MÁRCIO JOSÉ FERREIRA

**EXPRESSÃO DE IFN-GAMA E INTERLEUCINA (IL)-10 E SEUS
RECEPTORES PELAS CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS DE CAMUNDONGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre.

São Paulo
2007

MÁRCIO JOSÉ FERREIRA

**EXPRESSÃO DE IFN-GAMA E INTERLEUCINA (IL)-10 E SEUS RECEPTORES
PELAS CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS DE CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre.

Área de concentração:
Biologia Celular e Tecidual

Orientador(a):
Prof^ª. Dra. Estela Bevilacqua

São Paulo
2007

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ferreira, Márcio José.

Expressão de IFN-gama e interleucina (IL)-10 e seus receptores pelas células trofoblásticas de camundongos / Márcio José Ferreira. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia do Trofoblasto.

Versão do título para o inglês: Expression of IFN-gamma and interleukin (IL)-10 and its receptores in the mouse trophoblast cells.

Descritores: 1. Interleucina 10 2. Interferon tipo II 3. Trofoblasto 4. Receptores 5. Camundongos 6. Citocinas I. Bevilacqua, Estela Maris Andrade Forell II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual. III. Título.

ICB/SBIB196/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Márcio José Ferreira

Dissertação: Expressão de IFN-gama e interleucina (IL)-10 e seus receptores
pelas células trofoblásticas de camundongos

Orientador (a): Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em
sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a)

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a) Assinatura
Nome
Instituição

Examinador(a) Assinatura
Nome
Instituição

Presidente Assinatura
Nome
Instituição

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail:

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 140 nas fls. 23 do livro 2 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Estela Maris Andrade F. Bevilacqua, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "*Binômio IL-10 e IFN- γ na biologia das células trofoblásticas*" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Márcio José Ferreira e os pesquisadores Carla Lima, Mara Sandra Hoshida**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em 29.11.2005.

São Paulo, 30 de novembro de 2005.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Vice-Coordenador em Exercício
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente da CEEA

A Minha Família

Aos meus pais Antonio e Antonia, às minhas irmãs Aliandre e Maria Alesandra, à minha avó Sebastiana e aos meus sobrinhos Paloma, Pâmela, Eduardo e Pablo por estarem ao meu lado nesta longa jornada.

A Dra. Estela Bevilacqua

Por ter me orientado e ensinado toda a conduta profissional. Pelo apoio dedicado durante a execução do trabalho e por toda ajuda e paciência a mim conduzida.

Aos Meus Amigos

Para aquelas pessoas que fazem meu coração sorrir...

Para a galera que sempre estive junto até mesmo quando eu não estive disposto...

Para as pessoas que fizeram a diferença em minha vida...

Para as pessoas que quando olho para trás, sinto muitas saudades... Para as pessoas que me aconselharam quando me senti sozinho, e me ajudaram a entender que não importa em quantos pedaços meu coração tenha se partido, pois o mundo não irá parar para que eu o conserte...

Para as pessoas que amei, para as pessoas que abracei e para as pessoas que encontro apenas em meus sonhos...

Para as pessoas que encontro todos os dias e não tenho a chance de dizer tudo o que sinto olhando nos olhos...

O que importa não é “O QUE” eu tenho na vida, mas “QUEM” eu tenho na vida... Por isso, guardo todas as pessoas importantes da minha vida em uma caixinha que levo sempre comigo...

Márcio José Ferreira

Adaptado

*"Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho,
pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.*

*Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho,
mas quando parte, nunca vai só nem nos deixa a sós.
Leva um pouco de nós, deixa um pouco de si mesmo.
Há os que levam muito, mas há os que não levam nada".*

(Kalil Gibram).

AGRADECIMENTOS

Aos colaboradores:

Mara Hoshida, Carla Lima e Robert Galvez pela amizade, pelas críticas e por todo o empenho, dúvidas e comentários feitos ao longo do trabalho;

Aos professores:

Sergio Ferreira, Patrícia Gama, Alison, Irene, Gláucia, Anselmo Moriscot, Marília Seelaender e Maria Inês por toda a formação teórica e intelectual;

Aos colegas do Trofo's lab:

Cristiane Murazawa, Taiana, Andréa Amarante, Andréa Albieri, Fernanda, Luciana Pietro, Juliana, Sara Zago, Luciana Oliveira, Aline, Erica, Isis, Marcelo, Carla Letícia, Mirian, Eloíse, Priscila, Carol, Cláudia Regina, pelos momentos de alegria, descontração;

Aos amigos:

Eduardo, Vânia e Júlio pela amizade e, principalmente, pelo auxílio dado quando cheguei a São Paulo;

Joel Alves, Rosângela Farias por todos os conselhos pessoais;

Aldair, André e Julio Ferreira pela amizade e companheirismo;

Eloísa Ferro pela amizade, por me ingressar no meio científico e ensinar a dizer as coisas certas antes do funeral da pessoa;

Agradecimento Especial

Sara Zago, Andréa Albieri, Rose, Fernanda, Mara – Trofo's Lab

Celso – Secretário Pós graduação

Sra. Eva e Maria José Biblioteca ICB

Ao pessoal da copiadora ICB I

Às professoras Silvana Bordin e Rosângela Verlengia pelos auxílios técnicos de biologia molecular;

À Rosângela Farias e Sara Zago pelo por todo apoio e o grande auxílio técnico;

À Dra Carla Lima, Dra Mônica do Instituto Butantã por toda a gentileza e pelos cafés não tomados;

À secretaria da pós-graduação, através da Celiana, Eloíse e Beth, por toda atenção e esclarecimentos das dúvidas;

Aos colegas do biotério, Cláudio, Fernando e, especialmente, à Maley pela amizade por toda atenção e cuidados a qual me deram e, também, pela ajuda com os animais;

Ao setor de informática através da dona Marina por todo auxílio prestado;

À zeladoria do prédio, em particular à dona Rose, e aos porteiros e vigias;

À todos os amigos que fiz neste período em que estive aqui;

A todos aqueles que contribuíram com ‘nosso’ trabalho e que eu tenha esquecido de mencionar...

... A todos, muito obrigado!

RESUMO

FERREIRA, M.J. **Expressão de IFN-gama e Interleucina (IL)-10 e seus receptores pelas células trofoblásticas de camundongos.** 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Durante a gestação em camundongos estão presentes na interface materno-fetal IL-10 e IFN- γ , citocinas-chave na regulação da resposta imunológica. Particularmente, a presença de IL-10 caracteriza um ambiente antiinflamatório associado à inibição do desenvolvimento das células Th1 (linfócitos auxiliares 1) e estimulação da proliferação de linfócitos B (resposta humoral), enquanto que um aumento no perfil de IFN- γ previne a ativação das células Th2 (linfócitos auxiliares 2) e, portanto, favorece uma resposta pró-inflamatória do tipo Th1. A produção local destas citocinas por células NK uterinas e sub-populações específicas de linfócitos ativados, tais como a de linfócito T $\gamma\delta$ parece ser relevante, embora não exclusiva. Neste contexto, este estudo analisou uma possível contribuição das células trofoblásticas na manutenção de um balanço adequado Th1/Th2 na interface materno-placentária representada pela expressão, respectivamente, de IFN- γ e IL-10. Para isto, foi analisada a expressão da citocina antiinflamatória IL-10 (e seu receptor) na presença de um ambiente pró-inflamatório gerado pela presença de IFN- γ e ao contrário, a expressão de IFN- γ (e seu receptor) na presença de IL-10, caracterizando uma condição antiinflamatória. Células trofoblásticas de camundongo isoladas de sítios de implantação aos 7,5 dias de gestação foram utilizadas em sistema de cultivo. As expressões gênica e protéica foram respectivamente determinadas através de RT-PCR e imunohistoquímica. IL-10 e IFN- γ e seus receptores foram expressos pelas células trofoblásticas na ausência ou na presença, respectivamente, de IFN- γ ou IL-10. O tratamento com IFN- γ aumentou a expressão de IL-10R1 mas não a de IL-10. Ao contrário, na presença de IL-10 a expressão da citocina IFN- γ aumentou significativamente enquanto que a expressão do receptor diminuiu. Estes resultados sugerem que o ambiente pró-inflamatório aumenta a responsividade do trofoblasto a IL-10, enquanto que um ambiente antiinflamatório parece reforçar a importância da presença de IFN- γ na interface materno-placentária, nas fases iniciais da gestação.

Palavras-chave: Interferon-gama, Trofoblasto, IL-10

ABSTRACT

FERREIRA, M.J. **Expression of IFN- gamma and interleukine (IL)-10 and their receptors by trophoblast cells** 76 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Key cytokines such as IL-10 and IFN- γ , essential for immune response regulation, have also been found locally at maternal-placental interface during mouse pregnancy. Particularly, levels of IL-10 characterize an anti-inflammatory environment associated to the inhibition of T helper-1 lymphocytes (Th1) development and the proliferative stimulation of the B lymphocytes (humoral response). On the other hand, increases in IFN- γ profile prevent T helper-2 lymphocytes (Th2) activation leading to an inflammatory response that favors a Th1 response. The local production of these cytokines by NK uterine cells and T $\gamma\delta$ lymphocytes are relevant, but not exclusive. Thus, this study analyzed the potential contribution of the trophoblast in the maintenance of Th1/Th2 balance in the maternal-placental interface, represented, respectively by the expression of IL-10 and IFN- γ cytokines. The expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and its receptor was evaluated in the presence of an inflammatory environment mimetized by IFN- γ addition to the culture medium. On contrary, the expression of the IFN- γ (and its receptor) was evaluated in the presence of IL-10 characterizing an anti-inflammatory condition. Mouse trophoblast cells were isolated from implantation sites at gestational day 7.5 and cultured in standard conditions. Gene and protein expression were determined by immunohistochemistry and RT-PCR. IL-10 and IFN- γ and their receptors were expressed in cultured trophoblast cells in the absence or presence of IFN- γ and IL-10, respectively. IFN- γ treatment increased IL-10R1 expression but do not alter IL-10 expression. On contrary, in the presence of IL-10 the IFN- γ expression increased significantly while the expression of its receptor decreased. These results suggest that a pro-inflammatory environment increases trophoblast responsiveness to IL-10 whereas an anti-inflammatory condition seems to reinforce the importance of IFN- γ expression at the maternal-placental interface, on the initial periods of gestation.

Keywords: Interferon-gamma, Trophoblast, IL-10

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 Implantação embrionária	17
3.2 O cone ectoplacentário	20
3.3 Citocinas e o paradigma gestacional Th1/Th2	21
3.4 Citocinas na gestação	22
3.5 Interleucina (IL)-10	24
3.6 Interferon (IFN)-γ	25
3.7 Argumentação deste estudo	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Reagentes, abreviaturas e procedência	28
4.2 Animais	29
4.3 Acasalamento	29
4.4 Obtenção das células trofoblásticas	29
4.5 Culturas primárias de células trofoblásticas	30
4.6 Análise da expressão gênica por RT-PCR	31
4.6.1 Extração de RNA total das células trofoblásticas cultivadas	31
4.6.2 Quantificação do RNA	31
4.6.3 Avaliação da integridade do RNA	32
4.6.4 Síntese do cDNA	32
4.7 Análise da expressão protéica por imunohistoquímica	34
5 RESULTADOS	36
5.1 Caracterização das células trofoblásticas	36
5.2 Expressão de IL-10 e IFN-γ e seus receptores pelas células trofoblásticas	36
5.2.1 Expressão gênica	36
5.2.2 Expressão protéica	36
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos fatores que contribuem com o sucesso da gestação, um que merece destaque é a complexa rede de moléculas reguladoras que interagem entre si e contribuem para a adaptação da condição gestacional. Hormônios, moléculas sinalizadoras, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento fazem parte desta família de moléculas; algumas, produzidas por componentes locais presentes no trato genital feminino, outras alcançando o sítio de implantação via circulação (WEGMANN et al., 1993; HUNT et al., 2000; AYATOLLAHI et al., 2005; SALAMONSEN, 2007).

As citocinas, mediadores solúveis do sistema imunológico, que atuam na comunicação celular também fazem parte desta rede sinalizadora na interface materno-fetal. Estas moléculas são potentes mediadores de ativação e crescimento celular regulando respostas imunológicas e inflamatórias (ENTRICAN, 2002).

No contexto imunológico, os dois maiores subtipos de linfócitos T CD4+, T auxiliador do tipo 1 (Th1) e do tipo 2 (Th2), produzem diferentes padrões de citocinas e apresentam papéis distintos na resposta imunológica (**Fig. 1**). Por exemplo, células Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias como interferon(IFN)- γ , fator de necrose tumoral(TNF)- α e interleucina(IL)-2, ao passo que células Th2 secretam citocinas antiinflamatórias como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (RAGHUPATHY, 2001; NAN et al., 2007). Obviamente é o balanço entre estes perfis que define o estabelecimento de um ambiente pró- ou antiinflamatório.

As respostas Th1 e Th2 são mutuamente inibitórias. IL-10, um produto das células Th2 determina um ambiente antiinflamatório e inibe o desenvolvimento das células Th1, enquanto que IFN- γ , um produto das células Th1, estabelece um ambiente pró-inflamatório e previne a ativação das células Th2 (RAGHUPATHY, 2001).

A dominância de um padrão de citocinas do tipo Th2 durante a gestação (**Fig. 2**) associada a um mecanismo conversor da resposta imunológica Th1 para Th2 tem sido sugerido como um mecanismo fundamental para o sucesso gestacional (SAITO et al., 2007; PICCINNI, 2007). O predomínio de um padrão exacerbado de citocinas produzidas por linfócitos do tipo 1(Th1), tais como TNF- α , IFN- γ e IL-2 pode levar a um quadro potencialmente prejudicial à gestação com perdas fetais significativas

(RAGHUPATHY, 2001; LAIRD et al., 2003). Neste contexto é essencial que o balanço entre citocinas Th1 e Th2 seja mantido para garantir o sucesso da gestação (RAHMAN et al., 2004; WILCZYNSKI, 2005).

Figura 1: O esquema mostra o papel das citocinas Th1 e Th2 na regulação da imunidade celular e humoral. IL-6 possivelmente secretada por macrófagos ativados são capazes de polarizar a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ (Th0) em células efetoras Th2 pela produção inicial de IL-4. IL-12 por sua vez desencadeia a diferenciação de células Th1 (modificado de Cutolo et al., 1998).

Esta intrincada rede de sinalização via citocinas ganha novas dimensões quando, associada à gestação ocorre infecções patogênicas como a da *Leishmania major*, que desencadeia a produção predominante de citocinas do tipo Th1 (IFN-γ, IL-2 e TNF-α) (KRISHNAN et al., 1996). Aumentos dos índices de perdas fetais estão associados a esta patologia, mas que pode ser revertida experimentalmente pela administração de IL-10 durante a gestação. O papel da IL-10 parece ser desta forma crucial no controle da produção de quimiocinas e citocinas por células Th1 e macrófagos, restaurando o equilíbrio Th1/Th2 (CHAOUAT et al., 1995).

