MARIANE FERRACIN MARTUCCI

**EXPRESSÃO DO COMPLEXO RECEPTOR CD74 - CD44 PARA O FATOR DE
INIBIÇÃO DE MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) NA INTERFACE MATERNO
PLACENTÁRIA EM CAMUNDONGOS**

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

São Paulo
2011

MARIANE FERRACIN MARTUCCI

**EXPRESSÃO DO COMPLEXO RECEPTOR CD74 - CD44 PARA O FATOR DE
INIBIÇÃO DE MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) NA INTERFACE MATERNO
PLACENTÁRIA EM CAMUNDONGOS**

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

Área de Concentração:
Biologia Celular e Tecidual

Orientadora:
Profa. Dra. Estela Bevilacqua

São Paulo
2011

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

Martucci, Mariane Ferracin.

Expressão do complexo receptor CD74-CD44 para o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) na interface materno placentária em camundongos / Mariane Ferracin Martucci. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua.

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

Versão do título para o inglês: MIF receptors at maternal fetal interface in mice.

Descritores: 1. Placenta 2. Citocinas 3. Trofoblasto 4. Leucócitos 5. Macrófagos 6. Prenhez I. Bevilacqua, Estela Maris Andrade Forell II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual. III. Título.

ICB/SBIB040/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariane Ferracin Martucci.

Título da Dissertação: Expressão do complexo receptor CD74-CD44 para o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) na interface materno placentária em camundongos.

Orientador(a): Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua.

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:

À minha filha querida **Júlia** fonte de amor incondicional,

Ao meu pai "**Totonho**" pela compreensão, apoio e exemplo,

À minha mãe **Lana** pelo carinho, dedicação e apoio constantes,

À minha irmã **Marcele** pelo companheirismo ímpar,

Ao meu avô **Dorival** e toda minha **família** pela confiança e conselhos

Dedico este trabalho

Agradecimento Especial

À **Profa. Dra. Estela Bevilacqua** exemplo de determinação, competência e dedicação à ciência. Pela confiança, sabedoria e apoio. Por dividir experiências e mostrar os caminhos mais sublimes a serem seguidos.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Deus, princípio de todas as coisas;

À minha família, onde encontro meu porto seguro;

Aos meus pais Luís Antônio e Lana Mara, que permitiram que eu apostasse no meu futuro;

À minha filha querida Júlia, fonte de amor incondicional e apoio;

À minha irmã e companheira Marcelle, pelo apoio e incentivo constantes;

Ao Márcio, querido, pelo apoio e carinho;

À Profa. Dra. Estela Bevilacqua, por confiar em meu trabalho e possibilitar a realização deste ideal;

Às Dras. Mara Hoshida, Miriam Faria e Sara Gomes pelos primeiros ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Sérgio de Oliveira, pelo uso de seus equipamentos, de seu laboratório e por seus ensinamentos;

A Profa. Dra. Telma Zorn, não só pela disponibilidade de uso de seu laboratório, mas, sobretudo pelo carinho;

Aos Profs. Drs. Ana Flávia de Carvalho, Patrícia Gama e Ruy Jaeger pela participação na banca de qualificação e pelas sugestões;

Ao Prof. Dr. Zago Gomes, pelas surpreendentes aulas de histologia;

Aos Profs. Drs. Marinilce Fagundes e Ruy Jaeger, pelas monitorias no programa PAE;

Aos amigos e companheiros do Trofo's Lab: Adriana, Alexandre, Aline, Camila, Carla, Érica, Fernanda, Isis, Karen, Karollina, Lesandra, Letícia, Luciana, Luizinho, Márcio, Mariana (estagiária), Rodrigo, Simone e Sônia;

Ao William Festuccia, do laboratório de Prof. Dr. Ruy Cury, pelo auxílio na interpretação dos resultados do PCR;

Ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, por disponibilizar seu equipamento de PCR em tempo real;

Aos amigos queridos da faculdade de Veterinária da USP André Francioli, Phelipe Favaron, Drica e todos os outros que de uma forma ou outra contribuíram para este trabalho;

Aos Profs. Drs. Ana Flávia de Carvalho, Carlos Eduardo Ambrósio, Daniele dos Santos Martins e Celina Mançanares, pelo companheirismo e incentivo

À secretária da pós-graduação Celiana, por toda sua ajuda;

Ao amigo Renato Salgado, pelas dicas durante o trabalho;

A todos os funcionários da biblioteca que nos recebem com tanta presteza e gentileza;

A todos os funcionários deste departamento sempre dispostos a ajudar;

As amigas Juliana, Jéssica, Fabiana, Helô e Yordanka, pela convivência agradável e sincera;

Aos meus primos Bruno e Malu, que me fizeram sentir a família mais próxima;

Aos animais, que sem saber a razão, dão a sua vida para a realização de trabalhos científicos;

À CNPq, pelo apoio financeiro;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração deste estudo e que por ventura não estejam citados neste agradecimento;

E em especial à Rosângela Augusto Farias, que não só me ajudou como técnica do laboratório, mas também como uma grande e inesquecível amiga que me acolheu e incentivou desde o início.

"Se vi mais longe, foi por me haver colocado
sobre os ombros de gigantes."

(Issac Newton)

RESUMO

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.** 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) é uma citocina envolvida na ativação da imunidade inata e regulação de suas respostas adaptativas subsequentes, produzida por diversas células, incluindo o trofoblasto durante a gestação. Conhecer as células alvos do MIF pode revelar funções de populações celulares específicas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar a expressão gênica e a localização tecidual dos receptores do MIF na interface materno-placentária ao longo da gestação. Para isto, foram utilizados sítios de implantação e placentas de camundongos aos 7,5, 10,5, 13,5 e 17,5 dias de gestação (ddg). A expressão gênica de ambos: receptor e co-receptor foi observada na região materna ao longo de todo o período estudado. O complexo CD74-CD44 foi imunolocalizado em células decíduais fenotipicamente caracterizadas, o que não havia sido previamente relatado. Células endoteliais de vasos uterinos e leucócitos presentes no interior destes vasos também se mostraram reativos aos anticorpos anti-receptores. Estes resultados sugerem que estas populações celulares endometriais são presuntivos alvos do diálogo parácrino trofoblasto-decídua. O significado funcional destes achados, no entanto, merece investigações mais detalhadas. No compartimento fetal, a expressão de CD74 ocorreu principalmente nos dias 7,5 e 17,5 dg e de CD44, ao longo de toda a gestação. Embora tenha sido detectado RNAm do complexo receptor/co-receptor, a imunolocalização destes não foi observada na população trofoblástica no dia 7,5 dg. Esta correlação negativa sugere a ação de mecanismos reguladores pós-transcricionais. Como a transdução do sinal mediado por MIF requer seu reconhecimento pela porção extracelular de CD74 para a ativação de CD44, a baixa expressão de CD74 nos dias 10,5 e 13,5 dg sugere uma restrição à sinalização mediada por este fator. Neste contexto, estes resultados indicam que a ação de MIF sobre a porção fetal da placenta é população-específica, limitada as células trofoblásticas gigantes, podendo induzir respostas mediadas pelo complexo CD44-CD74 nas fases finais da gestação. Neste estudo observou-se a expressão de moléculas do complexo receptor CD74-CD44 na interface materno placentária, abrindo novas possibilidades de mecanismos autócrinos e parácrinos em relação à sinalização mediada por MIF durante a gestação.

Palavras-chave: CD74. CD44. Citocinas. Decídua. Gestação. Placenta.

ABSTRACT

MARTUCCI, M. F. **MIF receptors at maternal fetal interface in mice.** 2011. 75 p. Masters thesis (Cellular and Tecedual Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a cytokine involved in activation of innate immunity and regulation of the subsequent adaptive responses, produced by different cells, including trophoblast during gestation. Knowing MIF-target cells may reveal specific cell population functions. Therefore, this study aimed to determine the gene expression and tissue localization of MIF receptors CD44 and CD74 at the maternal-placental interface during gestation. Immunolocalization and gene expression of MIF receptors were done at implantation sites and placentas of mice on gestation days (gd) 7.5, 10.5, 13.5 and 17.5. The gene expression of both, receptor and co-receptor was observed in endometrial tissues throughout the studied period. The complex CD74-CD44 was immunolocalized in phenotypically-characterized decidual cells, which had not been previously reported. Endothelial cells of uterine vessels and leukocytes within these vessels also were immunoreactive to the receptor antibodies. These results suggest that these endometrial cell populations are targets of presumptive trophoblast-decidua paracrine dialogue; the functional significance of these findings, however, needs further investigation. In the placental fetal compartment, the expression of CD74 occurred mainly on days 7.5 and 17.5 of gestation and CD44, throughout pregnancy. Although mRNA of the complex receptor/co-receptor had been identified on gd7.5, the immunolocalization of these proteins was not observed in the trophoblast cell population. It is possible that this negative correlation result from post-transcriptional regulation. Because the signal transduction mediated by MIF requires recognition by the extracellular portion of CD74 for activation of CD44, low expression of CD74 on gd10.5 and 13.5 suggests a restriction of signaling mediated by this factor. In this context, these results indicate that the action of MIF on the fetal portion of placenta is limited to the trophoblast giant cells and therefore, cell population-specific and, might induce responses mediated by CD44-CD74 complex at the final stages of pregnancy. This study showed the expression of CD74 and CD44 at the maternal placental interface, opening new possibilities for autocrine and paracrine mechanisms by MIF-mediated signaling during pregnancy.

Key words: CD74. CD44. Cytokine. Decidua. Placenta. Pregnancy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Preparados histológicos de sítios de implantação aos 7,5 e placentas de 13,5 e 17,5 dias de gestação.....	40
Figura 2. Imunolocalização de CD44 (A-D) e de CD74 (E-H) na interface materno placentária aos 7,5 dias de gestação.....	47
Figura 3. Imunolocalização de CD44 (A-D) e CD74 (E-I) na interface materno placentária aos 10,5 dias de gestação.....	48
Figura 4. Imunolocalização de CD44 (A-E) e CD74(F-K) nos sítios de implantação aos 13,5 e 17,5 dias de gestação.....	49
Figura 5. Análise quantitativa da imunolocalização do complexo receptor (CD74-CD44) para o MIF.....	50
Figura 6. Curvas de dissociação mostrando um único produto amplificado. A: CD74, B: CD44 e C: YWHAZ.....	51
Figura 7. Curvas padrão para verificação da eficiência dos <i>primers</i> . A: CD74, B: CD44 e C: YWHAZ.....	52
Figura 8. Expressão gênica de CD 74 e CD44 na porção materna da placenta (decídua).....	53
Figura 9. Expressão gênica de CD 74 e CD44 em cones ectoplacentários e na porção fetal da placenta.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Seqüência de *primer* para CD74 e CD44 - RT-PCR.....42

Tabela 2- Seqüência de *primer* para CD74 e CD44 - PCR em Tempo Real.....44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 A INTERFACE MATERNO-PLACENTÁRIA	20
2.2 FATOR DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF).....	22
2.3 ATIVIDADES FUNCIONAIS DO MIF	24
2.4 Os RECEPTORES DO MIF	25
2.5 VIAS DE SINALIZAÇÃO.....	27
2.6 MIF NA GESTAÇÃO	28
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 REAGENTES, ABREVIATURAS E PROCEDÊNCIA.....	35
4.2 COMITÊ DE ÉTICA	35
4.3 ANIMAIS	36
4.4 IMUNOLocalização DOS RECEPTORES CD74-CD44.....	36
4.4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	36
4.4.2 REAÇÕES IMUNOHISTOQUÍMICAS	37
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS RECEPTORES CD74-CD44	39
4.5.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	39
4.5.2 RT-PCR E QRT-PCR.....	40
4.5.2.1 <i>EXTRAÇÃO DE RNA</i>	40
4.5.2.2 <i>ENSAIO POR RT-PCR</i>	41
4.5.2.3 <i>ENSAIO POR PCR EM TEMPO REAL</i>	43
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 IMUNOLocalização DE MIF NA INTERFACE MATERNO PLACENTÁRIA	46
5.2 PCR.....	50
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS.....	64

1 INTRODUÇÃO

A interface materno-placentária envolve um complexo diálogo entre moléculas regulatórias, cruciais para o sucesso da gestação (Zenclussen et al., 2007). Uma dessas moléculas é o Fator de Inibição de Migração de Macrófagos (MIF), uma citocina próinflamatória identificada como um fator solúvel não dializável liberado por linfócitos ativados e células imuno competentes, capaz de inibir a migração de células do exsudato peritoneal (Calandra et al., 2003).

