KAROLLINA FERREIRA DO NASCIMENTO

**INFLAMAÇÃO DURANTE A GESTAÇÃO: EFEITO DA
ADMINISTRAÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) DE
ESCHERICHIA COLI NA EXPRESSÃO DO FATOR DE INIBIÇÃO
DE MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) NA INTERFACE
MATERNO-FETAL**

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 em Ciências.

São Paulo
2012

KAROLLINA FERREIRA DO NASCIMENTO

**INFLAMAÇÃO DURANTE A GESTAÇÃO: EFEITO DA
ADMINISTRAÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) DE
ESCHERICHIA COLI NA EXPRESSÃO DO FATOR DE INIBIÇÃO
DE MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) NA INTERFACE
MATERNO-FETAL**

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 em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2012

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

Nascimento, Karollina Ferreira do.

Inflamação durante a gestação: efeito da administração do lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* na expressão do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) na interface materno-fetal / Karollina Ferreira do Nascimento. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. 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 e interação materno-fetal com ênfase na fisiologia trofoblástica.

Versão do título para o inglês: Inflammation during gestation: the effect of the administration of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* in the macrophage migrating inhibitory factor (MIF) expression at the materno-fetal interface.

1. Placenta 2. Gestação 3. Decidua 4. MIF 5. LPS 6. Implantação
I. Bevilacqua, Profa. Dra. 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/SBIB093/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karollina Ferreira do Nascimento.

Título da Dissertação: Inflamação durante a gestação: efeito da administração do lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* na expressão do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) na interface materno-fetal.

Orientador(a): Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevlacqua.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada 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. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEEA.001/2010

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 063/07/CEEA, datado de 31.08.07 e por solicitação da Profa. Dra. Estela Bevilacqua, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Karollina Ferreira do Nascimento** ao Projeto de Pesquisa "*Expressão do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) durante o desenvolvimento placentário em camundongos*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 13 de janeiro de 2010.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA
ICB/USP

Dedico este trabalho

Primeiramente à Deus, meu refúgio e minha Fortaleza;

Aos meus pais, José e Neusa, por sempre me apoiarem em todas as decisões e por estarem ao meu lado dia e noite, por me abraçarem, recolherem minhas lágrimas nos momentos de dor, por se alegrarem com a minha alegria; pelas noites de orações intensas, quando nos entregávamos de coração aberto à Deus; pelos conselhos, broncas e por todo amor que me dedicaram e dedicam até hoje....

Ao Emiliano, que me ensina a cada dia o que é amar;

Eu jamais teria chegado ao fim senão por vocês

Obrigada!!!

À Profa. Dra. Estela Bevilacqua...

Obrigada por abrir as portas do seu laboratório para uma aluna de iniciação científica que mal sabia o que esperar do primeiro estágio de graduação....Obrigada por me fazer sentir o gosto da pesquisa científica e o gosto de “fazer ciência”....Obrigada por me fazer acreditar que somos capazes, por não me deixar desistir de tudo, por me aceitar como sou e por me ajudar a escolher novos rumos na minha vida, novos caminhos e com muito orgulho poder olhar para trás e sentir que cumpri o dever....

Obrigado!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por me estimularem a seguir o caminho da pesquisa, pelo amor incondicional e por tudo que fizeram e fazem até hoje por mim;

Aos meus amigos queridos que esperaram por mim pacientemente quando eu estava ausente por conta dos experimentos, dissertação e laboratório: Marjorie D'Átillio, Mariana Suetsugu e Felipe Francesco, Cristiane R. de Souza, Régner e Nilbbert, Rosilene e Ana;

Ao Emiliano, que durante os 6 últimos anos me ensinou muito sobre o amor, o amor de Deus, sobre ter fé, sobre o poder da oração, perseverança, mansidão, retidão de caráter, enfim....me ensinou e ensina a cada dia como ser uma pessoa melhor;

À todas as senhoras e jovens do meu grupo de oração, por orarem sem cessar por este trabalho e por mim: Fátima, Agnes, Ivone, Ana de Souza, tia Ruth, Edi, Marisa Claudino, Luciana Carmo e Kenya (minha varetinha!!);

Às minhas queridas amigas e eternas alunas de pintura Ana, Beth e Irene que estão sempre firmes todos os sábados de manhã e sempre compartilhando o gosto pela arte;

À minha prima quase irmã Luciana Costa Alves e sua família maravilhosa (Daniel, Davi e Ana), obrigada pelas orações!;

À minha técnica querida e irmã na fé, Rose Farias, a linda, que me ensinou tudo sobre laboratório, desde como preparar decentemente uma solução até como conduzir os experimentos... E que também me ensinou muito do amor de Deus, orou e jejuou por mim, me chamou a atenção e me ajudou todas as vezes que o cerco se fechava e o soldado fraquejava...;

Às colegas que passaram a ser amigas e hoje são quase irmãs: Fernanda e Carla, por ajudarem em todos os momentos, pelas extrações de RNA e PCR feitos em larga escala, pelos momentos besteiro a noite no lab (com direito a pizza e tudo), pelas brigas por bagunça na bancada, por virem aos finais de semana e dobrarem as mangas e trabalharem comigo... E Karen, além de toda a convivência no lab, temos nossa aventura sem igual pelo Atacama! Sua expressão de desespero quando chegamos me fez achar que você fosse desistir e voltar no primeiro ônibus. Mas não, você ficou e passou por todas as desventuras possíveis ao meu lado!

À Sarinha, por me ensinar tudo que sei sobre Biologia Molecular....Obrigada!

Aos colegas do laboratório: Miriam Rubio (ninguém menos que a idealizadora do trabalho!), Rodrigão, pelo santo café e pelos papos de surfista, Simone e os experimentos de ELISA, Adriana Costa por ser uma amiga divertida e de humor incompreendido, Alexandre (que está longe, mas sempre presente), Aline Lorenzon,

Aos estagiários Alex, Paola e Aline Paixão pela ajuda decisiva na reta final;

À minha amiga que está muito longe e que sinto muita falta, Leticia Perez Tito, carinhosamente chamada de “sua argentina”... Sinto muito sua falta e muito obrigada pelos finais de semana no laboratório e pelas conversas e conselhos;

Ao Professor Sérgio por abrir as portas do seu laboratório e me ajudar sempre que necessário com bons conselhos sobre fotografia de lâminas e imunohistoquímica e também com ótimas receitas e bom gosto para culinária nordestina;

Ao Professor Fábio Siviero pelos momentos descontraídos e ajuda com interpretação de resultados do qPCR;

À Profa. Dra. Eloisa Ferro da Universidade Federal de Uberlândia, que mesmo longe sempre esteve à disposição com protocolos, ajuda em experimentos e conselhos;

À secretária Celiana, por me ajudar e me compreender no momento mais difícil e decisivo da entrega dos documentos de qualificação;

Às colegas e amigas do departamento Juliane, Fernanda (técnica), Ana Zen, Helô e Chayrra, por abrirem o laboratório delas, emprestarem reagentes e pelas confidências e conselhos;

Aos novos colegas de trabalho na Biogen: Mariana, Deise, Fernanda, Bruna, Carina, Aline, Fabiana, Marcos, Dirlei, Jonathas e especialmente Ignázio Di Gangi e Elizabeth Mor, que me ajudaram sempre que precisei me ausentar por conta da dissertação;

Aos funcionários da biblioteca e principalmente à Mônica, Socorro, Valéria, Eva e Juliana pela paciência com a formatação e por sempre responder todas as minhas dúvidas aos 45 minutos do segundo tempo;

Aos funcionários do biotério, Fernando, Claudio e Braz por cuidarem dos animais sempre que necessitavam de uma atenção especial;

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho direta ou indiretamente;

Aos animais que dão suas vidas para a realização de experimentos científicos.

Os meus inimigos procuram devorar-me todo dia; pois são muitos os que
pelejam contra mim, ó Altíssimo.
Em qualquer tempo em que eu temer, confiarei em Ti.
Em Deus louvarei a sua palavra, em Deus pus a minha confiança; não
temerei o que me possa fazer a carne.
Todos os dias torcem as minhas palavras; todos os seus pensamentos são
contra mim para o mal.
Ajuntam-se, escondem-se, marcam os meus passos, como aguardando a
minha alma. Porventura escaparão eles por meio da sua iniquidade? O
Deus derruba os povos na tua ira!
Tu contas as minhas vagueações; põe as minhas lágrimas no teu odre. Não
estão elas no teu livro?
Quando eu a Ti clamar, então voltarão para trás os meus inimigos: isto sei
eu, porque Deus é por mim.

Salmos 56:2-9

RESUMO

NASCIMENTO, K. F. **Inflamação durante a gestação:** efeito da administração do lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* na expressão do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) na interface materno-fetal. 2012. 78 f. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A implantação embrionária determina eventos biológicos de fundamental importância para o desenvolvimento do embrião e para o sucesso da gestação, como a intrusão do trofoblasto no estroma endometrial assumindo posições chave em contato com o sangue materno e com células residentes e de defesa que habitam o útero. Entre células maternas e o trofoblasto se estabelece um complexo diálogo molecular. Dentre as moléculas que participam deste processo destacam-se as citocinas, mediadores solúveis do sistema imunológico, com funções relevantes na interface materno-fetal. O fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) é uma das muitas citocinas que atuam durante a gestação, desempenhando múltiplas funções biológicas e atividades pró-inflamatórias, em resposta a infecções ou à presença de toxinas bacterianas e estresse. Esta citocina também é produzida na interface materno-fetal por diferentes tipos celulares em diferentes períodos gestacionais. Funções atribuídas à presença de MIF nestes locais incluem papéis na resposta imunológica inata e a manutenção de um ambiente inflamatório na interface materno-placentária. No entanto, pouco se sabe a respeito da modulação de sua expressão nestes locais em condições inflamatórias. Este estudo investigou a expressão de MIF na interface materno-placentária em condições infecto-inflamatórias simuladas no organismo materno pela administração de LPS de *Escherichia coli* no dia 7,5 de gestação, período imediatamente após a implantação embrionária. Para uma melhor avaliação dos efeitos inflamatórios na interface materno-fetal este estudo foi dividido em duas etapas; na primeira LPS foi administrado nas doses de 0,06, 0,1, 0,2 e 0,3 µg/g de peso corporal aos 7,5 dias de gestação e a gestação interrompida aos 17,5 dg para análise do perfil gestacional (com o objetivo de selecionar a dose adequada de LPS). Uma segunda etapa consistiu na administração de dose única de LPS (0,1 µg/g de peso corporal) aos 7,5 dg, sendo a gestação interrompida aos 30 minutos, 1, 3 e 6 horas após esta administração (para análise dos efeitos da inflamação materna na interface materno-fetal). Nossos resultados mostraram que a dose mais adequada para que houvesse inflamação sem óbito fetal significativo era a dose de 0,1 µg de LPS/g de peso corporal. Com esta dose observou-se diminuição o padrão de expressão protéica de MIF durante as 6 horas seguintes ao estímulo com LPS, enquanto que a expressão gênica permaneceu estável, aumentando significativamente apenas após 6 horas de tratamento. Dosagem de TNF- α foi utilizada como biomarcador da inflamação. Observou-se aumento dos níveis séricos desta citocina no soro até 1 hora após o estímulo com LPS, o que não ocorreu na interface materno fetal onde os níveis diminuíram após 30 min da administração do LPS. Em conjunto nossos resultados sugerem que os mecanismos de regulação de MIF na interface materno-fetal são tecido-específicos capazes de atenuar o processo inflamatório, podendo desta forma, atuar como fator de relevância na sobrevivência fetal.

Palavras-chave: MIF. LPS. Implantação . Placenta. Gestação. Decídua.

ABSTRACT

NASCIMENTO, K. F. **Inflammation during gestation:** the effect of the administration of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* in the macrophage migrating inhibitory factor (MIF) expression at the materno-fetal interface. 2012. 78 p. [dissertation (Master thesis in Cell and Tissue)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The embryo implantation determines fundamental biological events to the embryo development and to the success of gestation, such as the intrusion of the trophoblast into the endometrial stroma where it assumes key positions in contact with maternal blood and resident and defense cells that inhabit the uterus. A complex molecular dialogue is established amongst maternal cells and the trophoblast. Among the molecules that take part in this process highlight the cytokines, soluble mediators of the immune system that play important functions at the maternal-fetal interface. The macrophage migration inhibitory factor (MIF) is one of these cytokines that during gestation play multiple biological functions and pro inflammatory activities in response to infections, bacterial toxins or stress. This cytokine is also produced at the maternal-fetal interface by different cell types in different gestational periods. Functions attributed to the gestational MIF include roles in innate immune response and maintenance of an inflammatory environment at the maternal-placental interface. However, little is known about the modulation of its expression at the maternal fetal interface during inflammatory conditions. This study investigated the expression of MIF at the maternal-placental interface in maternal inflammatory conditions simulated by the administration of LPS from *Escherichia coli* during the day 7.5 of gestation, the period immediately after embryo implantation. To assess the inflammatory effects on maternal-fetal interface this study was divided in two steps: in the first LPS was administered at the doses of 0.06, 0.1, 0.2 and 0.3 µg / g body weight at 7, 5 days of gestation. The pregnancy was interrupted at 17.5 dg and the gestational profile analyzed (to select the appropriated LPS dose). In the second step LPS was administered as a single dose (0.1 µg / g body weight) at the day 7.5 of gestation and the pregnancy interrupted 30 minutes, 1, 3 and 6 hours after administration (to analyze the effects of the maternal inflammation on the maternal fetal interface). Our results showed that the more appropriate LPS dose was 0.1 µg/ g body weight to trigger inflammation without significant fetal losses. At this dose there was a decrease in the MIF pattern of protein expression during the 6 hours after LPS stimulus, whereas gene expression remained stable and, significantly increasing only after 6 hours of treatment. Analysis of TNF- α was used as a biomarker of inflammation. Serum levels of this cytokines increased up to 1 hour after stimulation with LPS, which was not observed at the maternal fetal interface, where 30 min after LPS administration a significant decreased were detected. Together, our results suggest tissue-specific MIF regulatory mechanisms at the maternal-fetal interface, able to attenuate the inflammatory process and therefore, playing role as a relevant factor for fetal survival.