IL-10 é produzida na interface materno-fetal em camundongos e humanos por diversas células do endométrio e da placenta, atuando na inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias em células linfócitos Th1, alterando as funções de

macrófagos e células dendríticas (D'ORAZIO e NIERDERKORN, 1998) e estimulando a ativação de células NK (*natural killer*) (MOCELLIN et al., 2003). Acredita-se que a IL-10 assume um papel vital na gestação na medida em que induz a expressão de HLA-G e, simultaneamente, regula negativamente a expressão de moléculas de histocompatibilidade maior de classe II (MHC-II) (MOREAU et al., 1999). Em camundongos IL-10 é expressa principalmente pelas células decíduais durante o início da gestação, sendo que esta expressão diminui com o decorrer da gestação (LIN et al., 1993; ROBERTS et al., 2003). Evidências experimentais também apontam uma expressão de IL-10 por células trofoblásticas (CHAOUAT et al., 2002; MOORE et al., 2001), macrófagos (WESSELS et al., 2000) e células NK uterinas (VIGANÒ et al., 2001).

Figura 2: O esquema mostra a prevalência de citocinas Th2 durante a gestação com conseqüente predomínio de uma imunidade humoral. IL-4, IL-5, IL-13 e principalmente IL-10 apresentam-se no sangue, baço e ambiente uterino-placentário em concentrações maiores do que as citocinas Th1 (IFN-γ, TNF-α e IL-2). IL-10 inibindo o crescimento de células Th1 mantém a resposta Th1 em níveis baixos. IFN-γ por sua vez não atinge os níveis necessários para impedir a ativação das células Th2.

IFN-γ também é produzido na interface materno-fetal por linfócitos T, células NK (ARCK et al., 1997; ASHKAR e CROY, 1999; ASHKAR et al., 2000) e células

trofoblásticas (PLATT e HUNT, 1998). Algumas das funções atribuídas a esta citocina nestes locais incluem: alterações nas artérias espiraladas uterinas (ASHKAR et al., 2000); indução da diferenciação de células trofoblásticas (ATHANASSAKIS et al., 2000); indução de fagocitose em células trofoblásticas gigantes (AMARANTE-PAFFARO et al., 2004; ALBIERI et al., 2005) e ativação da indoleamina 2,3 dioxigenase nas células trofoblásticas associada a mecanismos de proteção contra patógenos e tolerância fetal (BABAN et al., 2004).

Curiosamente em macrófagos, IFN- γ ativa funções citotóxicas e citolíticas, estimula a fagocitose e ainda diminui a atividade dos fatores de transcrição CREB e AP-1 conhecidos indutores da expressão de IL-10 (HU et al., 2006).

Dessa maneira, tentando simular um ambiente Th1 com um tratamento com IFN- γ ou Th2 com um tratamento com IL-10 analisamos a participação do trofoblasto no controle do balanço IL-10/IFN- γ na interface materno-fetal.

Partimos da hipótese de que se o IFN- γ fosse capaz de regular positivamente a produção de IL-10 nas células trofoblásticas, isto poderia ser um dispositivo adaptativo para criar um ambiente Th2 favorável ao desenvolvimento fetal na interface materno-fetal em situações de desequilíbrio em que esta citocina está aumentada. Estas respostas podem vir a auxiliar na compreensão dos mecanismos de adaptação da placenta a diferentes padrões de respostas imunológicas que podem ocorrer no organismo materno.

2 OBJETIVOS

Com base na literatura vigente e utilizando cultura de células trofoblásticas provenientes de cones ectoplacentários, a proposta deste trabalho foi:

- a) Analisar *in vitro* o efeito do IFN- γ sobre a expressão gênica de IL-10 e de seu receptor, IL-10R, pelas células trofoblásticas de camundongos na fase de pós-implantação embrionária;
- b) Analisar a expressão protéica de IL-10 e IL-10R pelas células trofoblásticas de camundongos.
- c) Analisar *in vitro* o efeito de IL-10 sobre a expressão gênica de IFN- γ e de seu receptor, IFN- γ R α e IFN- γ R β , pelas células trofoblásticas de camundongos na fase de pós-implantação embrionária;
- d) Analisar a expressão protéica de IFN- γ e seu receptor pelas células trofoblásticas de camundongos;
- e) Analisar a possível contribuição moduladora do trofoblasto no balanço Th1/Th2 durante a gestação através da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 na presença de um ambiente Th1 induzido pelo tratamento com IFN- γ ou ao contrário, na expressão de IFN- γ quando prevalece um ambiente Th2 induzido pela presença de IL-10.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Implantação embrionária*

O processo de implantação embrionária caracteriza o início do relacionamento entre o organismo materno e embrionário. É através deste mecanismo que o embrião se posiciona e se fixa no ambiente uterino, garantindo a sua sobrevivência ao estabelecer uma superfície estável para trocas metabólicas e aquisição de nutrientes. Esta íntima relação entre os tecidos materno e embrionário torna-se gradativamente mais complexa e dá origem à placenta (MOSSMAN, 1937; WELSH e ENDERS, 1987).

Em camundongos, a implantação tem início logo após a chegada do embrião ao útero. Neste momento, embrião encontra-se na fase de blastocisto e apresenta-se como uma esfera polarizada com uma cavidade, a blastocèle. Em um dos pólos e internamente, aglomeram-se poucas células responsáveis pela formação dos tecidos embrionários, o embrioblasto ou massa celular interna. A camada de células achatadas que reveste todo o blastocisto forma o trofoblasto. As células trofoblásticas que revestem a massa celular interna são denominadas de trofoblasto polar, ao passo que aquelas que revestem a blastocèle são chamadas de trofoblasto mural (BILLINGTON, 1971; MUNTENER e HSU, 1977).

As células trofoblásticas estão particularmente envolvidas com o processo de implantação embrionária. Em camundongos e ratos, elas se diferenciam em células trofoblásticas gigantes primárias (DICKSON, 1963), perdem sua capacidade proliferativa (ILGREN, 1983), tornam-se poliplóides (ZYBINA, 1970) e adquirem propriedades adesivas, invasivas e fagocitárias (TACHI et al., 1970; BEVILACQUA e ABRAHAMSOHN, 1989).

Particularmente nos camundongos por volta do 4º dia de gestação inicia-se o processo de implantação embrionária pela adesão das células trofoblásticas gigantes murais ao epitélio uterino inicialmente na região antimesometrial, gradativamente estendendo-se para a região mesometrial (SNELL e STEVENS, 1966; MOSSMAN, 1987).

Em primatas e roedores, a implantação inclui uma breve adesão do blastocisto ao organismo materno, seguida de uma intrusão no estroma endometrial. O acesso ao estroma uterino é acompanhado pelo rompimento de vasos sanguíneos uterinos, o que proporciona uma interação direta entre as células trofoblásticas e o

sangue materno. Esta interação é mantida por toda a gestação, evoluindo para uma eficiente superfície de trocas metabólicas entre o organismo materno e fetal, caracterizando uma placentação do tipo hemocorial (SCHLAFKE e ENDERS, 1975; MOSSMAN, 1987; WELSH e ENDERS, 1987; BEVILACQUA e ABRAHAMSOHN, 1989).

A primeira etapa do processo de implantação é a fase de aposição onde o blastocisto, livre da zona pelúcida, estabelece um fraco contato com o epitélio uterino representado pela aproximação de microvilosidades destes tecidos (DICKMAN e DE FEO, 1967; REINIUS, 1969; VITIELLO e PATRIZIO, 2007).

Na segunda fase, a de adesão, ocorre diminuição dos espaços entre o organismo materno e o embrionário, de modo que as projeções das membranas do trofoblasto e do epitélio uterino tornam-se estreitamente interdigitadas e paralelas entre si (POTTS, 1966; NILSSON, 1966; POTTS e PSYCHOYOS, 1967, VITIELLO e PATRIZIO, 2007).

Dentre os muitos eventos que ocorrem na fase de adesão, são dignos de destaque: as modificações no conteúdo de organelas e na disposição de moléculas da superfície das células epiteliais e trofoblásticas (ALDEN 1947; NILSSON, 1980; MOULTON e ELANGO VAN, 1981; DAMSKY et al., 1993), a diferenciação de células trofoblásticas em células gigantes (LOBEL et al., 1967; BEVILACQUA e ABRAHAMSOHN, 1988) e a formação da decídua a partir de fibroblastos do estroma endometrial (KREHBIEL, 1937; MOSSMAN, 1937; JOLLIE e BENCOSME, 1965; ENDERS e SCHLAFKE, 1967; KLEINFELD et al., 1976; ABRAHAMSOHN, 1983).

O processo de decidualização caracteriza-se por alterações funcionais e morfológicas vasculares e nas células do estroma uterino levando ao aumento da permeabilidade e remodelação do tecido conjuntivo (LEE et al., 2007). Os fibroblastos decidualizados assumem uma forma poliédrica, um arranjo e disposição tipicamente epitelióide (KREHBIEL, 1937; MOSSMAN, 1937; JOLLIE e BENCOSME, 1965) e apresentam citoplasma rico em organelas. Estas células também estabelecem extensas junções intercelulares entre si (JOLLIE e BENCOSME, 1965; ENDERS e SCHLAFKE, 1967; KLEINFELD et al., 1976; ABRAHAMSOHN, 1983).

Os processos de decidualização e diferenciação do trofoblasto coincidem com um específico balanço hormonal materno, com níveis de progesterona progressivamente crescentes e um pico de estrógeno. Estes esteróides e seus metabólitos agem sobre o endométrio e o trofoblasto desencadeando, direta e/ou

indiretamente, eventos fundamentais responsáveis pela implantação embrionária, tais como proliferação e diferenciação dos tecidos endometriais e indução de um estado de receptividade uterina que, conseqüentemente permite a adesão do blastocisto ao organismo materno (SMITH, 1968; GULYAS e DANIEL, 1969; UNGER e DICKSON, 1971; MACLAREN, 1973; WEITLAUF, 1973; BARRERA et al., 2007; LEE et al., 2007).

O período em que as modificações morfológicas, celulares e moleculares tornam o endométrio receptivo ao embrião é denominado de janela de implantação (ROGERS e MURPHY, 1989; HARPER, 1992). Este intervalo, relativamente curto, é caracterizado por mudanças morfológicas e funcionais no endométrio como a expressão de moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteinases de invasão (SIMÓM e VALBUENA, 1999).

Particularmente em primatas e roedores, após a fase de adesão, o processo de implantação progride com uma fase de invasão, por meio da qual o embrião ganha acesso ao estroma endometrial e seus vasos. A participação do trofoblasto neste processo inclui: a penetração de projeções celulares por entre células epiteliais uterinas, fagocitose, rompimento da membrana basal, migração no estroma decidualizado e intrusão na parede dos vasos endometriais (TACHI et al., 1970; BEVILACQUA e ABRAHAMSOHN, 1989). Durante a invasão trofoblástica no interstício endometrial, as células trofoblásticas expressam um amplo repertório de receptores da família das integrinas (ARMANT et al., 1986; SUTHERLAND et al., 1993) e metaloproteinases, enquanto que as células deciduais produzem específicos componentes da matriz extracelular e inibidores de metaloproteinases (ALEXANDER et al., 1996). Inúmeras evidências apontam para a importância do controle destas atividades nas células trofoblásticas e deciduais como um ponto vital para o sucesso de uma gestação normal (GELLERSEN et al., 2007).

A intrusão de células trofoblásticas na parede dos vasos sanguíneos uterinos é também um evento de extrema importância para o estabelecimento de uma adequada superfície de trocas com o organismo materno (BEVILACQUA, 1984; WELSH e ENDERS, 1987; HUPPERTZ, 2007). Em camundongos, a comunicação destas células com as demais células trofoblásticas que se organizam em forma de rede ao redor do embrião faz com que o sangue materno percole amplas malhas deixadas por entre estas células.

Durante a primeira metade da gestação, as células trofoblásticas em contato com o sangue materno exibem intensa atividade fagocitária, internalizando grande quantidade de células sanguíneas, principalmente hemácias. A esta fagocitose tem se atribuído principalmente funções nutritivas e aquisição de ferro para a hemopoiese fetal antes da formação da placenta (BILLINGTON, 1971). A atividade fagocítica das células trofoblásticas é facilmente constatada pela presença de grandes quantidades de fagossomas em seus citoplasmas, contendo restos celulares. No entanto, não somente células sanguíneas são internalizadas pelo trofoblasto durante a fase invasiva, também células epiteliais, deciduais e endoteliais em diferentes estágios de degeneração são observadas no interior destas células (Bevilacqua, 1984). Este processo parece, desta forma, também contribuir com a gradativa aquisição de espaço para o desenvolvimento embrionário na medida em que os espaços deixados pelas células fagocitadas passam a ser ocupados pelo trofoblasto. Nas últimas décadas, funções de proteção e de defesa imunológica também têm sido cogitadas como papel da fagocitose pelo trofoblasto (PAVIA, 1983; DRAKE e RODGER, 1987; FERRO et al., 2000; AMARANTE-PAFFARO et al., 2004,).

3.2 O cone ectoplacentário

Ao contrário das células trofoblásticas murais, as células trofoblásticas polares que recobrem a massa celular interna, mantêm intensa atividade mitótica e dão origem a uma excrescência celular de forma piramidal denominada **cone ectoplacentário** (MEHROTRA, et al., 1988), cujo ápice se projeta para a região mesometrial. Esta estrutura é peculiar a roedores, transiente, formada exclusivamente por células trofoblásticas e relacionada com a interação materno-fetal; muitos a denominam também de pré-placenta.

As células mais periféricas desta região também se diferenciam em células gigantes e são denominadas de células trofoblásticas secundárias (KAUFMANN, 1983). Estas células participam do processo de implantação embrionária na região mesometrial, enquanto que as células proliferativas, em contato com o embrioblasto contribuirão, em estágios subseqüentes, da formação dos diferentes tipos celulares da porção fetal da placenta (GARDNER et al., 1973).

O processo de diferenciação das células trofoblásticas gigantes primárias e secundárias não está associado apenas à implantação embrionária; inclui também a aquisição de inúmeras funções por parte destas células, tais como capacidade adesiva, fagocitária e endócrina como a biosíntese de hormônios peptídeos e esteróides capazes de redirecionar o sistema hormonal materno (SOARES et al., 1991, 1993), produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (RUTANEN, 1993; LIN et al., 1993) e participação nos mecanismos que impedem a rejeição fetal (GUILBERT et al., 1993) entre outros.

A partir desta fase pós-implantacional e durante toda a gestação, células trofoblásticas gigantes primárias e secundárias e células endometriais (decídua, vasos, células imunológicas e de defesa, etc...) lado a lado, tornam-se componentes ativos da interface materno-fetal, regulando e adequando este meio ambiente para o adequado progresso da gestação.

3.3 Citocinas e o paradigma gestacional Th1/Th2

Citocinas são importantes moléculas efetoras e reguladoras da resposta imunológica (GOSAIN e GAMELLI, 2005). Estas moléculas podem ser classificadas por diferentes padrões de acordo com a sua função e uma divisão bastante comum é o paradigma T auxiliador (T helper, Th) 1 /T auxiliador (Th) 2 que foi descrito pela primeira por Mosmann e colaboradores (1986).

