ferramenta de proteção do trato reprodutivo feminino frente à infecções (SEDLMAYR et al., 2002).

Camelo Jr. et al. (2004) avaliaram as concentrações de aminoácidos no soro, no sangue interviloso da placenta de mulheres grávidas e concluíram que as concentrações séricas de triptofano são semelhantes as encontradas no sangue interviloso da placenta humana.

A atividade da IDO foi observada no muco cervical através da análise em HPLC por observação da presença de quinurenina. No primeiro trimestre gestacional, a marcação positiva para IDO apareceu nas glândulas endometriais, em algumas células do estroma muitas vezes próximas a infiltrados inflamatórios, sugerindo assim alguma função tolerogênica nestes sítios. Na placenta a termo, células marcadas para IDO apresentaram-se dispersas no mesênquima e em algumas camadas trofoblásticas. A IDO também foi encontrada em algumas células endoteliais e em alguns capilares, sugerindo que a expressão da IDO na placenta ocorre nas zonas de maior contato entre mãe e feto (SEDLMAYR et al., 2002).

Recentemente, por meio da reação de imunistoquímica, a IDO foi localizada no blastocisto (dia 6 pós fertilização), no sincíciotrofoblasto, citotrofoblasto extra-viloso, macrófagos, no estroma viloso, nas membranas fetais (KUDO et al., 2004) e nos trofoblastos extravilosos invasivos com forte marcação (HONIG et al., 2004). Os trofoblastos invasivos estão em íntimo contato com o sistema imune materno caracterizando a expressão da IDO como agente ativo no mecanismo de regulação da ativação das células deste sistema (HONIG et al., 2004).

Na pré-eclampsia, estudos imunoistoquímicos revelaram uma diminuição da expressão da IDO localizada nas células endoteliais com marcação

predominantemente nuclear, indicando que esta atividade normalmente poderia prevenir ou limitar os danos causados por acúmulo de radicais livres na placenta e possivelmente na vascularização fetal. Nenhuma marcação foi encontrada no sincíciotrofoblasto em condições normais ou na pré-eclampsia. (SANTOSO et al., 2002), demonstrando que a placenta está intimamente relacionada à expressão e atividade da IDO durante a gestação.

A degradação do triptofano produz N-formil-quinurenina e quinurenina, os quais aparecem como marcadores séricos da atividade desta enzima. Schröcksnadel et al. (1996), em um estudo longitudinal dos níveis séricos de triptofano, quinurenina e neopterina (marcador da produção de IFN-γ) em mulheres gestantes hígidas, observaram que os níveis de triptofano diminuíram e os de quinurenina não se alteraram em relação às mulheres não-gestantes, e que os níveis de neopterina apresentaram correlação inversa com os níveis de triptofano e com a razão quinurenina/triptofano, indicando a ativação da IDO na gestação em conseqüência da ativação da resposta imune. Complementando esses achados, Schröcksnadel et al. (2003) constataram que, após o parto, os níveis séricos de ALT (marcador da atividade metabólica hepática) também estavam acima do esperado, sugerindo que o catabolismo de triptofano é desviado para o fígado no intuito de suprir a ausência da atividade da IDO placentária durante o puerpério. Neste mesmo estudo foram mensurados os níveis séricos de neopterina para avaliar a atividade da resposta imune, e encontraram concentrações elevadas durante a gestação que retornaram a níveis basais durante o puerpério.

Na pré-eclampsia, situação de intenso processo inflamatório, a razão quinurenina/triptofano permaneceu semelhante à encontrada em mulheres não-

gestantes, em virtude da supressão da atividade da IDO confirmada em ensaios de atividade *in vitro* e expressão gênica da enzima (KUDO et al., 2002).

Ao comparar a expressão da IDO nas células dendríticas e nos monócitos de pacientes que desenvolveram processo de rejeição ao transplante de células tronco, voluntários hígidos e mulheres gestantes, Steckel et al. (2003), encontraram somente expressão espontânea da IDO no grupo de mulheres gestantes (52%). Após a indução por IFN-γ *in vitro*, verificaram a expressão em todas as amostras do grupo de mulheres gestantes e em 13% dos pacientes com doença hospedeiro-contra-enxerto grave, sugerindo que a expressão de IDO está envolvida no desenvolvimento da imunotolerância alogeneica.

Em medicina veterinária, o papel da IDO durante a prenhez é pouco estudado, Brown et al. (2001) sugeriram que a expressão da IDO nos tecidos reprodutivos poderia inibir o crescimento de *Chlamydophila abortus* em ovelhas.

Todos os dados apresentados sugerem o importante papel da indoleamina 2,3-dioxigenase no estabelecimento da tolerância materno-fetal.