Keywords: MIF. LPS. Implantation. Placenta. Gestation. Decidua

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH – Hormônio adrenocoticotrópico

cDNA – Acido desoxirribonucleico complementar

COX-2 – Ciclooxigenase 2

Dg – Dia de gestação

DNase- Desoxirribonuclease

DPEC- Dietilpirocarbonato

EDTA - (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) Ácido etilenodiaminotetracético

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético

ERK1/2 - (*Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*) proteína quinase de sinal extracelular regulado 1 e 2

IFN- γ - Interferon gama

IL-1 - Interleucina 1

IL1 β - Interleucina 1 beta

IL-10 – Interleucina 10

IL-2 - Interleucina 2

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

LPS- Lipopolisacarídeo

MIF- Fator de inibição de migração de macrófagos

MMPs – Metaloproteinases de matrix extra-celular

Na₃VO₄ – Ortovanadato de Sódio

NaF- Fluoreto de sódio

NF κ B – Fator nuclear kappa B

NK – Célula *Natural killer*

PBS - *Phosphate buffer saline*

PCR- Reação em cadeia da polymerase

PGE2 – Prostaglandina E 2

PLA2 – Fosfolipase A2

PMSF – (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

qPCR- Reação em cadeia da polymerase quantitativa

RIPA - (*Radio-Immunoprecipitation Assay*) Imunoprecipitação de rádio-ensaio

RNAse- Ribonuclease

RT-PCR - *Reverse transcriptase chain reaction*

TBS- *Tris-phosphate buffer saline*

TLR-4 – Receptor semelhante ao *Toll* 4

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequencias de <i>primers</i> *, suas temperaturas de anelamento (T) e dimensões do produto esperado.....	41
Tabela 2 - Efeito da administração de LPS no dia 7,5 de gestação sobre os parâmetros gestacionais de fêmeas prenhes.....	44
Tabela 3 - Efeito da administração de LPS no dia 7,5 de gestação sobre o número de reabsorções totais e precoces.....	45
Tabela 4 - Efeito da administração de LPS no 7,5 dias de gestação sobre o peso e comprimento de fetos e placentas e diâmetro das placentas.....	45
Tabela 5 - Efeito da administração de LPS no 7,5 dias de gestação sobre a área das regiões do labirinto e da zona juncional.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Preparados histológicos de placentas corados pela HE.....	48
Figura 2 - Preparados histológicos corados pela HE.....	48
Figura 3 – Dosagem de TNF- α em soro e sítios de implantação de animais controle e tratados com LPS.....	50
Figura 4 – Preparados histológicos de sítios de implantação aos 7,5 dg tratados ou não com LPS.....	51
Figura 5 – Preparados histológicos de sítios de implantação aos 7,5 dg tratados ou não com LPS.....	52
Figura 6 – Imunolocalização de MIF em sítios de implantação aos 7,5dg.....	53
Figura 7 – Imunolocalização de MIF em sítios de implantação aos 7,5dg.....	54
Figura 8 – Géis representativos de RNA e cDNA.....	55
Figura 9 – Gel e gráfico de RT-PCR.....	55
Figura 10 – Curvas padrão e de dissociação dos ensaios quantitativos de PCR.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 A interface materno-placentária	22
2.2 Fator de Inibição de Migração de Macrófagos – MIF	25
2.3 MIF: atividades biológicas	27
2.4 MIF na interface materno-fetal	29
2.5 Inflamação na interface materno-fetal	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Reagentes, equipamentos e procedências.	34
4.2 Animais.....	35
4.3 Acasalamento e determinação da prenhez.....	35
4.4 Administração de lipopolissacarídeo de Escherichia coli	35
4.5 Coleta das amostras	36
4.6 Desempenho gestacional	37
4.7 Análises morfológica e morfométrica.....	38
4.8 Imunolocalização de MIF	38
4.9 Expressão gênica de MIF	40
4.9.1 <i>Análise estatística</i>	41
4.10 Dosagens de TNF-alfa sérica e de sítios de implantação.....	41
4.11.1 <i>Análise estatística</i>	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Efeitos do LPS no perfil gestacional de fêmeas prenhes	44
5.3 Análise morfológica das placentas	46
5.4 Análises morfométrica das placentas.....	47

5.5 Dosagens de TNF-alfa no soro e em sítios de implantação.....	49
5.6 Análise morfológica dos sítios de implantação	50
5.7 Imunolocalização de MIF	52
5.8 Expressão de MIF na interface materno fetal.....	54
6 DISCUSSÃO	57
6.1 Uso de LPS como indutor de inflamação durante a gestação	58
6.2 LPS, Resposta inflamatória e perfil gestacional	59
6.3 Resposta Inflamatória Induzida por LPS e Repercussões na Morfologia Placentária	60
6.4 Efeito da administração de LPS sobre sítios de implantação.....	61
6.5 Expressão de MIF na interface materno-fetal	62
7 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS*	68

A implantação embrionária determina eventos biológicos de fundamental importância para o desenvolvimento do embrião e para o sucesso da gestação, como a intrusão do trofoblasto no estroma endometrial para assumir posições chave em contato com o sangue materno e com células residentes e de defesa que habitam o útero (AMOROSO, 1955; APLIN 2006; CROY 2003).

Um complexo diálogo molecular se estabelece entre células maternas e trofoblásticas ao longo de toda a gestação. Dentre as moléculas que participam deste processo destacam-se as citocinas, mediadores solúveis do sistema imunológico, com papéis distintos e relevantes na interface materno-fetal (ENTRICAN, 2002; GOSAIN ; GAMELLI, 2005; ROBERTSON, 2007).

O fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) é uma das citocinas que atuam durante a gestação, desempenhando múltiplas funções biológicas e atividades primordialmente pró-inflamatórias. O MIF é produzido por eosinófilos, mastócitos, linfócitos T e B, monócitos, macrófagos e fibroblastos em resposta a infecções ou à presença de toxinas bacterianas e estresse (BERNHAGEN et al., 1993; CALANDRA & ROGER, 2003).

A importância do MIF foi demonstrada em camundongos MIF deficientes (MIF^{-/-}); ao contrário daqueles que produzem esta citocina, estes animais apresentam diminuição no grau de severidade de doenças inflamatórias e são incapazes de controlar uma infecção provocada por *Salmonella typhimurium* (KOEBERNICK et al., 2002). MIF induz a produção de citocinas inflamatórias tais como IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, COX-2, PLA2, e MMPs (LEECH et al., 1999), além de regular processos de proliferação e morte celular (apoptose), direta ou indiretamente (HUDSON et al., 1999).

Esta citocina também é produzida na interface materno-fetal por diferentes tipos celulares em diferentes períodos gestacionais (FARIA et al., 2010). Funções atribuídas à presença de MIF nestes locais incluem papéis na resposta imunológica inata e na manutenção de um ambiente inflamatório na interface materno-placentária. No entanto, pouco se sabe a respeito da modulação de sua expressão nestes locais em condições inflamatórias.

Este estudo investiga a expressão de MIF na interface materno-fetal em condições infecto-inflamatórias simuladas no organismo materno pela administração de lipolissacárideo (LPS) de *Escherichia coli*, durante a gestação, no dia 7,5 de gestação, período imediatamente após a implantação embrionária. Os resultados

obtidos com este estudo podem contribuir com o conhecimento das atividades da interface materno-placentária em condições de desafio à homeostase gestacional.

2.1 A interface materno-placentária

Durante a gestação, as células trofoblásticas são fundamentais para o desenvolvimento da placenta e conseqüentemente, para a estreita interação entre o feto e a mãe. Esta relação desafia os paradigmas imunológicos uma vez que tecidos maternos e fetais com diferentes repertórios genéticos permanecem em contato durante toda a gestação e, é resolvida através do desenvolvimento de mecanismos de tolerância. Surpreendentemente, estes mecanismos são ativados na presença de uma ampla variedade de células de defesa imunológica (RENAUD; GRAHAM, 2008).

A interface materno-fetal é formada por tipos celulares distintos, maternos e fetais, desempenhando inúmeras funções vitais para o sucesso gestacional, dentre as quais se destacam: a ancoragem do embrião no estroma endometrial, o desenvolvimento de mecanismos específicos para impedir a rejeição fetal pelo sistema imunológico materno, o transporte de nutrientes, metabólitos e gases entre o organismo materno e o fetal, proteção e, produção de hormônios e moléculas sinalizadoras que caracterizam o diálogo materno-fetal (AIN, 2003; MOSSMAN, 1937).

Durante o processo de implantação embrionária, as células trofoblásticas que revestem o blastocisto desempenham funções fundamentais ancorando e posicionando o embrião na parede uterina e, na sequência, invadindo e abrindo vasos sanguíneos uterinos para o estabelecimento da circulação uteroplacentária (BEVILACQUA; ABRAHAMSOHN, 1989).

Em roedores a implantação inicia-se por volta do dia 4,5 de gestação. Neste momento, o blastocisto é composto pela massa de celular interna ou embrioblasto, que originará o corpo do embrião e está revestido por células trofoblásticas, mediadoras das relações materno-fetais e, a partir das quais, a placenta é formada. A população de células trofoblásticas que revestem o embrião, mas não fazem contato com o embrioblasto é chamada de mural, enquanto que a que se sobrepõe ao embrioblasto é denominada polar (POOTS, 1969).

Durante essa fase também há diferenciação do trofoblasto culminando com diferentes tipos celulares responsáveis pelas diferentes funções da placenta. O trofoblasto mural é o primeiro a se diferenciar dando origem a células gigantes e poliplóides que perdem a capacidade proliferativa e tornam-se fagocitárias e

invasivas. Estas células invadem ativamente o epitélio e estroma endometrial, ultrapassando assim as barreiras maternas e levando o embrião ao interstício do estroma endometrial. Durante esta fase as células trofoblásticas também alcançam e invadem vasos endometriais, passando a substituir o endotélio e estabelecendo precocemente uma superfície direta de contato com o sangue materno para trocas moleculares que possam subsidiar o desenvolvimento fetal (BEVILACQUA; ABRAHANSON, 1989).

O trofoblasto polar, no polo embrionário, mantém sua capacidade proliferativa, formando uma excrescência que inicialmente se projeta para a luz uterina denominada de cone ectoplacentário. As células periféricas do cone ectoplacentário também se tornam gigantes, poliploides e fagocitárias: as células trofoblásticas gigantes secundárias. Assim como suas correlatas na região abembrionária estão envolvidas com a invasão endometrial e com a abertura de vasos sanguíneos maternos. A atividade invasiva e fagocitária das células do cone ectoplacentário é intensa entre os dias 7 e 9 da gestação (ALBIERI; BEVILACQUA, 1996). As células internas do cone ectoplacentário proliferam e se diferenciam formando o espongiotrofoblasto que junto com as células gigantes formam a camada juncional da placenta ao redor do 9º dia de gestação (CROSS, 2005).

Desta forma, a partir do dia 8 de gestação a estrutura pré-placentária inicia um gradual processo de diferenciação, tornando-se mais complexa e incorporando diferentes populações celulares com funções distintas. Após a gastrulação embrionária que ocorre neste período, forma-se o alantoide, que em roedores é constituído principalmente por mesenquima. Este tecido alcança a base do cone ectoplacentário e, a partir da fusão destes folhetos obedecendo uma complexa cascata de eventos de indução celular, forma-se a zona labiríntica, a porção fetal da placenta responsável pelas trocas materno-fetais (CROSS, 2000).

No interior desta estrutura cório alantoideana formam-se vasos fetais, ramificações de vasos do cordão umbilical (ANSON-CARTWRIGHT et al., 2000; CROSS et al., 2002). A estrutura labiríntica caracteriza-se desta forma por um eixo mesenquimal vascularizado revestido por três camadas de células trofoblásticas, sendo duas sinciciais e a mais externa em contato com o sangue materno, contendo células gigantes. A proximidade dos vasos fetais com o trofoblasto forma a barreira placentária que separa o sangue materno extravasado do sangue fetal nos capilares fetais. Este sangue é proveniente da abertura dos vasos maternos pelas células

gigantes durante a implantação e ao longo da primeira metade da gestação. Inicialmente o sangue é extravasado no interstício da malha de células gigantes primárias e secundárias. Mais tardiamente com a formação da placenta este sangue atravessa a zona juncional e labiríntica através de canais revestidos por trofoblasto até a base da placenta (placa coriônica) onde é extravasado para percolar os canais labirínticos em direção à decídua e posteriormente ser drenado por vasos venosos maternos (MÜNTENER; HSU, 1977).

Durante a fase de maturação placentária, as células trofoblásticas da zona juncional se diferenciam para dar origem a células que acumulam glicogênio (células de glicogênio) e células basófilas, produtoras de hormônios como a prolactina, o lactogênio placentário, hormônio de crescimento e inúmeras outras moléculas de regulação como citocinas, quimiocinas e peptídeos reguladores (AIN et al., 2003; MALASSINÉ et al., 2003; SOARES, 2004). Parte das células gigantes desta zona também alteram seu perfil para constituir diferentes populações celulares. Conforme descrito por Cross e colaboradores (2002) estas células passam a expressar diferentes tipos de proteínas (catepsinas), assumem um perfil invasivo e migram através do endométrio mesometrial até alcançar os vasos arteriais que suprem a placenta em formação. Estas células gradativamente destroem e substituem as células das camadas muscular e íntima destes vasos, formando vasos de baixa resistência, não responsivos a reguladores vasoativos periféricos (ADAMSON et al., 2002).

Durante a fase de implantação embrionária também ocorrem modificações no endométrio, conhecidas em conjunto como reação decidual. Sob a ação hormonal específica e indução embrionária, os fibroblastos da mucosa uterina tornam-se células poligonais, com núcleos poliploides, estabelecem junções entre si, alteram a produção de componentes de matriz extracelular assumindo um aspecto epitelióide (ABRAHAMSOHN; ZORN, 1993). Estas células produzem glicoproteínas de ação hormonal como a prolactina e inúmeros fatores de regulação celular que adaptam o útero à gestação. A migração de células Natural Killer (NKs) é intensa e associada à presença de macrófagos, células T reguladoras e células dendríticas principalmente na região da glândula metrial que é contígua à decídua em sua face mesometrial (CROY et al., 1997a). Nesta fase intensa angiogenese também é observada na região mesometrial onde se forma a placenta (PLAISIER, 2010).

A decídua por sua vez também sofre modificações significativas em sua morfologia ao longo da gestação. À medida que a porção fetal placentária se diferencia, a decídua involui tornando-se vestigial a partir do 13º dia de gestação (KATZ; ABRAHAMSOHN, 1987). A região antes ocupada por células decíduais retorna às características de tecido conjuntivo onde habitam um grande número de células do sistema imunológico materno (PAFFARO et al., 2003; WANG et al., 2003; ZAVAN et al., 2010), formando a estrutura erroneamente denominada de glândula metrial. A estas células são atribuídas inúmeras funções dentro do panorama gestacional, destacando-se:

- a) restrição de invasão das células trofoblásticas (KISO et al., 1992; MANASEKI ; SEARLE, 1989); ,
- b) participação em processos angiogênicos decíduais durante o período de implantação , via cascatas de sinalização envolvendo tradução de sinal mediada por interleucina-12 (CROY et al., 1997a), pelo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e pelo fator de crescimento placentário (TORRY et al., 2007).

A placenta madura desta forma apresenta três regiões fetais distintas: a zona juncional, o labirinto e a placa coriônica e a decídua mesometrial, na face materna.

Decídua/endométrio mesometrial e trofoblasto formam assim a interface materno-fetal, uma superfície de estreita associação entre diferentes tipos celulares que se mantém em um dinâmico processo de adaptação e remodelação, constituindo a placenta hemocorial, um órgão vital e híbrido com porção materna e fetal.

2.2 Fator de Inibição de Migração de Macrófagos – MIF

O Fator de Inibição de Migração de Macrófagos foi inicialmente mencionado nos trabalhos de Lewis e Richard (1932) e de David (1966) como um fator liberado por células do sistema imunológico e como o responsável pela inibição da migração de macrófagos *in vitro*.

Atualmente, o MIF é definido como uma citocina, uma proteína ou fator produzido de forma regulada para atuar sobre a ativação e diferenciação da resposta imunológica e em especial da imunidade inata, que necessita ser finamente regulada.