De acordo com estes autores os dois maiores subtipos de células T CD4+, Th1 e Th2, apresentam diferentes padrões de produção de citocinas e possuem papéis distintos na resposta imunológica. Células Th1 murinas secretam interleucina IL-2, IFN- γ e TNF- α/β e direcionam uma resposta imunológica do tipo inflamatória contra patógenos intracelulares (MOSNANN et al., 1986; MOSMANN e COFFMAN, 1989; RAGHUPATHY, 2001). Estas citocinas estimulam a fagocitose de células infectadas pela ativação de macrófagos, desencadeiam a produção de anticorpos e ativam o sistema complemento que contribui com a opsonização das partículas a serem fagocitadas (MOSMANN et al., 1986; RAGHUPATHY, 2001).

Por outro lado, linfócitos Th2 secretam IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e medeiam uma defesa humoral, antiinflamatória, estimulando a produção de anticorpos contra antígenos extracelulares; por outro lado, também inibem as funções macrofágicas (RAGHUPATHY, 2001).

O conceito Th1/Th2, amplamente utilizado por pesquisadores durante anos, no entanto, é bastante complexo. Os dois maiores antagonistas destas classes de citocinas, IFN- γ e IL-4, representam dois tipos distintos de reações imunológicas, contrabalanceando um ao outro (GUSTAFSSON, 2007). Outro exemplo disso é a IL-10, um produto das células Th2 que inibe o desenvolvimento de células Th1, enquanto que o IFN- γ , um produto das células Th1, previne a ativação das células Th2 (RAGHUPATHY, 2001). Dessa forma, as células Th1 e Th2 são mutuamente inibitórias (**Fig. 1**).

O padrão de resposta imunológica Th1 ou Th2, entretanto não é único. Recentemente outros padrões com produção específica de citocinas têm sido descritos, tais como a resposta imunológica do tipo Th3 e Tr1 (BORREGO et al., 2007). As células Th3 são aquelas que secretam TGF- β , IL-4 e IL-10 enquanto as células Tr(reguladoras)1 secretam níveis elevados de IL-10, IFN- γ , TGF- β e IL-5 e baixos níveis de IL-2; estas células não secretam IL-4 (LAN et al., 2005).

Outra maneira de se classificar as citocinas é considerando-se sua participação nos processos inflamatórios. Neste contexto, as citocinas podem ser pró-inflamatórias ou antiinflamatórias. As pró-inflamatórias incluem aquelas que levam à produção de óxido nítrico, prostanóides e leucotrienos (DINARELLO, 2000) tipicamente estimulados pelo IFN- γ , TNF- α e IL-1. As citocinas antiinflamatórias, como o TGF- β e a IL-10, por outro lado, inibem as funções agressivas de macrófagos e outras células imunológicas e estão geralmente relacionadas com a imunidade humoral e tolerância fetal (DINARELLO, 2000).

3.4 Citocinas na gestação

Do ponto de vista imunológico a gestação somente é possível porque uma intrincada rede imunorreguladora é ativada, com o objetivo único de desenvolver um estado de tolerância materno-fetal e permitir a implantação e manutenção do conceito, geneticamente diferente do organismo materno, até o momento do parto. Citocinas e quimiocinas desempenham um papel importante nesta adaptação imunológica e nos processos de remodelamento tecidual que são essenciais para o progresso da gestação (GOSAIN e GAMELLI, 2005); elas medeiam a comunicação intercelular, controlam o recrutamento e a proliferação de leucócitos e, coordenam uma resposta imunológica apropriada para a gestação (ROBERTSON, 2007).

Uma variedade de citocinas e seus receptores são expressos pelos diferentes tipos celulares presentes nos tecidos uterinos e placentários, ao longo da gestação (SALAMONSEN et al., 2000; DIMITRIADIS et al., 2005). São geralmente produzidas por macrófagos, linfócitos, células NK uterinas, células decíduais e pelas próprias células trofoblásticas, por meio de complexas vias de *feedback* positivo ou negativo, controlando o nível de ativação inflamatória nesse microambiente (MICHELON et al., 2006; DIMITRIADIS et al., 2005).

Em camundongos, citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) são detectáveis na interface materno-fetal durante todo o período gestacional, enquanto que IFN- γ , uma citocina Th1, é transiente, sendo detectada apenas na primeira metade da gestação (LIN et al., 1993; PICCINNI, 2002). Com base neste perfil de citocinas durante a gestação Wegmann e colaboradores (1993) hipotetizaram a existência de uma interação entre o sistema imunológico materno e o sistema reprodutivo, onde o sucesso da gestação dependeria de um padrão prevalente do tipo Th2. Este perfil atenuaria a resposta imunológica celular mediada por linfócitos Th1, cuja ação citotóxica poderia ter efeitos deletérios na placenta, embrião e/ou feto em desenvolvimento (JARVIS et al., 1996).

O controle da imunidade celular mediada por Th1 assim como da produção de citocinas inflamatórias (por exemplo: IFN- γ , TNF- α e IL-1) é uma das funções atribuída a IL-10 (LIN et al., 1993; CHAOUAT et al., 1995). A presença desta molécula sinalizadora caracteriza um ambiente tipicamente antiinflamatório (Th2) e potencializa a manutenção deste padrão na medida em que ativa a produção de outras citocinas Th2. Por outro lado, IL-10 desempenha funções de vital importância na interface materno-fetal. Camundongos deficientes de IL-10 apresentam altos níveis de perdas gestacionais que podem ser revertidos com a administração exógena de IL-10 (CHAOUAT et al., 1995).

Paradoxalmente, citocinas Th1, como o IFN- γ e o TNF- α , também são observadas nas gestações normais. No entanto, a tolerância a estas citocinas é limitada. Acima destes limites estas citocinas contribuem para taxas significativas de perdas fetais (HANNA et al., 2000). Exemplificam esta condição casos em que ocorrem infecções patogênicas como a *Leishmania major* e o *Toxoplasma gondii* durante a gestação; estes patógenos induzem a um aumento na produção de citocinas inflamatórias, especialmente IFN- γ e TNF- α , elevando consideravelmente

as taxas de perdas fetais. Estes índices também são revertidos pela administração de IL-10 (KRISHNAN et al., 1996; STAHI et al., 1994).

3.5 Interleucina (IL)-10

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica reconhecida por sua atividade inibitória sobre uma variedade de funções imunológicas exercendo efeitos antiinflamatórios sobre macrófagos e células dendríticas e por diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1, IL-6 (MOORE et al., 1993; Mosmann, 1994). IL-10 também pode suprimir a habilidade das células apresentadoras de antígenos (APCs) para iniciar uma resposta imunológica adaptativa por meio da inibição de moléculas da superfície celular como as de histocompatibilidade (MHC) de classe II, CD40 e B7 (HO e MOORE, 1994). Embora a IL-10 tenha sido inicialmente descrita como uma citocina produzida exclusivamente por células Th2 (FIORENTINO et al., 1989), estudos recentes mostraram que pode ser secretada por uma variedade de tipos celulares inclusive por células Th1 (TRINCHIERI, 2007).

Em humanos, a expressão de IL-10 durante a gestação foi observada no miométrio e na cérvix (SALLINEN et al., 2000) e associada à inibição da expressão de metaloproteinases, que regulam a invasão trofoblástica (ROTH e FISHER, 1999). Em camundongos, IL-10 está presente na interface materno-fetal, sendo expressa por células decíduais ao longo de toda a gestação (LIN et al., 1993) e por células placentárias durante a primeira metade da gestação (CHAUOUAT et al., 1999). Camundongos mutantes para o gene IL-10 apresentam modificações placentárias, tais como um relevante aumento da região do labirinto, indicando que IL-10 pode também desempenhar funções morfogênicas específicas na placenta (ROBERTS et al., 2003); em associação, o crescimento intra-uterino e pós-natal da progênie também sofre sérias consequências (WHITE et al., 2004).

A via de ativação mediada por IL-10 inclui a ligação desta citocina ao seu receptor, que é composto por duas cadeias polipeptídicas (IL-10R1 e IL-10R2) (ZDANOV, 2004). A citocina se liga inicialmente a cadeia IL-10R1 que imediatamente recruta a subunidade IL-10R2 formando o complexo estável citocina-receptor e, desencadeando, desta forma, a transdução do sinal. A ligação IL-10 – receptor envolve a fosforilação e ativação de quinases específicas do tipo Janus 1 (JAK) associadas a subunidade IL-10R1 e de tirosinas quinases (Tyk2) acopladas ao

IL-10R2 (DONNELLY et al., 2004). Esta fosforilação ativa o fator transdutor e ativador de transcrição 3 (STAT 3) que se transloca para o núcleo e ativa a expressão de genes responsivos a IL-10 (DONNELLY et al., 2004; MURRAY, 2006).

3.6 Interferon (IFN)- γ

O IFN- γ foi identificado pela primeira vez por Isaacs e Lindenmann (1957) como uma substância capaz de proteger as células de infecções virais. Na verdade, esta citocina pertence a uma família de interferons com atividades antivirais, secretados por diferentes tipos celulares em resposta a uma variedade de estímulos. Os interferons podem ser classificados em tipo I (IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- σ IFN- τ , IFN- κ e IFN- ω) e tipo II (IFN- γ) (PESTKA et al., 2004).

Particularmente o IFN- γ ou fator de ativação de macrófagos é uma citocina potencialmente pró-inflamatória que está envolvida com: mecanismos de defesa, estabelecimento de processos inflamatórios e auto-imunidade, controle de programas fagocitários, bactericidas e tumoricidas em monócitos/macrófagos, expressão de antígenos de histocompatibilidade (MHC) classe II, produção de mediadores derivados de macrófagos tais como o TNF- α , IL-1, IL-12 e NO e, regulação negativa da síntese de mediadores antiinflamatórios tais como a IL-10 (FARRAR e SCHREIBER, 1993; EL-HASHEMITE et al., 2004).

Freqüentemente referido como abortivo, o IFN- γ em níveis bastante aumentados pode ativar células NK uterinas, que liberam fatores diversos e causam danos irreversíveis ao trofoblasto (LIN et al., 1993). *In vitro*, células NK uterinas de ratos e camundongos produzem IFN- γ . Ain e colaboradores (2003) mostraram que *in vitro* o IFN- γ é capaz de inibir o crescimento do trofoblasto murino e Lash et al. (2006b) que o IFN- γ pode inibir a invasão do trofoblasto humano extraviloso, na medida em que diminui a expressão de metaloproteinases do tipo 2 (LASH et al., 2006b).

Por outro lado, estudos recentes também mostram que o IFN- γ em níveis fisiológicos pode exercer efeitos importantes durante a gestação. Na decídua, a remodelação dos vasos arteriais que diminui a resistência vascular e permite um fluxo sanguíneo estável durante a gestação é uma das funções atribuídas à presença de IFN- γ na interface materno-fetal (MONK et al., 2005; ASHKAR et al., 2000). Ainda nestes locais, uma estreita associação entre a produção de IFN- γ

pelas células NK uterinas e angiogênese uterina tem sido demonstrada por Lash e colaboradores (2006a). Particularmente em relação às células trofoblásticas também tem sido demonstrado que o IFN- γ pode induzir diferenciação (ATHANASSAKIS et al., 2000), atividade fagocítica (ALBIERI et al., 2005) e citolítica (AMARANTE-PAFFARO et al., 2004) e expressão gênica de outras moléculas de regulação imunológica, assim como a expressão de enzimas do metabolismo do triptofano (IDO) relacionadas a mecanismos de proteção (KUDO e BOYD, 2000).

A ação do IFN- γ ocorre via interação desta citocina com as subunidades α e β do seu receptor, o que também leva à ativação de Janus quinases (JAK1) e (JAK2) e fosforilação de STAT1, alterando a atividade transcripcional celular (DARNELL et al., 1994, 1998).

Sob condições infecciosas, a produção de IFN- γ por células imunocompetentes é controlada por citocinas derivadas de macrófagos tais como: TNF- α , IL-10, IL-12 e IL-18. Particularmente importante neste mecanismo de controle é a ação da IL-10 e seu potencial para inibir a formação de células produtoras de IFN- γ .

3.7 Argumentação deste estudo

Depreende-se a partir dos dados da literatura que a interface materno-fetal depende de um delicado balanço entre citocinas Th1 e Th2 para o sucesso gestacional; que o aumento no perfil de determinadas citocinas tais como IL-10 e IFN- γ podem ser sentidas no meio ambiente como indicativo de uma resposta Th2 ou Th1, respectivamente e, desta forma, desencadear outras secreções e respostas associadas a estes padrões no sistema imunológico materno ou uterino local. No entanto, pouco se sabe a respeito da possível contribuição do trofoblasto na manutenção deste equilíbrio, ou mesmo, se estas células da interface materno-fetal de fato contribuem com esta homeostase. Desta maneira, tentando simular um ambiente Th1 com um tratamento com IFN- γ ou, Th2 com um tratamento com IL-10 analisamos a participação do trofoblasto na expressão de IL-10/IFN- γ na interface materno-fetal.

Partimos da hipótese de que se o IFN- γ fosse capaz de regular positivamente a produção de IL-10 nas células trofoblásticas, isto poderia ser um dispositivo adaptativo para criar um ambiente Th2 favorável ao desenvolvimento fetal na

interface materno-fetal em situações em que esta citocina está aumentada. Ao contrário, se IFN- γ é relevante para a adaptação fetal no ambiente uterino, um desvio para secreções Th2, poderia levar a produção de IFN- γ .

Estas respostas podem vir a auxiliar na compreensão dos mecanismos de adaptação da placenta a diferentes padrões de respostas imunológicas que podem ocorrer no organismo materno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes, abreviaturas e procedência

Amresco Inc (Solon, OH, EUA): glicina; **BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, MA, EUA):** MitoTM; **BD Biosciense Pharmingen (San Diego, CA, EUA):** anticorpo monoclonal, IgG de rato anti-IL-10 de camundongo; **Cultilab (Campinas, SP, Brasil):** Soro bovino fetal; **Gobco BRL Lab. (Rockville, MD, EUA):** ácido láctico, aminoácidos não-essenciais, glicogênio, cloreto de cálcio; **Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA):** agarose, EDTA, brometo de etídio, ditiotretitol (DTT), dietil pirocarbonato (DEPC), *DNA Ladder* 100 pares de bases (pb), deoxirribonuclease I (DNase I), deoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTPs: dATP, dCTP, dTTP, dGTP), oligonucleotídeo (Oligo-dT); ácido 3-(N-morfolino)-propano sulfônico (MOPS), *SuperScriptTM II Reverse Transcriptase* (RT), dodecil sulfato de sódio (SDS), Taq DNA polimerase, TRizol®; **Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha):** azul de bromofenol, acetato de sódio, ácido clorídrico, cloreto de sódio, clorofórmio, etanol, xilol, formaldeído, Histosec®, isopropanol, metanol; **Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA):** anticorpo policlonal IgG de coelho anti IL-10R1 de camundongo; anticorpo monoclonal, IgG de rato anti-IFN- γ de camundongo; anticorpo monoclonal, IgG de hamster anti-IFN- γ R α e IFN- γ R β de camundongo, IgG de cabra anti-hamster conjugado com fosfatase alcalina; **Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA):** albumina sérica bovina (BSA), piruvato de sódio, lactato de cálcio, estreptomicina, Kit revelador Fast red TR/Naphtol AS-MX, glicerol, L-glutamina, periodato de sódio, guanosina, insulina, interferon-gama recombinante de camundongo (rIFN- γ), meio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM), Lisina, paraformaldeído, penicilina G, poli-L-lisina, tampão fosfato salina (PBS), Tris; **Vector Inc. (Burlingame, CA, EUA):** IgG de cabra biotinilado anti-IgG de rato, IgG de cabra anti- IgG de coelho biotinilado.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem CD-1 (*Mus musculus domesticus*) procedentes do Biotério da Universidade Estadual de Campinas, com aproximadamente dois meses de idade. Durante o período experimental os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP, onde foram submetidos a um regime de água e ração granulada *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, submetidos e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 140 fls 23).