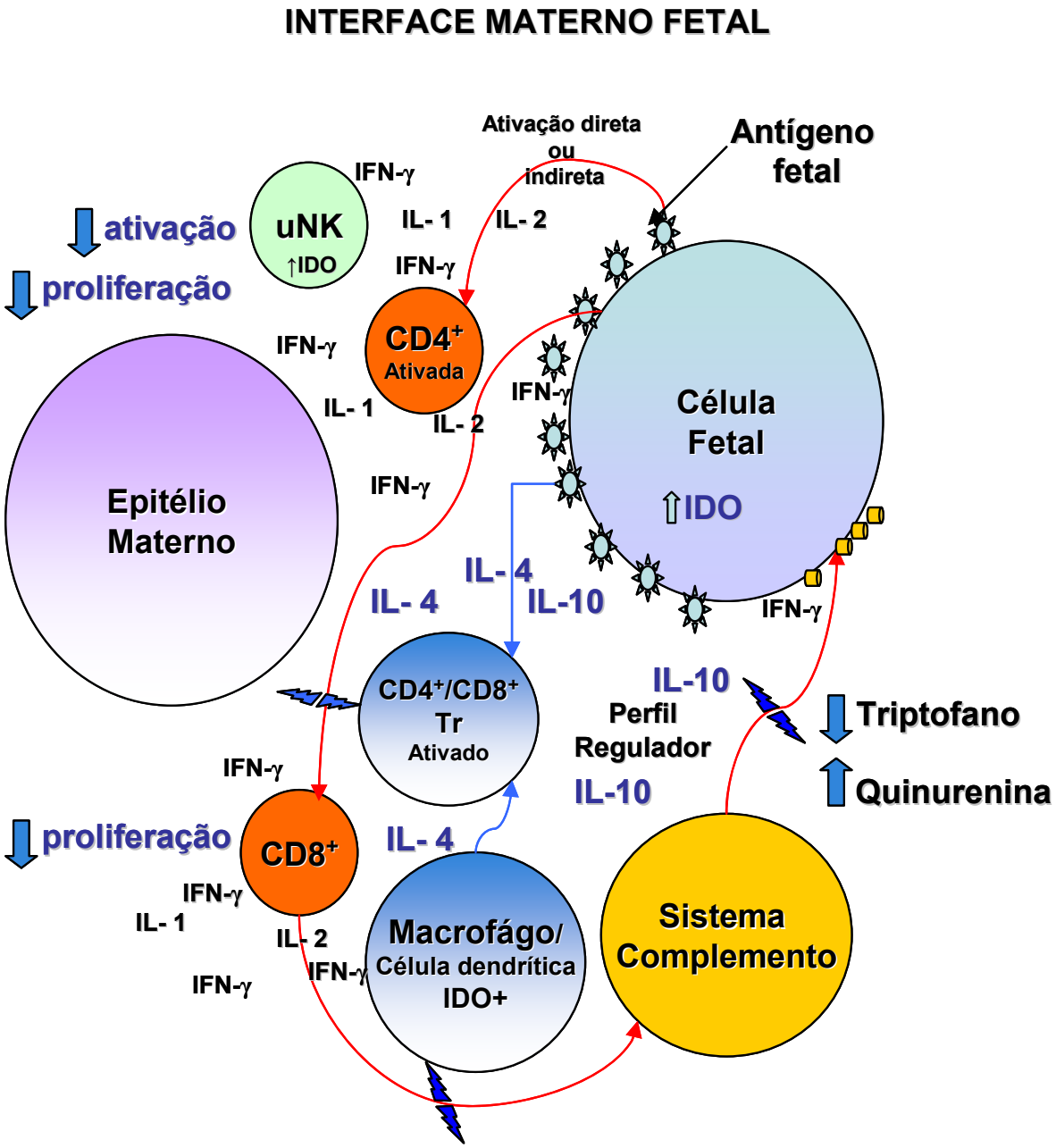

Figura 2 – Modelo gráfico hipotético proposto da atividade da *indoleamine 2,3-dioxigenase* no tecido placentário bovino

A figura 2 representa o mecanismo proposto de indução de tolerância via expressão da IDO na placenta bovina, no qual as células ativadas Th1 contra o enxerto fetal atuariam como fonte de INF-γ induzindo a expressão da IDO nas células fetais e nas células do sistema imune que diminuiria a concentração local de triptofano. Essa carência induzida no micro-ambiente placentário inibiria a proliferação das células ativadas do sistema imune.

A expressão da IDO em macrófagos e células dendríticas conjuntamente com a secreção de citocinas Th2 como IL-10 pelos trofoblastos recrutariam sub-populações com perfil regulador modulando a resposta inflamatória primária, desta forma auxiliaria na prevenção do estabelecimento da fase efetora da resposta Th1 inicial gerando um micro-ambiente composto de citocinas e células Th2 na placenta bovina.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

Para realização deste estudo, o material utilizado e a metodologia empregada foram descritos a seguir.

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Vinte e nove amostras de placenta de gestações normais foram coletadas no Frigorífico Mantiqueira Ltda, localizado na região metropolitana de São José dos Campos, Estado de São Paulo. Após o abate, as carcaças dos animais foram introduzidas na linha de abate e, no momento da evisceração, os úteros gravídicos foram coletados para o processamento imediato. Os úteros foram incisados na região de sua curvatura maior e cerca de cinco placentônios foram colhidos. Idade fetal foi mensurada por “crow-rump”, de acordo com Noden e Lahunta,1990. Acondicionadas a 4ºC para o transporte até o laboratório. Cinco amostras de placentônio de placenta de fetos clonados foram obtidas no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos desta Universidade, e do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Cenargen/Embrapa). No laboratório, as amostras foram armazenadas a -40ºC.

4.2 PREPARAÇÃO DO HOMOGENATO DO TECIDO PLACENTÁRIO

Os fragmentos de placenta bovina congelados foram homogeneizados em PBS^- com o auxílio de homogenizador doméstico, para o rompimento de todas as células do tecido. Foram realizados dois ciclos de centrifugação a 11.000rpm a 4ºC por 20 minutos e desproteinização por adição de acetona 2:1 (v:v), agitação e um ciclo de centrifugação a 4000rpm a 4ºC por 20 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram aliquotados e liofilizados.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRIPTOFANO E SEUS METABÓLITOS

A formação dos produtos foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (cromatrografia líquida de alta performance).

As amostras secadas a vácuo foram ressuspendidas em água/acetonitrila (75/25%) em 500µL, e 40 µL desta solução foram injetados em coluna C18 . O fluxo utilizado foi de 0,4mL/min. triptofano foi mensurado por absorção ultravioleta a 280 nm, quinurenina a 365 nm e N-formil-quinurenina 325 nm de comprimento de onda (Fig. 3). Estes produtos também foram monitorados por fluorescência com excitação a 285 nm e emissão a 365 nm.

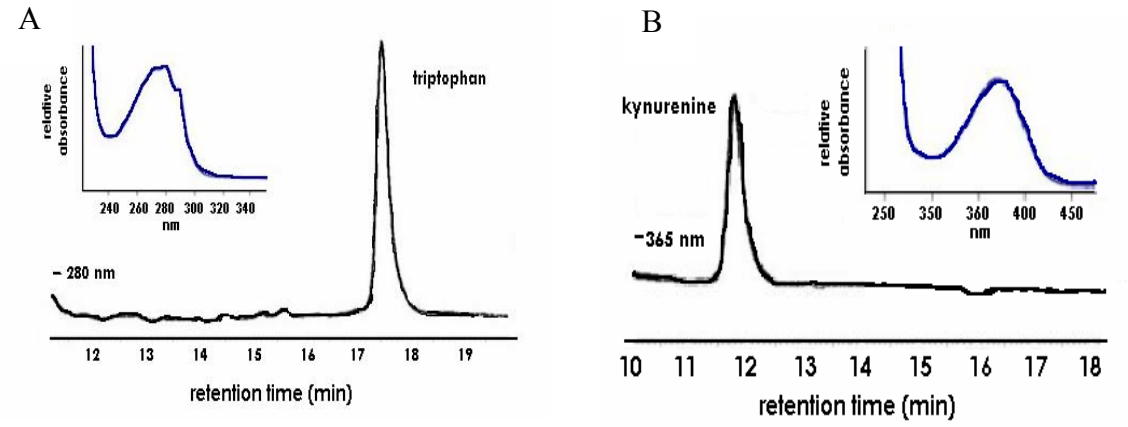

Figura 3 - Cromatogramas representativos das amostras de homogenatos placentários avaliados através do HPLC

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Visando homogenizar a variância dos dados obtidos, quatro amostras que não apresentaram concentração detectável de N-formil-quinurenina e quinurenina foram eliminadas da análise estatística.

Para obtenção das estatísticas descritivas utilizamos o procedimento PROC UNIVARIATE do programa Statistical Analysis System (1995). O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado, sendo que, cada grupo comparativo (GC) representou um tratamento. Para essas análises estatísticas utilizamos o procedimento PROC GLM do programa supracitado, de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ij} = \mu + gc_i + e_{ij}$$

em que,

y_{ij} = valor observado da mensuração do j-ésimo animal, no i-ésimo grupo comparativo;

μ = média geral;

g_i = efeito do i-ésimo grupo comparativo;

e_{ij} = erro aleatório inerente à observação y_{ij} .

Quando verificado efeito significativo ($P<0,05$) nas análises de variância entre os grupos comparativos para as diferentes variáveis estudadas, utilizou-se o Teste de t Student para discriminar as diferenças e/ou igualdades entre as médias dos diferentes grupos avaliados.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram expostos nos itens deste capítulos.

5.1 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS ESTIMATIVAS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS ANALISADAS.

Na tabela abaixo encontram-se os valores absolutos de L-triptofano, quinurenina e razão quinurenina/triptofano e idade gestacional aproximada dos animais estudados.