A expressão gênica e protéica de MIF tem sido relatada em diferentes órgãos e tipos celulares, o que inclui: cérebro (neurônios do córtex e cerebelo, hipotálamo, hipocampo, células da glia e epêndima), hipófise, rins (túbulos proximais, ducto coletor, glomérulo, cápsula de Bowman), pulmões (macrófagos alveolares e células epiteliais do brônquio), fígado (células de Kupffer e hepatócitos), baço (polpa branca e vermelha), adrenal (zonas glomerulosa e fasciculata), pele (queratinócitos e glândulas sebáceas), células endoteliais e fibroblastos, ovário e testículo (Calandra et al., 2003; Aeberli et al., 2006). Dentre as células de defesa, o MIF é encontrado em monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, eosinófilos, mastócitos, basófilos e neutrófilos.

As atividades biológicas desempenhadas pelo MIF apontam ações como inibição da migração de mononucleares *in vitro*, antagonismo a glicocorticóides (Calandra et al., 1995; Calandra e Roger, 2003; Fingerle-Rowson et al., 2003), regulação da expressão de receptores do tipo *Toll-like 4* (TLR-4) (Roger et al., 2001), ativação de macrófagos e células T (Roger et al., 2001; Calandra e Roger, 2003) e supressão da apoptose induzida e dependente de p53 (Hudson et al., 1999; Mitchell et al., 2002; Nguyen et al., 2003). Estes efeitos são particularmente importantes no desencadeamento de respostas inflamatórias e atividades proliferativas, o que confere ao MIF um papel relevante como ativador da imunidade inata, regulando respostas adaptativas subseqüentes (Hudson et al., 1999; Mitchell et al., 2002; Fingerle-Rowson et al., 2003; Leech et al., 2003).

Em diferentes tipos celulares, mostrou-se que o MIF liga-se ao receptor de superfície CD74 ativando uma via de sinalização (Leng et al., 2003; Miller et al., 2008) intermediada pela fosforilação de CD44 que, por sua vez, desencadeia a fosforilação e ativação de quinases reguladas por sinais extracelulares – 1/2 (ERK1/2) pertencentes à cascata de quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e

envolvidas na expressão de ciclina D1, síntese de DNA e inibição de apoptose (Liao et al., 2003; Swant et al., 2005; Shi et al., 2006).

A molécula de superfície celular CD74, no meio intracelular, regula o dobramento e endereçamento de proteínas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II) nas células apresentadoras de antígenos (Beswick e Reyes, 2009). Em alguns tipos celulares é também expresso de forma independente deste complexo, atuando como parte do complexo receptor para o MIF (Cuthbert et al., 2009) ou como fator facilitador de adesão para a bactéria *Helicobacter pylori* (Beswick e Reyes, 2009).

A proteína CD44 faz parte de uma família de glicoproteínas transmembrânicas de classe I, cuja função principal é participar de respostas celulares aos sinalizadores do microambiente, regulando o crescimento, sobrevivência, diferenciação e motilidade celular (Ponta et al., 2003); em associação com CD74, atua como co-receptor para o MIF (Shi et al., 2006).

Segundo Bernhagen et al. (2007), o MIF também é um ligante funcional não cognato para os receptores de quimiocina CXCR2 e CXCR4, controlando através desta ligação o recrutamento inflamatório e aterogênico de leucócitos.

Na interface materno-placentária em humanos, o MIF produzido pelas células trofoblásticas tem sido interpretado como uma forma de contrabalançar a ação antiinflamatória de IL-10 durante a implantação e regular a atividade das células *Natural Killer* uterinas (uNK) (Arcuri et al., 1999), que, uma vez ativadas poderiam comprometer a gestação (Konova, 2010). Uma possível função na resposta placentária contra patógenos locais também tem sido sugerida (Ferro et al., 2008).

Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que em camundongos, o MIF é produzido durante toda a gestação, atingindo picos máximos nas fases em que ocorre o amadurecimento placentário entre os dias 10 e 13 da prenhez (Faria et al., 2010). Estes estudos mostraram também que as principais células a expressar o MIF são as células trofoblásticas, embora outros componentes da interface materno-placentária também parecem contribuir com esta produção.

A presença do MIF na interface materno placentária sugere que as inúmeras funções atribuídas a este fator possam assumir papéis relevantes para a homeostase local e, conseqüentemente, para a própria gestação, em situações de

normalidade e/ou desafio por patógenos. Neste contexto, o mapeamento de células alvo do MIF na interface materno placentária é uma etapa fundamental para a compreensão de suas principais funções durante a gestação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A interface materno-placentária

A gestação envolve uma íntima associação entre a mãe e o conceito em desenvolvimento, por meio da interface materno-fetal representada pela placenta. Este órgão desafia as leis da imunologia ao manter em íntimo contato e perfeita harmonia funcional, tecidos maternos e fetais de diferentes repertórios genéticos, durante toda a gestação. Surpreendentemente a tolerância materna ao feto ocorre na presença de um grande número de leucócitos (Renaud e Graham, 2008).

A formação desta interface baseia-se na interação coordenada entre fatores transcricionais, epigenéticos e ambientais (Maltepe et al., 2010), que culminam com muitas e variadas funções. Dentre as funções placentárias destaca-se a ancoragem do conceito, a prevenção da rejeição fetal pelo sistema imunológico materno, o transporte de nutrientes, metabólitos e gases entre a mãe e o conceito, proteção, produção de hormônios e sinalização materno-fetal entre outras.

Os primeiros passos da formação da interface materno-embrionária ocorrem durante a implantação do embrião no endométrio. Em camundongos, este processo se inicia ao redor do 5º dia de gestação e inclui: i) uma breve fase de adesão entre o epitélio uterino e as células do revestimento externo do blastocisto, o trofoblasto; ii) uma fase de invasão na qual a relação materno-fetal é representada pela interação entre as células trofoblásticas e tecidos uterinos na medida em que estas células avançam em direção ao estroma endometrial; e, iii) uma fase de invasão dos vasos endometriais, o que permite uma interação direta entre as células trofoblásticas e o sangue materno. Durante toda a gestação, essa interação é mantida, permitindo trocas metabólicas complexas e a formação da placenta do tipo hemocorial (Mossman, 1937).

Durante o período de implantação embrionária, a decidualização e a adaptação do sistema vascular são de grande importância para o desenvolvimento do endométrio receptivo, adequado para a implantação. O endométrio se transforma em um tecido altamente vascularizado, caracterizado por remodelamento vascular e angiogênese, aumento da permeabilidade vascular, edema, intensa proliferação celular, diferenciação das células estromais em células deciduais e sítio de invasão de leucócitos (Plaisier, 2010). A decídua, desta forma, representa o tecido uterino

em íntima associação com o trofoblasto e juntamente com esta estrutura fetal durante a fase de pós-implantação constitui a interface materno-embrionária. Com o progresso da gestação, decídua e trofoblasto vão sofrendo modificações para constituir a placenta, um órgão vital e híbrido com porção materna e fetal.

A porção fetal da placenta torna-se gradualmente mais complexa. Entre os dias 8,5 e 13,5 da gestação, o trofoblasto associa-se com o mesoderma alantoideano o que desencadeia a diferenciação de específicas populações celulares específicas, que se organizam em regiões funcionalmente distintas. Na região mais próxima ao corpo do embrião em formação, o mesênquima alantoideano torna-se vascularizado e invade o trofoblasto que se organiza em camadas ao seu redor. Na superfície das células trofoblásticas percola o sangue materno extravasado e no interior do mesênquima correm vasos com sangue fetal. Esta região passa a ser denominada de zona labiríntica e é o sítio de trocas metabólicas e gasosas entre mãe e feto, sendo de extrema importância para a gestação (Müntener e Hsu, 1977).

Na região entre o labirinto e a decídua, as células trofoblásticas formam a zona juncional, dando origem a células que acumulam glicogênio e células basófilas, produtoras de hormônios como a prolactina, o lactogênio, hormônios de crescimento, além de citocinas (Ain et al., 2003; Malassiné et al., 2003; Soares, 2004).

A porção materna da interface materno-fetal também sofre modificações ao longo da gestação. Na medida em que a porção fetal da placenta diferencia-se a decídua mesometrial inicia um processo de involução. Ao redor do 13º dia de gestação esta estrutura já se encontra reduzida e quase vestigial (Katz e Abrahamsohn, 1987). A região de células decidualizadas passa a ser ocupada pela expansão da glândula metrial, tecido endometrial mais distal em relação ao embrião e que abriga células imunologicamente competentes entre as quais se destacam as células *natural killer* uterinas (Paffaro et al., 2003; Wang et al., 2003; Zavan et al., 2010). Estas células têm função primordial na gestação, uma vez que se acredita que limitam a invasão das células trofoblásticas (Kiso et al., 1992) por meio da sua atividade citotóxica (Manaseki e Searle, 1989) e produção de interferon gama (Marzusch et al., 1997) e ainda, suportam o desenvolvimento normal da decídua e

vasculatura uterina via cascatas de sinalização envolvendo tradução de sinal mediada por interleucina-12 (Croy et al., 1997a).

2.2 Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF)

O MIF foi uma das primeiras citocinas a ser descrita há cerca de 50 anos atrás (Bloom e Bennett, 1966). Esta citocina foi originalmente identificada como um fator derivado de células T responsável pela inibição da migração de macrófagos durante experimentos realizados para a caracterização de processos de hipersensibilidade tardia (David, 1966). Também se observou que o MIF pode ser liberado, à semelhança de hormônios, por células da glândula pituitária anterior após exposição do organismo ao LPS (Calandra e Roger, 2003).

O gene *Mif* está localizado no cromossoma 22 em humanos e no cromossoma 10 em roedores (Calandra e Roger, 2003). Um único RNA mensageiro de aproximadamente 0,8 kb codifica o *MIF* em humanos, camundongos e ratos, como uma proteína com 114 aminoácidos, não glicosilada e de 12,5 kDa. O *Mif* guarda uma homologia de aproximadamente 90% nas diferentes espécies de mamíferos (humano, camundongo, rato e gado) e pelo menos 9 pseudogenes do *Mif* foram encontrados no genoma do camundongo (Calandra e Roger, 2003).