4.3 Acasalamento

Para obtenção das células trofoblásticas, fêmeas virgens foram colocadas nas gaiolas dos machos na proporção de duas fêmeas para cada macho ou uma fêmea para cada macho. A constatação da cópula se fez pela presença de rolha vaginal na manhã do dia seguinte, sendo esta então considerada a metade do primeiro dia de gestação (ddg).

4.4 Obtenção de células trofoblásticas

No dia 7,5 de gestação, as fêmeas foram sacrificadas por deslocamento cervical e seus úteros com os sítios de implantação removidos e imediatamente colocados em 0,1 M tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,2 acrescido de 10% soro bovino fetal (SBF), a 36,5 °C.

A coleta de cones ectoplacentários foi realizada de acordo com a metodologia de Hinderstein e colaboradores (1972), sob estereomicroscópio e com o auxílio de tesouras e bisturis oftalmológicos. Resumidamente, cada sítio de implantação foi isolado através de uma incisão mediana de modo a expor o embrião em toda a sua extensão. Este foi em seguida isolado dos demais tecidos maternos, tomando-se o cuidado de não lesar as células trofoblásticas.

Os cones ectoplacentários, estruturas formadas exclusivamente por células trofoblásticas, foram obtidos a partir de uma incisão, na altura da cavidade

ectoplacentária, dos embriões inteiros, de modo a não seccionar estruturas pertencentes ao embrioblasto. Durante todo o procedimento o material permaneceu em PBS contendo 10% soro bovino fetal (SBF) estéril e aquecido a 36,5 °C, sob placa térmica.

4.5 Culturas primárias de células trofoblásticas

Os cones ectoplacentários recém coletados foram utilizados como fonte de células trofoblásticas para cultivo. Estes foram colocados sob fluxo laminar onde passaram por sucessivas lavagens em PBS-SBF e finalmente em meio DMEM, sendo então transferidos para placas de culturas de 24 poços contendo lamínulas de vidro (13 mm). Os poços foram completados com 500 µL de meio de cultura DMEM suplementado com SBF (20%), piruvato de sódio (0,05 mg/mL), lactato de cálcio (0,5 mg/mL), aminoácidos não essenciais (1%), insulina (0,2 µg/mL), BSA (4 mg/mL), Mito™ (0,2 ng/mL) e os antibióticos penicilina (50 UI/mL) e estreptomicina (0,05 mg/mL).

Os cones ectoplacentários foram mantidos por 48 h sob condições normais de cultura, a 36,5 °C, em ar contendo 5% de CO₂ e em atmosfera úmida para permitir a adesão e o espraçamento das células trofoblásticas às placas. Esta etapa foi acompanhada por meio de observação periódica em microscópio de luz invertida, equipado com um sistema de contraste de fase (Zeiss Axiovert S100). Durante este período novos volumes de meio foram adicionados quando necessário.

Ao término deste período o meio foi substituído por outro contendo ou não citocinas. Para isto, parte das amostras contendo as células trofoblásticas foi submetida ao tratamento com 100 U/mL IFN-γ recombinante de camundongo, parte com 10 ng/mL IL-10 recombinante de camundongo e parte recebeu apenas meio de cultura convencional (controle). Estas amostras permaneceram por 6h adicionais em cultura. Após este período as amostras foram removidas da cultura lavadas com meio de cultura sem citocina e preparadas para a determinação de expressões gênicas ou para reações imunohistoquímicas.

4.6 Análise da expressão gênica por RT-PCR

Para a análise da expressão gênica de cada grupo experimental foram utilizados pelo menos 3 *pools* de amostras, sendo que cada uma continha cerca de 100 cones ectoplacentários cultivados. O RNA total foi então extraído e quantificado isoladamente conforme descrito a seguir.

4.6.1 Extração de RNA total das células trofoblásticas cultivadas

O RNA total obtido de cada *pool* de cada amostra foi extraído utilizando-se a metodologia do tiocianato de guanidina (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987), empregando-se o reagente TRIzol®. Para isto, os cones ectoplacentários foram homogeneizados com 1,0 mL de TRIzol e incubados a temperatura ambiente por 5min. As amostras receberam então 200 µL de clorofórmio, foram incubadas por mais 15min a 4 °C e finalmente centrifugadas a 12.000 g por 15min a 4 °C.

Após a centrifugação formaram-se 3 fases: uma fase orgânica no fundo do tubo, uma interfase, e uma fase aquosa superior. O RNA, contido na fase aquosa, foi transferido para outro tubo, precipitado pela adição de 0,5 mL de isopropanol gelado e acrescido de 1 mg/mL glicogênio. Estas amostras foram incubadas a -80 °C e após 3h foram novamente centrifugadas a 12.000 g por 15min a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento formado lavado em 75% etanol em água livre de RNase, tratada com 0,1% dietil pirocarbonato (DEPC). Em seguida o material foi centrifugado a 8.000 g por 5min a 4 °C e o sobrenadante obtido foi novamente descartado.

O sedimento foi seco a temperatura ambiente por 10min e em seguida re-suspendido em 15 µL de água tratada com 0,1% DEPC. Após este processo, as amostras foram incubadas a 60 °C por 10min e quantificadas.

4.6.2 Quantificação do RNA

A quantificação do RNA foi realizada em duplicata diluindo-se as amostras na razão de 2:50 em água DEPC. A absorbância da amostra foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm (correspondente ao pico de absorção de RNA) e 280 nm (correspondente ao pico de absorção de proteínas). Para a quantificação do RNA considerou-se 1 OD (260 nm) igual a 40 µg/mL. Para a

análise da pureza do RNA, a relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas. As amostras utilizadas apresentaram razão igual ou superior a 1,80 (SAMBROOK et al., 1989).

4.6.3 Avaliação da integridade do RNA

A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose desnaturante. O tampão utilizado para a separação eletroforética do RNA foi o MOPS (ácido 3-[N-morfolino]-propano sulfônico), pH 7,0.

Para isto, preparou-se um gel de agarose a 1% em água DEPC, tampão MOPS 10X pH 7,0 e 4% formaldeído. Verteu-se então o material em cuba eletroforética (Horizon 11.14 Electrophoresis System, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA) previamente tratada com água DEPC para eliminar possíveis contaminações com RNase. Após o resfriamento, adicionou-se o tampão de corrida (20 mM MOPS acrescido de 8% formaldeído).

As amostras (1 µg de RNA) foram diluídas em tampão de amostra (63 µL de água deionizada, 81 µL de formaldeído 37%, 48 µL de glicerol – azul de bromofenol, 48 µL de MOPS 10X, 0,5 µL de brometo de etídeo 0,5 µg/mL), e então desnaturadas a 70 °C, por 10min.

Após a desnaturação, as amostras foram transferidas para o gelo, resfriadas por 2min e em seguida aplicadas ao gel. Todas as corridas eletroforéticas foram realizadas a 90 V por 1h utilizando-se uma fonte Gibco BRL (Electrophoresis Power Supply model 250, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA).

Após a eletroforese o aparecimento das bandas foi verificado por exposição do gel à luz ultravioleta em transiluminador GBOX Chemi HR (Syngene, Frederick, MD, EUA). Amostras íntegras de RNA apresentaram duas bandas intensas facilmente visíveis, correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S (**Fig. 3**). Os resultados foram foto-documentados por meio do programa *GeneSnap* (Syngene, Frederick, MD, EUA).

4.6.4 Síntese do cDNA

Para a remoção do DNA genômico, o RNA total extraído foi incubado por 15min em uma solução contendo: 2 µL DNase I, 2 µL solução tampão DNase 10X e

água-DEPC para um volume final de 20 µL. O bloqueio da reação foi realizado com 25 mM EDTA, por 10min, a 65 °C.

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada por meio da incubação de 0,5 µg RNA total tratado com DNase na presença de 1 µL de Oligo-dT (0,05 µg/µL), 1 µL de transcriptase reversa (*SuperScript™ II Reverse Transcriptase*) e água-DEPC para um volume final de 20 µL, por 10 min a 70 °C, por 50min a 42 °C, e por 15min a 70 °C no termociclador Bio-Rad Gene Cycler™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). O cDNA foi fracionado em gel de agarose a 1%, corado com 0,5 µg/mL brometo de etídio e visualizado em transiluminador. O cDNA foi amplificado utilizando-se 1 µL da enzima Taq DNA polimerase 2,5 U, MgCl₂ a 1,5 mM, dNTPs Mix a 0,2 mM e as oligossondas específicas (10 pmol/µL): IL-10, IL-10R1, IFN-γ, IFN-γRα, IFN-γRβ. Para semiquantificação do PCR a ciclofilina foi utilizada como gene controle (**Tabela 1**).

Tabela 1: Lista das seqüências de oligonucleotídeos (*primers sense e antisense*) para os genes estudados e os comprimentos dos fragmentos do produto do RT-PCR (pb)

<i>Genes</i>	<i>Primer sense</i>	<i>Primer antisense</i>	<i>Pb</i>
IL-10	5'-CTGGACAACATACTGCTAACCGAC-3'	5'-ATTCATTTCATGGCCTTGCTAGACACC-3'	277
IFN-γ	5'-CTCATGGCTGTTTCTGGCTGTTA-3'	5'-GACGCTTATGTTGTTGCTGATGG-3'	240
IL-10R1	5'-AGCAGAGGCAGCAGGCCAGCAGATGCT-3'	5'-TGGAGCCTGGCTAGCTGGTCACAGTAGGTC-3'	506
IFN-γ Rα	5' CGGTCGAAAAAGAAGAGTGTA-3'	5'-TCGGGAGTGATAGGCGGTGAG-3'	610
IFN-γ Rβ	5' TACACTTCTCCCCTCCCTTTG-3'	5'-ACATCATCTCGGTCCTTTTCT-3'	528
Ciclofilina	5'-CTTGCTGCAGACATGGTC-3'	5'-GCAATCCTGCTAGACTTG-3'	660

A padronização para a escolha dos ciclos de amplificação para os *primers* da **Tabela 1** foi realizada através de uma curva de ciclagem (25 a 45 ciclos), no qual se escolheu a fase em que estes se encontravam ainda em crescimento exponencial (ou seja equivalente ao número de ciclos que antecedeu ao platô da curva exponencial) (**Fig. 4 A-F**). Por se tratar de genes distintos a amplificação do cDNA para cada *primer* ocorreu como mostra a **Tabela 2**, ou seja: 30 ciclos para a ciclofilina, 38 ciclos para IL-10 e IFN-γ, 35 ciclos para IL-10R1 e IFN-γRβ e 33 ciclos para IFN-γRα.

A análise dos produtos amplificados por PCR foi realizada em gel de agarose a 1%, utilizando-se um marcador de peso molecular de DNA (*DNA Ladder*) de 100 pares de bases. O gel foi corado com o 0,5 µg/mL brometo de etídio para

visualização da imagem em transiluminador e posterior captura utilizando o programa *GeneSnap* (Syngene, Frederick, MD, EUA). As imagens foram processadas e semiquantificadas pelo programa *GeneTools* (Syngene, Frederick, MD, EUA).

Tabela 2: Padrões de amplificação dos cDNAs dos genes estudados

Genes	Padrões de ciclagem	Número de ciclos
IL-10	60s a 94°C, 60s a 62°C, 60s a 72°C	38
IFN- γ	30s a 95°C, 30s a 57°C, 60s a 72°C	38
IL-10R1	50s a 94°C, 45s a 59°C, 60s a 72°C	35
IFN- γ R α	30s a 94°C, 30s a 60°C, 60s a 72°C	33
IFN- γ R β	45s a 94°C, 35s a 60°C, 60s a 72°C	35
Ciclofilina	30s a 94°C, 50s a 58°C, 60s a 72°C	30

Para a semiquantificação a intensidade de cada banda do gel foi convertida em valores numéricos através de difração óptica e a conversão destes valores foi realizada pelo programa *GeneTools*. Uma vez convertidos em valores numéricos, os dados foram transformados em unidades arbitrárias (U.A). Para tal realizou-se a seguinte equação:

Grupo controle

$$U.A = \frac{\text{Valor gene}}{\text{Ciclofilina controle}}$$

Grupo tratado com IFN- γ

$$U.A = \frac{\text{Valor gene}}{\text{Ciclofilina tratada}}$$

Após a transformação dos dados em unidades arbitrárias os dados dos grupos controle e experimentais foram comparados utilizando a análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas foram analisadas pelo teste de Tukey, em $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos utilizando-se como referência a média de cada grupo ($\pm$ DP), onde o $n = 4$.

4.7 Análise da expressão protéica por imunohistoquímica

Após o período de cultura para a adesão das células trofoblásticas às lamínulas os cones ectoplacentários foram submetidos ou não (controle) ao tratamento com IFN- γ 100 U/mL ou IL-10 10 ng/mL.

Após 14h de incubação, as culturas tratadas e controles foram previamente lavadas com PBS estéril e posteriormente fixadas com PLP (paraformaldeído-lisina-periodato de sódio) pH 7,2 (MCLEAN e NAKANE, 1974), por 20min a temperatura ambiente, seguida de lavagens em 0,02 M tampão TRIS-salina (TBS).

Para permeabilização, as células fixadas foram incubadas por 10min em metanol à -20°C . A inibição da fosfatase alcalina endógena foi realizada por tratamento com 10% ácido acético em TBS por 10min e o bloqueio de ligações não específicas obtido incubando-se as amostras em uma solução contendo 5% BSA, 0,2% glicina e 0,05% saponina em TBS, pH 8,2, por 1h, a 37°C . A incubação com os anticorpos primários procedeu-se *overnight* a 4°C , em câmara úmida, utilizando-se os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal, IgG de rato anti-IL-10 de camundongo (BD PharmingenTM, San Diego, CA, EUA; diluição: 1:50 em TBS), anticorpo monoclonal, IgG de rato anti-IFN- γ de camundongo (Sigma Chemical CO., MO, USA), anticorpo policlonal, IgG de coelho anti-IL-10R1 de camundongo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; diluição: 1:50 em TBS), anticorpo monoclonal, IgG de hamster anti-IFN- γ R α e IFN- γ R β de camundongo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; diluição: 1:50 em TBS). Anticorpos secundários biotinilados espécie-específicos foram aplicados e a imunorreatividade visualizada utilizando-se o sistema avidina-biotina fosfatase alcalina (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA). Como anticorpos secundários foram utilizados os anticorpos IgG de cabra anti-coelho biotinilado para IL-10R1 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA, 1:50 em TBS) e ; IgG de cabra anti-rato biotinilado para IL-10 e IFN- γ (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA, 1:50 em TBS); IgG de cabra anti-hamster conjugado com fosfatase alcalina para IFN- γ R α e IFN- γ R β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; 1:50 em TBS). A fosfatase alcalina foi revelada utilizando-se o kit revelador *fast red* TR/Naftol AS-MX (Sigma Chemical Co. Saint Louis, MI, EUA) e os núcleos contracolorados com Hematoxilina de Mayer. Após a montagem das lâminas o material foi visualizado e fotografado em microscópio de luz acoplado a uma câmera digital Nikon Coolpix 5000 (Nikon Corporation, Tokyo, Japão). Em paralelo, realizaram-se reações-controle negativo, onde o anticorpo primário foi omitido.