Tabela – 1 Valores encontrados de triptofano, de quinurenina e da razão quinurenina/triptofano (Razão Q/T) e idade gestacional aproximada dos animais estudados

Continua

Animal	Triptofano (µM /L)	Quinurenina (µM /L)	Razão Q/T	Idade Gest. Aprox. (dias)
1	339,480	5,904	0,017	49
2	428,040	20,664	0,048	65
3	540,216	14,760	0,027	76
4	658,296	8,856	0,013	21
5	705,528	8,856	0,013	76
6	277,488	26,568	0,096	21
7	392,616	26,568	0,068	21
8	492,984	8,856	0,018	49
9	959,400	35,424	0,040	155
10	646,488	23,616	0,037	159
11	581,544	17,712	0,030	139
12	720,288	11,808	0,016	158
13	563,832	41,328	0,073	142
14	611,064	23,616	0,039	162
15	684,864	29,520	0,043	159
16	708,480	8,856	0,013	144
17	1236,888	35,424	0,029	109

Conclusão

Animal	Triptofano (µM /L)	Quinurenina (µM /L)	Razão Q/T	Idade Gest. Aprox. (dias)
18	773,424	0	0	180
19	351,288	0	0	187
20	1210,32	0	0	200
21	1210,32	0	0	200
22	1124,712	35,424	0,031	150
23	631,728	23,616	0,037	204
24	811,800	38,376	0,047	180
25	2267,136	82,656	0,036	196
26	944,640	44,280	0,047	290
27	856,080	165,312	0,193	234
28	773,424	17,712	0,023	222
29	457,560	14,760	0,032	290
Clone 1	711,432	29,520	0,041	290
Clone 2	684,864	20,664	0,030	260
Clone 3	428,040	11,808	0,028	.
Clone 4	516,600	17,712	0,034	.
Clone 5	1715,761	34,568	0,020	285

5.2 ESTIMATIVAS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS TRIPTOFANO, QUINURENINA E DA RAZÃO QUINURENINA:TRIPTOFANO NO TECIDO PLACENTÁRIO BOVINO NORMAL NO PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO TRIMESTRE GESTACIONAL

A estatística descritiva das estimativas médias dos valores encontrados para Triptofano, Quinurenina e Razão Quinurenina/Triptofano para cada período gestacional estudado, encontram-se nas tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2 - Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), erros padrões (E.P.), mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os valores de triptofano (µM /L), no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional

Período Gestacional	N	Média ±EP (µM /L)	Mínimo (µM /L)	Máximo (µM /L)
1º Trimestre	8	479,33 ± 53,04	277,49	705,53
2º Trimestre	9	745,87± 72,71	563,83	1236,89
3º Trimestre	8	983,39± 196,37	457,56	2267,14

Tabela 3 - Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), erros padrões (E.P.), mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os valores de quinurenina (µM /L), no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional

Período Gestacional	N	Média±EP (µM /L)	Mínimo (µM /L)	Máximo (µM /L)
1º Trimestre	8	15,13 ± 2,97	5,90	26,57
2º Trimestre	9	25,26± 3,72	8,86	41,33
3º Trimestre	8	52,77± 17,75	14,76	165,31

Tabela 4 - Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), erros padrões (E.P.), mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os valores da razão quinurenina/triptofano, no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional

Período Gestacional	N	Média ±EP	Mínimo	Máximo
1º Trimestre	8	0,038 ± 0,011	0,013	0,096
2º Trimestre	9	0,035 ± 0,005	0,013	0,073
3º Trimestre	8	0,056 ± 0,020	0,023	0.193

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS VARIÁVEIS TRIPTOFANO, QUINURENINA E RAZÃO QUINURENINA/TRIPTOFANO NO TECIDO PLACENTÁRIO BOVINO NO PRIMEIRO, SEGUNDO E TERCEIRO TRIMESTRE GESTACIONAL

Verificou-se que não há diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) nas estimativas médias em relação aos valores de triptofano entre o primeiro e o segundo e entre o segundo e o terceiro trimestre gestacional. Porém a média dos valores de triptofano do primeiro trimestre gestacional diferem estatisticamente ($p<0,05$) da média dos valores do terceiro trimestre gestacional no tecido placentário proveniente de vacas prenhes de fetos normais (Gráfico 1).

Verificou-se que não há diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) nas estimativas médias em relação aos valores de quinurenina entre o primeiro e o segundo, e entre o segundo e o terceiro trimestre gestacional. Porém a média dos valores de quinurenina do primeiro trimestre gestacional diferem estatisticamente ($p<0,02$) da média dos valores do terceiro trimestre gestacional no tecido placentário proveniente de vacas prenhes de fetos normais (Gráfico 2). A razão Q/T não apresentou nenhuma diferença estatística ($p>0,05$) entre os três trimestres gestacionais no tecido placentário proveniente de vacas prenhes de fetos normais (Gráfico 3).

Tabela 5 - Médias de quadrados mínimos para as variáveis triptofano (μM /L), quinurenina (μM /L) e razão quinurenina/triptofano (Razão Q/T) no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional.

Período Gestacional	Triptofano(μM /L)	Quinurenina(μM /L)	Razão Q/T
1º Trimestre	479,33 [a]	15,13a	0,038[c.]
2º Trimestre	745,87[a,b]	25,26[a,b]	0,035[c]
3º Trimestre	983,39[b]	52,77[b]	0,056[c.]

Médias em uma mesma coluna e com letras iguais não diferem entre si ao nível de, pelo menos 5% de probabilidade, pelo teste t.

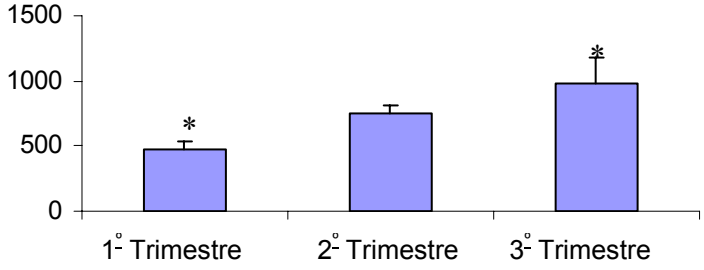

Gráfico 1 - Representação das estimativas médias e erros padrão para os valores de triptofano (µM /L), no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional

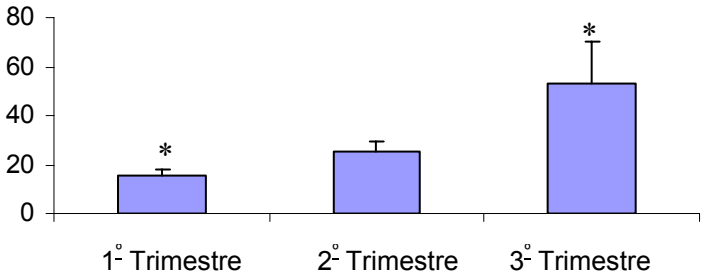

Gráfico 2 - Representação das estimativas médias e erros padrão para os valores de quinurenina (µM /L), no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional

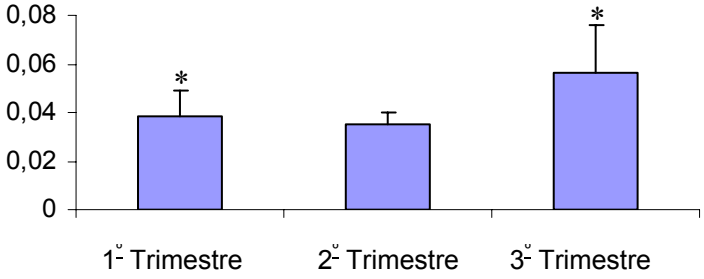

Gráfico 3 - Representação das estimativas médias e erros padrão para razão quinurenina/triptofano (Razão Q/T), no tecido placentário bovino no primeiro, segundo e terceiro trimestre gestacional