O MIF também é conhecido como fator inibidor de glicosilação (GIF) e surpreendentemente não pertence a nenhuma superfamília de citocinas. Homólogos do *Mif* de mamíferos também foram descritos em frangos, peixes com e sem mandíbula, carrapatos, parasitas e plantas. A conservação do *Mif* através das espécies sugere importantes funções biológicas (Calandra e Roger, 2003).

Estudos de cristalografia, sobre o MIF humano e dos ratos, indicam que esta proteína é um homotrímero (Sugimoto et al., 1999; Calandra e Roger, 2003), onde cada monômero possui estruturas α e β , semelhantes ao domínio peptídico de ligação da molécula do complexo de histocompatibilidade principal (Javeed e Zhao, 2008).

A expressão gênica e protéica de MIF tem sido relatada em diferentes órgãos e células, o que inclui: cérebro (neurônios do córtex e cerebelo, hipotálamo, hipocampo, células da glia e epêndima), hipófise, rins (túbulos proximais, ducto

coletor, glomérulo, cápsula de Bowman), pulmões (macrófagos alveolares e células epiteliais do brônquio), fígado (células de Kupffer e hepatócitos), baço (polpa branca e vermelha), adrenal (zonas glomerulosa e fasciculata), pele (queratinócitos e glândulas sebáceas), células endoteliais e fibroblastos. Dentre as células de defesa, o MIF também tem sido encontrado em monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, eosinófilos, mastócitos, basófilos e neutrófilos (Calandra et al., 2003).

O MIF também está expresso nos órgãos do sistema reprodutor como os ovários e os testículos em diferentes espécies (Paulesu et al., 2005; Aeberli et al., 2006). Em murinos e humanos, o RNA mensageiro do *MIF* é expresso nos tecidos ovarianos e uterinos em todos os estágios do ciclo estral (Suzuki et al., 1996; Paulesu et al., 2005). Durante a gestação, o MIF também foi detectado no soro materno, no fluido amniótico, em ovócitos, em embriões em desenvolvimento e no trofoblasto e decídua, em diferentes estágios da gestação (Suzuki et al., 1996). Em bovinos, foi demonstrada a expressão de MIF no corpo lúteo e células epiteliais endometriais em resposta ao interferon tau (Wang e Goff, 2003).

A associação do MIF a processos inflamatórios e de defesa tem sido recentemente estudada e após a administração de LPS em ratos, pró-formas de MIF são rapidamente liberadas nos tecidos (Calandra et al., 2003).

Por outro lado, na medida em que antagoniza a ação de glicocorticóides (Calandra et al., 1995; Fingerle-Rowson et al., 2003), o MIF é capaz de abolir os efeitos imunossupressivos dos esteróides (Mitchell et al., 1999), ativar macrófagos e células T (Roger et al., 2001; Calandra e Roger, 2003) e inibir a expressão de p53 e, neste caso agindo como fator de inibição da apoptose, em macrófagos (Hudson et al., 1999; Mitchell et al., 2002). Também em sido sugerida uma atividade inibitória da síntese de IgE, envolvida em processos alérgicos crônicos e infecções parasitárias (Calandra e Roger, 2003; Magalhães et al., 2009).

O MIF é desta forma considerada uma molécula reguladora da imunidade inata, principalmente associada à resposta inflamatória (Rossi et al., 1998; Yabunaka et al., 2000; Morand et al., 2002; Calandra e Roger, 2003; Fingerle-Rowson et al., 2003; Nguyen et al., 2003). Corroborando essa idéia, trabalhos recentes têm mostrado que a deficiência de *Mif* em ratos aumenta a susceptibilidade

desses animais à infecção por *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi* (Satoskar et al., 2001; Reyes et al., 2006).

Ao contrário de outras moléculas regulatórias, o MIF é constitutivamente expresso e armazenado nas células, sendo secretado quando estas são especificamente estimuladas (Calandra e Roger, 2003). O MIF não tem seqüência amino-terminal, indicando que a sua secreção se dá por mecanismos não convencionais (Calandra e Roger, 2003).

As vias de sinalização do MIF envolvem o complexo receptor de membrana CD74-CD44, os receptores de quimiocina CXCR2 e CXCR4 e também a sua captação via não receptor, por meio de endocitose (Berndt et al., 2008).

2. 3 Atividades Funcionais do MIF

O MIF é uma citocina pleiotrópica que exerce uma variedade de funções biológicas como atividades proinflamatórias na imunidade inata e adquirida, antagonismo de glicocorticóides, proliferação, migração e sobrevivência celular, modulação da resposta imunológica associada às células *Natural Killer* (NK), resposta ao dano do DNA, controle do ciclo celular, indução de metaloproteinases (Fingerle-Rowson e Petrenko, 2007; Nemajerova et al., 2007; Javeed e Zhao, 2008) e ainda suprime a síntese de IgE e tem atividade supressora antígeno-específica (Calandra e Roger, 2003).

O MIF é expresso constitutivamente em uma grande variedade de células e pode ser continuamente sintetizado e secretado ou estocado intracelularmente (Calandra e Roger, 2003). Por esta razão, quando ocorre o estímulo inflamatório, ele é uma das primeiras citocinas presentes na área lesada e promove direta ou indiretamente, a expressão de outras moléculas inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , interleucinas (1 β , IL-2, IL-6, IL-8). O MIF também exibe funções como ativador de macrófagos, o que culmina em aumento de adesão, fagocitose e indução da produção de óxido nítrico (Nishihira, 2000).

Ainda, o MIF endógeno promove a expressão de moléculas de adesão endoteliais (VCAM-1 e ICAM-1) levando a um aumento na interação leucócito-célula endotelial na inflamação (Amin et al., 2006; Cheng et al., 2010). Sob a ação de MIF,

macrófagos expressam MCP-1 o que, por sua vez, leva ao o acúmulo de neutrófilos como observado no espaço alveolar em inflamações do sistema respiratório (Takahashi et al., 2009).

Evidências experimentais também mostraram que o MIF pode atuar na adesão de monócitos ao trofoblasto humano aumentando a expressão da molécula de adesão ICAM-1 em culturas de vilos coriônicos estimulados com *Toxoplasma gondii* (Ferro et al., 2008). Javeed e Zhao (2008) relataram ainda a participação do MIF no recrutamento de monócitos e produção de citocinas próinflamatórias na rejeição de órgãos e enxertos.

Por outro lado, a deficiência de MIF tem sido associada à atenuação da resposta inflamatória em modelos de animais com artrites, hipersensibilidade tardia, endotoxemia, colite e encefalomielite alérgica experimental (Bozza et al., 1999).

Uma das mais proeminentes funções do MIF é sua habilidade em antagonizar os efeitos de glicocorticóides (Flaster et al., 2007). Assim, monócitos estimulados por LPS mantém a secreção de moléculas próinflamatórias como TNF alfa, interleucinas (1 β , 6 e 8) mesmo na presença de glicocorticóides quando MIF recombinante é adicionada à cultura celular (Calandra et al., 1995).

O MIF também antagoniza a regulação do ciclo celular dependente de Jab1 (proteína intracelular co-ativadora do fator de transcrição AP-1), por meio do aumento da expressão de p27^{kip1}, na medida em que promove a degradação do inibidor desta quinase dependente de ciclina (Kleemann et al., 2000).

Além das atividades funcionais acima descritas, o MIF também está envolvido com a resposta a danos no DNA e no controle proteossômico do ciclo celular. Ao se ligar com Jab1, o MIF inibe a interação desta proteína com moléculas-alvo do CSN (COP9 do signalosomo), mantendo a atividade de ubiquitina ligases (Lue et al., 2006; Nemajerova et al., 2007).

2. 4 Os Receptores do MIF

Conforme demonstrado em algumas células imunológicas, como macrófagos e células B, a via de sinalização clássica mediada por MIF inicia-se com a ligação deste fator ao receptor de superfície CD74 (Leng et al., 2003; Shi et al., 2006; Gore

et al., 2008; Miller et al., 2008). Esta ligação envolve também a fosforilação de CD44 (proteína sinalizadora), que por sua vez desencadeia a fosforilação de ERK1/2 MAPK, envolvidas na expressão de ciclina D1, síntese de DNA e inibição de apoptose (Liao et al., 2003; Swant et al., 2005; Shi et al., 2006).

A identificação do receptor de superfície para o MIF foi realizada através de estratégias moleculares por Leng e Bucala, em 2006. Estes autores sequenciaram 50 clones; a maioria codificou o CD74, uma proteína transmembrânica com 31 kDa, expressa como um homotrímero, com funções específicas como chaperona de moléculas MHC tipo II e como molécula co-estimulatória de células imunológicas. A expressão de CD74 pode ocorrer independentemente de MHC II, enfatizando as funções adicionais desta molécula como: receptor de superfície celular para o MIF, receptor para o *Helicobacter pylori*, facilitando a adesão deste patógeno às células epiteliais gástricas e, molécula de sinalização acessória em processos de proliferação celular (Beswick e Reyes, 2009).

O CD74 existe em diferentes isoformas e é glicosilado após sua tradução, através da adição de uma cadeia lateral de glicosaminoglicana do tipo condroitim sulfato, que atua como uma proteína acessória durante a ativação de células T por meio da interação com o CD44. A isoforma mais comum do CD74 é a p33 (33 kDa), existindo também as isoformas p35, p41 e p43 (Beswick e Reyes, 2009).

O camundongo deficiente para CD74 (Shachar e Flavell, 1996), apresenta anormalidades no desenvolvimento das células B, embora a expressão de MHC II não se altera. De forma semelhante, o camundongo deficiente para o MIF também mostra variações no fenótipo imunológico e comprometimento da resposta tipo Th2, mimetizando o camundongo deficiente em CD74 (Leng e Bucala, 2006).

O co-receptor para o MIF, CD44, é também conhecido como Glicoproteína 1 (Pgp-1) ou Antígeno Linfocítico (Ly-24). Trata-se de uma glicoproteína transmembrânica polimórfica que funciona como co-receptor, modulando a ativação de receptores de fatores de crescimento. Neste contexto, atua nas respostas celulares a seus microambientes e em diversos processos celulares, como regulação do crescimento, sobrevivência, diferenciação e motilidade celulares (Ponta et al., 2003; Leng e Bucala, 2006).

As múltiplas isoformas protéicas do CD44 são codificadas por *splicing* alternativo de um único gene e posteriormente modificadas por alterações pós traducionais (Ponta et al., 2003; Choi et al., 2006).

As funções do CD44 são fundamentais para a vida e sua ausência ou disfunção causa fenótipos profundamente alterados, uma vez que os processos dependentes desta proteína incluem desenvolvimento de órgãos, orientação de axônios e funções imunológicas e hematopoiéticas (Ponta et al., 2003).

Outra via sinalização desencadeada pelo MIF envolve os receptores de quimiocina, o CXCR2 e o CXCR4. Estudos recentes mostraram que o MIF é um ligante funcional não cognato para estes receptores atuando como uma quimiocina, mesmo sem apresentar características funcionais destas moléculas durante o recrutamento de células inflamatórias e aterosclerose (Bernhagen et al., 2007; Noels et al., 2009).