4.8 Avaliação dos anticorpos

Para comprovar a viabilidades dos anticorpos comerciais foram realizadas análises imunohistoquímicas em tecidos que expressam constitutivamente as proteínas de interesse. Fêmeas aos 7.5 dias de gestação tiveram seu baço e pulmões retirados e imediatamente fixados em formalina 10%. Após 24h de fixação o material foi processado para inclusão em parafina de acordo com o protocolo adotado pelo laboratório. O material foi seccionado, afixado em lâminas histológicas e desparafinizado em banhos seqüentes de xilol. Após esta etapa fez-se a reidratação do material o através de banhos com diferentes concentrações de etanol. Seguiu-se então o processamento do material para as reações de imunohistoquímica adotando o protocolo de rotina do laboratório. Foram testadas a viabilidades dos seguintes anticorpos primários: anticorpo monoclonal, IgG de rato anti-IL-10 de camundongo (BD PharmingenTM, San Diego, CA, EUA; diluição: 1:50 em TBS), anticorpo monoclonal, IgG de rato anti-IFN- γ de camundongo (Sigma Chemical CO., MO, USA), anticorpo policlonal, IgG de coelho anti-IL-10R1 de camundongo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; diluição: 1:50 em TBS), anticorpo monoclonal, IgG de hamster anti-IFN- γ R α e IFN- γ R β de camudongo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA; diluição: 1:50 em TBS). Os anticorpos secundários utilizados na reação imune de cones ectoplacentários também foram usados neste experimento. As análises dos anticorpos para IFN- γ , IL-10 e IL-10R1 foi realizada no tecido pulmonar que os receptores de IFN- γ (IFN- γ R α e IFN- γ R β) tiveram suas análises feitas em cortes de baço.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das células trofoblásticas

Cones ectoplacentários de camundongos, obtidos aos 7.5 dias de gestação e cultivados exibiram uma região central formada por um aglomerado de células de pequenas dimensões e células espiçadas irradiando a partir desta estrutura, com maiores dimensões nucleares e citoplasmáticas, as células trofoblásticas gigantes. Esta morfologia das células trofoblásticas está de acordo com as observações de Hoshida e colaboradores (2007).

A morfologia das células que receberam tratamento experimental (IFN- γ 100 U/mL ou IL-10 10ng/mL) não apresentou diferenças relevantes em relação às células que não receberam tratamento (controle).

5.2 Expressão de IL-10 e IFN- γ e seus receptores pelas células trofoblásticas

5.2.1 Expressão gênica

A análise das amostras por RT-PCR mostrou que as células trofoblásticas de camundongo em condições normais expressam RNAm para IL-10 e IFN- γ e seus respectivos receptores IL-10R1, IFN- γ R α e IFN- γ R β . Estes níveis de expressão apresentaram alterações significativas quando as células trofoblásticas foram submetidas ao tratamento com IFN- γ ou IL-10.

Através da análise semiquantitativa, utilizando a ciclofilina como gene de referência foi possível observar que na presença de IFN- γ a expressão gênica de IL-10 não sofre alterações significativas (**Fig. 5A**), no entanto, os níveis de IL-10R1 foram significativamente maiores atingindo níveis extremos ($p<0,005$) (**Fig. 5B**). Diferentemente, na presença de IL-10, as células trofoblásticas aumentam consideravelmente ($p<0,005$) os níveis de expressão gênica para IFN- γ (**Fig. 6A**) e diminui os níveis de IFN- γ R α (**Fig. 6 B**) e IFN- γ R β (**Fig. 6C**).

5.2.2 Expressão protéica

As proteínas IL-10, IFN- γ , IFN- γ R α e IFN- γ R β foram imunolocalizadas em todas as amostras analisadas, tratadas ou não com IFN- γ ou IL-10. A reação foi

sempre citoplasmática e a região celular de maior reatividade foi a região perinuclear.

As células do cone ectoplacentário e, especialmente, as células trofoblásticas gigantes mais periféricas mostraram-se mais reativas ao anticorpo anti-IL-10R1 quando tratadas com IFN- γ (**Fig. 8 B-C**) do que as amostras não tratadas (**8 A-D**). Embora nenhum método quantitativo tenha sido utilizado, claramente observamos que o número de células reativas a este anticorpo foi maior nas amostras tratadas. Em relação à reatividade para IL-10, não se observou alterações dignas de nota nas amostras tratadas com IFN- γ .

Preparados histológicos de pulmão, repletos de células imunológicas serviram de controle positivo para a reação de IL-10, IL-10R1 e IFN- γ (**Fig 7, 8, 10 e 11 D e E; e fig. 9 D**), assim como nas reações em que o anticorpo primário foi omitido (**Figs. 7, 8 e 9 1 A**). Existem relatos de que o IFN- γ e IL-10 estão presentes nos fluidos pulmonares atuando, provavelmente, na resposta imune local. Preparados histológicos em cortes de baço também foram utilizados como controle positivo, porém, apenas para os receptores de IFN- γ (**Fig 10 e 11 D**).

A imunolocalização de IFN- γ e seu receptores nas amostras tratadas com IL-10 mostrou uma intensidade maior nas células que receberam IL-10 (**Fig. 9 C**) quando comparadas com as que não receberam (**Fig. 9 B**). A marcação para as cadeias alfa e beta do receptor de IFN- γ (IFN- γ R α IFN- γ R β) não mostrou grande diferença de intensidade (**Figs 10 e 11 B-C**) como foi evidenciado nos outros grupos experimentais. Os resultados de imunohistoquímica de certa forma, foram condizentes com a expressão gênica apresentada neste trabalho sugerindo que talvez possa representar uma intensa atividades celular.

Figura 3: Gel de RNA a partir do RNA total extraído das células trofoblásticas de camundongos cultivadas por 48 horas na ausência (1) ou presença (2) de 100 U/mL IFN- γ e/ou 10 ng/mL IL-10. As bandas correspondem aos RNAs ribossômicos 28s e 18s.

Figura 4: Padronização do ensaio de RT-PCR para os *primers* de ciclofilina (A), IL-10 (B), IFN- γ (C), IL-10R (D), IFN- γ R α (E) e IFN- γ R β (F) utilizando cDNA de células trofoblásticas de camundongo. A padronização foi determinada a partir dos resultados obtidos com diferentes ciclos de PCR (25 a 45) conforme indicado nos géis. A representação gráfica representa medidas densitométricas em unidades arbitrárias (U.A) obtidas a partir da análise dos géis.

Figura 5: Expressão de IL-10 (**A**) e de seu receptor, IL-10R1 (**B**) nas células trofoblásticas de cones ectoplacentários tratados (+) ou não (-) com 100 U/mL IFN- γ . Géis representativos estão inseridos no lado direito da figura. Representação gráfica da análise semiquantitativa realizada por RT-PCR encontram-se a esquerda. Os valores foram expressos em unidades arbitrárias utilizando-se como referência a média ($n = 4$) de cada grupo ($\pm$ DP). (*) valores significativamente diferentes em relação ao controle ($p < 0,01$). **PM** – Padrão de peso molecular (100 pb).

Figura 6: Expressão de IFN- γ (**A**) e das cadeias α (IFN- γ R α , **B**) e β (IFN- γ R β , **C**), do seu receptor nas células trofoblásticas de cones ectoplacentários tratados ou não com 10 η g/mL IL-10. À esquerda, representação gráfica da quantificação densitométrica dos géis em unidades arbitrárias; os valores correspondem à média de cada grupo ($n=4$) ($\pm$ DP). (*) diferenças significativas em relação ao controle ($p<0,01$). À direita, géis representativos de cada um dos grupos experimentais. **PM** – Padrão de peso molecular 100 pb.

Figura 7: Imunolocalização de IL-10 nas células trofoblásticas cultivadas por 48 horas na ausência (**B**) e na presença (**C**) de 100 UI/mL IFN- γ . **A**, Controle negativo da reação imunológica em que o anticorpo primário foi omitido. **D**, controle positivo da reação realizada em cortes de pulmão de camundongo. Notar a presença de reatividade nas células trofoblásticas gigantes e em células de defesa pulmonares (**setas**). **CC**, centro do cone ectoplacentário e (*) células trofoblásticas gigantes espalhadas. Amostras contra-coradas com hematoxilina de Mayer ou verde metil. **A** e **E**, aumento 40 x; **B-C**, 100 x, **D**, 200 x.

Figura 8: Imunolocalização do receptor de IL-10, IL-10R1, em células trofoblásticas cultivadas por 48 horas na ausência (**B**) e na presença (**C**) de 100 UI/mL IFN- γ . **A**, Controle negativo da reação imunológica em que o anticorpo primário foi omitido. **D**, controle positivo da reação em cortes de pulmão de camundongo. Notar reatividade nas células trofoblásticas e no estroma pulmonar (**setas**). **CC**, centro do cone ectoplacentário e (*), células trofoblásticas gigantes espiadas. Contra-coloração com hematoxilina de Mayer ou verde metil. **A**, 40 x; **B-C**, 100 x, **D**, 40 x e **E**, 200 x.

Figura 9: Imunolocalização de IFN- γ nas células trofoblásticas cultivadas por 48 horas na ausência (**B**) e na presença (**C**) de 10 η g/mL IL-10. **A**, Controle negativo da reação imunológica em que o anticorpo primário foi omitido. **D**, controle positivo da reação em pulmão de camundongo. Notar a presença de reatividade nas células trofoblásticas e no tecido pulmonar marcados com uma coloração avermelhada (**setas**). **CC**, centro do cone ectoplacentário e (*), células trofoblásticas gigantes espalhadas. **A, D**, 100 x; **B**, 40 x; **C, E**, 200 x.

Figura 10: Imunolocalização de IFN- γ R α , em células trofoblásticas cultivadas por 48 horas na ausência (**B**) e na presença (**C**) de 10 ng/mL IL-10. **A**, Controle negativo da reação em que o anticorpo primário foi omitido. **D**, controle positivo da reação em baço de camundongo. Notar a presença de reatividade nas células trofoblásticas e esplênicas (**setas**). **CC**, centro do cone ectoplacentário e (*) células trofoblásticas gigantes espiadas. **A, D**, 100 x; **B-C**, 40 x; **E**, 400 x.

Figura 11: Imunolocalização de IFN- γ R β , em células trofoblásticas cultivadas por 48 horas na ausência (B) e na presença (C) de 10 ng/mL IL-10. A, Controle negativo da reação em que o anticorpo primário foi omitido. D, controle positivo da reação em baço de camundongo. Notar a presença de reatividade nas células trofoblásticas e esplênicas marcadas com uma coloração avermelhada (setas). CC, centro do cone ectoplacentário e (*) células trofoblásticas gigantes espalhadas. A-C, 100x; D, 200x e E, 400x.

6 DISCUSSÃO

A resposta imunológica materna é determinante para o sucesso da gestação; falhas nos mecanismos associados a este processo podem levar a inadequação do meio macro- e micro-ambiental da gestação e, conseqüentemente, a perdas fetais (LAIRD et al., 2003).

Neste contexto, muitos estudos têm mostrado a importância da produção de citocinas na interface materno-fetal assim como o efeito destas moléculas de sinalização para ambos, organismo materno e fetal, via placenta.

De modo geral, na interface materno-placentária coexistem moléculas de sinalização de ação pró- e/ou antiinflamatória com funções específicas e vitais no desenvolvimento de uma gestação normal. Por exemplo, a interleucina (IL)-3 e o fator de estimulação de colônia para granulócitos e monócitos (GM-CSF), ambos derivados de linfócitos T agem como fatores de crescimento para o trofoblasto murino e desta forma previnem abortos (ATHANASSAKIS et al., 1987; ARMSTRONG e CHAOUAT, 1989; CHAOUAT et al., 1990); da mesma forma, o fator estimulador de colônia do tipo 1 (CSF-1) que é expresso em altos níveis no útero gravídico também age sobre as células trofoblásticas e é essencial para a implantação e desenvolvimento fetal (POLLARD, 1987). Possivelmente, a citocina mais conhecida na interação materno-fetal é o fator inibidor de leucemia (LIF), um fator pró-inflamatório (Th1), produzido no útero e absolutamente necessário para a implantação em camundongos (STEWART et al., 1992). Ainda, produzidas pelo trofoblasto, podemos mencionar como exemplos a IL-12 e IL-18 associada a IL-10 (OSTOJIC et al., 2003), com ações tipicamente pró-inflamatórias, capazes de ativar células NKs e produção de IFN- γ (McMASTER et al., 1992; CAI et al., 1999) e, IL-11 e IL-13, que possuem ação antiinflamatória e são imprescindíveis para o processo implantacional (ROBB et al., 1998; CHOMARAT e BANCHEREAU, 1998).

Dentre as muitas citocinas produzidas ou de ação na interface materno-fetal, o IFN- γ , descrito como um dos principais responsáveis por perdas gestacionais em condições inflamatórias, a altas concentrações, tem despertado grande interesse nos últimos anos. Assim como o TNF- α e a IL-2, também citocinas inflamatórias, quando em níveis aumentados no soro materno ou mesmo na interface materno-fetal é considerado abortifaciente (TEZABWALA et al., 1986; CHAOUAT et al., 1990) e, portanto, deletério à gestação. No entanto, inúmeros estudos têm caracterizado a

presença desta citocina ao longo da gestação na interface materno-placentária (NAN et al., 2007; SACKS et al., 2001; WU et al., 2006). Inúmeras funções fisiológicas têm sido atribuídas a esta citocina, mas sem dúvida as mais importantes são: a remodelação vascular endometrial que permite o fluxo sanguíneo placentário (ASHKAR et al., 2000), a manutenção da decídua (REDLINE, 2000) e a ativação do trofoblasto para a fagocitose (ALBIERI et al., 2005).

Em diferentes modelos, a prevalência de padrões específicos de citocinas, particularmente do tipo Th2 é considerada uma característica específica da gestação para impedir a “rejeição” do feto no organismo materno. Moléculas de histocompatibilidade (MHC) estranhas ao organismo materno, como as oriundas do genoma paterno, presentes no feto, atuam como antígenos, produzindo respostas imunológicas potentes. No entanto, mamíferos grávidos não rejeitam estes antígenos MHC fetais, embora células trofoblásticas derivadas do feto sejam banhadas pelo sangue materno (ENTRICAN, 2002). Uma explicação plausível para este fenômeno recentemente explorada é a baixa expressão e limitado polimorfismo de moléculas MHC nas células trofoblásticas sob a influência preponderante de citocinas Th2, o que impede o reconhecimento destas células por linfócitos T CD8⁺ e NKs (ENTRICAN, 2002). Além da tolerância das células T CD8⁺ em relação às células trofoblásticas, em virtude da expressão de antígenos de histocompatibilidade existem outros fatores de tolerância. Células trofoblásticas humanas e de murinos expressam a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) que degrada o triptofano. A inibição desta enzima na placenta resulta em rejeição fetal, o que sugere que a IDO induz a tolerância de células T CD8⁺ ao MHC I fetal via privação do triptofano (MUNN et al., 1998; KUDO e BOYD, 2000).