O MIF é uma molécula extremamente conservada ao longo da evolução, sendo seus homólogos amplamente encontrados em organismos unicelulares como por exemplo os protozoários *Leishmania major* e *Plasmodium falciparum*. Evidências experimentais sugerem que a produção de MIF nestes organismos interfere na resposta do sistema imunológico do hospedeiro. MIF também está presente em organismos não infecciosos e que produzem poucas ou até mesmo nenhuma citocina, como é o caso da *Arabidopsis thaliana*. Questiona-se a presença de MIF nestes organismos com funções distintas das encontradas em mamíferos. Curiosamente, nenhum homólogo seu foi descrito em *Drosophila melanogaster* ou *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando que seja qual for sua função, pode ser dispensável em muitos organismos pluricelulares ou em leveduras (BUCALA et al., 2007).

Ainda que parcialmente, seu papel começou a ser elucidado na imunologia básica. A partir do isolamento e clonagem do cDNA que codifica o MIF humano biologicamente ativo (WEISER et al., 1989), as funções inicialmente propostas, advindas de experimentos *in vitro*, foram associadas à indução precoce de inflamação, principalmente na presença de fragmentos de parede de bactérias gram negativas (lipopolissacarídeo, LPS) (BACHER et al., 1996). Experimentos posteriores, entretanto mostraram uma relação mais complexa, através de um diálogo molecular entre o sistema imunológico e o endócrino, na medida em que na presença de LPS, havia liberação de MIF por células de defesa e por células hipofisárias produtoras do hormônio adrenocorticotrófico – ACTH (CALANDRA; ROGER, 2003).

Novos estudos desde então, têm protagonizado este fator atribuindo-lhe muitas outras funções além da inicialmente descoberta, dentre as quais se destacam: regulação negativa de glicocorticoides (CALANDRA et al., 1995), ativação de ERK1/2 (MITCHELL et al., 2002), inibição da proteína p53 (HUDSON et al., 1999) e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e PGE2 (BOZZA et al., 1999).

Este fator é produzido por eosinófilos e mastócitos, linfócitos T e B, monócitos, macrófagos e fibroblastos (BAUGH; BUCALA, 2002; BERNHAGEN et al., 1993; CALANDRA; ROGER, 2003; CHAISAVANEYAKORN et al., 2005) em resposta a infecção e estresse. Bactérias, toxinas microbianas e citocinas são potentes indutores de MIF.

2.3 MIF: atividades biológicas

MIF é uma citocina bastante versátil que medeia a imunidade inata e adaptativa e desempenha papéis importantes nos processos inflamatórios e infecciosos. Como função primária esta citocina causa a inibição da mobilidade de macrófagos *in vitro* (CALANDRA et al., 1995). Adicionalmente, entretanto, MIF regula positivamente a expressão de NF κ B que por sua vez aumenta em macrófagos e linfócitos a expressão de citocinas inflamatórias como, por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ), proteína inflamatória-2 de macrófago e interleucinas 1 β (IL1 β), IL-2, IL-6 e IL-8. (MITCHELL et al., 2002, ONODERA et al., 1999, 2002) e estimula a fagocitose (LEU, 1977). Reciprocamente, muitas moléculas pró-inflamatórias do sistema imunológico tais como o TNF- α e o IFN- γ são capazes de induzir a liberação de MIF por macrófagos (CALANDRA et al., 1994).

O MIF também atua sobre o crescimento celular e a viabilidade de tumores na medida em que modula a resposta imunológica e favorece o crescimento de vasos (angiogênese) associados aos tumores. MIF age sobre a proliferação celular inibindo a expressão de p53, o que reduz os processos apoptóticos e gera uma resposta inflamatória mais intensa (HUDSON et al., 1999).

Evidências experimentais mostram ainda a participação do MIF em respostas inflamatórias como antagonista de glicocorticóides (CALANDRA; ROGER, 2003) e regulador da expressão de receptor para lipopolisacarídeos presentes na parede de bactérias gram-negativas (*Toll-like receptor 4*, TLR-4) (ROGER et al., 2001).

Sendo capaz de incrementar a resposta inflamatória o MIF é, portanto, um fator de importância nas doenças infecciosas, embora seu exato papel nestes casos não esteja ainda completamente elucidado. Como mencionado anteriormente, toxinas bacterianas são potentes indutores da expressão de MIF durante o curso de uma infecção. Exemplifica esta relevância a incapacidade de camundongos deficientes em MIF (MIF $^{-/-}$) de controlar infecções como a provocada pela *Salmonella typhimurium* (KOEBERNICK et al., 2002). Este estudo mostra que estes camundongos apresentam baixos níveis séricos de citocinas inflamatórias (IL-12, IFN- γ e TNF- α) e elevados níveis de óxido nítrico e corticosterona, sugerindo que MIF não somente induz respostas inflamatórias protetoras, mas também previne a

formação de níveis elevados de intermediários reativos de nitrogênio e hormônios corticosteróides, ambos com funções imunossupressoras.

O reconhecimento de patógenos em macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e em outras células de defesa imunológica ocorre por meio de receptores transmembrânicos da superfície celular. Dentre estes, os receptores do tipo *Toll-like* (TLR) exercem um papel fundamental por reconhecer estruturas moleculares de padrões repetitivos típicas de inúmeros patógenos, tais como a estrutura dos ácidos nucleicos bacterianos (com repetições não-metiladas de dinucleotídeos), moléculas de RNA viral de dupla fita (KRIEG, 2000; WAGNER, 1999) e açúcares da parede externa de bactérias gram-negativas. Estes açúcares associados a lipídeos e designados como lipopolissacarídeos (LPS) geralmente apresentam em sua estrutura molecular seis carbonos e açúcares pouco comuns como a abequose, colilose, paratose ou tinelose que se arranjam em sequências ramificadas de quatro ou cinco unidades. Os polissacarídeos têm propriedades antigênicas e composição única dentro de um grupo servindo muitas vezes para a distinção entre gêneros e espécies de bactérias. Essas moléculas são necessárias à sobrevivência dos micro-organismos e altamente conservadas no curso da evolução. O LPS, por exemplo, foi o primeiro adjuvante imunológico identificado como ligante do receptor do tipo Toll, sendo reconhecido pelo TLR4 (MIYAKE, 2004).

Em macrófagos a presença de LPS e sua associação com receptores TLR-4 desencadeiam uma via de sinalização que ativa o fator de transcrição NFκB levando, consequentemente produção de citocinas inflamatórias como o MIF, por exemplo (AKIRA, 2006). O MIF liberado pelos macrófagos ativados pelo LPS pode ainda aumentar a expressão de TLR-4 intensificando ainda mais a resposta ao LPS (AKIRA, 2006; CALANDRA et al., 1994).

Neste contexto, o MIF facilita a detecção de toxinas/estruturas bacterianas permitindo que células diretamente relacionadas com a defesa inata, respondam rapidamente com a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Estas por sua vez, contrabalançam os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressivos dos glicocorticóides sobre as células T. O efeito anti-inflamatório dos glicocorticóides ocorre através da indução da síntese de inibidores de fosfolipase A2, impedindo a liberação dos mediadores da inflamação (GOPPELT-STRUEBE et al., 1997) e bloqueando a translocação de NFκB para o núcleo, o que suprime a transcrição dos genes associados ao processo inflamatório (FROST et al., 2000).

2.4 MIF na interface materno-fetal

MIF está presente na interface materno-placentária. De acordo com Arcuri et al., 1999, a expressão de MIF na placenta humana pode estar associada à manutenção de um ambiente favorável para o desenvolvimento fetal. Estes autores argumentam que o MIF é liberado pelas células trofoblásticas e que pode contrabalancear a ação da interleucina 10 (IL-10) abundante nas fases iniciais da implantação embrionária. Neste contexto, agiria como fator de regulação da atividade das células “NKs” uterinas, bastante numerosas neste período gestacional (FUKUI et al., 2011).

Produção muito aumentada de MIF por macrófagos, no entanto, tem também sido relacionada à perda embrionária precoce como sugere Baines et al., (1997). Macrófagos são abundantes na interface materno-fetal em primatas, determinando um alto potencial para a produção de MIF nestes locais, se devidamente ativados. Hunt e Robertson (1996) explicam este paradoxo sugerindo que macrófagos placentários não se ativam completamente limitando-se apenas a fagocitose de bactérias e a produção dos fatores necessários à gestação.

A presença de MIF na interface materno-placentária em camundongos também foi demonstrada recentemente em nosso laboratório. Faria e colaboradores (2010) mostraram a expressão de MIF ao longo da gestação com picos de expressão gênica e protéica entre os dias 10,5 e 13,5 de gestação. Este achado corrobora a ideia geral de que um ambiente inflamatório favorece o sucesso gestacional e, enfatizam um possível papel para o MIF na interação materno-fetal, além dos certamente relevantes papéis possíveis desempenhados nos processos inflamatórios e/ou infecciosos.

2.5 Inflamação na interface materno-fetal

Inflamação é a primeira linha de defesa contra traumas, lesões provocadas por diferentes causas, agentes infecciosos ou ainda contra danos provocados por estes patógenos. Embora um processo vital para a homeostase orgânica, sob diferentes condições, principalmente quando exacerbada ou atípica, pode também levar a uma resposta deletéria e às vezes, até mesmo letal para o hospedeiro.

O desencadeamento de uma resposta inflamatória está associado a expressão de sinais cardinais peculiares tais como dor, calor, rubor e tumor, e envolve uma plethora de moléculas reguladoras como citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e a ativação de diferentes populações celulares associadas a defesa orgânica. Estas células por sua vez, podem, por exemplo, tornarem-se capazes de reconhecer padrões moleculares típicos de microorganismos através de receptores específicos (JANEWAY, 1989).

A resolução de uma inflamação envolve programas específicos anti-inflamatórios que permitem o retorno à normalidade do tecido ou órgão e, desta forma são de vital importância.

A inflamação, no entanto, nem sempre está associada a patógenos ou é patológica. Durante a gestação, ocorrem respostas inflamatórias, que envolvem vários órgãos e sistemas, mas que é bem tolerada pelo organismo materno (KANELLOPOULOS-LANGEVIN et al., 2003). Durante a gestação saudável, citocinas pró-inflamatórias predominam nas fases mais precoces e mais tardias da gestação, ou seja, na fase peri-implantacional durante a formação da placenta e em uma segunda fase próxima ao parto. A resposta pró-inflamatória gestacional contribui para o sucesso da gestação, mas se exacerbada como, por exemplo, com a sobreposição de uma infecção durante este período pode levar a perdas gestacionais ou comprometer o normal desenvolvimento fetal (KAGA et al., 1996; WANG et al., 2003). Um exemplo desta associação é a presença ou cronicidade de infecções bucais (doença periodontal) durante a gestação repercutindo no baixo peso ao nascimento (ARCE, 2009).

Além de uma resposta inflamatória exagerada, mecanismos compensatórios ineficientes como, por exemplo, a produção inadequada de moléculas de perfil anti-inflamatório também é muito importante. São inúmeros os estudos que destacam a importância do delicado ajuste entre a produção de moléculas reguladoras pró e anti-inflamatórias assim como das células de defesa que as produzem para o sucesso gestacional (FUKUI et al., 2011).

Neste contexto, a compreensão dos mecanismos reguladores do perfil inflamatório celular e molecular que, quando alterado, pode comprometer de diferentes formas o processo gestacional, torna-se imprescindível seja para a avaliação de estratégias terapêuticas adequadas ou mesmo como preditor das repercussões possíveis para o feto em desenvolvimento.

Sabendo-se que MIF é uma citocina pró-inflamatória, cuja expressão está diretamente relacionada com a fase aguda do processo inflamatório e que é produzida pelas células da interface materno-fetal, levantamos a hipótese de que as células da interface materno-fetal alteram a expressão de MIF na presença de LPS para atenuar os efeitos inflamatórios locais, contribuindo desta forma com o sucesso gestacional.

Neste contexto nossos objetivos gerais e específicos estão compilados abaixo.

3.1 Objetivo geral

Este estudo pretende verificar a expressão do fator de inibição de macrófagos (MIF) na interface materno-fetal de camundongos durante a fase aguda da inflamação, no período embrionário pós-implantacional, após a administração de LPS.

3.2 Objetivos específicos

Utilizando fêmeas prenhes de camundongos da linhagem CD-1 aos 7,5 dias de gestação, este estudo visa:

- a) Estabelecer uma dose de LPS que administrada intraperitonealmente cause inflamação na fêmea prenhe, mas que seus efeitos sobre a prole não sejam letais;
- b) Determinar se há variação na expressão gênica de *Mif* durante as primeiras 6 horas após a administração de LPS por meio de ensaios de RT-PCR semiquantitativo e em tempo real;
- c) Determinar qual compartimento placentário está envolvido na expressão de MIF através de reações imunohistoquímicas durante as 6 primeiras horas pós-LPS;
- d) Avaliar a ativação do processo inflamatório nas fêmeas prenhes que receberam LPS através da dosagem da citocina pró-inflamatória TNF- α no soro e nos sítios de implantação durante o período experimental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes, equipamentos e procedências.

Os reagentes e equipamentos a seguir relacionados foram adquiridos das seguintes empresas:

Abcam (Cambridge, ING): anticorpo policlonal de coelho anti-MIF(ab65869) **Adobe Systems Inc.** (EUA): Software Adobe Photoshop CS5 extended versão 12.0 **Applied Biosystems** (Foster City, CA EUA): *master mix SYBER Green*, StepOnePlus Real-Time PCR System *with* Dell™ Tower, software GeneAmp. **Bayer** (São Paulo, Brasil): cloridrato de cetamina (Ketalar), cloridrato de tiazina (Rompun®). **BD Bioscience** (Franklin Lakes, NJ, EUA): kit de ELISA OptEia™ para TNF-alfa, placas de 96-wells. **Byosystems** (PR, Brasil): Homogenizador mecânico HOMO MIX D-130 **Cripion** (Andradina, Brasil): Soro não imune de coelho. **GE Healthcare** (Buckinghamshire, Reino Unido): *Ready-To-Go T-Primed First-Strand* kit. **Integrated DNA Technologies** (Carlsbad, CA, EUA): *primers* para MIF, peptidilprolil isomerase (*Ppia*) e YWHAZ. **Invitrogen Life Technologies** (Carlsbad, CA, EUA): agarose, brometo de etídio, ditiotreitól (DTT), dietilpirocarbonato (DEPC), DNA Ladder 100-1000 pares de bases (pb), desoxirribonuclease I (DNase I), deoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTPs: dATP, dCTP, dTTP, dGTP), oligonucleotídeo (Oligo-dT); dodecil sulfato de sódio (SDS), Taq DNA polimerase, TRIzol®. **Merck KGaA** (Darmstadt, Alemanha): ácido acético, ácido clorídrico, cloreto de sódio, clorofórmio, etanol, formaldeído, hidróxido de sódio, Histosec®, isopropanol. **Sigma Chemical Co.** (St Louis, MO, EUA): ácido cítrico, ácido etileno diamino tetraacético (EDTA), albumina sérica bovina (BSA), glicerol, kit revelador *fast red* TR/Naftol AS-MX e *fast* DAB, lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) L2654, paraformaldeído, poli-L-lisina, tampão fosfato salina (PBS), tampão tris (TBS), inibidor de protease (# P8340). **Syngene** (Frederick, MD, EUA): transiluminador G:BOX Chemil-R, *software* Gene Tools. **Thermo Scientifics / Nunc Brand Products:** (Rockford, IL EUA): Pierce BCA *Protein Assay* kit, microplacas para ELISA 96 poços. **Vector Inc.** (Burlingame, CA, EUA): IgG biotinilada de cabra anti IgG de coelho e complexo avidina-biotina, conjugada à enzima fosfatase alcalina. **Zeiss** (Mannheim, Alemanha): microscópio Axioskop 2, sistema de captura Axio Vision 4.7, software para análise morfométrica AxionVision Rel. 4.8.2 **Zymed Laboratories** (São Francisco, CA, EUA) *Digest-All 3™*.