A ligação de MIF a estes receptores parece ser devido à semelhança estrutural de sua forma monomérica com CXCL8 (ligante cognato do CXCR2), tendo como consequência a detenção de monócitos e neutrófilos em células endoteliais aórticas.

2. 5 Vias de sinalização

As funções inerentes ao MIF são resultado da ativação de vias de sinalização desencadeadas por este fator, as quais envolvem a ligação ao complexo receptor (CD74-CD44), a via clássica; ligação a receptores de quimiocina (CXCR2 e 4), via não clássica e ainda sua endocitose (Berndt et al., 2008). Dependendo do tipo celular diferentes vias de sinalização podem ser estimuladas.

A ligação de MIF ao CD74 leva à ativação da via ERK 1/2 MAPK com consequente proliferação celular e ativação da fosfolipase A2, importante componente da cascata inflamatória para a produção de PGE2 (Mitchell et al., 1999; Leng et al., 2003). Em 2006, Shi et al. mostraram que em fibroblastos, o complexo CD74-CD44 era essencial para que a via ERK 1/2 fosse ativada e que esta via impedia o desencadeamento da apoptose neste tipo celular. A ligação de MIF ao complexo receptor CD74-CD44 com ativação da via ERK e p38 MAPKs também se

mostrou envolvida com a síntese de fatores angiogênicos como VEGF, IL-8 e MCP-1 em cultura de células endometriais (Veillat et al., 2010).

Por outro lado, a ação de MIF também tem sido relacionada à fosforilação das proteínas BAD e Foxo3a levando a prevenção de apoptose e promoção da sobrevivência de células tumorais pela ativação da via Akt com participação da quinase Src e fosfoinositol 3 quinase (PI3K) (Lue et al., 2007).

A ligação do MIF ao complexo receptor CD74-CD44 também pode ativar NF- κ B com a intermediação das quinases Syk e Akt (Gore et al., 2008). Similarmente, estudos recentes têm mostrado que a ligação de MIF a CD74-CXCR4 também pode levar à ativação da via Akt em linfócitos T (Schwartz et al., 2009).

A captura de células T em lesões ateroscleróticas é normalmente desencadeada pela ligação CXCR4-CXCL12, através de p56 Src quinase (Laudanna e Alon, 2006). No entanto, a interação de MIF com CXCR4 também pode ativar estas células através de quinases da família Src, conferindo ao MIF e CXCL12 funções análogas no que se refere à presença de linfócitos no endotélio aórtico (Bernhagen et al., 2007). De fato, ao longo da formação e progressão de uma lesão aterosclerótica, células endoteliais vasculares exibem aumento na expressão de MIF, o que tem se correlacionado à aderência de monócito nestas células e seu acúmulo subendotelial (Noels et al., 2009).

Evidências recentemente publicadas mostraram também a possibilidade de ativação de ERK de forma sustentada a partir da endocitose do complexo MIF-CD74 (Lue et al., 2006; Xie et al., 2011). Nesta via de ativação, β -arrestina (uma molécula adaptadora conhecida por seu papel na internalização e transdução de sinal em receptores ligados a proteína G) interage com o CD74 do complexo endocitado, recrutando moléculas de sinalização que mantém a ativação de ERK (Xie et al., 2011).

2.6 MIF na Gestação

O MIF tem sido associado à reprodução, principalmente em eventos que envolvem mediadores da inflamação, como ovulação, ciclo menstrual e início da gestação (Wada et al., 1997; Arcuri et al., 2001).

O primeiro grupo a demonstrar a expressão de RNA mensageiro do *MIF* em embriões de murinos e em órgãos reprodutivos maternos e a discutir suas possíveis funções no início da gestação foi Suzuki et al. em 1996. Baseados em seus achados os autores sugeriram que esta citocina tem um importante papel na manutenção da gestação na medida em que contribui para o estabelecimento de um adequado meio ambiente para o desenvolvimento embrionário.

O principal tipo celular a produzir o MIF pertence à população de células trofoblásticas, embora outros componentes da interface materno-fetal pareçam contribuir com a produção desta citocina neste local. Esta produção tem sido interpretada como uma forma de contrabalançar a ação antiinflamatória de interleucinas durante a implantação e, desta forma, regular a atividade das células uNK uterinas, bastante numerosas neste período da gestação (Arcuri et al., 2006; Viganò et al., 2007). Também tem sido sugerida uma possível função na resposta placentária contra patógenos locais (Ferro et al., 2008; Satoskar et al., 2001; Reyes et al., 2006).

Neste contexto é importante ressaltar que a gestação envolve um intrínseco balanço entre o sistema imune materno e a presença do feto semi-alogênico, envolvendo um estado de privilégio imunológico, no qual respostas inflamatórias indesejadas são suprimidas pela placenta. Assim, a atividade do MIF em extratos placentários, sua expressão nos vilos coriônicos e em células epiteliais amnióticas sugerem a importância desta citocina na manutenção de uma gestação saudável (Zeng et al., 1993; Arcuri et al., 1999; Akoum et al., 2005; Li et al., 2005). Uma expressão anormal do *Mif* pode estar envolvida com o desenvolvimento de doenças como a preeclampsia, que é uma resposta alterada do sistema imunológico materno (Todros et al., 2005; Hristoskova et al., 2006).

No início da gestação, as células uNK representam a população mais abundante de leucócitos (70%). Essas células aumentam no sítio de implantação até a metade da gestação e então desaparecem gradualmente até a decídua a termo. No período da implantação, as células uNK estão marcadamente presentes, sugerindo sua importância para o sucesso da gestação, por atuar na diminuição da resposta imune materna contra o feto semi-alogênico ou limitar a invasão das células trofoblásticas na decídua, uma vez que estas células mantêm íntimo contato

com as uNK (Trundley e Moffett, 2004). Em estudos realizados em 2006, Arcuri et al. relataram que as uNK produzem e respondem ao MIF, em uma ação autócrina e parácrina, o que contribui para o privilégio imunológico na interface materno placentária.

Em estudos *in vivo*, Veillat et al., em 2010, sugeriram um efeito angiogênico no endométrio exercido pelo MIF. A ação angiogênica de MIF foi relatada em células de carcinoma pulmonar e está relacionada ao aumento da expressão da quimiocina proangiogênica CXCL8 e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Coleman et al., 2008). O VEGF por sua vez tem sido espacial e temporalmente correlacionado com mudanças na angiogênese e reatividade vascular nos sítios de implantação, na decídua e tecidos placentários na primeira metade da gestação (Chakraborty et al., 1995).

O MIF parece ser dispensável para o sucesso da gestação, uma vez que camundongos deficientes em MIF se reproduzem e desenvolvem normalmente, sugerindo mecanismos compensatórios pró-inflamatórios nestes animais (Bozza et al., 1999; Fingerle-Rowson et al., 2003). Segundo Yu et al., em 2002, entretanto, a ausência do CD44 na gestação, prejudica a manutenção da lactação pós-parto e acelera a involução uterina em camundongos.

Estudos em nosso laboratório mostraram também que em camundongos, o MIF é produzido durante toda a gestação, atingindo picos máximos entre o 10º e o 13º dias de gestação (Faria et al., 2010), o que coincide com a fase de maturação placentária e sugere uma função adicional na manutenção da gestação. Estes estudos mostraram que as principais células a expressar o MIF são as células pertencentes à população trofoblástica, embora outros componentes da interface materno-placentária também possam contribuir com a sua produção. Sob nossa perspectiva, as inúmeras funções de MIF podem ser de importância para a homeostase da interface materno placentária, particularmente aquelas envolvidas com o controle de apoptose, que pode entre outras possibilidades, comprometer seriamente o *status* gestacional em situações de normalidade e de desafio por patógenos.

Neste contexto, informações importantes sobre como um fator atua podem ser adquiridas conhecendo os tecidos alvos de sua ação. Conseqüentemente, definir as

células alvo associadas ao MIF durante a gestação pode facilitar o entendimento da cascata de sinalização e as funções desencadeadas por este fator na homeostase da interface materno-placentária.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este estudo pretende determinar a expressão do complexo receptor CD74 e do co-receptor CD44 para o fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) na interface materno placentária durante a gestação, em camundongos.

3.1.1 Objetivos específicos

Este estudo visa:

1. Localizar a distribuição dos receptores para o MIF nos componentes da interface materno-placentária ao longo da gestação: placenta e decídua, por meio de reações imunohistoquímicas.
2. Avaliar a expressão gênica dos receptores para o MIF nos componentes da interface materno-placentária ao longo da gestação: placenta e decídua, por meio de ensaios de RT-PCR semiquantitativo e PCR em Tempo Real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes, abreviaturas e procedência

BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA, EUA): anticorpo monoclonal conjugado à biotina IgG de rato anti CD44 (Pgp-1, Ly-24) de camundongo, anticorpo monoclonal purificado IgG de rato anti CD74 (li) de camundongo; **Integrated DNA Technologies (Carlsbad, CA, EUA):** primers *CD74*, *CD44*, peptidilprolil isomerase (*Ppia*) e *YWHAZ*; **Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA):** agarose, brometo de etídio, ditioneitol (DTT), dietilpirocarbonato (DEPC), DNA *Ladder* 100-1000 pares de bases (pb), desoxirribonuclease I (DNase I), desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTPs: dATP, dCTP, dTTP, dGTP), oligonucleotídeo (Oligo-dT); ácido 3-(N-morfolino)-propano sulfônico (MOPS), *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (RT), dodecil sulfato de sódio (SDS), Taq DNA polimerase, TRIzol®, primers *CD74* e *CD44*; **Merck KGaA (Darmstadt, Germany):** ácido acético, ácido clorídrico, cloreto de sódio, clorofórmio, etanol, formaldeído, hidróxido de sódio, Histosec®, isopropanol; **Promega Corporation (Madison, WI, EUA):** enzima *ImProm-II™ Reverse Transcription System*, *random primers*; **Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA):** ácido cítrico, ácido etileno diamino tetraacético (EDTA), albumina sérica bovina (BSA), glicerol, *rabbit ExtrAvidin Alkaline Phosphatase Staining kit* produzido em cabra, *kit revelador fast red TR/Naftol AS-MX*, paraformaldeído, poli-L-lisina, tampão fosfato salina (PBS); **Vector Inc. (Burlingame, CA, EUA):** IgG biotinilada de cabra anti IgG de rato.

4.2 Comitê de Ética

Todos os procedimentos experimentais deste estudo foram realizados de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ANEXO A).

4.3 Animais

Foram utilizados, neste estudo, camundongos *Mus musculus domesticus* da linhagem CD1 fornecidos pelo Centro de Criação de Roedores da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo sob regime *ad libitum* de água e ração granulada.

Para a obtenção das fêmeas prenhes, fêmeas virgens de aproximadamente três meses foram colocadas nas gaiolas dos machos para o acasalamento na proporção de 2:1, respectivamente. A presença de um “plug” vaginal, indicativa de acasalamento, foi pesquisada todos os dias pela manhã. O dia em que a rolha vaginal era observada foi considerado como dia 0,5 da gestação (dg). Para a análise da interface materno-placentária foram utilizadas fêmeas prenhes aos 7,5 (fase de pós-implantação embrionária), 10,5, 13,5 (fase de formação da placenta) e 17,5 dias de gestação (fase de placenta plenamente diferenciada).