5.4 ESTIMATIVAS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS TRIPTOFANO, QUINURENINA E DA RAZÃO QUINURENINA/TRIPTOFANO NO TECIDO PLACENTÁRIO BOVINO PROVENIENTES DE GESTAÇÕES NORMAIS E DE CLONES NO TERCEIRO TRIMESTRE GESTACIONAL

A estatística descritiva das estimativas médias dos valores encontrados para Triptofano, Quinurenina e Razão Quinurenina/Triptofano no tecido placentário bovino provenientes de gestações normais e de clones no terceiro trimestre gestacional, encontram-se nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 - Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), erros padrões (E.P.), mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os valores de triptofano, no tecido placentário bovino proveniente de gestações normais e de clones no terceiro trimestre gestacional

Período Gestacional	N	Média ±EP	Mínimo	Máximo
Controle	9	983,39± 196,37	457,56	2267,14
Clone	5	811,34 ± 232,14	428,04	1715,76

Tabela 7 - Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), erros padrões (E.P.), mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os de valores quinurenina, no tecido placentário bovino proveniente de gestações normais e de clones no terceiro trimestre gestacional

Período Gestacional	N	Média ±EP	Mínimo	Máximo
Controle	9	52,77± 17,75	14,76	165,31
Clone	5	22,85 ± 4,09	11,81	34,57

Tabela 8 - Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), erros padrões (E.P.), mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os valores da razão quinurenina/triptofano, no tecido placentário bovino provenientes de gestações normais e de clones no terceiro trimestre gestacional.

Período Gestacional	N	Média ±EP	Mínimo	Máximo
Controle	9	0,056 ± 0,020	0,023	0,193
Clone	5	0,031 ± 0,003	0,020	0,041

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS VARIÁVEIS TRIPTOFANO, QUINURENINA E RAZÃO QUINURENINA/TRIPTOFANO NO TECIDO PLACENTÁRIO BOVINO DE GESTAÇÕES NORMAIS E DE CLONES,NO TERCEIRO TRIMESTRE GESTACIONAL

Verificou-se que não há diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) das estimativas médias em relação aos valores de triptofano e quinurenina encontrados no tecido placentário proveniente de vacas prenhes de fetos normais quando comparados aos encontrados no tecido placentário provenientes de vacas prenhes de fetos clonados.

A razão Q/T não apresentou diferença estatística ($p>0,05$) entre os valores encontrados no tecido placentário proveniente de vacas prenhes de fetos normais quando comparados aos encontrados no tecido placentário provenientes de vacas prenhes de fetos clonados.

Tabela 9 - Médias de quadrados mínimos para as variáveis triptofano (µM /L), quinurenina (µM /L) e razão quinurenina/triptofano (Razão Q/T) no tecido placentário bovino provenientes de gestações normais e de clones no terceiro trimestre gestacional

Período Gestacional	Triptofano(µM /L)	Quinurenina(µM /L)	Razão Q/T
Controle	983,39[a]	52,77[b]	0,056[c]
Clone	811,34[a]	22,85[b]	0,031[c]

Médias em uma mesma coluna e com letras iguais não diferem entre si ao nível de, pelo menos 5% de probabilidade, pelo teste t.

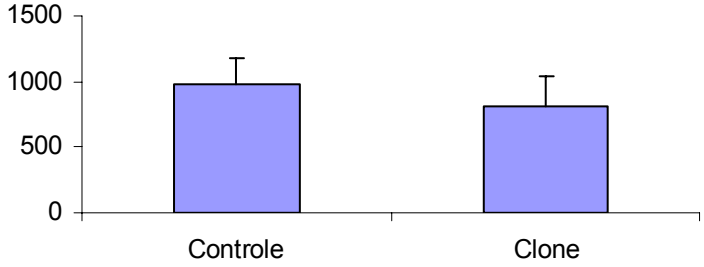

Gráfico 4 - Representação das estimativas médias e erros padrão para os valores triptofano (µM /L), no tecido.placentário bovino de gestações normais e de clones, no terceiro trimestre gestacional

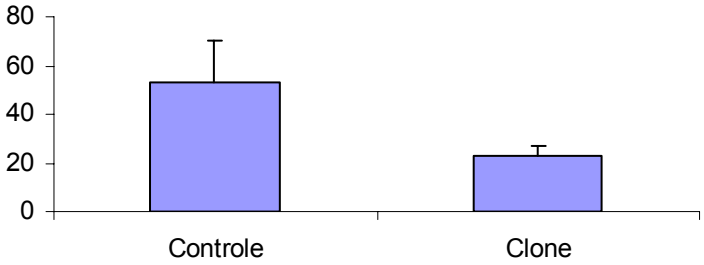

Gráfico 5 - Representação das estimativas médias e erros padrão para os valores quinurenina (µM /L), no tecido placentário bovino de gestações normais e de clones, no terceiro trimestre gestacional

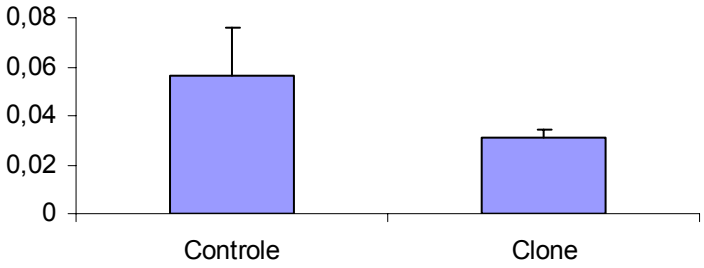

Gráfico 6 - Representação das estimativas médias e erros padrão para razão quinurenina/triptofano (Razão Q/T), no tecido placentário bovino de gestações normais e de clones, no terceiro trimestre gestacional

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O catabolismo de triptofano na placenta humana vem sendo largamente estudado, devido a sua aparente função imunomoduladora do sistema imune materno frente a antígenos fetais. Entretanto, estes estudos nos processos reprodutivos em medicina veterinária são escassos e geralmente direcionados ao papel da IDO como via de controle de infecções no sistema reprodutor (BROWN et al., 2001).

Com o avanço das biotécnicas da reprodução aplicadas à medicina veterinária, muitas questões surgiram sobre os mecanismos envolvidos na tolerância materno-fetal, principalmente na clonagem, na qual as taxas de sucesso são muito baixas e as alterações encontradas no processo de placentação sugerem o desequilíbrio dos mecanismos de tolerância materna.

A presença de catabólitos do triptofano como a N-formil-quinurenina e a quinurenina indicam a atividade da IDO no tecido placentário bovino em todos os trismestres gestacionais.

Neste trabalho, os níveis de triptofano na placenta bovina aumentaram com o avanço da gestação (479,33μM/L no primeiro; 745,87μM/L no segundo; 983,39μM/L no terceiro trimestre em média) diferindo do perfil encontrado nas amostras de soros de mulheres gestantes, nas quais os valores de triptofano diminuíram (SCHRÖCKSNADEL et al., 1996; SCHRÖCKSNADEL et al., 2003).