Dentre as interleucinas antiinflamatórias que desempenham importantes papéis nos processos de modulação imunológica da gestação (MOORE et al., 2001), destaca-se a IL-10, que atua como reguladora central da resposta inflamatória inibindo a proliferação de linfócitos T, reduzindo a síntese de TNF- α por macrófagos e monócitos e de outras citocinas pró-inflamatórias como o próprio IFN- γ (MOORE et al., 2001). Linfócitos deciduais de mulheres com abortos recorrentes são menos responsivos a IL-10 do que os clones de gestação normal (PICCINNI et al., 1998), o que enfatiza ainda mais o papel desta citocina na gestação. Além disto, perdas fetais associadas a infecções patogênicas e altos níveis de citocinas

inflamatórias podem ser evitadas com a administração de IL-10 (KRISHNAN et al., 1996; TANGRI et al., 1993; CHAOUAT et al., 1995).

Desta forma, um complexo controle da resposta imunológica de proteção à gestação parece ter lugar na interface materno-placentária, na qual o equilíbrio e não a ausência de um ou outro elemento parece ser fundamental para o sucesso da gestação. Neste contexto, considerando o papel fundamental do IFN- γ e da IL-10 na imunidade da interface materno-placentária determinando a ativação e/ou inibição de padrões ulteriores de secreção e de controle de diferentes vias de sinalização imunológica e de defesa, analisamos neste estudo o potencial do trofoblasto para influenciar o seu meio ambiente, ou seja a capacidade de resposta destas células para alterar um ambiente inflamatório na presença de IFN- γ (expressando a citocina IL-10 e/ou seus receptores) ou para alterar um meio tipicamente antiinflamatório (expressando IFN- γ e seus receptores).

Nossos resultados revelaram que as células trofoblásticas expressam IL-10, mas que esta expressão não é modificada pela presença de IFN- γ . Estes resultados não corroboram os recentes achados de Sacks e colaboradores (2001) que atribui a expressão de IL-10 pelo trofoblasto como uma possível contaminação de leucócitos decíduais. Vale ressaltar, que em nosso modelo foram utilizadas culturas puras de células trofoblásticas e que estas células foram cultivadas durante 48 horas para também eliminar possíveis leucócitos aprisionados nas malhas das células trofoblásticas e que poderiam afetar profundamente os resultados finais (HOSHIDA et al., 2007). Como estes resultados de Sacks e colaboradores (2001) foram realizados com fragmentos de placenta humana, pode ser que diferentes mecanismos caracterizam as diferentes espécies, em relação aos mecanismos de controle imunológico da gestação, como preconizado por vários pesquisadores (CHAOUAT et al., 2007).

De forma isolada em um sistema de cultivo com variáveis controladas e um ambiente com prevalência de uma citocina pró-inflamatória (na presença de IFN- γ) as células trofoblásticas não alteraram o padrão de expressão de IL-10. Nenhuma outra citocina antiinflamatória foi avaliada neste estudo, o que não nos permite afirmar que uma alteração de perfil inflamatório para antiinflamatório não esteja sendo imposto pelas secreções trofoblásticas nestas condições. No entanto, este resultado significa que as células trofoblásticas não utilizam a expressão de IL-10 para tentar neutralizar o ambiente pró-inflamatório local. Por outro lado, pode ser

que a concentração utilizada de IFN- γ não tenha sido suficiente para caracterizar um perfil inflamatório, embora Ashkar e Croy (1999) mostraram que os valores máximos fisiológicos de IFN- γ são de 10 U e, portanto, 10 vezes menores do que os utilizados neste estudo. Neste contexto, nossa hipótese inicial, de que o trofoblasto poderia contribuir com a homeostase imunológica local, alterando o perfil da citocina IL-10, uma citocina chave no controle da ativação de uma resposta do tipo anti-inflamatória/inibição de uma resposta inflamatória, não se consolidou. Ainda, é possível que como em macrófagos e monócitos o aumento na expressão de IL-10 seja também dependente do tipo de agente indutor; nestas células lipopolissacarídeos (LPS) não só levam ao aumento na expressão de IL-10, mas de forma autócrina, também reduzem significativamente a expressão das citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α (WAAL et al., 1991).

Em complementação, não se pode descartar a possibilidade de que a modulação no perfil de IL-10, adequado para garantir adaptações funcionais transientes ao longo da gestação seja uma função primordial das células imunológicas presentes na interface materno-placentária, tais como macrófagos e células NKs, conforme mostrado por Lidstrom e colaboradores, (2003) e não das células trofoblásticas. (LIN et al., 1993; CHAOUAT et al., 1999; SALLINEN et al., 2000).

Interessantemente, houve um aumento significativo na expressão do receptor de IL-10 induzido pelo IFN- γ (**Fig. 5B e 8C**). Receptores para IL-10 são expressos em uma ampla variedade de células além das células imunológicas. Em geral, somente poucas cópias destes receptores estão presentes na superfície celular e poucos são os fatores de regulação desta expressão conhecidos (CARSON et al., 1995; JURLANDER et al., 1997). O aumento na expressão de IL-10R na presença de IL-10 pode significar um mecanismo regulador, eventualmente autócrino, nas próprias células trofoblásticas, mediado e dependente da expressão do receptor. Uma maior demanda de receptores na superfície celular aumentaria a ação de IL-10 sobre estas células e a resposta gênica a ela associada. Considerando que em outros modelos, tais como neutrófilos, monócitos e queratinócitos a ligação IL-10-IL-10R leva a inibição de expressão de citocinas pró-inflamatórias (CREPALDI et al., 2001; MOORE et al., 2001), poderia-se pensar em um papel modulador por parte do trofoblasto, se nestas células houvesse uma inibição ou regulação negativa de tais citocinas. Este seria um mecanismo alternativo que também seria capaz de interferir

com as condições da interface materno-placentária. Para consolidar esta possibilidade, no entanto, é necessário avaliar de forma mais geral a expressão de citocinas pró e antiinflamatórias das células trofoblásticas com técnicas mais sofisticadas como macro-arranjos de cDNA, o que está em andamento em nosso laboratório.

Figura 12: Representação esquemática dos resultados de expressão de IL-10 e seu receptor nas células trofoblásticas de cones ectoplacentários de camundongo, tratadas (B) ou não (A) com IFN- γ .

As reações imunohistoquímicas confirmaram a presença de IL-10 e seu receptor nas células trofoblásticas principalmente nas células mais diferenciadas do cone ectoplacentário, as células gigantes. Lembrar que *in vivo*, estas células formam a verdadeira linha de frente da placenta no endométrio e sistema vascular materno.

Nossos resultados também mostraram uma discreta expressão gênica de IFN- γ e seus receptores pelas células trofoblásticas da fase de pós-implantação e sua distribuição nas células do cone ectoplacentário. Este resultado estende os achados de Chen e colaboradores (1994), os primeiros a mostrar a expressão desta citocina pelas células pré-placentárias de camundongos, após o 9,5 dia de gestação e, confirma os de Albieri e colaboradores. (2005) sobre a expressão de receptores para esta citocina. A presença de IFN- γ e TNF- α produzidas por outras células da unidade materno-placentária tais como células NK uterinas, linfócitos T e células decíduais (WU et al., 2006; LAIRD et al. 2003; VIVES et al., 1999) têm sido mostrada por diferentes grupos o que em conjunto parece indicar a necessidade de um perfil de citocinas pró-inflamatórias na fase de peri-implantação (ATHANASSAKIS et al.,

2000; CROY et al., 2002). Além disso, o perfil de citocinas, o aumento de permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas que acompanham a implantação embrionária, também reforçam este perfil.

Estes resultados sugerem que o trofoblasto pode auxiliar a manutenção deste estado “inflamatório” na fase de peri-implantação, mas também que estas células são responsivas a esta citocina, uma vez que expressam as cadeias α e β do receptor para IFN- γ (também confirmado neste estudo) e as principais proteínas da via de ativação mediada por esta citocina (LEANZA et al., 2007). A expressão de produto e seu receptor pela mesma população celular podem também estar associados a mecanismos autócrinos para garantir atividades funcionais importantes e, por conseguinte, a progressão gestacional.

Evidências experimentais apontam para um possível papel do IFN- γ na diferenciação celular do cone ectoplacentário (ATHANASSAKIS et al., 2000) e atividades funcionais como fagocitose e expressão de IDO (MACKLER et al., 2003), relacionados a mecanismos de defesa (HONIG et al., 2004). *In vivo*, também se observa a presença desta citocina no soro materno (em camundongos, entre os dias 6 e 10 de gestação, período de diferenciação das células trofoblásticas gigantes para a invasão do estroma e vasos endometriais e de formação das populações celulares que constituirão a placenta fetal) e nos sítios de implantação (ASHAKAR e CROY, 1999; HOSHIDA, 2007). Por outro lado, recentemente, HOSHIDA colaboradores (2007) mostrou uma ampla gama de genes ativados pelo IFN- γ nas células trofoblásticas, o que inclui inúmeras moléculas de sinalização do sistema imunológico, tais como IL-1, IL-3R α , fator inibidor de macrófago (MIF), IFN- γ etc.

Quando as células trofoblásticas foram cultivadas em um ambiente em que prevalece IL-10 e, portanto, um ambiente antiinflamatório, observou-se claramente um significativo aumento da expressão de IFN- γ , e uma diminuição da expressão da cadeia α do seu receptor (**Fig. 9 e 10**). Este efeito é bastante diferente do observado em células imunológicas, onde o tratamento com IL-10 diminui a síntese de IFN- γ nas células T D8+CD122+ e, conseqüentemente, a proliferação de células T CD8+ (ENDHARTI et al., 2005). Por outro lado, nossos achados parecem indicar uma responsividade diminuída a esta citocina por parte das células trofoblásticas, mesmo na presença de uma maior expressão de IFN- γ . Talvez, neste caso, a adaptação das células trofoblásticas seja no sentido de manter a interface materno-placentária em

uma condição inflamatória, mas não de exacerbação das atividades do IFN- γ sobre suas próprias células; a ação do IFN- γ seria então muito mais parácrina do que autócrina.

Figura 13: Representação esquemática dos resultados de expressão de IFN- γ e seu receptor nas células trofoblásticas de cones ectoplacentários de camundongo tratadas (B) ou não (A) com IL-10.

Nas células trofoblásticas o IFN- γ participa da ativação da fagocitose pelas células trofoblásticas de camundongo com um possível enfoque nutricional ou de proteção (AMARANTE-PAFARO et al., 2004; ALBIERI et al., 2005) e estimula a produção de óxido nítrico (GAGIOTI et al., 2000; LEANZA et al., 2007) e de radicais livres (GAGIOTI et al., 1995). A produção exagerada destes produtos celulares, no entanto, pode levar a modificações estruturais severas no DNA, proteínas e membranas que culminam com a morte celular (FORTENBERRY et al., 1998). Neste sentido, é possível que a diminuição da atividade responsiva ao IFN- γ seja um mecanismo de proteção que, ao mesmo tempo, torna as células mais refratárias a esta citocina, sem comprometer as funções do IFN- γ nas demais populações celulares da interface materno-placentária.

Em conclusão, expondo células do cone ectoplacentário, um dos principais constituintes da interface materno-placentária a um meio ambiente com IFN- γ e portanto inflamatório, notamos uma resposta nas células trofoblásticas no sentido de tornarem-se mais responsivas, sem aumentar relevantemente a expressão de IL-10, mas apenas de seu receptor. Este achado faz-nos pensar em um mecanismo

autócrino, que pode determinar outros eventos biológicos de importância, mas não analisados neste estudo. Por outro lado, na presença de um ambiente anti-inflamatório com o predomínio de IL-10, estas células aumentam a produção de IFN- γ e restringem a expressão de seu receptor, indicando uma atividade parácrina principalmente sobre as demais células da interface materno-placentária. Este achado pode ser um mecanismo de defesa das células trofoblásticas para manter o meio tendendo a um perfil inflamatório, sem, no entanto, sofrer as consequências que um relevante aumento desta citocina pode desencadear como degeneração e morte celular.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

1. Células trofoblásticas do cone ectoplacentário de camundongos expressam IL-10 e IFN- γ e seus receptores, independente de uma ação indutora específica.
2. A presença de IFN- γ no meio de cultura das células trofoblásticas torna estas células mais responsivas ao IL-10 sem interferir na expressão de IL-10.
3. Na presença de IL-10 no meio de cultura, as células trofoblásticas aumentam a expressão de IFN- γ e diminuem a expressão do receptor para esta citocina.

Considerações finais

No contexto da interface materno-placentária onde componentes maternos e placentários co-habitam estes achados podem indicar que um ambiente inflamatório pode induzir uma resposta trofoblástica do tipo autócrina em relação a IL-10 (IL-10: $\uparrow$ IL-10R=respostas específicas) enquanto que IL-10 parece induzir uma ação parácrina aumentando IFN- γ indução de uma ação autócrina gestação o que sugere uma atividade parácrina sobre outro elementos da interface .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSOHN, P.A. Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. **Anat. Embryol.**, v. 166, p. 263-273, 1983.

AIN, R.; CANHAM, L.N.; SOARES, M.J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. **Dev. Biol.**, v. 260, p. 176-190, 2003.

ALBIERI, A.; HOSHIDA, M.S.; GAGIOTI, S.M.; LEANZA, E.C.; ABRAHAMSOHN, I.; CROY, A.; ASHKAR, A.A.; BEVILACQUA, E. Interferon-gamma alters the phagocytic activity of the mouse trophoblast. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 3, p. 34, 2005.

ALDEN, R.H. Implantation of the rat egg. II alterations in osmiophilic epithelial lipids of the rat uterus under normal and experimental conditions. **Anat. Rec.**, v. 97, p.1-19, 1947.

ALEXANDER, C.M.; ELIZABETH, J.H.; OLE B.; MARGARET, L.F.; NERENDRA, S.; KISHNANI, S.; SUSAN, P.H.; ZENA, W. Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. **Development**, v. 122, p. 1723-1736, 1996.

AMARANTE-PAFFARO, A.; QUEIROZ, G.S.; CORRÊA, S.T.; SPIRA, B.; BEVILACQUA, E. Phagocytosis as a potential mechanism for microbial defense of mouse placental trophoblast cells. **Reproduction**, v. 128, p. 207-218, 2004.

ARCK, P.C.; FERRICK, D.A.; STEELE-NORWOOD, D.; CROITORU, K.; CLARK, D.A. Regulation of abortion by $\gamma\delta$ T cells. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 37, p. 87-93, 1997.

ARMANT, D.R.; KAPLAN, H.A.; LENNARZ, W.I. Fibronectin and laminin promote in vitro attachment and outgrowth of mouse blastocysts. **Dev. Biol.**, v. 116, p. 519-523, 1986.

ARMSTRONG, D.T.; CHAOUAT, G. Effects of lymphokines and immune complexes on murine placental cell growth in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 40, p. 466-474, 1989.

ASHKAR, A.A.; CROY, B.A. Interferon- γ contributes to the normalcy of murine pregnancy. **Biol. Reprod.**, v. 61, p. 493-502, 1999.

ASHKAR, A.A.; DI SANTO, J.P.; CROY, B.A. Interferon- γ contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity and uterine Natural Killer cell maturation during normal murine pregnancy. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 259-269, 2000.