4.4 Imunolocalização dos receptores CD74-CD44

4.4.1 Obtenção das amostras

Fêmeas prenhes nos dias 7,5, 10,5, 13,5 e 17,5 de gestação foram eutanasiadas por deslocamento cervical, laparotomizadas e os cornos uterinos retirados. Imediatamente após a remoção, os cornos uterinos foram mantidos em 0,1 M tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,4 e seccionados transversalmente. Nas amostras de 7,5 dg, o miométrio foi retirado e cada sítio de implantação isolado. Cortes paralelos ao plano sagital dos sítios de implantação foram realizados de modo a expor a superfície embrionária aos fixadores. A partir do 10,5 dg as amostras foram obtidas pela extrusão dos cornos uterinos e separação da placenta fetal juntamente com a decídua do restante do feto e do endométrio.

As amostras foram fixadas por imersão, por 4 a 6 horas, em solução de 4% paraformaldeído em PBS ou methacarn (metanol:ácido acético:clorofórmio, 1:1:1, v/v). Após este período as amostras foram lavadas em PBS e submetidas aos procedimentos rotineiros para inclusão em parafina Histosec® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

4.4.2 Reações imunohistoquímicas

Para as reações imunohistoquímicas, cortes de 5 µm de espessura, aderidos a lâminas histológicas previamente preparadas com poli-L-lisina (0,1%) foram desparafinizados, hidratados em série decrescente de etanol e submetidos ao seguinte protocolo:

1. Tampão Tris-salina (TBS) 0,02 M pH 7,4 a 4 °C, *overnight*
2. Resgate dos sítios antigênicos em tampão citrato de sódio 0,01M, pH 6,0 a 96 °C por 20 min
3. Lavagem com TBS a temperatura ambiente
4. Bloqueio da atividade enzimática endógena por 15 min a temperatura ambiente
5. Lavagem com TBS a temperatura ambiente
6. Bloqueio dos sítios inespecíficos com albumina sérica bovina (BSA) 3 % ou soro normal de cabra 2 % em TBS por 1 h a temperatura ambiente
7. Incubação *overnight* a 4 °C em câmara úmida, com anticorpo primário monoclonal biotilado: - IgG de rato anti-CD74 de camundongo (clone In-1) ou IgG de rato anti-CD44 de camundongo (Pgp-1, Ly-24), nas diluições de 1:100 e 1:50 em TBS, respectivamente
8. Lavagem com TBS a temperatura ambiente
9. Incubação com anticorpo secundário: - IgG de cabra anti-IgG de rato biotilado (H+L) (Vector), na diluição de 1:200 em TBS por 1 h a temperatura ambiente em câmara úmida
10. Lavagem com TBS a temperatura ambiente

11. Incubação com complexo avidina-biotina, conjugada à enzima fosfatase alcalina ou peroxidase por 1 h em temperatura ambiente em câmara úmida na diluição de 1:100 em TBS
12. Lavagem com TBS a temperatura ambiente
13. Revelação da atividade enzimática
14. Contra-coloração com hematoxilina de Mayer

Para o bloqueio da atividade enzimática endógena foi utilizado:

- Para a fosfatase alcalina - ácido acético 8 % em água destilada;
- Para a peroxidase - peróxido de hidrogênio a 3 % em Metanol.

Para a revelação da atividade enzimática:

- Para a fosfatase alcalina utilizou-se o kit revelador *SIGMAFAST™ Fast Red TR/Naftol AS-MX* (Sigma);
- Para a peroxidase utilizou-se o kit revelador *SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidine* (Sigma).

Grupos controle negativos seguiram o protocolo acima, porém a incubação com o anticorpo primário foi substituída por incubação em soro não imune de cabra na diluição de 1:200 em TBS.

As amostras foram analisadas em microscópio de luz convencional (Axioskop 2, Zeiss, Germany) acoplado a um sistema de captura de imagens (Axio Vision 4.7, Zeiss). As imagens foram capturadas e digitalizadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop (Microsoft USA). As áreas de imunoreatividade foram segmentadas utilizando-se o programa *Colour Deconvolution* (escrito por Gabriel Landini, <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>) e analisadas pelo software ImageJ 1.43g (NIMH, NIH, Bethesda, MD, EUA, <http://rsweb.nih.gov/ij/>) que estimou o número de pixels contido dentro do perímetro segmentado, que foram normalizados e expressos em micrômetros.

4.5 Análise da expressão gênica dos receptores CD74-CD44

4.5.1 Obtenção das amostras

Para a obtenção de amostras para a análise da expressão gênica do complexo receptor do MIF na interface materno placentária utilizou-se tecido materno (decídua) e trofoblástico (cones ectoplacentários e placenta após sua formação) aos 7,5, 10,5, 13,5 e 17,5 dias de gestação, dissecados dos demais tecidos embrionários e maternos.

Aos 7,5 e 10,5 dias de gestação, imediatamente após a eutanásia dos animais, os cornos uterinos foram extrusados, o miométrio retirado e os sítios de implantação foram individualmente isolados. Sob microscópio estereoscópico e em PBS gelado, os embriões foram expostos pela retirada de uma calota da parede endometrial e com o auxílio de estiletes e tesouras oftalmológicas, gentilmente removidos da decídua. Na sequência, estes embriões tiveram seus cones ectoplacentários separados dos embrioblastos. Da decídua remanescente foi então removida a porção mesometrial, contígua ao trofoblasto (Fig. 1A).

Aos 13,5 e 17,5 dias de gestação, os cornos uterinos foram abertos e os discos placentários isolados dos demais tecidos circunjacentes. A decídua mesometrial em contato com a placenta fetal também foi cuidadosamente isolada dos demais tecidos uterinos (Fig. 1B e 1C).

Todas as amostras foram fragmentadas, lavadas em PBS para remoção das células sanguíneas e subdivididas em lotes. Pelo menos três lotes de cada período experimental foram submetidos às análises de expressão gênica (RT-PCR, *reverse transcriptase polymerase chain reaction* e qRT-PCR, *quantitative real time*) as quais, por sua vez, foram realizadas sempre em triplicatas.

Figura 1. Preparados histológicos de sítios de implantação aos 7,5 (A) e placentas de 13,5 (B) e 17,5 (C) dias de gestação. Nas figuras A-B-C estão demarcadas (linhas e setas) as regiões de isolamento das porções fetais e maternas, nas diferentes fases da gestação. Em A1, B1 e C1 estão representadas as regiões maternas isoladas e em A2 um cone ectoplacentário (Ce) isolado dos tecidos maternos e embrionários. PF, porção fetal da placenta; D, decídua; E, região embrionária. Parafina, HE.

4.5.2 RT-PCR e qRT-PCR

4.5.2.1 Extração de RNA

A extração do RNA total foi realizada por meio da técnica de Chomczynski e Sacchi (1987) modificada. Para tal, os fragmentos foram picados e colocados no TRIzol (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) na proporção de 1 mL para cada 50 mg de tecido e congeladas a -80°C . Após descongelamento, as amostras foram homogeneizadas e foi adicionado 200 μL de clorofórmio, homogeneizando-se por

inversão e centrifugando-se a 12.000 g por 15 min, à 4 °C. O sobrenadante foi coletado e colocado em novo frasco, no qual foi precipitado com 500 µL de isopropanol (Sigma Co., Saint Louis, Missouri, EUA) durante 10 min. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min, a 4 °C e, os pellets aderidos à parede do frasco foram ressuspensos em 1 mL de 75 % etanol. Após nova centrifugação a 8.000 g por 10 min a 4 °C, as amostras foram solubilizadas em 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA). As amostras foram diluídas 50 vezes em água Milli-Q, quantificadas e, a concentração e pureza do RNA total, calculadas por espectrofotometria (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburgo, Germany), na absorbância A260 e por meio da relação A260/A280 respectivamente (Sambrook et al., 1989). Alíquotas de 2,0 µg de RNA foram corridas em gel de agarose a 1 % a 80V (Gibco BRL, Electrophoresis Power Supply, Model 250, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA) para se constatar a integridade do RNA obtido.

4.5.2.2 Ensaio por RT-PCR

Remoção do DNA genômico: Para a remoção do DNA genômico, o RNA total extraído foi incubado por 15 min a 25 °C em solução contendo: 10 % de desoxiribonuclease I purificada (DNase, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), 10 % solução tampão DNase 10 X em água com dietilpirocarbonato (DEPC). O bloqueio da reação realizou-se com 25 mM EDTA, 10 min, a 65 °C (Sambrook et al., 1989).

Geração de cDNA por transcrição Reversa: O cDNA foi gerado utilizando-se o sistema de transcrição reversa *ImProm-II™* conforme instruções do fabricante. Inicialmente uma solução foi preparada pela incubação de 1,0 µg de RNA total na presença de 1 µL de Oligo-dT (0,05 µg/µL) e água DEPC, por 5 min a 70 °C em um termociclador Mastercycler ep (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). Separadamente foi preparada uma solução contendo 1,0 µL de enzima *ImProm-II™*, 3 mM MgCl₂, tampão 1X em água DEPC. Transcorrida a incubação inicial, as soluções foram adicionadas e a solução final foi incubada por 5 min a 25 °C, 1 h a 42 °C e 15 min a 70 °C no mesmo termociclador. Uma alíquota de 1,0 µL foi diluída

50 vezes em água Milli-Q, quantificada e a concentração e pureza do cDNA foram calculadas por espectrofotometria, na absorbância A260 e por meio da relação A260/A289 e A260/A230, respectivamente. O cDNA foi então fracionado em gel de agarose a 1,5 %, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador (G-BOX, Syngene, Frederick, MD, EUA).

PCR do cDNA: O cDNA foi amplificado utilizando-se 1 U/μL da enzima Taq DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 mM de dNTP Mix e os *primers* específicos para os receptores do MIF e para a peptidilprolil isomerase (*Ppia*), utilizada como controle endógeno da reação (Tabela 1). A ciclagem utilizada foi de 30 ciclos para CD74 e *Ppia* e 40 ciclos para CD44 sendo cada etapa de 1 min a 95 °C, 1 min a temperatura da oligossonda e 1 min a 72 °C.

Tabela 1- Seqüência de *primers* para CD74 e CD44 para reações de RT-PCR

Primer	Seqüência (5'-3')	Produto de PCR	Temperatura de anelamento
CD74	S: GCCTTCGCATGAAGCTTCCGAAAT	565 pb	63,5 °C
	A: TGGGACGATGAAACAGACACCAGT		
CD44	S: CAGTCACAGACCTACCCAATTCCT	284 pb	58 °C
	A: TGCTGTACTATTAGGAGTGGTGGC		
<i>Ppia</i>	S: CTTGCTGCAGACATGGTC	669 pb	58 °C
	A: GCAATCCTGCTAGACTTG		

S: *sense*, A: *antisense*

O produto da PCR foi fracionado em gel de agarose a 1 %, utilizando-se um marcador de peso molecular de DNA, para confirmação do tamanho dos amplificados. O gel de agarose foi corado com o brometo de etídio para visualização da imagem em transiluminador e posterior captura da imagem utilizando o programa GeneSnap (Syngene, Frederick, MD, EUA). Estimou-se em unidades arbitrárias, a densidade relativa das bandas nos géis (análise semi-quantitativa) com o programa GeneTools (Syngene, Frederick, MD, EUA).