Os níveis de quinurenina também se elevaram com o avanço da idade gestacional (15,13μM/L no primeiro; 25,26μM/L no segundo; 52,77μM/L no terceiro trimestre em média), diferindo novamente do perfil encontrado nos níveis séricos de

mulheres gestantes que permaneceram estáveis (SCHRÖCKSNADEL et al., 1996; SCHRÖCKSNADEL et al., 2003).

A razão quinurenina/triptofano no tecido placentário bovino, ao contrário dos achados encontrados no soro de mulheres gestantes que demonstraram aumento da razão com idade gestacional tanto no estudo pontual (SCHRÖCKSNADEL et al., 1996) como no longitudinal (SCHRÖCKSNADEL et al., 2003), não apresentou diferenças estatisticamente significativas durante período gestacional (0,038 no primeiro; 0,035 no segundo; 0,056 no terceiro trimestre em média).

O contínuo aumento das concentrações de triptofano e quinurenina sugere indução do catabolismo de triptofano para manutenção do equilíbrio no microambiente placentário e provavelmente da imunomodulação local, ao contrário do encontrado em humanos que a razão varia devido à diminuição da concentração de triptofano e não ao aumento da concentração de quinurenina.

Essa via de catabolismo de triptofano com produção de quinurenina é realizada somente pela IDO e pela TDO. Uma vez que a TDO expressão predominantemente hepática, a presença de catabólitos de triptofano sugere a atividade de IDO na placenta bovina. Munn et al. (1998) descreveu a atividade da IDO na placenta humana e murina por meio de testes funcionais, que diferiram do método empregado neste trabalho. Entretanto, recentes trabalhos demonstraram a expressão da TDO nos primeiros dias após a fecundação ocorrendo sua diminuição com o início da expressão de IDO (SUZUKI et al., 2001).

A via catabólica da IDO e da TDO possuem algumas diferenças dentre as quais somente a IDO utiliza o superóxido auxiliando na manutenção do equilíbrio oxidativo do microambiente placentário.

Os valores encontrados para o terceiro trimestre gestacional não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados aos obtidos das placentas provenientes de fetos clonados. Entretanto, a concentração de triptofano nessas placentas foi menor que a média encontrada no terceiro trimestre. Da mesma forma as concentrações de quinurenina apresentaram-se menores em relação à média encontrada nas placentas de fetos normais no terceiro trimestre. Conseqüentemente, a razão quinurenina/triptofano diminuiu em relação ao valor médio encontrado nas placentas de fetos normais no terceiro trimestre.

A análise estatística dos dados demonstrou grande heterogeneidade das amostras, o que não alterou os resultados das análises estatísticas obtidas nos estudos comparativos entre os terços gestacionais. Além disso, os animais clonados eram zebuínos e parâmetros específicos devem ser estabelecidos para uma comparação mais fiel dos dados. É importante salientar que uma maior acurácia dos dados mais precisos poderiam ser encontrados em um grupo mais homogêneo.

Alguns dos animais clonados apresentaram alterações na placentação que sugerem um desequilíbrio das respostas pró-inflamatória e tolerogênica, indicando a necessidade de mais estudos para esclarecer o envolvimento ou não da IDO no estabelecimento e manutenção da tolerância materno-fetal em bovinos.

É importante ressaltar que as amostras de tecido placentário utilizadas neste estudo foram obtidas de animais abatidos em frigoríficos, nos quais nas regras de manejo pré-abate inclui o jejum mínimo de 24 horas dos animais, sendo o triptofano, um aminoácido essencial, um possível aumento da concentração plasmática e/ou placentária pós-prandial foi minimizado.

Nenhum estudo foi conduzido com intuito de mensurar diretamente concentração de triptofano no tecido placentário humano como o realizado neste

trabalho, porém as concentrações plasmáticas de triptofano materna e do espaço interviloso são semelhantes em mulheres (CAMELO JR. et al., 2004).

O aumento da concentração de triptofano com avanço da prenhez pode ocorrer em razão da placenta de ruminantes ser um órgão de crescimento contínuo e apresentar alta atividade metabólica e exigência nutricional no final da gestação, somado ao acelerado crescimento fetal, poderia aumentar a exigência desse aminoácido essencial no micro-ambiente placentário.

Quanto aos aspectos imunológicos a placentação dos ruminantes é sinepitéliocorial (LEISER; KAUFMANN et al., 1994), havendo migração e fusão das células fetais durante toda gestação. Aventando a hipótese de que a exposição dos antígenos fetais é contínua ao sistema imune materno é necessário que os mecanismos de tolerância sejam ativados constantemente para promoção do equilíbrio entre as respostas inflamatória e a tolerogênica, durante a prenhez em bovinos. Contrariamente ocorrido na placenta humana, que no início da gestação há a exposição direta do citotrofoblasto ao sistema imune uterino, em razão de sua característica altamente invasiva vários mecanismos de imunotolerância devem ser prontamente ativados para o estabelecimento da gestação.

Kudo et al. (2001) sugeriram que a atividade da IDO no primeiro terço gestacional em humanos teria maior relevância, pois no final da gestação a interface materno-fetal ser basicamente formada pelo sincíciotrofoblasto, que não apresentaria antígenos MHC (HLA) como forma de “escape” do sistema imune materno. Estudos para comprovar essa hipótese estão sendo conduzidos por vários grupos de pesquisas.

Na placenta bovina, os dados deste trabalho sugerem que a atividade da IDO aumenta com o avanço do período gestacional, em razão da placenta bovina no

início do desenvolvimento apresentar-se somente justaposta ao epitélio uterino. Com o avanço da idade gestacional e a interação entre a porção materna e a fetal torna-se mais íntima, os vasos mais finos, provavelmente aumentando a exposição dos antígenos fetais ao sistema imune materno.

É importante ressaltar que este estudo é inovador em medicina veterinária e que metodologia mais precisa é necessária para a avaliação da atividade da IDO na placenta bovina. Métodos funcionais como atividade enzimática *in vitro*, clonagem e seqüenciamento da IDO na placenta bovina e imunolocalização da enzima são alvo de estudos futuros para esclarecer o envolvimento da IDO na reprodução de ruminantes, uma vez que a utilização da biotecnologia aplicada à reprodução de pode alterar o estabelecimento da tolerância materno-fetal na placenta bovina.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu concluir que:

1. A presença de catabólitos de triptofano (N-fomil-quinurenina e quinurenina) na placenta bovina sugere a atividade da IDO neste tecido;
2. As concentrações de triptofano e quinurenina aumentam com o avanço da idade gestacional;
3. A razão quinurenina/triptofano não se altera com o avanço da idade gestacional, sugerindo que o catabolismo de triptofano aumenta de acordo com a concentração do aminoácido no micro-ambiente placentário;
4. Não há diferenças estatisticamente significativas no catabolismo de triptofano entre as gestações normais e de fetos clonados ($p>0,05$).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ASBURY, A. C.; HANSEN, P. J. Effects of susceptibility of mares to endometritis and stage of cycle on phagocytic activity of uterine-derived neutriphils. **Journal of Reproduction Fertility,** Supplement 35, p 311-316, 1987.

BEER, A. E.; BILLINGHAM, R. E. Host response to intr-uterine tissue, cellular and fetal allografts. **Journal of Reproduction and Fertility.** Supplement. 21, p. 59-88, 1974.