4.2 Animais

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem CD-1, com idade aproximada de 3 meses, fornecidos pela Universidade de Campinas e mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos com água e ração granulada sob regime *ad libitum* e suplementação alimentar (sementes de girassol, milho e aveia, 1:6:3) uma vez por semana.

Todo o procedimento de manipulação animal obedeceu às normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) tendo sido autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, conforme certificado de número 063/07/CEEA datado de 31/08/2007.

4.3 Acasalamento e determinação da prenhez

Ao fim da tarde, lotes de aproximadamente 20 fêmeas eram colocados em gaiolas com machos (2 fêmeas: 1 macho) para o acasalamento. A presença de rolha vaginal na manhã seguinte marcava a metade do primeiro dia de gestação (0,5 dg).

4.4 Administração de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

O lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* foi diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (PBS) e administrado como dose única intraperitoneal as 9 h da manhã (de acordo com OGANDO et al., 2003) em um volume final de 0,1 mL. Para tanto, foram utilizadas fêmeas prenhes aos 7,5 dias de gestação, período em que as células trofoblásticas apresentam intensa atividade invasiva. Os grupos controle seguiram o mesmo protocolo dos grupos experimentais, porém, receberam apenas o veículo de diluição do LPS. Cada grupo foi constituído por pelo menos, cinco fêmeas prenhes.

Este estudo foi dividido em duas etapas:

- a) administração de doses de 0,1, 0,2 e 0,3 µg/g de peso corporal de LPS, aos 7,5 dias de gestação. A gestação foi interrompida aos 17,5 dg e o perfil

gestacional estudado para a determinação da dose adequada de LPS. Cada dose foi administrada em pelo menos 5 fêmeas prenhes;

- b) administração de dose única de LPS (0,1 µg/g de peso corporal) aos 7,5 dg. A gestação foi interrompida aos 30 minutos, 1, 3 e 6 horas após a administração do LPS para análise dos efeitos do agente inflamatório na interface materno fetal e do perfil de MIF.

4.5 Coleta das amostras

Nos períodos determinados no item anterior após a administração de LPS os animais foram anestesiados com dose letal de cloridrato de tiazina e cloridrato de quetamina (1:1 v/v). Sob anestesia profunda realizou-se coleta de sangue e laparotomia para a análise e coleta dos sítios de implantação ou placentas.

Para o estudo do perfil gestacional as fêmeas prenhes aos 17,5 dias de gestação tiveram seus cornos uterinos removidos e colocados imediatamente em PBS gelado e sob microscopia estereoscópica, abertos longitudinalmente para remoção das placentas e dos sítios de implantação. As placentas foram então cuidadosamente dissecadas e analisadas conforme descrito no item 4.6. Para a análise da repercussão da administração de LPS na interface materno-fetal foram coletados os sítios de implantação 30, 1, 3 e 6 horas após a inoculação do agente inflamatório. Estes foram gentilmente removidos sem o miométrio com o auxílio de bisturis oftálmicos. As amostras de placenta seguiram procedimentos abaixo mencionados para análise morfológica, imunohistoquímica e morfométrica. As amostras de sítios de implantação foram subdivididas para posterior análise morfológica, para análise de expressão gênica e de conteúdo protéico.

Para a análise morfológica, imunohistoquímica e morfométrica cada placenta de 17,5 dias de gestação ou sítio de implantação (7,5 dias de gestação) foi cuidadosamente cortado de modo que o eixo de corte passasse na linha mediana da amostra. No caso dos sítios de implantação esta incisão expunha tecidos embrionários e maternos, no caso das placentas, expunha a região de inserção do cordão umbilical e tecido materno e fetal. Estes espécimes foram imediatamente fixados em 4% paraformaldeído em PBS por 24 h a 4 °C e seguiram protocolo de rotina para inclusão em parafina.

Para a análise de conteúdo protéico parte dos espécimes foi imersa em tampão RIPA (NP-40 1%, deoxicolato de sódio 0,25%, NaF 1 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, PMSF 1Mm, Na₃VO₄ 1Mm, Tris-HCl 50 mM pH 7,4 suplementado com coquetel inibidor de proteases. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 14.000g por 5 minutos a 4°C e seus sobrenadantes recolhidos e mantidos a -80 °C, até o momento do uso.

Para a análise de expressão gênica, sítios de implantação recém coletados foram rapidamente lavados em PBS e imersos em TRIzol® de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 Desempenho gestacional

A avaliação do desempenho gestacional dos animais do grupo tratado e controle foi realizada no dia 17,5 de gestação. Após os cornos uterinos terem sido seccionados na sua extensão longitudinal tiveram:

- a) fetos e placentas removidas, contadas e analisadas em microscópio estereoscópico para determinação do padrão de normalidade e viabilidade, fetos vivos e mortos, degenerados ou em reabsorção foram contados;
- b) determinação e contagem das reabsorções fetais, que se procedeu da seguinte forma:
 - reabsorções tardias - fetos e placentas de alguma forma reconhecíveis,
 - reabsorções precoces – subtraindo-se do número de áreas sulfeto positivas no útero (total de sítios de implantação) os fetos vivos e reabsorções tardias.

A identificação de sítios de implantação foi realizada pelo método preconizado por Salewski (1964) incubando-se o corno uterino após a retirada das placentas e fetos e reabsorções visíveis com sulfeto de amônio 10%, por 10 min. Estas áreas sulfeto+ contadas nos forneceram o total de sítios de implantação/animal.

A partir destes dados foi calculado o índice de reabsorção para cada fêmea prenhe de acordo com a seguinte fórmula: número total de reabsorções/ número total de sítios de implantação x 100 (OGANDO et al., 2003). Os valores médios encontrados foram plotados e comparados em relação ao grupo controle. Os valores foram estatisticamente analisados pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis e teste complementar de Dunn para comparações múltiplas. Consideraram-se diferenças significativas quando $p < 0,05$.

4.7 Análises morfológica e morfométrica

A análise morfológica e morfométrica das placentas e morfológica dos sítios de implantação foram realizadas a partir de cortes transversais totais de 3 animais de cada grupo experimental. Os fragmentos de tecido foram rotineiramente processados para inclusão em Histosec®. Cortes de 5 µm foram obtidos, corados por HE e analisados em microscópio de luz convencional.

A análise morfométrica foi realizada em imagens obtidas a partir destes cortes histológicos. Para a análise da placenta, tomou-se o cuidado, entretanto, de só medir áreas em que a inserção do cordão umbilical fosse observável no preparado histológico, o que foi considerado como referência de equivalência entre as amostras. As imagens foram capturadas e digitalizadas sempre na mesma magnitude (2,5x) utilizando-se o sistema de captura Axioncam. Para os sítios de implantação a referência de equivalência utilizada foi a observação de cones ectoplacentários íntegros.

As medidas de extensão das camadas placentárias foram realizadas com o auxílio do software AxionVision Release versão 4.8.2. Foram realizadas pelo menos 5 medidas da região mediana das placentas nas circunjuncções da inserção do cordão umbilical. As áreas totais referentes às camadas juncional e labiríntica também foram estimadas com o auxílio do *software* Image-J. Este sistema possibilita a desconstrução da imagem e a medida do perímetro de cada região em separado. As áreas totais das estruturas foram comparadas pelo teste estatístico *t* de *Student* em relação ao grupo controle. O nível de significância considerado foi de $p \leq 0,05$.

4.8 Imunolocalização de MIF

A imunolocalização de MIF foi realizada em preparados histológicos de sítios de implantação. Cortes seriados de 5 µm de espessura aderidos a lâminas histológicas previamente preparadas com poli-L-lisina (0,1%) foram desparafinizados, reidratados e submetidos ao seguinte protocolo:

- a) tampão Tris-salina (TBS) 0,02 M pH 7,4 a 4 °C, overnight;

- b) resgate dos sítios antigênicos com enzima *Digest-All 3™*, a 37 °C por 5 min, em câmara úmida;
- c) lavagem com TBS a temperatura ambiente;
- d) bloqueio da atividade enzimática por 15 min, a temperatura ambiente;
 - para a fosfatase alcalina - ácido acético 8% em água destilada,
 - para a peroxidase - peróxido de hidrogênio 36% vol e Metanol 1:1 (v/v).
- e) lavagem com TBS à temperatura ambiente;
- f) bloqueio de sítios inespecíficos com albumina sérica bovina (BSA) 3 % em TBS por 1 h à temperatura ambiente;
- g) incubação com anticorpo primário policlonal IgG de coelho anti-MIF, na diluição de 1:100 em TBS, overnight à 4° C em câmara úmida;
- h) lavagem com TBS a temperatura ambiente;
- i) incubação com anticorpo secundário: IgG de cabra anti-IgG de coelho biotilado (H+L) (Vector), na diluição de 1:100 em TBS por 1 h à temperatura ambiente em câmara úmida;
- j) lavagem com TBS à temperatura ambiente;
- k) incubação com complexo avidina-biotina, conjugada à enzima fosfatase alcalina ou peroxidase por 1 h em temperatura ambiente em câmara úmida
- l) lavagem com TBS à temperatura ambiente;
- m) revelação da atividade enzimática;
 - para a fosfatase alcalina utilizou-se o kit revelador *SIGMAFAST™ Fast Red TR/Naftol AS-MX*;
 - para peroxidase utilizou-se o kit revelador *SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine*.
- n) contra-coloração com hematoxilina de Mayer;
- o) montagem da lâmina;

Grupos controle negativos seguiram o protocolo acima, porém a incubação com o anticorpo primário foi substituída por incubação em soro não imune de coelho na diluição de 1:10000 em TBS. As amostras foram analisadas em microscópio de luz convencional Axioskop 2 (Zeiss) acoplado a um sistema de captura de imagens. As imagens foram capturadas e digitalizadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop.

4.9 Expressão gênica de MIF

Para cada grupo de tratamento com LPS, foram sacrificados 3 animais sendo que de cada animal foram separados 3 sítios de implantação aparentemente saudáveis para análise da expressão gênica de MIF por RT-PCR e qPCR. Os procedimentos para a extração de RNA, síntese e amplificação de cDNA seguiram a descrição de FARIA et al. (2010), que resumidamente se segue.

As amostras coletadas foram colocadas em 500 µL de reagente TRIzol® e homogeneizadas. A seguir foram ressuspensas em clorofórmio e centrifugadas a 12.000g, por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi retirado e precipitado em isopropanol por 1 hora a -80 °C. As amostras foram centrifugadas a 12.000g, por 15 min a 4 °C e o precipitado lavado em 70% de etanol em água tratada com DEPC, sendo centrifugado em seguida a 8.000g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento com RNA foi seco ao ar e eluído em água DEPC e mantido a -80° C até o momento do uso. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *Ready-To-Go T-Primed First-Strand Kit* de acordo com a recomendação do fabricante.

As reações de RT-PCR semi-quantitativo e qPCR foram geradas a partir de 1 µg de cDNA utilizando-se um mix 2,5 µL de tampão para PCR 10X, 0,5 µL de dNTP mix, 1,5 µL MgCl₂ (1,5mM), 0,5 µL de *primer sense* e 0,5 µL de *primer anti-sense* conforme mostrado na Tabela 1. Após a incubação do mix a 94 °C por 5 min, adicionou-se a enzima Taq DNA polimerase e a amplificação dos produtos ocorreu após 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão.

A análise dos produtos de PCR foi realizada em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL utilizando-se marcador de peso molecular (DNA Ladder) de 100 pares de bases. As imagens foram visualizadas em transiluminador (G:BOX Chemil-R) para quantificação densitométrica das bandas no gel de agarose através do programa *Gene Tools*. Os valores obtidos para a ciclofilina (peptidilprolil isomerase, *Ppia*) foram utilizados como referência para a análise semi-quantitativa.

Os mesmos cDNAs utilizados no ensaio de RT-PCR foram utilizados para o ensaio quantitativo de PCR em tempo real. Para isso foi utilizado o kit máster mix com SYBR Green (especificação) de acordo com a orientação do fabricante em um *Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System with Dell™ Tower*. O método de análise $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado com o gene *Ywhaz* (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide*

[*Mus musculus*]) como normalizador. As amplificações foram realizadas utilizando-se condições padrão de ciclagem sendo: 10 min a 95 °C para ativação da enzima, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg, anelamento por 60 seg nas temperaturas referentes aos primers e extensão a 72 °C por 30 seg. As curvas padrão foram realizadas para todos os transcritos a fim de se comprovar a linearidade e eficiência de amplificação utilizando-se diluições seriadas dos cDNA. A curva de dissociação foi realizada com os produtos de amplificação para se assegurar a temperatura de dissociação dos mesmos e eficiência do *primers*. O software GeneAmp foi utilizado para quantificar os níveis de expressão dos genes. Como controle negativo foi utilizado um mix de amplificação completo no qual o cDNA foi substituído por água.

Tabela 1 - Sequência de *primers**, suas temperaturas de anelamento (T) e dimensões do produto esperado

<i>Primer</i>	GenBank nº	Sense 5'-3'	Antisense 5'-3'	Produto de (pb)	T°C
<i>Mif</i>	NM_001481076	TGCCCAGAACCGC AACTACAGTAA	TCGCTACCGGTGGATAA ACACAGA	218	60
<i>Ppia</i>	NM_913899	CTTGCTGCAGACAT GGTC	GCAATCCTGCTA GACTTG	660	58
<i>Ywhaz</i>	NM_0117402	GAAGCCACAATGTT CTTGCCCAT	AAACCAACAGAGACTTG GAAGCAC	84	58

*Sequencia de *primers* utilizados nos experimentos de RT-PCR e qPCR. Devido ao pequeno tamanho do produto sintetizado o mesmo *primer* para *Mif* foi utilizado para ensaios quantitativos e semi-quantitativos. Para os ensaios semi-quantitativos, utilizou-se o *primer Ppia* para análise do controle interno enquanto que para os ensaios quantitativos utilizou-se o *Ywhaz*.

FONTE: Nascimento (2012)

4.9.1 Análise estatística

A quantificação relativa foi analisada estatisticamente através do Software para análise de expressão relativa REST (©)Beta V1.9.12, 2009. O grupo de animais controle de 30 minutos foi utilizado como amostra de referência, sendo considerado artificialmente como o calibrador (PFAFFL et al., 2002).

4.10 Dosagens de TNF-alfa sérica e de sítios de implantação

A avaliação de um ambiente inflamado após a administração de LPS foi inferida pela dosagem de TNF- α no soro e localmente no sítio de implantação.

O sangue coletado (500 μ L / fêmea) foi imediatamente centrifugado a 4 °C, 2000 g por 30 minutos para obtenção do soro, que foi aliquotado e conservado a -80 °C até o momento da determinação da concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Os sítios de implantação foram homogeneizados no tampão RIPA e centrifugados a 12.000 g por 5 min, a 4 °C e desaceleração lenta. Os sobrenadantes foram coletados, tiveram as proteínas totais quantificadas e congelados a -80 °C até o momento do uso. Para a dosagem utilizou-se para isto o kit OptEIA™ como descrito a seguir.