4.5.2.3 Ensaio por PCR em Tempo Real

Os cDNAs obtidos como anteriormente descrito foram utilizados para a PCR em Tempo Real.

A PCR em Tempo Real foi realizada para a quantificação do cDNA gerado pela transcrição reversa, utilizando-se solução *master mix* com *SYBR Green*, conforme orientação do fabricante, em um *Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System* com *Dell™ Tower* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para o controle interno utilizou-se a *Ywhaz* (tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide [*Mus musculus*]). Para o controle negativo, foi utilizado um *mix* de amplificação completo no qual o cDNA foi substituído por água. O método de análise $2^{\Delta\Delta CT}$ foi utilizado com o gene da *Ywhaz* como normalizador. As amplificações foram realizadas utilizando-se condições padrão de ciclagem (10 min a 95 °C para ativação da enzima, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento-extensão por 60seg na temperatura referente aos *primers* utilizados (Tabela 2). Curvas padrões foram realizadas para todos os transcritos, a fim de se comprovar a linearidade e eficiência de amplificação, utilizando-se diluições seriadas do cDNA. A curva de dissociação foi realizada com os produtos de amplificação para se assegurar a temperatura de dissociação dos mesmos. O software GeneAmp (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi utilizado para quantificar os níveis de expressão dos genes.

Tabela 2- Seqüência de *primers* para CD74 e CD44 para PCR em Tempo Real

Primer	Seqüência (5'-3')	Produto de PCR	Temperatura de anelamento
CD74	S: GCC TTC GCA TGA AGC TTC CGA ATT A: TAA CGT TCT TCA CAG GCC CAA GGA	120 pb	60.3 °C
CD44	S: ATC ATC TTG GCA TCT CTC CTG GCA A: TTT CTT CTG CCC ACA CCT TCT CCT	82 pb	60.2 °C
Ywhaz	S: GAA GCC ACA ATG TTC TTG GCC CAT A: AAA CCA ACA GAG ACT TGG AAG CAC	84 pb	58 °C

S: *sense*, A: *antisense*.

4.6 Análise Estatística

Para o estudo da expressão de RNAm, o número de cópias de cDNA normalizado para cada transcrito em diferentes dias de gestação foi comparado utilizando-se o teste ANOVA com um fator seguido por comparações múltiplas pelo método de Tukey. A suposição de homogeneidade de variâncias foi verificada e empregou-se transformação logarítmica. Para tal utilizou-se o programa Prism para Windows 95, versão 4.00 (GraphPad Software Inc.), considerando-se diferenças estatisticamente significantes com $p < 0,05$.

Para as imagens capturadas e medidas com o programa Image J, os dados obtidos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) com localização de diferenças significativas pelo teste Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas foram estabelecidas para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Imunolocalização de Mif na interface materno placentária

A imunorreatividade para os receptores CD74 e CD44 foi observada em leucócitos em todos os períodos gestacionais estudados (7,5, 10,5, 13,5 e 17,5 dias de gestação), enquanto que a reatividade em outros tipos celulares variou em função do período gestacional.

Dia 7,5 de gestação

A análise dos preparados histológicos submetidos à imunolocalização do complexo receptor (CD74-CD44) para o MIF não mostrou reatividade nas células trofoblásticas, fossem elas da região mural ou polar, gigantes ou diplóides (Fig. 2). Chamou a atenção, no entanto, a presença de leucócitos maternos, extravasados da circulação materna, fortemente reativos e em grande proximidade com as células trofoblásticas gigantes do cone ectoplacentário (Fig. 2 C-D).

De forma semelhante, os leucócitos presentes nos vasos deciduais também se apresentaram fortemente reativos a ambos os anticorpos testados (Fig. 2 A-D). Interessantemente, vasos da região decidual antimesometrial, distantes do cone ectoplacentário não continham leucócitos reativos.

Ao contrário da reatividade observada para CD44, CD74 foi imunolocalizado também em células presentes na decidua e células endoteliais (Fig. 2 F-H).

Figura 2. Imunolocalização de CD44 (A-D) e de CD74 (E-H) na interface materno placentária aos 7,5 dias de gestação. Notar a ausência de reatividade para ambas as moléculas nas células trofoblásticas na região de cone ectoplacentário (ec), e a presença de positividade em leucócitos (setas, B-C) no interior de vasos da decídua mesometrial (md) e em contato com o trofoblasto do (ec) cone ectoplacentário (setas em D). CD74 foi imunolocalizado na decídua e em células endoteliais (setas nas figuras F e G) e em leucócitos na região mesometrial (H). A figura E representa um controle negativo em que o anticorpo primário foi omitido da reação. E, embrião; am, região antimesometrial da decídua; s, vaso sanguíneo materno. Barra representa 200 μ m em A, B, C e H, 50 μ m em D e F, 500 μ m em E e G.

Dia 10,5 de gestação

Neste período da gestação, a região decidual mesometrial exibe vastos e numerosos sinusóides, conferindo ao tecido um aspecto rendilhado (Fig. 3 A), sugestivo de uma intensa atividade angiogênica. A reação imunohistoquímica para a localização do co-receptor CD44 mostrou intensa reatividade nesta região (Fig. 3 A-B). Assim como no dia 7,5 de gestação, leucócitos também foram fortemente reativos. No tecido fetal, células trofoblásticas gigantes foram reativas, mas em um padrão muito mais fraco do que o observado na decídua (Fig. 3 C).

A imunolocalização do receptor CD74 mostrou um padrão distinto do observado para o CD44, na medida em que além da marcação nas células deciduais (Fig. 3 H) e leucócitos também se observou reatividade nas células trofoblásticas gigantes (Fig. 3 E-G).

Figura 3. Imunolocalização de CD44 (A-D) e CD74 (E-I) na interface materno-placentária aos 10,5 dias de gestação. As figuras A e B mostram reatividade para CD44 na região da decídua (d). As setas mostram a área limitante entre a decídua e a glândula metrial (*), que também apresenta reatividade em suas regiões mais distais. Ao contrário, (C) células trofoblásticas gigantes (g) mostram-se fracamente reativas. (E-G) Notar células trofoblásticas gigantes (g) e células deciduais (d nas figuras F e H) fortemente imunocoradas para CD74 (setas). As figuras D e I representam controles negativos nos quais o anticorpo primário foi omitido. Barra: representa 500 μ m em A e E, 100 μ m em B, 200 μ m em C, D, F e I e 50 μ m em G e H.

Dias 13,5 e 17,5 de gestação

A imunolocalização dos receptores CD74 e CD44 revelou uma similaridade entre os dias 13,5 e 17,5 de gestação no que se refere à distribuição destas moléculas na interface materno-placentária. Em ambos os períodos gestacionais, a reatividade para os anticorpos CD74 e CD44 foi observada em células deciduais muito próximas da camada de células trofoblásticas gigantes da zona juncional (Fig. 4 A e G). Células gigantes quando reativas exibiram uma marcação fraca (Fig. 4 F-J). Nos tecidos maternos, reatividade também foi observada em leucócitos no interior de vasos endometriais (Fig. 4 B, H e I) e ocasionalmente em células endoteliais (Fig. 4 K). Leucócitos percorrendo a zona placentária do labirinto também se mostraram reativos, assim como algumas células trofoblásticas desta região (Fig. 4 C-D).

Controles negativos em que o anticorpo primário foi omitido da reação ou substituído por soro de animal não imune na reação imunohistoquímica, não revelaram estruturas reativas (Fig. 2 E, 3 D, 3 I e 4 E).

As reações imunohistoquímicas também foram quantificadas. A Figura 5 mostra os valores encontrados para a imunolocalização dos receptores CD74 e CD44. Como pode ser observada nesta figura, a intensidade da reação é muito mais acentuada no dia 10,5 de gestação para os dois receptores mostrando valores significativamente maiores ($p=0,0189$ para CD44 e $p=0,0001$ para CD74) em relação ao dia 7,5 de gestação. Nos demais períodos a intensidade de reação é discreta, não diferindo estatisticamente do dia 7,5 de gestação.

Figura 4. Imunolocalização de CD44 e CD74 em placentas aos 13,5 e 17,5 dias de gestação. Células reativas para CD74 e CD44 são observadas na decídua, vasos sanguíneos e células trofoblásticas. As figuras A e B mostraram reatividade para CD44 e CD74, respectivamente aos 13,5 dg. Figuras C, D e E mostraram reatividade para CD44 aos 17,5 dg e as figuras F, G, H, I e J imunolocalizam CD74 aos 17,5 dg. A figura K representa o controle negativo da reação, no qual o anticorpo primário foi omitido. Barra: representa 100 μ m em A e C, 50 μ m em B, D, I, J e K, 200 μ m em E e H, 500 μ m em F e 20 μ m em G.

Figura 5. Análise quantitativa da imunolocalização do complexo receptor (CD74-CD44) para o MIF, em número de pixels por área segmentada. Quantificação realizada no programa Image J (NIH, Bethesda, EUA). As barras representam o desvio padrão. Em ambos os gráficos, asteriscos representam diferenças significativas em relação ao dia 7,5 de gestação; *, $p < 0,05$ para CD74; *, $p < 0,0001$ para CD44. ANOVA seguido por teste Student-Newman-Keuls.

5.2 PCR

Como controle dos experimentos de qRT-PCR foram realizadas curvas de dissociação e curvas padrão para as amostras de placentas fetais e decídua. As curvas de dissociação para as amostras de placenta e decídua foram realizadas com os *primers* para *CD74*, *CD44* e *Ywhaz*. Para os dois compartimentos, as curvas de dissociação mostraram apenas um pico, confirmando a amplificação de apenas um único produto (Fig. 6).

Curvas padrão também foram realizadas para a estimativa da eficiência das reações. As amostras mostraram uma eficiência de 96,9% para *CD74*, 112,2% para *CD44* e 109,7 para *Ywhaz* (Fig. 7).

Para analisar a expressão gênica do complexo receptor para o MIF (CD74-CD44), as regiões maternas e fetais foram analisadas separadamente estatisticamente e comparadas entre os grupos gestacionais estudados.

A detecção da expressão gênica de *CD74* e *CD44* no cone ectoplacentário e porções fetais e maternas da placenta por RT-PCR mostrou bandas de tamanhos esperados: 565 e 284 pares de bases, respectivamente, em todos os períodos

gestacionais estudados (Figs. 8 A, 9 A). A avaliação quantitativa da expressão gênica foi realizada por qRT-PCR (Figs. 7 B, 8 B).

A

B

C

Figura 6. Curvas de dissociação confirmando a amplificação de produto único. A: CD74, B: CD44 e C: YWHAZ.

Figura 7. Curvas padrão para verificação da eficiência dos *primers*. A: CD74, B: CD44 e C: YWHAZ.

Na decídua, a expressão gênica de *CD74* não apresentou diferença significativa entre as idades gestacionais estudadas ($p = 0,289$). A quantificação de RNAm para *CD44*, no entanto, mostrou um aumento significativo nos dias 13,5 e 17,5 de gestação ($p < 0,05$) em relação aos dias 7,5 e 10,5 de gestação.