BOZIC, C. R.; KOLAKOWSKI JR., L. F.; GERARD, N. P.; GARCIA-RODRIGUEZ, C.; VON UEXKULL- GULDENBAND, C.; CONKLYN, M. J.; BRESLOW, R.; SHOWELL, H. J.; GERARD, C. Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC **The Journal of Immunology**, v.154, n.11, p- 6048-6057, 1995.

BROWN, J.; HOWIE, S. E. M.; ENTRICAN, G. A role for tryptophan in immune control of chlamydial abortion in sheep. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 82, p. 107-119, 2001.

CAMELO JR., J. S.; JORGE, S. M.; MARTINEZ, F. E. Amino acid composition of parturient plasma, the intervillous space of the placenta and the umbilical vein of term newborn infants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research,** v. 37, p. 711-717, 2004.

COUMANS, B.; THELLIN, O.; ZORZI, W.; MELOT, F.; BOUGOUSSA, M.; MELEN, L.; ZORZI, D.; HENNEN, G.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Lymphoid cell apoptosis induced by trophoblastic cells: a model of active foetal-placental tolerance. **Journal of Immunological Methods,** v.224, p. 185-196, 1999.

CROSS, J. C ; WERB, Z.; FISHER, S. J. Implantation and the placenta: key pieces of development puzzle. **Science**, v.266, p.1508-1018, 1994.

CROY, B.A.; ESADEG, S.C.S.; ASHKAR, A.A.; WEI, Q. Decidual natural killer cells: key regulators of placental development. **Journal of Reproductive Immunolgy**, v.57, p.151-168, 2002.

CROY, B.A.; He, H.; ESADEG, S.; WEI, Q.; MACCARTNEY, D.; ZHANG, J.; BORZYCHOWSKI, A.; ASHKAR, A. A.; BLACK, G. P.; EVANS, S. S.; CHANTAKRU, S.; VAN DEN HEUVEL, M.; PAFFARO JR., V. A.; YAMADA, A. T. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. **Reproduction**, v. 126, n. 2, p.149-160, 2003.

DAVIES, C. J.; FISHER, P. J.; SCHLAFER, H. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. **Placenta**. v.21, n.2-3, p.194-202, 2000.

DE, M.; SANFORD, T. R.; WOOD, G. M. Expression of interleukin 1, interlekine 6 and tumor necrosis factor α mouse uterus during the peri-implantation period of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, n 1 p. 83-89, 1993.

DRISCOLL, K. E.; HASSENBEIN, D. G.; HOWARD, B. W.; ISFORT, R. J.; CODY, D.; TINDAL, M. H.; SUCHANEK, M.; CARTER, J. M. Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 58, n. 3, p. 359-364, 1995.

DUC-GOIRAN, P.; MIGNOT, T. M.; BOURGENOIS, C.; FERRÉ, F. Embryo-maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 83, n.1, p. 85-100, 1999.

DINNYÉS, A.; OUSA, P.; KING, T.; WILMUT, I. Somatic cell nuclear transfer: recent progress and challenges. **Cloning and stem cells**, v. 4, n. 1, p. 81-90, 2002.

FALLARINO, F.; VACCA, C.; ORABONA, C.; BELLADONA, M. L.; BIANCHI, R.; MARSHALL, B.; KESKIN, D. B.; MELLOR, A. L.; FIORETTI, M. C.; GROHMANN, U.; PUCETTI, P. Functional expression of indolemine 2,3-dioxygenase by murine CD8[alpha] + dendritic cells. **International Immunology**, v. 14, n. 1, p. 65-68, 2002.

FRUMENTO, G.; ROTONDO, R.; TONETTI, M.; FERRARA. G. B. T cell proliferation is blocked by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Transplantation Proceedings,** v.33, n. 1, p. 428-430, 2001.

FUJIGAKI, S.; SAITO, K.; SEKIKAWA, K.; TONE, S.; TAKIKAWA, O.; FUJII, H.; WADA, H.; NOMA, A.; SEISHIMA, M. Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-γ-independent mechanism. **European Journal of Immunology,** v. 31, n. 8, p. 2313-2318, 2001.

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

GOTTSHALL, S.L.; HANSEN, P.J. Regulation of leucocyte subpopulations in the sheep endometrium by progesterone. **Immunology**, v.76, p. 636-641, 1992.

GULERIA, I.; POLLARD, J. W. The trophoblast is a component of innate immune system during pregnancy. **Nature Medicine**, v. 6 n. 5, p. 589-593, 2000.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004, 513 p.

HALPERIN, R.; PELLER, S.; ROTSCHILD, M.; BUKOVSKY, I.; SCHNEIDER, D. Placental apoptosis in normal and abnormal pregnancies. **Gynecology Obstetrics Investigation**, v.50, n.2, p 84-87, 2000.

HANSEN, P. J.; BAZER, F. W.; SEGERSON, E. C. Skin graft survivalin uterine lumen of ewes treated with progesterone. **American Journal Reproductive Immunology Microbiology**, v. 12, p 48-54, 1986.

HEIKKINEN, J.; MÖTTÖNEN, M.; KOMI, J.; ALANEN, A.; LASSILA, O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. **Clinical Experimental Immunology**, v.131, n.3, p.498-505, 2003.

HEYMAN. Y.; ZHOU, Q. I.; LEBOURHIS, D.; CHAVATTE-PALMER, P.; RENARD, J. P.; VIGNON, X. Novel approches and hurdles to somatic cloning in cattle. **Cloning and Stem Cells,** v. 4, n. 1, p. 47-55, 2002.

HILL, J. R.; SCHLAFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. **Biology of Reproduction,** v. 67, n. 1, p. 55-63, 2002.

HIRATA, F.; HAYASHI, O. Studies on indoleamine 2,3-dioxygenase: I. Superoxide anion as substrate. **The journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 15, p. 5960-5966, 1975.

HOLMES, C. H.; SIMPSON, K. L. Complement and pregnancy: new insights into the immunobiology of fetomaternal relationship. **Baillieres Clinical Obstetrics Gynaecology,** v. 6, n. 3, p. 439-460, 1992.

HOLERS, V. M.; GIRARD, G.; M. O., L.; GUTHRIDGE, J. M.; MOLINA, H.; PIERANGELI, S. S.; ESPINOLA, R.; XIAO-WEI, L. E.; MAO, D.; VIALPANDO, C. G.; SALMON, J. Complement C3 activation is required for the antiphospholipid antibody-induced fetal loss. **Journal Experimental Medicine**, v. 195, n.2, p. 211-220, 2002.

HOLERS, V. M.; KINOSHITA, T.; MOLINA, H. The evolution of mouse and human complement C3-binding proteins: divergence of form but conservation of function. **Immunology Today**, v. 13, p. 231-236, 1992.

HONIG, A.; RIEGER, L.; KAPP, M.; SUTTERLIN, M.; DIETL, J.; KAMMERER, U. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance. **Journal of Reproductive Immunology,** v. 61, n. 2, p. 79-86, 2004.

HUDDLESTON, H.; SCHUST, D. J. Immune interactions at the maternal-fetal interface: a focus on antigen presentation. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 51, n. 4, p. 283-289, 2004.

HUNT, J. S.; JADHAV, L.; CHU, W.; GERAGHTY, D. E.; OBER, C. HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v. 183, n. 3, p. 682-688, 2000b.