Placas de 96 wells foram revestidas com o anticorpo de captura anti-TNF- α na concentração de 1:250. A placa foi incubada *overnight* em câmara úmida e à temperatura de 4 °C. No dia seguinte, após a lavagem com PBS contendo 0,1% de Tween, realizou-se o bloqueio com tampão PBS contendo 5% de BSA por 1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação e lavagem, as amostras puras foram colocadas na placa e foi realizada a diluição seriada. A placa foi incubada *overnight* em câmara úmida e à temperatura de 4 °C e na sequência lavadas, acrescidas do anticorpo conjugado à estreptavidina e incubadas à temperatura ambiente, por 1 hora. Em seguida, foi adicionado o TMB responsável pela coloração da placa. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico e lida em leitor óptico utilizando-se filtro de 450nm.

4.11.1 Análise estatística

A análise quantitativa de TNF- α foi realizada a partir dos valores medianos obtidos da relação de TNF- α da curva padrão. Os resultados foram analisados utilizando-se teste t de *Student*. Todos os dados foram expressos como mediana $\pm$ desvio padrão. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5.1 Efeitos do LPS no perfil gestacional de fêmeas prenhes

As Tabelas 2 e 3 mostram o efeito das diferentes doses de LPS administradas em fêmeas prenhes no período pós-implantacional com análise no dia 17,5 de gestação.

Como pode ser observado na Tabela 2, o total de sítios de implantação encontrados não variou em função da dose administrada, confirmando que as fêmeas randomicamente selecionadas para os experimentos partiram de condições reprodutivas semelhantes. A análise destes sítios, entretanto mostrou que o LPS interfere na viabilidade dos mesmos. Nas doses acima de 0,2 e 0,3 µg de LPS/g de peso corporal, o índice de reabsorções foi significativamente elevado em comparação às demais doses ($p<0,001$), passando de valores entre 5 e 8% para cerca de 75% de perdas embrionárias e/ou fetais. Nota-se, entretanto que na dose de 0,1 µg de LPS/g de peso corporal apesar de ter havido aumento significativo no número de perdas fetais ($p=0,0003$), este não atingiu valores equivalentes aos observados nas doses mais altas do LPS.

Tabela 2- Efeito da administração de LPS no dia 7,5 de gestação sobre os parâmetros gestacionais de fêmeas prenhes

LPS/µg/g peso corporal	Nº de fêmeas prenhes	Total de sítios de implantação	Nº total de reabsorções	Índice de reabsorção (%)
0	10	14±1,61	1,00±1,31	5,88±9,99
0,06	7	12,5±1,29	1,25±0,9	7,98±8,15
0,1	8	13,0±2,23	1,87±1,8	16,09±17,8
0,2	9	14,6±2,06	10,8±5,8 ^a	75,06±38,94 ^a
0,3	4	12,75±4,11	8,5±5,44 ^b	76,38±47,22 ^b

Os dados representam a média ± desvio padrão. a-b, diferenças significativas em relação ao grupo controle ($ap<0,05$; $bp<0,01$). Teste de Kruskal- Wallis e teste complementar de Dunn para comparações múltiplas. Os valores do índice de reabsorção foram calculados para cada indivíduo de acordo com a seguinte fórmula: número total de reabsorções/ número total de sítios de implantação x 100 (Ogando et al., 2003).

FONTE: Nascimento (2012)

A análise macroscópica e o uso de sulfeto de amônio nos cornos uterinos permitiram identificar nas amostras fetos reabsorvidos tardiamente e massas hemorrágicas fruto de reabsorção precoce. Esta análise (Tabela 2 e 3) mostrou que o aumento no número médio de reabsorções observadas com a dose igual a 0,2 e

0,3 µg/g de peso corporal é o resultado de reabsorções precoces ($p=0,008$) e não de comprometimento fetal tardio, sugerindo que a ação do LPS ocorreu em fases imediatamente após sua administração.

Tabela 3 - Efeito da administração de LPS no dia 7,5 de gestação sobre o número de reabsorções totais e precoces

LPS / µg/g peso corporal	Nº de fêmeas prenhes	Total de reabsorções	Reabsorções tardias	Reabsorções precoces
0	10	1,00±1,31	0,2±0,4	1,00± 1,3
0,06	7	1,25±0,9	0,57±0,97	0,43±0,78
0,1	8	1,87±1,8	0,3±0,51	1,5±1,5
0,2	9	10,8±5,8 ^a	1,6±3,39	9,2±6,8 ^b

Os dados representam a média ± desvio padrão. a-b, diferenças significativas em relação ao grupo controle ($ap<0,05$; $bp<0,01$). Teste Kruskal- Wallis e teste complementar de Dunn para comparações múltiplas.

FONTE: Nascimento (2012)

5.2 Efeitos do LPS nos Parâmetros Biométricos de Fêmeas Prenhes

A Tabela 4 mostra o efeito da administração de diferentes doses de LPS no peso dos fetos. Nitidamente houve diferença significativa em relação ao grupo controle quando a dose administrada foi de 0,2 µg LPS/g de peso animal ($p<0,05$). Neste grupo, o peso médio fetal mostrou-se reduzido em quase 50%.

Animais que receberam esta mesma dose de LPS também apresentaram alteração significativa no peso das placentas ($p<0,01$) e no comprimento fetal ($p<0,001$). Nenhum grupo tratado apresentou diferença significativa no diâmetro das placentas quando comparado com o grupo controle.

Tabela 4 - Efeito da administração de LPS no 7,5 dias de gestação sobre o peso e comprimento de fetos e placentas e diâmetro das placentas

LPS / µg/g peso corporal	Nº de fêmeas prenhes	Peso fetos	Comprimento fetos	Peso placentas	Diâmetro placentas
0	10	1,05±1,08	2,00±0,11	0,12±0,02	0,9±0,08
0,06	7	1,21±0,13	1,9±0,24	0,12±0,007	0,42±0,49
0,1	8	1,17±0,13	2,06±0,15	0,12±0,02	0,86±0,07
0,2	9	0,52±0,63 ^a	0,93±1,10 ^b	0,05±0,06 ^c	0,17±0,34

Os dados representam a média ± desvio padrão dos valores encontrados. a-c, diferenças significativas em relação ao grupo controle ($ap<0,05$; $bp<0,001$; $cp<0,01$). Teste Kruskal- Wallis e teste complementar de Dunn para comparações múltiplas.

FONTE: Nascimento (2012)

5.3 Análise morfológica das placentas

A análise morfológica das placentas de 17,5 dias de gestação de fêmeas que receberam diferentes doses de LPS foi realizada em cortes histológicos corados pela HE e analisados em microscopia de luz convencional.

As amostras das fêmeas do grupo controle mostraram estrutura placentária organizada e bem definida em suas regiões principais, a saber: placa coriônica, labirinto e zona juncional. O labirinto, formado por colunas ramificadas e anastomosadas de cório, está revestido externamente por células trofoblásticas gigantes associadas a outras duas camadas sinciciais. Estas camadas de trofoblasto estão em íntimo contato com vasos fetais, revestidos por endotélio. Por entre os espaços destas colunas percola sangue materno extravasado.

A face externa do labirinto, voltada para o endométrio, faz contato com a camada juncional. Esta, muito menor em espessura do que o labirinto, está composta por diferentes tipos celulares e caracteristicamente não apresenta mesênquima associado. Células trofoblásticas gigantes delimitam a interface com a decídua e se organizam em forma de malha, estabelecendo contatos entre si através de seus prolongamentos. Estas células por sua vez fazem contato com células de dimensões menores, em sua maioria de citoplasma basófilo, as células do espongiotrofoblasto. Menos numerosas, as células de glicogênio são encontradas em ninhos por entre as células do espongiotrofoblasto e as gigantes. O sangue materno percola por entre estas células.

Nas placentas das fêmeas tratadas com LPS, em geral três situações puderam ser observadas:

- a) massas hemorrágicas ou fibrosadas em áreas antes ocupadas pela placenta madura ou em desenvolvimento (reabsorções);
- b) placentas de fetos mortos em avançado estado de degeneração;
- c) placentas de fetos vivos. Neste estudo foram analisadas apenas as placentas de fetos vivos, independentemente da dose de LPS administrada.

De modo geral estas placentas apresentaram estrutura semelhante a observada nas fêmeas controle; presença de placa coriônica, labirinto e zona juncional, sem focos hemorrágicos ou áreas de enfarto. No entanto, comparativamente a zona juncional das placentas de animais tratados pareceu maior do que nas placentas dos

animais controle e frequentemente projeções de células de glicogênio invadiam a camada labiríntica (Figs. 1 e 2). Essa característica foi observada nas placentas de todos os grupos que receberam LPS sendo, entretanto, mais evidente nos grupos que receberam LPS nas doses de 0,1 e 0,2 $\mu\text{g/g}$ peso. Ainda, os espaços formados pela malha de células trofoblásticas da camada juncional parecem estar muito maiores, formando grandes lagos repletos de sangue materno, dando um aspecto muitas vezes hiperêmico a esta camada.

5.4 Análises morfométrica das placentas

A análise morfométrica das regiões placentárias confirmou a observação morfológica. Conforme pode ser observado na Tabela 3, as placentas de fetos vivos de mães que receberam o LPS na dose de 0,1 e 0,2 $\mu\text{g/g}$ peso corporal apresentaram diminuição da área da camada labiríntica ($p < 0,01$ e $p < 0,05$). O labirinto é a região de trocas metabólicas entre os organismos materno e fetal e ocupa cerca de 2/3 (75%) da placenta fetal nas fases finais da gestação. Nas placentas tratadas esta relação está alterada, ocupando o labirinto cerca de 60, 50 e 40% respectivamente para as dosagens de 0,06, 0,1 e 0,2 $\mu\text{g/g}$ de LPS.

Figura 1 – Preparados histológicos de placentas corados pela HE

Preparados histológicos de placentas coradas pela HE. Placentas de fêmeas-controle (A) e de fêmeas tratadas com LPS (B, 0,06 µg/g; C, 0,1 µg/g; D, 0,2 µg/g). Notar as dimensões menores das placentas tratadas (B-D) e a invasão de células de glicogênio na camada labiríntica (C). Zona juncional (ZJ), Labirinto (L). Aumento: 2,5X.

FONTE: Nascimento (2012)

Figura 2 - Preparados histológicos corados pela HE

Preparados histológicos de placentas coradas pela HE. **A,C** - Placentas de fêmeas-controle. **B,D** – placentas de fêmeas tratadas com LPS (0,2 µg/g de peso corporal). Notar a maior invasão de células de glicogênio na camada labiríntica da placenta de fêmeas tratadas com a dose 0,2 µg/g (C). Zona juncional (ZJ), Labirinto (L). Aumento: **A** - 2,5X; **B,D** - 10X; **C**- 5X.

FONTE: Nascimento (2012)

Tabela 5 - Efeito da administração de LPS no 7,5 dias de gestação sobre a área das regiões do labirinto e da zona juncional

LPS / $\mu\text{g/g}$ peso corporal	Nº de fêmeas prenhes	Área ocupada pelo Labirinto		Área ocupada pela Zona Juncional	
		(μm^2)	%	(μm^2)	%
0	10	$3,95 \times 10^6 \pm 5,3 \times 10^5$	75	$1,23 \times 10^6 \pm 1,45 \times 10^5$	25
0.06	7	$3,10 \times 10^6 \pm 3,96 \times 10^5$	60	$2,07 \times 10^6 \pm 7,2 \times 10^5$	40
0.1	8	$2,04 \times 10^6 \pm 5,6 \times 10^{5a}$	50	$1,84 \times 10^6 \pm 6,92 \times 10^5$	50
0.2	9	$2,34 \times 10^6 \pm 7,61 \times 10^{5b}$	40	$2,17 \times 10^6 \pm 5,4 \times 10^5$	60

Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão dos valores encontrados. *, diferenças significativas em relação ao grupo controle (^a $p < 0,01$ e ^b $p < 0,05$). Teste *t* de Student ($n=3$).

FONTE: Nascimento (2012)

5.5 Dosagens de TNF-alfa no soro e em sítios de implantação

Os níveis séricos de TNF- α mostraram uma resposta de valores relevantes após 30 min e 1 hora da administração do LPS. Em média estes valores foram 4000 vezes maiores do que os observados no controle. Após 3 e 6 horas, entretanto, os valores decrescem atingindo níveis semelhantes ao controle (Fig. 3A).

Na placenta, ao contrário os níveis de TNF- α são constitutivamente altos, na ordem 2500 pg/mL, sofrendo um relevante decréscimo após 30 minutos da administração de LPS e retornando a níveis semelhantes aos observados no controle nos tempos de 1, 3 e 6 horas (Fig. 3B).

Figura 3 – Dosagem de TNF- α em soro e sítios de implantação de animais controle e tratados com LPS

Dosagem de TNF- α no soro (**A**) e em sítios de implantação (**B**) de fêmeas tratadas ou não com LPS. Em **A**, nota-se o significativo aumento dos níveis de TNF- α após 30 minutos e 1 h após a administração de LPS e o restabelecimento de seu nível basal após 3 horas de tratamento. Os sítios de implantação apresentam valores altos de TNF- α (**B**), que diminuem significativamente 30 min após a administração de LPS, retornando a seus níveis altos nos momentos seguintes.

FONTE: Nascimento (2012)

5.6 Análise morfológica dos sítios de implantação

Os sítios de implantação de fêmeas prenhes que receberam LPS na dose de 0,1 μ g/g peso corporal no dia 7,5 de gestação foram analisados 30 minutos e 1, 3 e 6 horas após a inoculação. A análise foi realizada em cortes histológicos corados pela HE.

Em relação aos sítios de animais controles que receberam PBS no lugar do LPS, observaram-se as seguintes alterações: vasodilatação venosa na região mesometrial e um maior influxo sanguíneo na região do cone ectoplacentário (Figs. 4 e 5). A vasodilatação foi observada principalmente como um aumento do lúmen dos capilares decíduais que via de regra estavam repletos de sangue em seus interiores (Figs. 4B-F, 3C). No embrião também se observou dilatação do saco vitelino que apresentou lúmen muito mais aumentado nos sítios do grupo com LPS (Figs. 4B-D, F). Também se observou infiltrado leucocitário na superfície das células trofoblásticas e (Fig. 4D). Nos vasos decíduais frequentemente observou-se adesão de leucócitos (Fig. 4E). Estas alterações foram mais exuberantes 1h após a administração do LPS. Em alguns casos a hiperemia era tão intensa que não era possível distingui-la de áreas hemorrágicas.

Figura 4 – Preparados histológicos de sítios de implantação aos 7,5 dias de gestação tratados ou não com LPS

Sítios de implantação aos 7,5 dias de gestação: controle (A) e 30-min (B), 1-h (C), 3-h (D) e 6-H (E-F) após tratamento com LPS. Notar a dilatação do saco vitelino (y) e aumento de vasodilatação na decídua mesometrial (*) em B, C, D e F. (E) embrião, (CE) cone ectoplacentário. Hematoxilina e Eosina. Barra em A = 1 mm em todos os painéis. Aumento: 5X.

FONTE: Nascimento (2012).