ATHANASSAKIS, I.; BLEACKLEY, R.C.; PAETKAU, V.; GUILBERT, L.; BARR, P.J.; WEGMANN, T.G. The immunostimulatory effect of T cells and T cell lymphokines on murine fetally derived placental cells. **J. Immunol.**, v. 138, p. 37-44, 1987.

ATHANASSAKIS, I.; PAPADIMITRIOU, L.; BOURIS, G.; VASSILIADIS, S. Interferon- γ induces differentiation of ectoplacental cone cells to phenotypically distinct trophoblast. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 24, p. 663-672, 2000.

AYATOLLAHI, M.; GERAMIZADEH, B.; SAMSAMI, A. Transforming growth factor beta-1 influences on fetal allografts during pregnancy. **Transplantat. Proc.**, v. 37, p. 4603-4604, 2005.

BABAN, B.; CHANDLER, P.; MCCOOL, D.; MARSHALL, B.; MUNN, D.H.; MELLOR, A.L. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. **J. Reprod. Immunol.**, v. 61, p. 67-77, 2004.

BARRERA, D.; AVILA, E.; DIAZ, L. Immunological role of progesterone in the maintenance of pregnancy. **Rev. Invest. Clin.**, v. 59, p. 139-145, 2007.

BEVILACQUA, E.; ABRAHAMSOHN, P.A. Trophoblast invasion during implantation of the mouse embryo. **Arch. Biol. Med. Exp.**, v. 22, p. 107-118, 1989.

BEVILACQUA, E.; ABRAHAMSOHN, P.A. Ultrastructure of trophoblast giant cell transformation during invasive stage of implantation of the mouse embryo. **J. Morphol.**, v. 198, p. 341-451, 1988.

BEVILACQUA, E.M.A.F. **Estudo ultra-estrutural da interação materno-embrionária durante o início da gestação da camundonga**. 162 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.

BILLINGTON, W.D. Biology of trophoblast. **Adv. Reprod. Physiol.**, v. 5, p. 27-66, 1971.

BORREGO, L.M.; ROSA, S.; ALGUERÓ, C.; TRINDADE, H.; PINTO, J.R. Células reguladoras. **Rev. Port. Pneumol.**, v. XIII, p. 365-376, 2007.

CAI, G.; KASTELEIN, R.A.; HUNTER, C.A. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 2658-2665, 1999.

CARSON, W.E.; LINDEMANN, M.J.; BAIOCCHI, R.; LINETT, M.; TAN, J.C.; CHOU, C.C.; NARULA, S.; CALIGIURI, M.A. The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. **Blood**, v. 85, p. 3577-3585, 1995.

CHAOUAT, G.; CAYOL, V.; MAIROVITZ, V.; DUBANCHET, S. Localization of the Th2 cytokines IL-3, IL-4, IL-10 at the murine fetal/maternal interface during pregnancy. In: GUPTA, S. K. **Reproductive Immunology** (Ed.). New Delhi: Narosa Publishing House, 1999. p. 61-70.

CHAOUAT, G.; DUBANCHET, S.; LEDEE, N. Cytokines: Important for implantation? **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 24, p. 491-505, 2007.

CHAOUAT, G.; MELIANI, A.A.; MARTAL, J.; RAGHUPATHY, R.; ELLIOT, J.; MOSMANN, T.; WEGMANN, T.G. IL-10 prevents naturally occurring fetal loss in the CBA x DBA/2 mating combination, and local defect in IL-10 production in this abortion-prone combination is corrected by in vivo injection of IFN- γ . **J. Immunol.**, v. 154, p. 4261-4268, 1995.

CHAOUAT, G.; MENU, E.; CLARK, D.A.; DY, M.; MINKOWSKI, M.; WEGMANN, T.G. Control of fetal survival in CBA X DBN2 mice by lymphokine therapy. **J. Reprod. Fertil.**, v. 89, p. 447-458, 1990.

CHAOUAT, G.; ZOURBAS, S.; OSTOJIC, S.; LAPPREE-DELAGÉ, G.; DUBANCHET, S.; LEDEE, N.; MARTAL, J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the maternal-fetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. **J. Reprod. Immunol.**, v. 53, p. 241-256, 2002.

CHEN, H.L.; KAMATH, R.; PACE, J.L.; RUSSEL, S.W.; HUNT, J.S. Expression of the interferon- γ receptor gene in mouse placenta is related to stage of gestation and is restricted to specific subpopulations of trophoblast cells. **Placenta**, v. 15, p. 109-121, 1994.

CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. **Int. Rev. Immunol.**, v. 94, p. 1-52, 1998.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156-159, 1987.

CREPALDI, L.; GASPERINI, S.; LAPINET, J.A.; CALZETTI, F.; PINARDI, C.; LIU, Y.; ZURAWSKI, S.; DE WALL MALEFYT, R.; MOORE, K.W.; CASSATELLA, M.A. Up-regulation of IL-10R1 expression is required to render human neutrophils fully responsive to IL-10. **J. Immunol.**, v. 167, p. 2312-2322, 2001.

CROY, B.A.; CHANTAKRU, S.; ESADEG, S.; ASHKAR, A.A.; WEI, Q. Decidual natural killer cells: key regulators of placental development (a review). **J. Reprod. Immunol.**, v. 57, p. 151-168, 2002.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; VILLAGGIO, B.; SERIOLO, B.; ACCARDO, S. Relations between steroid hormones and cytokines in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 57, p. 573-577, 1998.

D'ORAZIO, T.J.; NIEDERHORN, J.Y. A novel role for TGF-beta and IL-10 in the induction of immune privilege. **J. Immunol.**, v. 160, p. 2089-2098, 1998.

DALTON, D.K.; PITTS-MEEK, S.; KESHAV, S.; FIGARI, I.S.; BRADLEY, A.; STEWART, T.A. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- γ genes. **Science**, v. 259, p. 1739, 1993.

DAMSKY, C.; SUTHERLAND, A.; FISHER, S. Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation, and placentation. **FASEB J.**, v. 7, p. 1320-1329, 1993.

DARNELL, J.E.JR.; KERR, I.M.; STARK, G.R. JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, v. 364, p. 1415-1421, 1994.

DARNELL, J.E. JR. Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the JAK-STAT pathway. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 18, p. 549-554, 1998.

DICKSON, D. Trophoblast giant cell transformation of mouse blastocysts. **J. Reprod. Fertil.**, v. 6, p. 465-466, 1963.

DIMITRIADIS, E.; WHITE, C.A.; JONES, R.L.; SALAMONSEN, L.A. Cytokines, chemokines and factors in endometrium related to implantation. **Hum. Reprod. Update.**, v. 11, p. 613-630, 2005.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. **Chest.**, v. 118, p. 503-508, 2000.

DONNELLY, R.P.; SHEIKH, F.; KOTENKO, S.V.; DICKENSHEETS, H. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. **J. Leukoc. Biol.**, v. 76, p. 314-321, 2004.

DRAKE, B.L.; RODGER, J.C. Phagocytic properties of cultured murine trophoblast. **Placenta**, v. 8, p. 129-134, 1987.

EL-HASHEMITE, N.; ZHANG, H.; WALTER, V.; HOFFMEISTER, K.M.; KWIATKOWSKI, D.J. Perturbed IFN- γ -JAK-STAT signal transducers and activators of transcription signaling in tuberous sclerosis mouse models. **Cancer Res.**, v. 64, p. 3361-3375, 2004.

ENDERS, A.C.; SCHLAFKE, S. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. **Am. J. Anat.**, v. 120, p. 185-226, 1967.

ENDERS, A.C.; SCHLAFKE, S. Comparative aspects of blastocyst-endometrial interaction at implantation. **Ciba Fund. Ser.**, v. 64, p. 3-32, 1979.

ENDHARTI, A.T.; RIFA'L M., 1º.; SHI, Z.; FUKUOKA, Y.; NAKAHARA, Y.; KAWAMOTO, Y.; TAKEDA, K.; ISOBE, K.; SUZUKI, H. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. **J. Immunol.** v. 175, p. 7093-7097, 2005.

ENTRICAN, G. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. **J. Comp. Pathol.**, v. 126, p. 79-94, 2002.

FARRAR, M.A.; SCHREIBER, R.D. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 571-611, 1993.

FERRO, E.A.V. Cinética da infecção congênita de células trofoblásticas por toxoplasma gondii na placenta de *Calomys callosus*. São Paulo, 2000. 147p. Tese (doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, v. 170, p. 2081-2095, 1989.

FORTENBERRY, J.D.; OWENS, M.L.; BROWN, M.R.; ATKINSON, D.; BROWN, L.A. Exogenous nitric oxide enhances neutrophil cell death and DNA fragmentation. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** v. 18, 421–428, 1998.

GAGIOTI, S.; COLEPICCOLO, P.; BEVILACQUA, E. Post-implantation mouse embryos have the capability to generate and release reactive oxygen species. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 1111-1116, 1995.

GAGIOTI, S.; SCAVONE, C.; BEVILACQUA, E. Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 260-268, 2000.

GARDNER, R.L.; PAPAIONNOU, V.E.; BARTON, S.C. Origin of the ectoplacental cone and secondary giant cells in mouse blastocyst reconstituted from isolated trophoblast and inner cell mass. **J. Embriol. Exp. Morphol.**, v. 30, p. 561-570, 1973.

GELLERSEN, B.; BRIESE, J.; OBERNDORFER, M.; REDLIN, K.; SAMALECOS, A.; RICHTER, DU.; LONING, T.; SCHULTE, H.M.; BAMBERGER, A.M. Expression of the Metastasis Suppressor KAI1 in Decidual Cells at the Human Maternal-Fetal Interface Regulation and Functional Implications. **Am. J. Pathol.** v. 170, p. 126-139, 2007.

GOSAIN, A.; GAMELLI, R.L. A primer in cytokines. **J. Burn. Care Rehabil.**, v. 26, p. 7-12, 2005.

GUILBERT, L.; ROBERTSON, S.A.; WEGMANN, T.G. The trophoblast as an integral component of macrophage-cytokine network. **Immunol. Cell Biol.**, v. 71, p. 49-57, 1993.

GULYAS, B.J.; DANIEL, J.C. Incorporation of labeled nucleic acid and protein precursors by diapausing and nono diapausing blastocysts. **Biol. Reprod.**, v. 3, p. 11-15, 1969.

GUSTAFSSON, C. **Local immune regulation in human pregnancy with focus on decidual macrophages**. 76 f. Medical Dissertations - Department of Clinical and Experimental Medicine Faculty of Health Sciences, Linköping University, 2007.

HANNA, N.; HANNA, I.; HLEB, M.; WAGNER, E.; DOUGHERTY, J.; BALKUNDI, D.; PADBURV, J.; SHARMA, S. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. **J. Immunol.**, v. 164, p. 5721-5728, 2000.

HARPER, M.J. The implantation window. Baillieres Clin. **Obstet Gynaecol.**, v. 6, p.351-371, 1992.

HO, A.S.; MOORE, K.W. Interleukin-10 and its receptor. **Ther. Immunol.**, v. 1, p. 173, 1994.

HONIG, A.; RIEGER, L.; DIETL, J.; KAMMERER, U. Mechanisms regulating the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase during decidualization of human Endometrium. **Hum. Reprod.** v. 19, p. 1222-1230, 2004.

HOSHIDA, M.S.; GORJÃO, R.; LIMA, C.; DAHER, S.; CURI, R.; BEVILACQUA, E. Regulation of gene expression in mouse trophoblast cells by interferon-gamma. **Placenta**, v. 28, p. 1059-1072, 2007.

HU, X.; PAIK, P.K.; CHEN, J.; YARILINA, A.; KOCHERITZ, L.; LU, T.T.; WOODGETT, J.R.; IVASHKIV, L.B. IFN- γ suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. **Immunity**, v. 24, p. 563-574, 2006.

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

HUPPERTZ, B. The feto–maternal interface: setting the stage for potential immune interactions. **Semin. Immunopathol.**, v. 29, p. 83–94, 2007.

ILGREN, E.B. Control of the trophoblast growth. **Placenta**, v. 4, p. 307-328, 1983.

ISAACS, A.; LINDERNMANN, J. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. **J. Interferon Res.**, v. 7, 429-438, 1987.

JARVIS, J.N.; ZHAO, L.; MOORE, H.T.; LONG, P.M.; GUTTA, P.V. Regulation of cytokines mRNA expression in activated lymphocytes by human horiocarcinoma JAR cells. **Cellular Immunol.**, v. 168, p. 251-257, 1996.

JOLLIE, W.F.; BENCOSME, S.A. Electron microscopic observations on primary deciduas formation in the rat. **Am. J. Anat.**, v. 116, p. 217-236, 1965.

JURLANDER, J.; LAI, C.F.; TAN, J.; CHOU, C.C.; GEISLER, C.H.; SCHRIBER, J.; BLUMENSON, L.E.; NARULA, S.K.; BAUMAM, H.; CALIGIURI, M.A. Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. **Blood**, v. 89, p. 4146-4152, 1997.

KAUFMAN, M.H. The origin, properties and fate of trophoblast in the mouse. In: LOKE, Y.W.; WHITE, A. (Ed.). **Biology of trophoblast**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 23-69.

KLEEINFELD, R.G.; MORROW, H.A.; DE FEO, V.J. Intercellular junctions between decidual cells in the growing deciduoma of the pseudopregnant rat uterus. **Biol. Reprod.**, v. 15, p. 593-603, 1976.

KREHBIEL, R.H. Cytological studies of the decidual reaction in the rat during pregnancy and in the production of deciduomata. **Physiol. Zool.**, v. 10, p. 212-238, 1937.

KRISHNAN, L.; GUILBERT, L.J.; WEGMANN, T.G.; BELOSEVIC, M.; MOSMANN, T.R.; T helper 1 response against *Leishmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal reabsorptions. **J. Immunol.**, v. 156, p. 653-662, 1996.

KUDO, V.; BOYD, C.A.R. Human placental indolamine 2,3-dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1500, p. 119-124, 2000.

LAIRD, S.M.; TUCKERMAN, E.M.; CORK, B.A.; LINJWI, S.; BLAKEMORE, A.I.F.; LI, C. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. **Hum. Reprod. Update**, v. 9, p. 163-174, 2003.

LAN, R.Y.; ANSARI, A.A.; LIAN, Z.X.; GERSHWIN, M.E. Regulatory T cells: Development, function and role in autoimmunity. **Autoimmun. Rev.**, v. 4, p. 351-63, 2005.

LASH, G.E.; BARBARA, S.; MAUREN, K.; BARBARA, A.I.; ALIX, COOPER.; ROGER, F.S.; STEPHEN, C.R.; JUDITH, N.B. Expression of angiogenic growth factors by uterine natural killer cells during early pregnancy. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, p. 572-580, 2006a.

LASH, G.E.; OTUN, H.A.; INNES, B.A.; KIRKLEY, M.; De OLIVEIRA, L.; SEARLE, R.F.; ROBSON, S.C.; BULMER, J.N. Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. **FASEB J.**, v. 20, p. 2512-2518, 2006b.

LEANZA, E.C.; HOSHIDA, M.S.; COSTA, A.F.; FERNANDES, C.M.; FATIMA, P.; TEIXEIRA, C.; BEVILACQUA, E. Signaling Molecules Involved in IFN-gamma-Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in the Mouse Trophoblast. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 58, p. 537-546, 2007.