A

B

Figura 8. Expressão gênica de CD74 e CD44 na porção materna da placenta (decídua). **A:** Gel representativo mostrando os produtos finais do RT-PCR. Bandas mostram *Ppia*, *CD74* e *CD44* e os dias 7,5, 10,5, 13,5 e 17,5 de gestação. **B:** Histograma representando a expressão gênica de *CD74* e *CD44* em relação à expressão de *Ywhaz* por qRT-PCR. Barras representam o desvio padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao dia 7,5 de gestação ($p < 0,05$). ANOVA seguido por teste de Tuckey para comparações múltiplas.

No compartimento fetal, a expressão gênica do CD74 mostrou diferença significativa entre os dias 7,5 e 10,5 de gestação e também entre os dias 10,5 e 17,5 de gestação ($p < 0,05$). A expressão do gene CD44 na porção fetal da placenta mostrou diferença significativa entre os dias de gestação 13,5 e 17,5 em relação aos dias 7,5 e 10,5 de gestação ($p < 0,05$).

A **B**

Figura 9. Expressão gênica de CD74 e CD44 em cones ectoplacentários e na porção fetal da placenta. **A:** Gel representativo mostrando os produtos finais do RT-PCR. Bandas mostram *Ppia*, *CD74* e *CD44* e os dias 7,5, 10,5, 13,5 e 17,5 de gestação. **B:** Histograma representando a expressão gênica de *CD74* e *CD44* em relação à expressão de *Ywhaz* por qRT-PCR. Barras representam o desvio padrão. Asteriscos representam diferenças significativas em relação ao dia 7,5 de gestação ($p < 0,05$). ANOVA seguida do teste de Tuckey para comparações múltiplas.

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo estabelecer o padrão de expressão do complexo receptor CD74-CD44 para o MIF na interface materno-placentária desde a fase inicial da gestação (período de implantação embrionária) até o amadurecimento da placenta. Para isto foram utilizadas técnicas que possibilitaram a localização e expressão gênica destes receptores.

O Fator de inibição de migração de macrófagos (MIF) é uma citocina pleiotrópica produzida por uma variedade de células e tecidos normais, incluindo macrófagos, monócitos, glândulas endócrinas e órgãos reprodutivos. O MIF é considerado o principal mediador da resposta proinflamatória e estudos recentes o apontaram como uma citocina envolvida em eventos reprodutivos como a ovulação, o ciclo menstrual e o início da gestação, ou seja, eventos reprodutivos fundamentais (Ietta et al., 2002).

Neste estudo observamos que CD74 e CD44 são expressos em componentes maternos e fetais ao longo de toda a gestação. Na região materna, o RNAm de ambos receptor e co-receptor estava sempre presente e com maior intensidade após o amadurecimento da placenta aos 17,5 dias de gestação, sugerindo fortemente a presença de células-alvo para MIF, nesta região.

A expressão gênica de CD74 e CD44 foi positivamente correlacionada à localização imunohistoquímica destes receptores na interface materno-fetal, que mostrou um pico de intensidade aos 10,5 dias de gestação. Coincidentemente, estudos prévios mostraram forte expressão gênica e protéica de MIF por células trofoblásticas também neste período gestacional (Faria et al., 2010), sugerindo uma correlação funcional parácrina. Nesta fase, ocorre a maturação dos componentes placentários maternos e fetais, onde a ação de MIF e suas interações podem participar ativamente da regulação dos eventos biológicos que governam e estabilizam o processo de diferenciação placentária.

Baseado nas reações de imunolocalização é provável que a expressão gênica de CD74 e CD44 na decídua corresponda à imuno co-localização observada em células leucocitárias, deciduais e endoteliais durante todos os períodos gestacionais analisados.

Neste estudo, os subtipos de leucócitos CD74 e CD44 reativos não foram caracterizados, mas é possível que pelo menos parte dos leucócitos endovasculares

e outros presentes na decídua pertençam à população de células NK, uma vez que estas células são abundantes na decídua mesometrial (Paffaro et al., 2003; Zavan et al., 2010). Coerente com esta possibilidade, Hannan et al. (2010) sugeriram em humanos, que macrófagos e células NK uterinas durante a gestação expressam altos níveis de transcritos e moléculas de CD44 na superfície celular.

As ações do MIF nas células NK incluem a regulação de respostas líticas, o que pode ser um mecanismo protetor para embrião (Apte et al., 1998), indução da ativação de células T seguida por morte celular, mecanismo que parece conciliar a inibição do sistema imunológico com o potencial pró-inflamatório do MIF (Javeed e Zhao, 2008) e sobrevivência de células B (Lue et al., 2007), intimamente relacionada com o perfil de citocinas Th2, uma dominância benéfica para a manutenção da gestação de acordo com vários estudos (Lin et al., 1993; Wegmann et al., 1993; Suthanthiran e Strom, 1995).

As células uNK são fonte e ao mesmo tempo alvo do MIF, comprovando o envolvimento desta citocina em aspectos importantes da reprodução humana (Arcuri et al., 2006). A ativação de uNK também desencadeia produção de citocinas e proteínas de matriz extracelular, implicadas na maturação da placenta (Croy et al., 2000). Na interface materno-placentária, todas as funções desencadeadas por MIF, através de vias de sinalização mediadas por CD74-CD44 merecem atenção, já que elas podem criticamente regular respostas imunológicas, participar de eventos inflamatórios ou desenvolver mecanismos de tolerância.

Outro aspecto a ser considerado é a possibilidade de que outros leucócitos façam parte do rol das células presentes na decídua CD74-CD44 reativas. Inúmeros estudos têm demonstrado que leucócitos, entre eles monócitos/macrófagos, linfócitos B além das células NK são alvos prevalentes do MIF para a tradução de sinais iniciada pela ligação com o complexo receptor e co-receptor CD74-CD44 (Gregory et al., 2004; Shi et al., 2006; Gore et al., 2008; Miller et al., 2008).

Embora na placenta de roedores não ocorra infiltração de leucócitos como em outras espécies, não se pode deixar de lado os leucócitos circulantes na medida em que percolam os vasos maternos endometriais e os seios placentários. Neste estudo leucócitos e praticamente apenas aqueles que estavam em estreita proximidade à placenta mostraram-se reativos aos receptores e, portanto aptos a responder

prontamente ao MIF produzido na interface materno-placentária. O significado funcional deste achado, certamente merece investigações mais detalhadas. Com base em dados da literatura, os resultados obtidos neste estudo sugerem que independente da sub-população de leucócito presente no endométrio, estes são presuntivos alvos do diálogo parácrino trofoblasto-decídua.

O complexo CD74-CD44 também foi imunolocalizado em células decíduais fenotipicamente caracterizadas, o que não havia sido previamente relatado. Funcionalmente, a presença destes receptores nestas células pode estar relacionada com qualquer uma das funções gerais do MIF, como por exemplo: ativação da cascata de sinalização envolvendo Akt e NF- κ B, proliferação e sobrevivência dependente de CD74-CD44 e ativação de p53 e de JAB1/CSN5 (Kleemann et al., 2000; Liao et al., 2003; Swant et al., 2005; Shi et al., 2006; Lue et al., 2006; Berndt et al., 2008; Jung et al., 2008; Gore et al., 2008). Estes processos são importantes para a homeostase celular e, portanto, relevantes para mecanismos regulatórios de sobrevivência celular em geral.

Nossos resultados também mostraram células endoteliais CD74-CD44 reativas, fazendo parte da porção materna da placenta. Aumento da permeabilidade vascular acompanhado por remodelamento da matriz extracelular e angiogênese do estroma uterino são características importantes encontradas nos sítios de implantação durante uma grande parte da gestação em roedores (Halder et al., 2000). Particularmente nestes locais, a angiogênese é responsável pelo aumento da área vascular na região mesometrial placentária, aonde tem se sugerido uma importante participação das células trofoblásticas e NKs (Torry et al., 2007; Cross et al., 2002).

Embora nenhum experimento funcional tenha sido realizado, é tentador especular que a presença destes receptores nas células endoteliais decíduais possa estar relacionada ao potencial angiogênico de MIF, capaz de aumentar a expressão de quimiocinas pró angiogênicas, como CXCL8 e VEGF (Bernhagen et al., 2007) nestas células (Chakraborty et al., 1995; Vestweber et al., 2009).

Por outro lado, estudos recentes também têm mostrado que o MIF promove a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, facilitando as interações leucócito-endotélio. Este papel do MIF parece estar estreitamente relacionado à expressão da molécula de adesão VCAM-1 (Cheng et al., 2010). Evidências

experimentais sugerem que na placenta humana o MIF também age na adesão de monócitos induzindo a expressão de ICAM-1, em situações de desafio imunológico como a infecção por *Toxoplasma gondii* (Ferro et al., 2008).

A via de ativação desencadeada pelo MIF através de CD74-CD44 e seus possíveis papéis funcionais não foram aqui estudadas, no entanto, este estudo mostra pela primeira vez a expressão destes receptores na decídua e levanta a possibilidade de novas células-alvo na interface materno-placentária que podem desempenham funções específicas na manutenção da gestação.

Na porção fetal, o panorama parece ser um pouco diferente do que ocorre na decídua. Exceto pelas fases finais da gestação, (17,5 dias de gestação) praticamente não houve correlação entre a expressão do receptor e seu co-receptor na porção fetal da placenta.

Na fase de pós-implantação, embora tenha sido detectado RNAm para o complexo receptor co-receptor, a imunolocalização protéica destes não foi observada na população de células trofoblásticas do cone ectoplacentário ou mesmo no trofoblasto mural. Esta correlação negativa sugere a possibilidade de mecanismos pós-transcricionais reguladores nesta etapa da gestação como observado em outros modelos (Salgado et al., 2009).

Já na fase gestacional final, a expressão dos receptores correlaciona-se com a presença de células reativas na placenta fetal. Células trofoblásticas gigantes presentes nos limites entre a porção materna e fetal da placenta foram reativas aos dois receptores caracterizando-as como uma população passível de responsividade ao MIF. Estudo anterior (Faria et al., 2010) mostrou que nesta fase da gestação tanto células deciduais como células trofoblásticas gigantes expressam MIF, o que sugere um mecanismo de ação autócrina e parácrina em relação à sinalização mediada por MIF na interface materno-placentária.

Durante as fases gestacionais intermediárias aqui estudadas, duas situações distintas foram observadas em relação aos dias 10,5 e 13,5 de gestação. Neste período de intensas modificações na interface materno-fetal para o estabelecimento da placenta, notou-se a expressão gênica de CD44, mas uma redução muito marcante na expressão de CD74. Visto que a tradução de sinal mediada pelo MIF requer o reconhecimento deste fator pela porção extracelular de CD74 para a

ativação de CD44, nossos resultados abrem diversas possibilidades interpretativas: 1) O desequilíbrio entre CD74-CD44 pode ter um significado restritivo da resposta ao MIF placentário; 2) expressão de CD74 embora muito baixa possa ser suficiente para a ativação do complexo receptor; ou ainda, 3) a resposta sinalizadora mediada pelo MIF pode utilizar formas alternativas independentes de CD74. No entanto, a constatação de que em camundongos deficientes em CD74, o MIF é incapaz de ativar a fosforilação das proteínas ERK1/2 em macrófagos, confirma o significado funcional da presença de CD74 nas respostas ao MIF que utilizam as vias clássicas de ativação mediadas pelo complexo CD74-CD44 (Leng e Bucala, 2006). Desta forma, este contexto sugere uma ação restritiva da ação de MIF sobre as células trofoblásticas nesta fase da gestação.