HUNT, J. S.; PETROFF, M. G.; MORALES, P.; SEDLMAYR, P.; GERAGHTY, D. E.; OBER, C. HLA-G in reproduction: studies on the maternal-fetal interface. **Human Immunology**, v. 61, n. 11, p. 1113-1117, 2000a.

HUNT, J. S.; VASSMER, D.; FERGUSON, T. A.; MILLER, L. Fas ligand is poditioned in mouse uterus and placenta to prevent trafficking of activated leukocytes between the mother and the conceptus. **Journal** I**mmunology**, v. 158, n. 9, p 4122-4128, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Brasília 2004-. Disponível em :<Internet: www.ibge.gov.br >. Acesso em : 22 fev 2005.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. SHLOMCHIK, M. **Immunobiology: The immune system in health and disease.** 5. ed. Nova Iorque: Churchill Livingstone, 2002, 732 p.

JERZAK, M.; BISCHOF, P. Apoptosis in the first trismestre human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast remodeling. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 100, n.2, p. 138-142, 2002.

JOHANSSON, M.; BROMFIELD, J. J.; JASPER, M. J.; ROBERTSON, S. H. Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice. **Immunology,** v. 112, n. 2, p. 290-300, 2004.

JOKHI, P. P.; KING, A.; BOOCOCK, C.; LOKE, Y. W. Secretion of colony stimuling factor-1 by human first trimester placental and decidual cell populations and efect of this citokine on trophoblast thymidine uptake in vitro. **Human Reproduction**, v.10, n. 10, p. 2800-2807, 1995.

JOOSTEN, I.; SANDERS, M. F.; HENSEN, E. J. Involvement of major histocompatibility complex class I compatibility between dam and calf in the aetiology of bovine retained placenta. **Animal Genetics,** v. 22, n. 6, p. 455-63, 1991.

KAI, S.; GOTO, S.; TAHARA, K.; SASAKI, A.; TONE, S.; KITANO, S. Indoleamine 2,3-dioxygenase is necessary for cytolitic activity of natural killer cells**. Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, n. 2, p. 177-182, 2004.

KIM, Y. U.; KINOSHITA, T.; MOLINA, H.; HOURCADE, D.; TSUKASA, S.; WAGNER, L. M.; HOLERS, V. M. Mouse complement regulatory protein Crry/p65 uses the specific mechanisms of both human decay-accelerating factor and membrane cofactor protein. **Journal Experimental Medicine**, v. 181, n.1, p-151-159, 1995.

KING, G. J.; ATKINSON, B. A.; ROBERTSON, H. A. Implantation and early placentation in domestic ungulates. **Journal of Reproductive and Fertility.** Supplement 31, p. 17-30, 1982.

KOVATS, S.; MAIN, E.K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISHER, S.J.; DEMARS, R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblast. **Science.** v. 248, n. 4952, p. 220, 1990.

KUDO, Y.; BOYD, C. A. R. Human Placental Indoleamine 2,3-Dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1500, n. 1, p.119-124, 2000.

KUDO, Y.; BOYD, C. A. R. Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 61,n. 2, p. 87-98, 2004.

KUDO, Y.; BOYD, C. A. R. The role of l-triptophan transport in l-triptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase in human explants. **Journal of Physiology,** v. 531, n. 2, p. 417-423, 2001b.

KUDO, Y.; BOYD, C. A. R.; SARGENT, I. L.; REDMAN, C. W. G. Decreased tryptophan catabolism by placental indoleamine 2,3-dioxygenase in preeclampsia. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v. 188, n. 3, p. 719-726, 2002.

KUDO, Y.; BOYD, C. A. R.; SARGENT, I. L.; REDMAN, C. W. G Triptophan degradation by human placental indoleamine 2,3-dioxygenase regulates lymphocyte proliferation. **Journal of Physiology**, v. 535, n. 1, p. 207-215, 2001a.

LEE, C. S.; GOGOLIN-EWENS, K.; BRANDON, M. R. Identification of a unique lymphocyte subpopulation in the sheep uterus. **Immunology,** v.63, n. 1, p. 157-164, 1988.

LEE, C. S.; MEEUSEN, E.; GOGOLIN-EWENS, K.; BRANDON, M. R. Quantitative and qualitative changes in the intraepithelial lymphocyte population in the uterus of nonpregnant and pregnant sheep. **American Journal Reproductive Immunology**, v. 28, n. 2, p. 90-96, 1992.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental Clinical Endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

LIU, W.-J.; GOTTSHALL, S. L.; HANSEN, P. J. Increased expression of cell surface markers on endometrial $\gamma\delta$ T-cell receptor+ intraepithelial lymphocytes induced by the local presence of the sheep conceptus. **American Journal Reproductive Immunology,** v.37, p. 199-205, 1997.

LOW, B. G.; HANSEN, P. J.; DROST, M.; GOGOLIN-EWENS, K. J. Expression of major histocompatibility complex antigens on the bovine placenta. **Journal of Reproduction and Fertility.** v. 90, n. 1, p. 235-243, 1990.

MAO, D.; WU, X.; DEPPONG, D.; FRIEND, L. D.; DOLECKI, G.; NELSON, D. M.; MOLINA, H. Negligible role of antobodies and C5 in pregnancy loss associated exclusively with C3-dependent mechanisms through complement alternative pathway. **Immunity**, v. 19, n. 6, p. 813-822, 2003.

MARJONO, A. B.; BROWN, D. A.; HORTON, K. E.; WALLACE, E. M.; BREIT, S. N.; MANUELPILLAI, U. Macrophage inhibitory cytokine-1 in gestational tissues and maternal serum in normal and pre-eclamptic prenancy. **Placenta**, v. 24, n. 1, p. 100-106, 2003.

MEEUSEN, E.; FOX, A.; BRANDON, M.; LEE, C. S. Activation of uterine intraepithelial $\gamma\delta$ T cell receptor-positive lymphocytes during pregnancy. **European Journal Immunology**, v. 23, n. 5, p. 1112-1117, 1993.

MEIER, A. H.; WILSON, J. M. Tryptophan feeding adversely influences pregnancy. **Life Sciences**. v. 32, n. 11, p. 1193-1196, 1983.

MELLOR, A., L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism and T-cell Tolerance: Immunosupresion by Starvation? **Immunology Today**, v. 20, n. 10, p. 469-473, 1999a.

MELLOR, A., BABAN, B.; CHANDLER, P., MARSHALL, B., JHAVER, K., HANSEN, A., KONI, P.A., IWASHIMA, M., MUNN, D.H Cutting Egde: Induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppress T cell clonal expansion. **The Journal of Immunology**. v. 171, n. 4, p. 1652-1655, 2003.

MELLOR, A., SIVAKUMAR, J.; CHANDLER, P.; SMITH, K.; MOLINA, H.; MAO, D.; MUNN, D.H. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. **Nature Immunology**, v. 2, n. 1, p. 64-68, 2001.

MELLOR, A., ZHOU, M., CONWAY, S. J., MUNN, D. HLA-G transgenic mice **Journal of Reproductive Immunology**, v. 43, n. 2, p. 253-261, 1999b.