Figura 5 – Preparados histológicos de sítios de implantação aos 7,5 dg tratados com LPS

Fotomicrografias de sítios de implantação de fêmeas prenhes tratadas com LPS aos 7.5 dias de gestação e sacrificadas 30 min (A), 1h (B, D-E), 3h (C) e 6h (F) após o tratamento. Notar que em todos os espécimes há sinais de hiperemia. Em B (⊗) e D, observa-se acúmulo de leucócitos (L) na superfície do cone ectoplacentário (ct). Vasodilatação dos capilares da decidua mesometrial (d) é particularmente evidente na figura 5C (*). Observar também o grande número de leucócitos marginalizados nos vasos decíduais (E). Hematoxilina e Eosina. Aumentos: A-B= 10x; C,F=5x; D-E=20x; G=40x.

FONTE: Nascimento (2012)

5.7 Imunolocalização de MIF

Células imunorreativas para MIF foram observadas nos sítios de implantação de 7,5 dias de gestação nos animais dos grupos controle e tratado (Fig. 5). Nas amostras provenientes do grupo controle (Fig. 5A) células decíduais e células trofoblásticas gigantes do cone ectoplacentário e do trofoblasto mural apresentaram forte reatividade ao anticorpo, sendo a reatividade trofoblástica mais proeminente do que a decídua em contato com estas populações celulares. Na região decidual mais periférica em relação ao embrião, a decídua foi fortemente reativa ao anticorpo anti-MIF.

Na linha do tempo pós-administração de LPS observamos as seguintes características (Figs. 6B-D):

- a) após 30 minutos de administração de LPS, nitidamente a reação foi diminuída embora os locais de expressão da proteína MIF não tenham se modificado. Neste contexto, células deciduais periféricas principalmente da decídua mesometrial foram as mais reativas, assim como as células trofoblásticas do cone ectoplacentário (Fig. 6B);
- b) a reatividade ao MIF diminuiu visivelmente nos sítios de implantação das amostras de 3 horas após a administração de LPS, sendo que nas amostras de 6 horas a reatividade foi muito mais discreta (Fig. 6C-D).

Figura 6 – Imunolocalização de MIF em sítios de implantação aos 7,5 dias de gestação

Imunolocalização de MIF em sítios de implantação aos 7,5 dias de gestação. As imagens são representativas dos grupos experimentais que receberam LPS (B-D) e do grupo controle (A). O tempo de análise após a administração do LPS está indicado canto superior direito de cada figura. A reatividade ao MIF (coloração amarronzada) é muito mais intensa no controle (A) do que nos grupos experimentais (B-D) e se localiza principalmente nas camadas profundas da decídua mesometrial (de). CE, cone ectoplacentário, E, embrião. Imunoperoxidase, contracoloração Hematoxilina de Mayer. Barra em A = 1 mm.

FONTE: Nascimento (2012).

Quando analisados os componentes celulares reativos, observa-se que principalmente células endoteliais e deciduais próximas a grandes vasos estavam coradas além das células trofoblásticas no compartimento embrionário (Fig. 6). Este achado foi observado em todas as amostras, variando em intensidade e em número de células reativas nas amostras dos sítios de 30 minutos e 1 hora.

Figura 7 – Imunolocalização de MIF em sítios de implantação aos 7,5 dias de gestação

Imunolocalização de MIF em sítios de implantação aos 7,5 dias de gestação. Em (A) células decíduais e (B) endoteliais imunoreativas localizadas próximas a grandes vasos após 30 minutos de tratamento com LPS. (C) Células do trofoblasto mural imunoreativas após 3 horas de administração de LPS. (D-E) Após 6 horas da administração de LPS a decídua mesometrial apresenta células discretamente marcadas. (ce) cone ectoplacentário; (d) decídua mesometrial; (cm) capilar materno. Aumentos: A,E= 10x; B,D=10x; C,E=20x.

FONTE: Nascimento (2012).

5.8 Expressão de MIF na interface materno fetal

A expressão de MIF na interface materno-fetal foi avaliada a partir da extração do RNA total de sítios de implantação. As amostras de RNA total extraídas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% com formaldeído a fim de se constatar a integridade do mesmo. Somente as amostras que apresentaram 2 bandas distintas correspondentes aos RNAs das subunidades ribossomais 18S e 28S na proporção 2:1 foram utilizados para a síntese de cDNA. O controle da eficiência da síntese de cDNA foi checado através da eletroforese das amostras em gel de agarose 1%. As amostras que apresentaram um “arraste” foram utilizadas para as reações de PCR (Fig.8).

Figura 8 – Géis representativos de RNA e cDNA

Géis representativos onde se observam: em A, As bandas 28S e 18S de uma amostra de RNA íntegro, e em B, bandas difusas de cDNA.

FONTE: Nascimento (2012)

Uma banda correspondente ao peso de 212pb - produto de *Mif* em RT-PCR- foi obtida a partir de cada amostra examinada. A análise quantitativa obtida através da técnica de qPCR mostrou uma maior expressão de *mRNA* no sítio de implantação no grupo analisado 6 horas após a administração de LPS, em relação ao respectivo controle (Fig. 9).

Figura 9 – Gel e gráfico de RT-PCR

Expressão de *Mif* em sítios de implantação após a administração de LPS e PBS. Em **A**, gel representativo mostrando os fragmentos amplificados de cDNA de *Mif* e *Ppia* obtidos de sítios de implantação através da técnica de RT-PCR. Em **B**, histograma representando a expressão relativa de *Mif* em relação à YWHAZ através de qRT-PCR. a, valores significativamente diferentes em relação aos demais, $p < 0,01$.

FONTE: Nascimento (2012)

Como controle para os experimentos de qPCR, foram realizadas curvas de dissociação e curvas padrão para as amostras dos grupos tratados e controles. Todas as curvas foram realizadas com *primers* para *Mif* e *Ywhaz* e mostraram apenas um pico (Fig. 10 A), evidenciando um único produto amplificado e a ausência de formação de dímeros que pudessem comprometer as reações. Curvas padrão realizadas para verificar a eficiência das reações mostraram uma eficiência de 95,9% para o *Ywhaz* e 99,9% para o *Mif* (Fig. 10 B).

Figura 10 – Curvas padrão e de dissociação dos ensaios quantitativos de PCR

Curvas de dissociação (**A**) e curvas padrão (**B**) representativas das amostras de sítios de implantação utilizados nas reações de qPCR.

FONTE: Nascimento (2012)

6.1 Uso de LPS como indutor de inflamação durante a gestação

Mediadores solúveis derivados de agentes infecciosos como toxinas e constituintes da parede celular dos microrganismos, tais como o lipopolisacarídeo (LPS), têm sido há muito utilizados como modelo para estudo do processo inflamatório. De modo geral, o uso deste produto microbiano pode resultar em ativação celular e liberação de mediadores inflamatórios responsáveis em promover respostas orgânicas em diferentes níveis (permeabilidade vascular, ativação e quimiotaxia leucocitária, produção citocinas e quimiocinas, etc) entre outras múltiplas respostas associadas com o mecanismo de eliminação do microrganismo.

Neste estudo, LPS foi utilizado como indutor de inflamação durante a gestação. LPS é capaz de ativar a expressão e atividade da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) responsável pela produção de prostaciclina e prostaglandina e ainda, participa de mecanismos indutores de óxido nítrico (NO). Este por sua vez, atua como modulador do sistema imunológico inato ativando leucócitos locais ou atuando diretamente como bactericida. Estudos realizados por Friebe et al. (2011), Ogando et al. (2003), O'sullivan et al. (1988) e Silver et al. (1995) dentre muitos outros mostram o drástico efeito da administração de altas doses de LPS, durante a gestação. Nestes experimentos, LPS utilizado nas fases gestacionais iniciais induziram altos índices de reabsorção (OGANDO et al., 2003; O'SULLIVAN et al., 1988; SILVER et al., 1995). O exacerbado processo inflamatório desencadeado pelo uso de LPS desencadeia uma intensa resposta do sistema imunológico materno o que por sua vez é incompatível com a manutenção das condições necessárias para os processos de implantação embrionária e desenvolvimento placentário. Já sua utilização em doses baixas em fases mais tardias, ao redor do 13º dia de gestação tem sido bastante útil como modelo de estudo dos mecanismos associados à indução de aborto ou de nascimento prematuro (FRIEBE et al., 2011 ; RENAUD et al., 2011).

Diferentemente dos demais trabalhos mencionados, este estudo teve como objetivo analisar gestações a termo que tenham sucedido uma infecção. Neste foco, diferentes doses de LPS foram testadas e o efeito sobre a gestação, analisado. Foi selecionada a maior dose de LPS com os menores índices de comprometimento fetal.

6.2 LPS, Resposta inflamatória e perfil gestacional

Nossos resultados mostraram que doses de LPS maiores do que 0,2 µg/g de peso corporal administrado no dia 7,5 de gestação interferem de forma significativa nas taxas de perdas fetais. As perdas fetais foram de quase 100% sendo praticamente todas precoces. A análise destes fetos e placentas mostrou um claro comprometimento no desenvolvimento de ambos, talvez reflexo de uma análise tardia (dia 17,5 de gestação), muitos dias após a perda de viabilidade fetal.

Evidências experimentais têm associado as perdas fetais induzidas pelo LPS à expressão de TLR4, o que também pode ter sido neste estudo a causa do aumento das perdas fetais. Em gestações humanas, cogita-se a possibilidade do aumento na exposição desse receptor por células trofoblásticas e, fibroblastos e células dendríticas da decídua da placenta humana levar à exacerbação da resposta imunológica e inflamatória principalmente no território placentário materno além de problemas neurológicos e perda de peso fetal (ADAMS et al., 2007; ARCE et al., 2010; ELOVITZ et al., 2011; LI et al., 2010; YUEHONG et al., 2007).

No contexto deste estudo, entretanto, com o objetivo de estudar doses que permitissem o desenvolvimento gestacional, as doses iguais ou maiores do que 0,2 µg/g não se mostrando compatíveis com o sucesso gestacional, não foram aqui consideradas.

As doses menores testadas de 0,06 e 0,1 µg/g não alteraram as taxas de mortalidade nem os valores paramétricos dos fetos e placentas e, portanto se adequaram às nossas metas de estudo.

Dados acumulados na literatura mostram que o desencadeamento de uma resposta inflamatória está associado a um aumento na produção de TNF-α (KRAKAUER et al., 2010; LEAZER et al., 2002; MAKITA et al., 1998; SILVER et al., 1995). Neste contexto o perfil sérico de TNF-α das fêmeas prenhes que receberam a maior dose de LPS sem interferência com as taxas de perdas fetais (0,1 µg/g) foi analisado, observando-se um acréscimo significativo desta citocina, confirmando o desencadeamento de uma resposta inflamatória.

6.3 Resposta Inflamatória Induzida por LPS e Repercussões na Morfologia Placentária

Neste estudo foram analisadas apenas as placentas de fetos vivos. A análise morfológica mostrou placentas de estrutura semelhante ao observado no grupo controle, com regiões bem definidas e sem focos hemorrágicos ou áreas de infarto. As modificações mais evidentes observadas foi o aumento da zona juncional em detrimento da diminuição da zona labiríntica, projeções de células de glicogênio invadindo mais preponderantemente a camada labiríntica e, aumento dos espaços formados pela malha de células trofoblásticas da camada juncional formando grandes lagos repletos de sangue materno e dando um aspecto hiperêmico a esta camada. A intensidade destas características pareceu ser dose dependente, sendo mais evidentes nos grupos que receberam LPS nas doses mais altas. Nossos resultados corroboram estudos prévios da literatura que também evidenciaram modificações mais proeminentes na zona juncional da placenta de roedores em situações de inflamação materna (ARCE et al., 2009). Provavelmente devido à concentração utilizada de LPS (baixa) não se observou, entretanto infiltração de células de defesa em nenhum dos tecidos placentários, fetal ou materno, como demais estudos que utilizaram LPS na gestação (O'SULLIVAN et al., 1988).

A possível repercussão destes achados por outro lado é digna de nota. A diminuição do labirinto, a área de trocas moleculares da placenta, pode sem dúvida comprometer o desenvolvimento fetal e dependendo do grau de injúria levar a óbito fetal. O exato mecanismo através da qual os mediadores inflamatórios agem nesta região vital ainda são especulativos, exceto quando ocorre intensa infiltração leucocitária e se supõe uma ação direta de moléculas citotóxicas.

O aumento da zona juncional por sua vez é uma característica encontrada em diferentes modelos de stress gestacional seja ele físico, emocional, químico ou infeccioso (RAUNIG et al., 2011). Uma análise generalista sobre estes achados nos leva a hipótese de que esta é uma área de extrema sensibilidade da placenta que responde a todo agente estressor aumentando sua capacidade de acumular reservas energéticas como glicogênio (GICQUEL et al., 2006) e hormônios relacionados entre outras funções à disponibilização de glicose no sangue materno como, por exemplo, o hormônio lactogênio placentário, (KIM et al., 2010) ou ao amadurecimento das condições maternas para a vida pós-fetal (prolactina) sugerido

por, SUH et al., (2011). Neste contexto, nossos achados morfológicos após a administração de LPS corroboram e confirmam esta hipótese, mesmo nas doses mais baixas.

6.4 Efeito da administração de LPS sobre sítios de implantação

Uma vez selecionada a dose inflamatória, mas compatível com a gestação, analisou-se a morfologia dos sítios de implantação 30 minutos, 1, 2, 3 e 6 horas após a administração de LPS.

A resposta aguda ao LPS se caracterizou por vasodilatação dos capilares decíduais, maior acúmulo de sangue nestes vasos (hiperemia), edema decidual, edema embrionário e adesão de leucócitos às paredes dos vasos endometriais com um dos sinais de ativação leucocitária, (KOIZUMI et al., 2003), Todos claramente fazem parte dos sinais iniciais de um processo inflamatório, que deve ter se propagando de forma sistêmica, uma vez que o LPS foi administrado intraperitonealmente e coerente com os achados compilados na literatura.

A ação do LPS em desencadear a resposta inflamatória parece estar diretamente envolvida com alterações de função das células endoteliais causadas por lesões microvasculares que levam ao aumento da permeabilidade vascular endotelial (LIU et al., 2005). O endotélio é a primeira barreira encontrada pelo LPS circulante, que estimula a produção de citocinas inflamatórias, incluindo o TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 e, sozinho ou combinado com estas citocinas induz a expressão de moléculas de adesão endotelial (E-selectina, moléculas de adesão celular (ICAM)-1, molécula de adesão vascular (VCAM)-1) que aumentam a adesão leucocitária aos vasos. A resposta do endotélio ao LPS inclui também alteração na forma destas células com formação de fendas intercelulares e aumento da permeabilidade trans-endotelial.

A ação celular do LPS parece depender ainda da ligação com o receptor de membrana CD14 (WRIGHT et al., 1990) presente em muitos tipos celulares, e estes unidos se ligam a receptores do tipo *toll* 4 (TLR4). Uma vez estabelecida a ligação LPS-TLR4, sinalização intracelular é iniciada através do domínio citoplasmático TIR (Toll/interleukin-1) a partir do qual duas rotas podem ser seguidas: via MyD88 e Mal/TIRAP (semelhante a MyD88 adaptadora/proteína adaptadora contendo TIR) que leva à ativação do fator nuclear κ B e produção de citocinas pró-inflamatórias

(TNF- α , IL1- β e IFN- γ) ou via TRAM (molécula adaptadora relacionada com TIF) e Trif (molécula adaptadora contendo TIR introduzindo interferon- β) que levam à ativação do fator 3 de resposta ao interferon (IRF-3), aumentam a transcrição de interferon 1 (IFN- α e IFN- β) e consequentemente de uma resposta antibacteriana (OHNISHI et al., 2007).