LEE, K.Y.; JEONG, J.W.; TSAI, S.Y.; LYDON, J.P.; DEMAYO, F.J. Mouse models of implantation. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 18, p. 234-239, 2007.

LIDSTROM, C.; MATTHIESEN, L.; BERG, G.; SHARMA, S.; ERNERUDH, J.; EKERFELT, C. Cytokine secretion patterns of NK cells and macrophages in early human pregnancy decidua and blood: implications for suppressor macrophages in decidua. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 50, p. 444-452, 2003.

LIN, H.; MOSMANN, T.R.; GUILBERT, L.; TUNTIPOPIPAT, S.; WEGMANN, T.G.; Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. **J. Immunol.**, v. 151, p. 4562-4573, 1993.

LOBEL, B.L.; LEVY, E.; SHELESNYAK, M.C. Studies on the mechanisms of nidation. XXXIV dynamics of cellular interaction during progestation and implantation in the rat. **Acta Endocrinol.**, v. 56, p. 07-109, 1967.

MACKLER, A.M.; BARBER, E.M.; TAKIKAWA, O.; POLLARD, J.W. Indoleamine 2,3-dioxygenase is regulated by IFN-gamma in the mouse placenta during *Listeria monocytogenes* infection. **J. Immunol.**, v. 170, p. 823-830, 2003.

MACMASTER, M.T.; NEWTON, R.C.; DEY, S.K.; ANDREWS, G.K. Activation and distribution of inflammatory cells in the mouse uterus during the preimplantation period. **J. Immunol.**, v. 148, p. 1699-705, 1992.

MCLAREN, A. Endocrinology of implantation. **J. Reprod. Fertil.**, v. 18, p. 159-166, 1973.

MCLEAN, I.W.; NAKANE, P.K. Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 22, p. 1077-1083, 1974.

MEHROTRA, P.K. Ultrastructure of mouse ectoplacental cone cells. **Biol. Struct. Morphog.**, v. 1, p. 63-68, 1988.

MICHELON, T.; SILVEIRA, J.G.; GRAUDENZ, M.; NEUMANN, J. Imunologia da gestação. **Rev. AMRIGS**, v. 50, p. 145-151, 2006.

MOCELLIN, S.; PANELLI, M.C.; WANG, E.; NAGOESSEN, D.; MARINCOLA, F.M. The dual role of IL-10. **Trends Immunol.**, v. 24, p. 36-43, 2003.

MONK, J.M.; LEONARD, S.; McBEY, B.A.; CROY, B.A. Induction of murine spiral artery modification by recombinant human interferon-gamma. **Placenta**, v. 26, p. 835-838, 2005.

MOORE, K.W.; MALEFYT, R.W.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MOORE, K.W.; O'GARRA, A.; MALEFYT, R.W.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R. Interleukin-10. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 11, p. 65, 1993.

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 trophoblasts and monocytes. **Int. Immunol.**, v. 11, p. 803-811, 1999.

MOSMANN, T.R. Properties and functions of interleukin-10. **Adv. Immunol.**, v. 56, p. 01-26, 1994.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, p. 2348-2357, 1986.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145-173, 1989.

MOSSMAN, H.W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Contr. Embryol. Carneg. Inst.**, v.26, p. 133-246, 1937.

MOSSMAN, H.W. **Vertebrate fetal membranes**. New Brunswick: Rutgers Univ. Press, 1987. 383 p.

MOULTON, B.C.; ELANGO VAN, S. Lysosomal mechanism in blastocyst implantation. In: GLASSER, S.R.; BULLOCK, D.W (Ed.). **Cellular and Molecular Aspects of Implantation**. New York: Plenum Press, 1981. p. 344-355.

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

MUNTENER, M.; HSU, T.C. Development of trophoblast and placenta of the mouse. **Acta Anat.**, v. 98, p. 241-252, 1977.

MURRAY, P.J. STAT3-mediated anti-inflammatory signaling. **Biochem. Soc. Transac.**, v. 34, p. 1028-1031, 2006.

NAN, C.L.; LEI, Z.L.; ZHAO, Z.J.; SHI, L.H. OUYANG, Y.C. SONG, X.F., SUM, Q.Y., CHEN, D.Y. Increased Th1/Th2 (IFN- γ / IL4) cytokine mRNA ratio of rat embryos in the pregnant mouse uterus. **J. Reprod. Dev.**, v. 53, p. 219-228, 2007.

NAN, C.L.; LEI, Z.L.; ZHAO, Z.J.; SHI, L.H.; OUYANG, Y.C.; SONG, X.F.; SUN, Q.Y.; CHEN, D.Y. Increased Th1/Th2 (IFN-gamma/IL-4) Cytokine mRNA Ratio of Rat Embryos in the Pregnant Mouse Uterus. **J. Reprod. Dev.**, v. 53, p. 219-228, 2007.

NILSSON, B.O. Estrogen-induced increase of adhesiveness in uterine epithelium of the mouse and rat. **Exp. Res.**, v. 43, p. 239-241, 1966.

OSTOJIC, S.; DUBANCHET, S.; CHAOUAT, G.; ABDELKARIM, M.; TRUVENS, C.; CAPRON, F. Demonstration of the presence of IL-16, IL-17 and IL-18 at the murine fetomaternal interface during murine pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 49, p. 101-112, 2003.

PAVIA, C.S. Expression of the cell-mediated antimicrobial immunity by mouse trophoblast monolayers. **J. Infect. Dis.**, v. 147, p. 1006-1010, 1983.

PICCINNI, M.P. Role of T-cell cytokines in deciduas and in cumulus oophorus during pregnancy. **Gynecol. Obstet. Invest.**, v. 64, p. 144-148, 2007.

PICCINNI, M.P. T-cell cytokine in pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 47, p. 289-294, 2002.

PICCINNI, M.P.; BELONI, L.; LIVI, C.; MAGGI, E.; SCARSELLI, G.; ROMAGNANI, S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. **Nat. Med.**, v. 4, p. 1020-1024, 1998.

PLATT, J.S.; HUNT, J.S. Interferon-gamma gene expression in cycling and pregnancy mouse uterus: temporal aspects and cellular localization. **J. Leukoc. Biol.**, v. 64, p. 393-400, 1998.

POLLARD, J.W.; BARTOCCI, A.; ARCECI, R.J.; ORLOFSKY, A.; LADNER, M.B.; STANLEY, E.R. Apparent role of the macrophage growth factor CSF-1 in placental development. **Nature**, v. 330, p. 484-486, 1987.

POTTS, M.; PSYCHOYOS, A. Evolution de l'ultrastructure des relations ovoendometriales sous l'influence de l'oestrogen, chez la ratte en retard experimental de nidation. **C.R. Acad. Sci.**, v. 264, p. 370-378, 1967.

POTTS, M. The attachment phase of ovoidimplantation. **Am. J. Obstetr. Gynecol.**, v. 96, p. 1122-1128, 1966.

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

RAHMAN, A.N.M.A.; SNIBSON, K.J.; LEE, C.S.; MEEUSEN, E.N.T. Effects of implantation and early pregnancy on the expression of cytokines and vascular surface molecules in the sheep endometrium. **J. Reprod. Immunol.**, v. 64, p. 45-58, 2004.

REDLINE, R.W. Role of Uterine Natural Killer Cells and Interferon- γ in Placental Development. **J. Exp. Med.**, v. 192, F1–F4, 2000.

ROBB, L.; LI, R.; HARTLEY, L.; NADURKAR, H.H.; KOENTGEN, F.; BEGLEY, C.G. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. **Nature Med.**, v. 4, p. 303-308, 1998.

ROBERTS, C.T.; WHITE, C.A.; WIEMER, N.G.; RAMSAY, A.; ROBERTSON, S.A. Altered placental development in interleukin-10 null mutant mice. **Placenta**, v. 24, p. 94-99, 2003.

ROBERTSON, S.A. GM-CSF regulation of embryo development and pregnancy. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 18, p. 287-298, 2007.

ROGERS, P.A.W.; MURPHY, C.R. Uterine receptivity for implantation: human studies. In: YOSHINAGA, K. (Ed.). **Blastocyst Implantation**. Boston: Adams, 1989. p. 231-238.

ROTH, I.; FISHER, S.J. IL-10 is an autocrine inhibitor of human placental cytotrophoblast MMP-9 production and invasion. **Dev. Biol.**, v. 205, p. 194-204, 1999.

RUPPERTZ, B. The feto–maternal interface: setting the stage for potential immune interactions. **Semin. Immunopathol.**, v. 29, p. 83-94, 2007.

RUTANEN, E.M. Cytokines in reproduction. **Ann. Med.**, v. 25, p. 343-347, 1993.

SACKS, G.P.; CLOVER, L.M.; BAINBRIDGE, D.R.J.; REDMAN, C.W.G.; SARGENT, I.L. Flow cytometric measurement of intracellular Th1 and Th2 cytokine production by human villous and extravillous cytotrophoblast. **Placenta**, v. 22, p. 550-559, 2001.

SAITO, S.; SHIOZAKI, A.; NAKASHIMA, A.; SAKAI, M.; SASACHI, Y. The role of the immune system in preeclampsia. **Mol. Aspec. Med.**, v. 28, p. 192–209, 2007.

SALAMONSEN, L.A.; DIMITRIADIS, E.; ROBB, L. Cytokines in implantation. **Semin. Reprod. Med.**, v. 18, p. 299-310, 2000.

SALAMONSEN, L.A.; HANNAN, N.J.; DIMITRIADIS, E. Cytokines and Chemokines during Human Embryo Implantation: Roles in Implantation and Early Placentation. **Semin. Reprod. Med.**, v. 25, p. 437-444, 2007.

SALLINEN, K.; VERAJANKORVA, E.; POLLANEN, P. Expression of antigens involved in the presentation of lipid antigens and induction of clonal anergy in the female reproductive tract. **J. Reprod. Immunol.**, v. 46, p. 91-101, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 88p.

SCHLAFKE, S.; ENDERS, A.C. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. **Biol. Reprod.**, v. 12, p. 41-65, 1975.

SIMÓN, C.; VALBUENA, D. Embryonic implantation. **Ann. Endocrinol.**, v. 60, p. 134-136, 1999.

SMITH, D.M. The effect of the time of estrogen injection on implantation in ovariectomy pregnant mice. **J. Endocrinol.**, v. 41, p. 11-15, 1968.

SNELL, G.G.; STEVENS, L.C. Early embryology. In: GREEN, E.L. (Ed.). **Biology of Laboratory Mouse**. New York: McGraw Hill, 1966. p. 205-245.

SOARES, M.J.; FARIA, T.N.; HAMLIN, G.P.; LU, X-J.; DEB, S., Trophoblast differentiation: expression of the placental prolactin family. In: SOARES, M.J.; HANDWERGER, S.; TALAMANTES, F. (Ed.). **Trophoblast Cells: Pathways for maternal-embryonic communication**. New York: Springer-Verlag, 1993, p. 43-65.

SOARES, M.J.; FARIA, T.N.; ROBY, K.F.; DEB, S. Pregnancy and the prolactin family of hormones: coordination of anterior pituitary uterine, and placental expression. **Endocrinol. Rev.**, v. 12, p. 402-423, 1991.

STAHL, W.; KANEDA, Y.; NOGUCHI, T. Reproductive failure in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res.**, v. 80, p. 22-28, 1994.

STEWART, C.L.; KASPAR, P.; BRUNET, L.J.; BLATT, H.; GADI, I.; KOTGEN, F.; ABBONDANZO, S.J. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature*, v. 359, p. 76-79, 1992.

SUTHERLAND, A.E.; CALARCO, P.G.; DAMSKY, C.H. Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. **Development**, v. 119, p. 1175-1186, 1993.

TACHI, S.; TACHI, C.; LINDNER, H.R. Ultrastructural features of blastocysts attachment and trophoblastic invasion in the rat. **J. Reprod. Fertil.**, v. 21, p. 37-56, 1970.

TANGRI, S.; RAGHUPATHY, R. Expression of cytokines in placentas of mice undergoing immunologically mediated spontaneous fetal resorptions. **Biol. Reprod.**, v. 49, p. 850-856, 1993.

TEZABWALA, BU.; JOHSTONE, A.P. Effects of IL-12 administration on pregnancy. **J. Reprod. Immunol. Suppl.**, v. 1, p. 147, 1986.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **JEM.** v. 204, p. 239-243, 2007.

UNGER, B.; DICKSON, A.D. Effect of cicloheximide and actinomycin D on the mouse blastocyst undergoing the giant cell transformation. **J. Anat.**, v. 108, p. 519-525, 1971.

VIGANÒ, P.; GAFFURI, B.; SOMIGLIANA, E.; INFANTINO, M.; VIGNALI, M.; DI BLASIO, A.M. Interleukin-10 is produced by human uterine natural killer cells but does not affect their production of interferon-gamma. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 7, p. 971-977, 2001.

VITIELLO, D.; PATRIZIO, P. Implantation and early embryonic development: Implications for pregnancy. **Semin. Perinatol.**, v. 31, p. 204-207, 2007.

VIVES, A.; BALASCH, J.; YAGUE, J.; QUINTO, L.; ORDI, J.; VANRELL, J.A. Type-1 and type-2 cytokines in human decidual tissue and trophoblasts from normal and abnormal pregnancies detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 42, p. 361-368, 1999.

WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C.G.; VRIES J.E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 174, p. 1209-1220, 1991.

WEGMANN, T.G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T.R. Bidirectional cytokine interaction in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? **Immunol. Today**, v. 14, p. 353-356, 1993.

WEITLAUF, H.M. *In vitro* uptake and incorporation of aminoacids by blastocysts from intact and ovariectomized mice. **J. Exp. Zool.**, v. 183, p. 303-308, 1973.

WELSH, A.O.; ENDERS, A.C. Trophoblast-decidual cell interaction and establishment of maternal blood circulation in the parietal yolk sac placenta of the rat. **Anat. Rec.**, v. 217, p. 213-219, 1987.

WESSELLS, J.; WESSNER, D.; PARSELLS, R.; WHITE, K.; FINKENZELLER, D.; ZIMMERMANN, W.; DVEKSLER, G. Pregnancy specific glycoprotein 18 induces IL-10 expression in murine macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, p. 1830-1840, 2000.

WHITE, C.A.; JAHANSSON, M.; ROBERTS, C.T.; RAMSAY, A.J.; ROBERTSON, S.A. Effect of interleukin-10 null mutation on maternal immune response and reproductive outcome in mice. **Biol Reprod.**, v. 70, p.123-131, 2004.

WILCZYNSKI, J.R. Th1/Th2 cytokines balance-yin and yang of reproductive immunology. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 122, p. 136–143, 2005.

WU, X.; WEI, H.; ZHANG, J.; TIAN, Z. Increased uterine NK-derived IFN-gamma and TNF-alpha in C57BL/6J mice during early gestation. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 3, p. 131-137, 2006.

ZDANOV, A. Structural features of the interleukin-10 family of cytokines. **Curr. Pharm. Design**, v. 10, p. 3873-3884, 2004.

ZYBINA, E.V. Anomalies of polyploidization of the cells of the trophoblast. **Tsitologiya**, v. 12, p. 1081-1093, 1970.