MIKI, T.; SUN, H.; LEE, Y-H.; TANDIN, A.; KOVSCEK, A. M.; SUBBOTIN, V.; FUNG, J. J.; VALDIVIA, L. A. Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. **Transplantation Proceedings,** v. 33, n. 129-130, 2001.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI,Y.; Specific localization of macrophages in pregnant bovine caruncules. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 39, n.3, p. 125-128, 2004.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI,Y.; IWANAGA, T. Reduced phagocytotic activity of macrophages in the bovine retained placenta. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 53, n. 1, p. 53-56, 2002.

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

MOREAU, P.; ADRIAN-CABESTRE, F.; MENIER, C.; GUIARD, V.; GOURAND, L.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblast and monocytes. **International Immunolog,**. v. 11, n. 5, p. 803-811, 1999.

MUNN, D; SHARMA, M. D.; LEE,J. R.; JHAVER, K. G.; JOHNSON, T.S.; KESKIN, D. B.; MARSHALL, B; CHANDLER, P; ANTONIA, S.J.; BURGESS, R; SLINGLUFF J.R., C.L.; MELLOR, A.L. Potential Regulatory of Human Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase. **Science**, v.297, n. 5588, p.1867-1870,2002

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

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

NISHIKORI, K.; NOMA, J.; HIRAKAWA, S.; AMANO, T.; KUDO, T. The change of membrane complement regulatory protein in chorion of early pregnancy. **Clinical Immunology Immunopathology**, v.69, n. 2, p. 176-174, 1993.

O`LEARY, S. O.; JASPER, M. J.; WARNES, G. M.; ARMSTRONG, D. T.; ROBERTSON, S. A. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. **Reproduction**. v. 128, n. 2, p. 237-247, 2004.

PHILLIPS, T. A.; NI, J.; PAN, G.; RUBEN, S.M.; WEI, Y; PACE, J. L.; HUNT, J. S. TRAIL (Apo-2L) and TRAIL Receptors in Human Placentas:Implications for Immune Privilege. **The Journal of Immunology**, v.162, n. 10, p. 6053–6059, 1999.

PICCINNI, M. P. T-cell cytokines in pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology,** v.47, n.5, p. 289-94, 2002.

PICCINNI, M. P.;BELONI, L.;LIVI, C.; MAGGI, E.; SCARSELLI, G.; ROMAGNANI, S. Defective production of both leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained reccurent abortions. **Nature Medicine**, v.4, n. 9, p. 1020-1024, 1998.

ROBERTSON, S.A.; INGMAN, W.V.; O'LEARY, S.; SHARKEY, D.J.; TREMELLEN, K.P. Transforming growth factor β – a mediator of immune deviation in seminal plasma. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 1-2, p. 109-128, 2002.

SAITO, S. Cytokine network at feto-maternal interface. **Journal of Reproductive Immunology**. v.47, n. 2, p. 87-103, 2000.

SANTOSO, D.I.S.; ROGERS, P.; WALLACE, E.M.; MANUELPILLAI, U.; WALKER, D.; SRI BETKTI SUBAKIR Localization of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and 4-Hydroxynonenal in Normal and Pre-Eclamptic Placentae, **Placenta**, v. 23, n. 5, p. 373-379, 2002.

SCHÖCKSNADEL, H.; BAIER-BITTERLICH, G.; DAPUNT, O.; WATCHER, H.; FUCHS, D. Decresead plasma tryptophan in pregnancy. **Obstetrics Gynecology**, v. 88, n. 1, p. 47-50, 1996.

SCHÖCKSNADEL, K.; WIDNER, B.; BERGANT, A., NEURAUTER, G.; SCHENNACH, H.; SCHÖCKSNADEL, H.; FUCHS, D. Longitudinal study of triptophan degradation during and after preganacy **Life Science**, v.72, n. 7, p.785-793, 2003.

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

SHIOZAKI, A.; KATAOKA, K.; FUJIMURA, M.; YUKI, H.; SAKAI, M.; SAITO, S. Survivin inhibits apoptosis in cytotrophoblasts. **Placenta**, v. 24, p. 65-76, 2002.

STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. **SAS user's guide:** basic and statistic versão 8.02. Cary: SAS, 1995.

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

SUZUKI, T.; HIROMATSU, K.; ANDO, Y.; OKAMOTO, T.; TOMODA, Y.; YOSHIKAI, Y. Regulatory role of $\gamma\delta$ T cells in uterine intraepithelial lymphocytes in maternal antifetal immune response. **Journal of Immunology**. v.154, n. 9, p. 4476-4484, 1995.

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

TAKIKAWA, O.; YOSHIDA, R.; KIDO, R.; HAYAISHI, O. Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 8, p. 3648-3653, 1986.

TEDESCO, F.; RADILHO, O.; CANDUSSI, G.; NAZZARO, A.; MOLLNES, T.E.; PECORARI, D. Immunohistochemical detection of terminal complement complex and S protein in normal and pré-eclamptic placentae. **Clinical Experimental Immunology**. v. 80, n. 2, p. 236-240, 1990.

TEKIN, S.; EALY, A.D.; WANG, S.; HANSEN, P.J. Differences in lymphocyte . regulatory activity among variants of ovine interferon-τ. **Journal of Interferon Cytokine Research**, v. 20, n. 11, p.1001-1005, 2000.

TERNESS, P.; BAUER, M.; RÖSE, C.; WATZLIK, A.; SIMON, H.; OPELZ, O. Inhibition of allogenic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: Mediation of suppression by tryptophan metabolites. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 196, n. 4, p. 447-457, 2002.

THOMAS, S. R.; MOHR, D.; STOCKER, R. Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-γ primed mononuclear phagocytes. **The Journal of Biologycal Chemistry,** v. 269, n. 20, p. 14457-14464, 1994.

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

UCKAN, D.; STEELE, A.; CHERRY; WANG, B.-Y.; CHAMIZO, W.; KOUTSONIKOLIS, A.; GILBERT-BARNESS, E.; GOOD, R. A. Trophoblasts express Fas-ligand: a proposed mechanism for immune privilege in placenta and maternal invasion. **Molecular Human Reproduction,** v. 3, n. 8, p. 655-662, 1997.

VERECHIA, F. T.; MIGLINO, M. A.; VISINTIN, J. A.; MELLO, M. R. B.; GARCIA, J. M.; YAMAZAKI, W.; AMBRÓSIO, C. E.; CARVALHO, A. F.; BRAGA, F. C.; SANTOS, T. C.; LEISER, R.; CARTER, A. M. Cloned cattle placentation: microvascular arquitecture and structure. **Placenta**, A5, 2003.

WALDVOGEL, A. S.; HEDIGER-WEITHALER, B. M.; EICHER, R.; ZAKHER, A.; ZARLENGA, D. S.; GASBARRE, L. C.; HEUSSLER, T. Interferon-γ e interleukina-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhea vírus. **Veterinary Immunology Immunophatology,** v. 77, n. 3-4, p. 201-212, 2000.

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

WELLS, M.; BENNETT, J.; BULMER, J. N.; JACKSON, P.; HOLGATE, C. S. Complement component deposition in uteroplacental (spiral) arteries in normal human pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 12, n. 2, p. 1250135, 1987.

WOODING, F. B. P.; WATHES, D. C. Binucleate cell migration in the bovine placentome. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 59, n. 1, p. 425-430, 1980.

XU, C.; MAO, D.; HOLERS, M.V.; PALANCA, B.; CHENG; A.M.; MOLINA, H. A critical role for murine complement regulator Crry in fetomaternal tolerance. **Science**, v.287, n. 5452, p. 498-501, 2000.