6.5 Expressão de MIF na interface materno-fetal

A expressão de MIF nos sítios de implantação nos tempos experimentais anteriormente descritos foi analisada por PCR (transcriptase reversa e quantitativo) e imunohistoquímica.

A presença de MIF nos sítios de implantação no dia 7,5 de gestação mostrou células trofoblásticas do cone ectoplacentário e deciduais mesometriais fortemente reativas. Após a administração de LPS, ao contrario do que se esperava houve diminuição desta expressão em todas as regiões mencionadas ao longo das 6 horas de análise. Quando comparadas as expressões protéica e gênica de MIF, nota-se que só há modificação no padrão de expressão gênica desta citocina após 6 horas de ação do LPS, sugerindo um estímulo tardio para a formação de novas moléculas de MIF. Ao contrário o estímulo de LPS alterou a presença da proteína, diminuindo a reatividade intracelular ao MIF. Evidências experimentais mostram que após a indução de inflamação pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) em ratos, MIF é rapidamente liberado nos tecidos (CALANDRA et al., 2003), o que pode explicar a diminuição de reatividade ao MIF intracelular encontrada após a indução de inflamação nos sítios de implantação.

Além disto, uma resposta inflamatória via de regra induz a produção de glicocorticóides em uma tentativa de manutenção da homeostase orgânica (CALANDRA et. al., 1995) e estes hormônios, por sua vez, regulam a produção e liberação de MIF (CALANDRA et al., 1995; FINGERLE-ROWSON et al., 2003), que passa a níveis séricos aumentados, como observado na indução experimental de peritonite ou sepsis (CALANDRA 2000; MAKITA et al., 1998).

Embora a abordagem experimental utilizada neste estudo não nos permita confirmar diretamente que uma situação semelhante está ocorrendo na interface materno-fetal, não se pode omitir a possibilidade de que os níveis de produção de RNAm para MIF tenham se mantido estáveis devido a influencia de glicocorticóides.

Por outro lado, a regulação de glicocorticóides sobre a expressão de MIF tem sido recentemente questionada. Aparentemente em condições inflamatórias, a produção de MIF é aumentada e esta citocina agindo como uma molécula de ação pró-inflamatória não responde mais à ação reguladora dos glicocorticóides (BRUHN et al., 2006). Neste contexto, reforça-se a possibilidade de que a queda na expressão celular de MIF seja devido a uma rápida liberação desta citocina para o meio extracelular.

Em uma análise mais detalhada das reações imunohistoquímicas, notou-se que são as células decíduais mais periféricas do sítio de implantação que reagem ao anticorpo anti-MIF, assim como leucócitos e algumas células endoteliais. Estudos realizados em nosso laboratório, buscando caracterizar potenciais células alvo para a ação do MIF na interface materno-fetal no dia 7,5 de gestação, mostraram que o complexo receptor CD74 e CD44 está presente em poucas células decíduais, mas de forma sistemática em leucócitos presentes nos espaços vasculares endometriais (MARTUCCI, 2011). A grande parte das células decíduais não apresenta o co-receptor CD44, que segundo Shi e colaboradores (2006) é essencial para a ativação intracelular de MIF.

Neste contexto, é possível que nesta fase da gestação, a liberação de MIF após a indução inflamatória esteja também voltada para a ativação leucocitária periférica, contribuindo para o desencadeamento de mecanismos de defesa relacionados à imunidade inata e adquirida.

De modo geral, níveis gênicos e protéicos aumentados de MIF são observados imediatamente após um estímulo inflamatório (CALANDRA; ECHTENACHER, 2000). O aumento da produção e liberação de MIF gera uma cascata de ativação celular associada à liberação de outras citocinas inflamatórias como o TNF- α , IFN- γ , IL1 β , entre outras (BACHER et al., 1996; HAN et al., 2012) e à expressão de receptores do tipo Toll (TLR4), sítios de reconhecimento e ligação de agentes patogênicos (ROGER et al., 2005). Na interface materno-fetal os dados obtidos sugerem que o MIF armazenado nas células decíduais tenha sido secretado após o estímulo; ainda, não foram encontradas evidências de aumento de produção da citocina pelo menos nas 6 primeiras horas após a administração do LPS. Embora neste estudo, a expressão de MIF não foi avaliada no sangue materno ou na interface materno-fetal, a expressão da proteína intracitoplasmática parece sugerir uma diminuição de MIF no compartimento tecidual.

Em diferentes modelos experimentais, MIF que é normalmente presente no soro aumenta relevantemente durante a inflamação induzida pelo LPS (BACHER et al., 1996; CALANDRA et al., 1994; LUE et al., 2002), no entanto, nem todos os tecidos respondem de forma semelhante a inflamação e à produção de MIF. A inflamação causada por peritonite aumenta os níveis de MIF no tecido renal, mas não no fígado, pulmão e coração (CALANDRA et al., 2000). Experimentos utilizando tecido cardíaco, também mostraram uma queda inicial do MIF intracelular nas primeiras 8 horas pós LPS com um aumento bastante acentuado após este período. Diferentemente, entretanto, esta diminuição dos estoques celulares correlacionou-se com o aumento imediato da produção de citocinas inflamatórias que diminuíram drasticamente as condições funcionais do órgão (GARDNER et al., 2003).

Em nosso modelo, a diminuição das reservas celulares de MIF também se mostrou associada a um aumento no perfil sérico de TNF- α mas não no perfil tecidual desta citocina que, ao contrário, diminuiu. Quando buscamos entender o perfil inflamatório no período pós LPS observamos que no soro a resposta inflamatória levou a um aumento de TNF- α entre 30 minutos e 1 hora, enquanto que no sítio de implantação os níveis de TNF- α diminuem na resposta imediata ao agente inflamatório. Embora o perfil sérico não seja compatível com uma inflamação de grandes proporções, foi suficiente para mostrar o comportamento inverso do sítio de implantação, que por sua vez também diminui a presença de MIF e não aumenta sua expressão gênica.

O aumento dos níveis séricos e teciduais de TNF- α tem sido utilizado como referência para a avaliação de inflamação em diferentes modelos utilizando LPS como agente indutor (BACHER et al., 1996; BRUHN et al., 2006; CALANDRA et al., 2000; POPA et al., 2006; ZANETTI et al., 1992). Em um primeiro contato do LPS com células efectoras, estas são ativadas e passam a liberar TNF- α aumentando seus níveis circulantes. A ativação dessas células, por sua vez, faz com que o MIF estocado citoplasmaticamente seja liberado para o meio, o que por sua vez, ativa positivamente as células efectoras de todo o organismo, liberando mais TNF- α e mais citocinas pró-inflamatórias, aumentando a resposta contra o agente infeccioso. Desse modo, sua atividade não se restringe somente ao local da inflamação, mas gera o aumento sistêmico de uma resposta contra um agente infeccioso.

Neste contexto, estes resultados parecem sugerir que a interface materno-fetal apresenta mecanismos de resposta inflamatória diferentes daqueles observados pelo organismo materno como um todo. Esta pode ser uma situação de proteção e sobrevivência fetal.

O MIF produzido na interface materno-fetal tem sido interpretado em muitos estudos, como uma forma de contrabalançar a ação antiinflamatória de IL-10 e de glicocorticóides (CALANDRA et al., 1995; FLASTER et al., 2007; LEECH et al., 1999; PAFFARO et al., 2003; PETROVSKY et al., 2003). Neste contexto, na medida em que uma reação inflamatória se instala ela obrigatoriamente desvia o equilíbrio inflamatório/antiinflamatório. É possível que na interface materno-fetal seja este desequilíbrio que faça parte do mecanismo de atenuação da produção de MIF.

Em face dos resultados obtidos neste estudo parece plausível especular que o MIF presente na interface materno-fetal responde diferencialmente a insultos inflamatórios brandos ou, mais precisamente parece ser regulado negativamente e desta forma, não exacerba a resposta inflamatória que é deletéria e abortiva, devido ao perfil de citocinas inflamatórias produzidas. Este sistema de controle do MIF, uma citocina inflamatória de largo espectro no organismo parece ser de fundamental importância para a manutenção e sucesso gestacional.

Os resultados obtidos com este estudo nos permitiram concluir que a dose de LPS selecionada de 0,1 µg/g de peso corporal:

- Aumentou os níveis séricos de TNF-alfa, sugerindo uma resposta inflamatória,
- Não aumentou os níveis de TNF-alfa na interface materno-fetal, nem as taxas de mortalidade e valores paramétricos de fetos e placentas, sugerindo mecanismos locais diferenciais em relação á indução de uma resposta inflamatória,
- Em consonância com esta possibilidade o perfil de expressão gênica de MIF na interface materno-fetal manteve-se baixo após o estímulo inflamatório, assim como a intensidade de reatividade ao MIF na interface materno-fetal (30min – 3h),
- MIF foi sempre imunolocalizado na decídua, inclusive em células endoteliais deciduais.

REFERÊNCIAS*

- ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. Implantation and decidualization in rodents. **J. Exp. Zool.**, v. 266, p. 603-628, 1993.
- ADAMS, K. M.; LUCAS, J.; KAPUR, R. P.; STEVENS, A. M. LPS induces translocation of TLR4 in amniotic epithelium. **Placenta**, v. 28, p. 477-481, 2007.
- ADAMSON, S. L.; LU, Y.; WHITELEY, K. J.; HOLMYARD, D.; HEMBERGER, M.; PFARRER, C.; CROSS, J. C. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. **Dev. Biol.**, v. 25, p. 358-373, 2002.
- ADOBE. Photoshop CS5 extended. Version 12.0. EUA: Adobe Systems Inc. Software.
- 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.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783-801, 2006.
- ALBIERI, A.; BEVILACQUA, E. Induction of erythrophagocytic activity in cultured mouse trophoblastic cells by phorbol myristate acid and all-trans-retinal. **Placenta**, v. 17, p. 507-512, 1996.
- AMOROSO, E. C. Endocrinology of pregnancy. *Br. Med. Bull.*, v. 11, p. 117-125, 1955.
- ANSON-CARTWRIGHT, L.; DAWSON, K.; HOLMYARD, D.; FISHER, S. J.; LAZZARINI, R. A.; CROSS, J. C. The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. **Nat. Genet.**, v. 25, p. 311-314, 2000.
- APLIN, J. D. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. **Reprod. Biomed.**, v. 13, p. 833-839, 2006.
- ARCE, R. M.; BARROS, S. P.; WACKER, B.; PETERS, B.; MOSS, K.; OFFENBACHER, S. Increased TLR4 expression in murine placentas after oral infection with periodontal pathogens. **Placenta**, v. 30, p. 156-162, 2009.
- ARCE, R.M.; DIAZ, P.I.; BARROS, S. P.; GALLOWAY, P.; BOBETSIS, Y.; THREADGILL, D.; OFFENBACHER, S. Characterization of the invasive and inflammatory traits of oral *Campylobacter rectus* in a murine model of fetoplacental growth restriction and in trophoblast cultures. **J. Reprod. Immunol.**, v. 84, p. 145-153, 2010.
- ARCURI, F.; CINTORINO, M.; VATTI, R.; CARDUCCI, A.; LIBERATORI, S.; PAULESU, L. Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblast. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 1299-1303, 1999.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AXIONVISION Rel. Version. 4.8.2. Mannheim: ZEISS. Software.

BACHER, M.; METZ, C. N.; CALANDRA, T.; MAYER, K.; CHESNEY, J.; LOHOFF, M.; GEMSA, D.; DONNELLY, T.; BUCALA, R. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 95, p. 7849-7854, 1996.

BAINES, M. G.; DUCLOS, A. J.; ANTECKA, E.; HADDAD, E. K. Decidual infiltration and activation of macrophages leads to early embryo loss. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 37, p. 471-477, 1997.

BAUER, S.; POLLHEIMER, J.; HARTMANN, J.; HUSSLEIN, P.; APLIN, J. D.; KNÖFLER, M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits trophoblast migration through elevation of plasminogen activator inhibitor-1 in first-trimester villous explant cultures. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.89, p. 812-822, 2004.

BAUGH, J.A.; BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor. **Crit. Care Med.**, v. 30, p. S27-S35, 2002.

BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; MITCHELL, R. A.; MARTINS, S. B.; TRACEY, K. J.; VOELTER, W.; MANOGUE, K. R.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF is a pituitary-derived cytokine potentiates lethal endotoxaemia. **Nature**, v.365, p. 756-759, 1993.

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

BOZZA, M.; SATOSKAR, A. R.; LING, L. U. B.; HUMBLE, A. A.; GERARD, C.; DAVID, J. R. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 341-346, 1999.

BRUHN, A.; VERDANT, C.; VERCROY, V.; SU, F.; VRAY, B.; VINCENT, J. L. Effects of dexamethasone on macrophage migration inhibitory factor production in sepsis. **Shock**, v. 26, p. 169-173, 2006.

BUCALA, R. **MIF: most interesting factor**. London, UK: Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 2007. Cap. 4. p. 51.

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; METZ, C. N.; SPIEGEL, L. A.; BACHER, M.; DONNELLY, T.; CERAMI, A.; BUCALA, R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. **Nature**, v.377, p. 68-71, 1995.

CALANDRA, T.; ECHTENACHER, B.; ROY, D. L.; PUGIN, J.; METZ, C. N.; HULTNER, L.; HEUMANN, D.; MANNEL, D.; BUCALA, R.; GLAUSER, M. P. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. **Nat. Med.**, v. 6, p. 164-170, 2000.

CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 791-800, 2003.

CALANDRA, T.; BERNHAGEN, J.; MITCHELL, R. A.; BUCALA, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. **J. Exp. Med.**, v.179, p. 1895-1902, 1994.

CHSAVANEEYAKORN, S.; LUCCHI, N.; ABRAMOWSKY, C.; OTHORO, C.; CHAIYAROJ, S. C.; SHI, Y. P.; NAHLEN, B. L.; PETERSON, D. S.; MOORE, J. M.; UDHAYAKUMAR, V. Immunohistological characterization of macrophage migration inhibitory factor expression in *Plasmodium falciparum*-infected placentas. **Infect . Immun.**, v. 73, p. 3287-3293, 2005.

CROSS, J. C. Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 11, p. 105-113, 2000.

CROSS, J. C. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice--a review. **Placenta**, v.26, p. 3-9, 2005.

CROSS, J. C.; HEMBERGER, M.; LU, Y.; NOZAKI, T.; WHITELEY, K.; MASUTANI, M.; ADAMSON, S. L. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 22, p. 207-212, 2002.

CROY, B. A.; MCBEY, B.A.; VILLENEUVE, L.A.; KUSAKABE, K.; KISO, Y.; VAN DEN HEUVEL, M. Characterization of the cells that migrate from metrial glands of the pregnant mouse uterus during explant culture. **J. Reprod. Immunol.**, v. 32, p. 241-263, 1997.

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

DAVID, J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 56, p. 72-77, 1966.

ELOVITZ, M. A.; BROWN, A. G; BREEN, K.; ANTON, L.; MAUBERT, M.; BURD, I. Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v.29, p. 663-667, 2011.

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

FARIA, M. R.; HOSHIDA, M. S.; FERRO, E. A.; IETTA, F.; PAULESU, L.; BEVILACQUA, E. M. Spatiotemporal patterns of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in the mouse placenta. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 8, p. 95-95, 2010.

FINGERLE-ROWSON, G.; KOCH, P.; BIKOFF, R.; LIN, X.; METZ, C. N.; DHABHAR, F. S.; MEINHARDT, A.; BUCALA, R. Regulation of macrophage migration inhibitory factor expression by glucocorticoids in vivo. **Am. J. Pathol.**, v, 162, p. 47-56, 2003.

FLASTER, H.; BERNHAGEN, J.; CALANDRA, T.; BUCALA, R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. **Mol. Endocrinol.**, v. 21, p. 1267-1280, 2007.

FRIEBE, A.; DOUGLAS, A. J.; SOLANO, E.; BLOIS, S. M.; HAGEN, E.; KLAPP, B. F.; CLARK, D. A.; ARCK, P. C. Neutralization of LPS or blockage of TLR4 signaling prevents stress triggered fetal loss in murine pregnancy. **J. Mol. Med. (Berl.)**, v.89, p. 689-699, 2011.

FROST, J. A.; SWANTEK, J. L.; STIPPEC, S.; YIN, M. J.; GAYNOR, R.; COBB, M. H. Stimulation of NFkappa B activity by multiple signaling pathways requires PAK1. **J. Biol. Chem.**, v.30, p. 19693-19699, 2000.

FUKUI, A.; FUNAMIZU, A.; YOKOTA, M.; YAMADA, K.; NAKAMURA, R.; FUKUHARA, R.; KIMURA, H.; MIZUNUMA, H. Uterine and circulating natural killer cells and their roles in women with recurrent pregnancy loss, implantation failure and preeclampsia. **J. Reprod. Immunol.**, v.90, p. 105-110, 2011.

GARNER, L. B.; WILLIS, M. S.; CARLSON, D. L.; DIMAIO, J. M.; WHITE, M. D.; WHITE, D. J.; ADAMS, G. A. 4th; HORTON, J. W.; GIROIR, B. P. Macrophage migration inhibitory factor is a cardiac-derived myocardial depressant factor. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v.285, p.H2500-H2509, 2003.

GICQUEL, C.; LE BOUC, Y. Hormonal regulation of fetal growth. **Horm. Res.** v. 65, p. 28-33, 2006.

GOPPELT-STRUEBE, M. Molecular mechanisms involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids. **Biochem. Pharmacol.**, v, 15, p. 1389-1395, 1997.

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

HAN, G.; LI, F.; SINGH, T. P.; WOLF, P.; WANG, X. J. The pro-inflammatory role of TGFβ1: a paradox? **Int. J. Biol. Sci.**, v. 8, p. 228-235, 2012.

HUDSON, J. D.; SHOAIBI, A.; MAESTRO, R.; CARNERO, A.; HANNON, G. J.; BEACH, D. H. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. **J. Exp. Med.**, v. 190, p. 1375-1382, 1999.

HUNT, J. S.; ROBERTSON, S. A. Uterine macrophages and environmental programming for pregnancy success. **J. Reprod. Immunol.**, v. 32, p. 1-25, 1996.

JANEWAY, C. A. J. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., v. 54, p. 1-13, 1989.

KAGA, N.; KATSUKI, Y.; FUTAMURA, Y.; OBATA, M.; SHIBUTANI, Y. Role of urinary trypsin inhibitor in the maintenance of pregnancy in mice. **Obstet. Gynecol.**, v. 88, p. 872-882, 1996.

KANELLOPOULOS-LANGEVIN, C.; CAUCHETEUX, S. M.; VERBEKE, P.; OJCIUS, D. M. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 2, p. 1-16, 2003.

KATZ, S.; ABRAHAMSOHN, P. A. Involution of the antimesometrial decidua in the mouse. An ultrastructural study. **Anat. Embryol. (Berl.)**, v.176, p. 251-258, 1987.

KIM, H.; TOYOFUKU, Y.; LYNN, F.C.; CHAK, E.; UCHIDA, T.; MIZUKAMI, H.; FUJITANI, Y.; KAWAMORI, R.; MIYATSUKA, T.; KOSAKA, Y.; YANG, K.; HONIG, G.; VAN DER HART, M.; KISHIMOTO, N.; WANG, J.; YAGIHASHI, S.; TECOTT, L. H.; WATADA, H.; GERMAN, M. S. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. **Nat. Med.**, v. 16, p. 804-808, 2010.

KISO, Y.; YAMASHIRO, S.; MCBEY, B. A.; CROY, B. A. Tissue-specific differentiation of a natural killer cell subset in ectopically grafted murine uterine tissue. **Transplantation**, v. 54, p. 185-187, 1992.

KOEBERNICK, H.; GRODE, L.; DAVID, J.R.; ROHDE, W.; ROLPH, M. S; MITTRÜCKER, H.; KAUFMANN, S. H. E. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against *Salmonella typhimurium*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, p. 13681-13686, 2002.

KOIZUMI, K.; POULAKI, V.; DOEHMEN, S.; WELSANDT, G.; RADEZKY, S.; LAPPAS, A.; KOCIOK, N.; KIRCHHOF, B.; JOUSSEN, A. M. Contribution of TNF-alpha to leukocyte adhesion, vascular leakage, and apoptotic cell death in endotoxin-induced uveitis in vivo. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 44, p. 2184-2191, 2003.

KRAKAUER, T.; BUCKLEY, M. J.; FISHER, D. Proinflammatory mediators of toxic shock and their correlation to lethality. **Mediators Inflamm.** v. 2010, p. 517-594, 2010.

KRIEG, A. M. The role of CpG motifs in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 35-43, 2000.

LEAZER, T. M.; BARBEE, B.; EBRON-MCCOY, M.; HENRY-SAM, G. A.; ROGERS, J. M. Role of the maternal acute phase response and tumor necrosis factor alpha in the developmental toxicity of lipopolysaccharide in the CD-1 mouse. **Reprod. Toxicol.**, v. 16, p. 173-179, 2002.

LEECH, M.; METZ, C.; HALL, P.; HUTCHINSON, P.; GIANIS, K.; SMITH, M.; WEEDON, H.; HOLDSWORTH, S. R.; BUCALA, R.; MORAND, E; F. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. **Arthritis Rheum.**, v. 42, p. 1601-1608, 1999.

LEU, R. W.; WOODSON, P. D.; WHITLEY, S. B. Role of macrophage activation on the response to migration inhibitory factor (MIF). **J. Reticuloendothel. Soc.**, v. 22, p. 329-340, 1977.

LEWIS, M. R.; RICH, A. R. The nature of allergy in tuberculosis as revealed by tissue culture studies. **Bull. Johns Hopkins Hosp.**, v. 50, p. 115, 1932.

LI, L.; KANG, J.; LEI, W. Role of Toll-like receptor 4 in inflammation-induced preterm delivery. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 16, p.267-272, 2010.

LIU, D.; ZHANG, D.; SCAFIDI, J.; WU, X.; CRAMER, C. C; DAVIS, A. E. 3rd. C1 inhibitor prevents Gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced vascular permeability. **Blood**, v. 15, p. 2350-2355, 2005.

MAKITA, H.; NISHIMURA, M.; MIYAMOTO, K.; NAKANO, T.; TANINO, Y.; HIROKAWA, J.; NISHIHARA, J.; KAWAKAMI. Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 158, p. 573-579, 1998.

MALASSINÉ, A.; FREND, J. L.; EVAIN-BRION, D. A. Comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. **Hum. Reprod.**, v. 9, p. 531-539, 2003.

MANASEKI, S.; SEARLE, R. F. Natural killer (NK) cell activity of first trimester human decidua. **Cell Immunol.**, v. 121, p. 166-173, 1989.

MARTUCCI, M. F. **Expressão do complexo receptor cd74 - cd44 para o fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) na interface materno placentária em camundongos.** 56 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MITCHELL, R. A.; LIAO, H.; CHESNEY, J.; FINGERLE-ROWSON, G.; BAUCH, J.; DAVID, J.; BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role of innate immune response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, p. 345-350, 2002.

MIYAKE, K. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. **Semin. Immunol.**, v. 16, p. 11-16, 2004.

MÜNTENER, M.; HSU, Y. C. Development of trophoblast and placenta of the mouse. A reinvestigation with regard to the in vitro culture of mouse trophoblast and placenta. **Acta. Anat. (Basel.)**, v. 98, p. 241-252, 1977.

NASCIMENTO, K. F. **Inflamação durante a gestação: efeito da administração do lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* na expressão do fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) na interface materno-fetal.** 2012. 78 f. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

OGANDO, D. G.; PAZ, D.; CELLA M.; FRANCHI, A. M. The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. **Reproduction.**, v. 125, p. 110-195, 2003.

OHNISHI, T.; MUROI, M.; TANAMOTO, K. The lipopolysaccharide-recognition mechanism in cells expressing TLR4 and CD14 but lacking MD-2. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 51, p. 84-91, 2007.

ONODERA, S.; KANEDA, K.; MIZUE, Y.; KOYAMAL, Y.; FUJINAGA, M.; NISHIHARA, J. High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints. **Cytokine**, v. 11, p. 163-167, 1999.

ONODERA, S.; NISHIHARA, J.; IWABUCHI, K.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, K.; TANAKA, S.; MINAMI, A. Macrophage migration inhibitory factor up regulates matrix metalloproteinase-9 and 13 in rat osteoblasts. - Relevance to intracellular signaling pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 7865-7874, 2002.

O'SULLIVAN, A. M.; DORÉ, C. J.; BOYLE, S.; COID, C.R; JOHNSON, A.P. The effect of campylobacter lipopolysaccharide on fetal development in the mouse. **J. Med. Microbiol.**, v. 26, p. 101-105, 1988.

PAFFARO, V. A. J.; BIZINOTTO, M. C.; JOAZEIRO, P. P.; YAMADA, A. T. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. **Placenta.**, v. 24, p. 470-488, 2003.

PETROVSKY, N.; SOCHA, L.; SILVA, D.; GROSSMAN, A. B.; METZ, C.; BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor exhibits a pronounced circadian rhythm relevant to its role as a glucocorticoid counter-regulator. **Immunol. Cell Biol.**, v. 81, p. 137-143, 2003.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 1, p. 30-36, 2002.

PLAISIER, M.; DENNERT, I.; ROST, E.; KOOLWIJK, P.; VAN HINSBERGH, V. W.; HELMERHORST, F. M. Decidual vascularization and the expression of angiogenic growth factors and proteases in first trimester spontaneous abortions. **Hum. Reprod.**, v. 24, p. 185-197, 2009.

POTTS, D. M. The ultrastructure of egg implantation. In:____. **Advances in reproductive physiology**. London: Ed. Anne McLaren. Logos Press, 1969 v. 4, p. 241.

RAUNIG, J. M.; YAMAUCHI, Y.; WARD, M. A.; COLLIER, A. C. Placental inflammation and oxidative stress in the mouse model of assisted reproduction. **Placenta.**, v. 32, p. 852-858, 2011.

RENAUD, S. J.; COTECHINI, T.; QUIRT, J. S.; MACDONALD-GOODFELLOW, S. K.; OTHMAN, M.; GRAHAM, C. H. Spontaneous pregnancy loss mediated by abnormal maternal inflammation in rats is linked to deficient uteroplacental perfusion. **J. Immunol.**, v. 186, p. 1799-1808, 2011.

RENAUD, S. J.; GRAHAM, C. H. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. **Immunol. Invest.**, v. 27, p. 535-564, 2008.

REST[®] Beta. Version 1.9.12. Hilden: Qiagen,, 2009. Software. Disponível em: <<http://www.REST.de.com>>. Acesso em: 15 abril 2012.

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

ROGER, T.; DAVID, J.; GLAUSER, M. P.; CALANDRA, T. MIF regulates innate immune responses through modulation of toll-like receptor 4. **Nature**, v. 414, p. 920-924, 2001.

ROGER, T.; CHANSON, A. L.; KNAUP-REYMOND, M.; CALANDRA, T. Macrophage migration inhibitory factor promotes innate immune responses by suppressing glucocorticoid-induced expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. **Eur. J. Immunol.**, v. 35, p. 3405-3413, 2005.

SALEWSKI, E. Färbemethode zum makroskopischen nachweis vom implantationsstellen am uterus der ratte. **Archiv. Path. Pharm.**, p. 247-367, 1964.

SHI, X.; LENG, L.; WANG, T.; WANG, W.; DU, X.; LI, J.; MCDONALD, C.; CHEN, Z.; MURPHY, J. W.; LOLIS, E.; NOBLE, P.; KNUDSON, W.; BUCALA, R. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. **Immunity**, v. 25, p. 595-606, 2006.

SILVER, R. M.; EDWIN, S. S.; TRAUTMAN, M. S.; SIMMONS, D. L.; BRANCH, D. W.; DUDLEY, D. J.; MITCHELL, M. D. Bacterial lipopolysaccharide-mediated fetal death. Production of a newly recognized form of inducible cyclooxygenase (COX-2) in murine decidua in response to lipopolysaccharide. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 725-731, 1995.

SOARES, M. J. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 2, p. 51, 2004.

SUH, C. H.; CHO, N. K.; LEE, C. K.; LEE, C. H.; KIM, D. H.; KIM, J. H.; SON B. C.; LEE, J. T. Perfluorooctanoic acid-induced inhibition of placental prolactin-family hormone and fetal growth retardation in mice. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 30, p. 7-15, 2011.

TORRY, D. S.; LEAVENWORTH, J.; CHANG, M.; MAHESHWARI, V.; GROESCH, K.; BALL, E. R.; TORRY, R. J. Angiogenesis in implantation. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 24, p. 303-315, 2007.

WAGNER, H. Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious Danger. **Adv. Immunol.**, v. 73, p. 329-368, 1999.

WANG, C.; TANAKA, T.; NAKAMURA, H.; UMESAKI, N.; HIRAI, K.; ISHIKO, O.; OGITA, S.; KANEDA, K. Granulated metrial gland cells in the murine uterus: localization, kinetics, and the functional role in angiogenesis during pregnancy. **Microsc. Res. Tech.**, v. 60, p. 420-429, 2003.

WEISER, W.Y.; TEMPLE, P. A.; WITEK-GIANNOTTI, J. S.; REMOLD, H. G.; CLARK, S. C.; DAVID, J. R. Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 86, p. 7522-7526, 1989.

WRIGHT, S. D.; RAMOS, R. A.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J.; MATHISON, J. C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**, v. 249, p. 1431-1433, 1990.

YUEHONG, M. A.; KRIKUN, G.; ABRAHAMS, V. M.; MOR, G.; GULLER, S. Cell Type-Specific Expression and Function of Toll-Like Receptors 2 and 4 in Human Placenta: Implications in Fetal Infection. **Placenta**, v. 28, p. 1024-1031, 2007.

ZANETTI, G.; HEUMANN, D.; GÉRAIN, J.; KOHLER, J.; ABBET, P.; BARRAS, C.; LUCAS, R.; GLAUSER, M. P.; BAUMGARTNER, J. D. Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. Comparative protective efficacy of antibodies to tumor necrosis factor-alpha and to lipopolysaccharide. **J. Immunol.**, v.184, p. 1890-1897, 1992.

ZAVAN, B.; PAFFARO, A. M.; JOAZEIRO, P. P.; YAMADA, A. T.; PAFFARO, V. A. J. Immunocytochemical studies of adhesion molecules on mouse UNK cells and their extracellular matrix ligands during mouse pregnancy. **Anat. Rec.**, v. 293, p. 1081-1088, 2010.