Ainda em relação à expressão do complexo receptor CD74-CD44 pela porção fetal da placenta seguem-se considerações importantes: 1. Ao contrário do observado em relação à expressão gênica de CD74 e CD44, principalmente no dia 10,5 de gestação, a análise imunohistoquímica detectou a presença de células trofoblásticas reativas de forma inversa. Isto parece significar que no momento estudado, estas células estavam expressando RNAm para CD44, mas não para CD74 enquanto que seu repertório protéico destas moléculas, ao contrário, continha CD74 e muito pouco CD44. Se evidenciarmos uma expressão compensatória para equilibrar o perfil protéico destas moléculas, é algo que merece ser futuramente explorado, uma vez que esta resposta pode indicar mecanismos funcionais na interface materno-fetal. Desde que não existam relatos de frações solúveis destas moléculas que pudessem justificar que as reações imunohistoquímicas estariam flagrando moléculas de CD74 produzidas em outros locais, talvez a hipótese compensatória possa ser no momento uma possibilidade plausível.

Com base nas observações aqui apresentadas, constatamos a expressão de moléculas do complexo receptor CD74-CD44 na interface materno placentária, abrindo novas possibilidades de relações autócrinas e parácrinas em relação à sinalização mediada por MIF.

A expressão e a presença do complexo receptor CD74 - co-receptor CD44 na interface materno-placentária muito possivelmente é apenas mais uma peça da complexa rede de diálogo materno-fetal. Acrescentar informações mesmo que

parciais a este complexo, entretanto, pode nos permitir futuramente aprofundar conhecimentos sobre importantes processos fisiológicos e talvez, servir de base para a compreensão do aparecimento de doenças da gestação.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permitiram concluir que:

1. A expressão e localização de CD74-CD44 na interface materno-placentária variam de acordo com a fase gestacional e tipo celular materno ou fetal.
2. Em todos os períodos estudados houve expressão gênica do receptor/co-receptor de *Mif*, na porção materna da placenta.
3. Na porção materna da placenta, imunoreatividade para o receptor e o co-receptor de MIF: CD74 e CD44, respectivamente, foi observada em leucócitos, células decíduais e endoteliais em todos os períodos gestacionais estudados, levando à conclusão de que estas células poderiam ser responsivas ao MIF.
4. Na porção fetal da placenta, a expressão gênica de CD74 e de CD44 não obedeceu a padrões semelhantes. Houve expressão de CD44 em todos os períodos estudados, mas não de CD74, que foi mais abundante apenas nos dias 7,5 e 17,5 de gestação. A baixa expressão do receptor CD74 pode ser um fator de limitação da ação do MIF nestas fases da gestação.
5. Células trofoblásticas gigantes apresentaram-se imunorreativas para CD44 e CD74 nos dias 10,5, 13,5 e 17,5, mas não no dia 7,5 de gestação. A ausência de imunomarcagem pode significar que estas células não são responsivas ao MIF nesta fase da gestação.
6. A diferença entre a expressão gênica de CD74 e CD44 no dia 7,5 de gestação e a imunoreatividade para estes fatores sugere mecanismos pós-transcricionais de regulação desta via de sinalização.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Aeberli D, Leech M, Morand EF. Macrophage migration inhibitory factor and glucocorticoid sensitivity. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(8):937-43.

Ain R, Canham LN, Soares MJ. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Dev Biol*. 2003;260(1):176-90.

Akoum A, Metz CN, Morin M. Marked increase in macrophage migration inhibitory factor synthesis and secretion in human endometrial cells in response to human chorionic gonadotropin hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):2904-10.

Amin MA, Haas CS, Zhu K, Mansfield PJ, Kim MJ, lackowski NP, Koch AE. Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFkappaB. *Blood*. 2006;107(6):2252-61.

Apte RS, Sinha D, Mayhew E, Wistow GJ, Niederkorn JY. Cutting edge: role of macrophage migration inhibitory factor in inhibiting NK cell activity and preserving immune privilege. *J Immunol*. 1998;160(12):5693-6.

Arcuri F, Cintonino 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*. 1999;60:1299-1303.

Arcuri F, Ricci C, Ietta F, Cintonino M, Tripodi SA, Cetin I, Garzia E, Schatz F, Klemi P, Santopietro R, Paulesu L. Macrophage migration inhibitory factor in the human endometrium: expression and localization during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod*. 2001;64(4):1200-5.

Arcuri F, Cintonino M, Carducci A, Papa S, Riparbelli MG, Mangioni S, Di Blasio AM, Tosi P, Viganò P. Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. *Reproduction*. 2006;131(1):175-82.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Berndt K, Kim M, Meinhardt A, Klug J. Macrophage migration inhibitory factor does not modulate co-activation of androgen receptor by Jab1/CSN5. *Mol Cell Biochem.* 2008;307(1-2):265-71.

Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, McColl SR, Bucala R, Hickey MJ, Weber C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med.* 2007;13(5):587-96.

Beswick EJ, Reyes VE. CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol.* 2009;15(23):2855-61.

Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science.* 1966;153(731):80-2.

Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med.* 1999;189(2):341-6.

Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.* 1995;377:68-71.

Calandra T, Froidevaux C, Martin C, Roger T. Macrophage Migration Inhibitory Factor and Host Innate Immune Defenses against Bacterial Sepsis. *J Infect Dis.* 2003;187:385-90.

Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature.* 2003;3:791-800.

Chakraborty I, Das SK, Dey SK. Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNAs in the mouse uterus around the time of implantation. *J Endocrinol.* 1995;147(2):339-52.

Cheng Q, McKeown SJ, Santos L, Santiago FS, Khachigian LM, Morand EF, Hickey MJ. Macrophage migration inhibitory factor increases leukocyte-endothelial interactions in human endothelial cells via promotion of expression of adhesion molecules. *J Immunol.* 2010;185(2):1238-47.

Choi CH, Roh CR, Kim TJ, Choi YL, Lee JW, Kim BG, Lee JH, Bae DS. Expression of CD44 adhesion molecules on human placentae. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;128(1-2):243-7.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.

Coleman AM, Rendon BE, Zhao M, Qian MW, Bucala R, Xin D, Mitchell RA. Cooperative regulation of non-small cell lung carcinoma angiogenic potential by macrophage migration inhibitory factor and its homolog, D-dopachrome tautomerase. *J Immunol.* 2008;181(4):2330-7.

Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;187(1-2):207-12.

Croy BA, Ashkar AA, Foster RA, DiSanto JP, Magram J, Carson D, Gendler SJ, Grusby MJ, Wagner N, Muller W, Guimond MJ. Histological studies of gene-ablated mice support important functional roles for natural killer cells in the uterus during pregnancy. *J Reprod Immunol.* 1997;35(2):111-33.

Croy BA, Chantakru S, Narumiya S, Ichikawa A, Sugimoto Y. Prolonged gestation does not extend survival of uterine natural killer lymphocytes in mice deleted in the receptor for prostaglandin F2 α . *J Reprod Immunol.* 2000;46(2):125-9.

Cuthbert RJ, Wilson JM, Scott N, Coletta PL, Hull MA. Differential CD74 (major histocompatibility complex Class II invariant chain) expression in mouse and human intestinal adenomas. *Eur J Cancer.* 2009;45(9):1654-63.

David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1966;56(1):72-7.

Faria MR, Hoshida MS, Ferro EA, Ietta F, Paulesu L, Bevilacqua E. Spatiotemporal patterns of macrophage migration inhibitory factor (Mif) expression in the mouse placenta. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8:95.

Ferro EA, Mineo JR, Ietta F, Bechi N, Romagnoli R, Silva DA, Sorda G, Bevilacqua E, Paulesu LR. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. *Am J Pathol.* 2008;172(1):50-8.

Fingerle-Rowson G, Koch P, Bikoff R, Lin X, Metz CN, Dhabhar FS, Meinhardt A, Bucala R. Regulation of macrophage migration inhibitory factor expression by glucocorticoids in vivo. *Am J Pathol.* 2003;162:47-56.

Fingerle-Rowson G, Petrenko O, Metz CN, Forsthuber TG, Mitchell R, Huss R, Moll U, Müller W, Bucala R. The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(16):9354-9.

Fingerle-Rowson G, Petrenko O. MIF coordinates the cell cycle with DNA damage checkpoints. Lessons from knockout mouse models. *Cell Div.* 2007;2:22.

Flaster H, Bernhagen J, Calandra T, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol Endocrinol.* 2007;21(6):1267-80.

Gore Y, Starlets D, Maharshak N, Herman S, Kaneyuki U, Leng L, Bucala R, Shachar I. Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces B Cell Survival by Activation of a CD74-CD44 Receptor Complex. *J Biol Chem.* 2008;283:2784-92.

Gregory JL, Leech MT, David JR, Yang YH, Dacumos A, Hickey MJ. Reduced leukocyte-endothelial cell interactions in the inflamed microcirculation of macrophage migration inhibitory factor-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 2004;50(9):3023-34.

Halder JB, Zhao X, Soker S, Paria BC, Klagsbrun M, Das SK, Dey SK. Differential expression of VEGF isoforms and VEGF(164)-specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for VEGF(164) in vascular permeability and angiogenesis during implantation. *Genesis.* 2000;26(3):213-24.

Hannan NJ, Paiva P, Dimitriadis E, Salamonsen LA: Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol Reprod.* 2010;82(2):235-45.

Hristoskova S, Holzgreve W, Zhong XY, Hahn S. Macrophage migration inhibition factor is elevated in pregnancy, but not to a greater extent in preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2006;274(1):25-8.

Hudson JD, Shoaibi A, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med.* 1999;190:1375-82.

Ietta F, Wu Y, Romagnoli R, Soleymanlou N, Orsini B, Zamudio S, Paulesu L, Caniggia I. Oxygen regulation of macrophage migration inhibitory factor in human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292(1):E272-80.

Javeed A, Zhao Y, Zhao Y. Macrophage-migration inhibitory factor: role in inflammatory diseases and graft rejection. *Inflamm Res*. 2008;57(2):45-50.

Jung H, Seong HA, Ha H. Critical role of cysteine residue 81 of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in MIF-induced inhibition of p53 activity. *J Biol Chem*. 2008;283(29):20383-96.

Katz S, Abrahamsohn PA. Involution of the antimesometrial decidua in the mouse. An ultrastructural study. *Anat Embryol (Berl)*. 1987;176(2):251-8.

Kiso Y, Yamashiro S, McBey BA, Croy BA. Tissue-specific differentiation of a natural killer cell subset in ectopically grafted murine uterine tissue. *Transplantation*. 1992;54(1):185-7.

Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, Johannes FJ, Roger T, Calandra T, Kapurniotu A, Grell M, Finkelmeier D, Brunner H, Bernhagen J. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*. 2000;408(6809):211-6.

Konova E. The role of NK cells in the autoimmune thyroid disease-associated pregnancy loss. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010;39(3):176-84.

Laudanna C, Alon R. Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thromb Haemost*. 2006;95(1):5-11.

Leech M, Lacey D, Xue Jr, Santos L, Hutchinson P, Wolvetang E, David JR, Bucala R, Morand EF. Regulation of p53 by macrophage migration inhibitory factor in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:1881-9.

Leng L, Bucala R. Insight into the biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF) revealed by the cloning of its cell surface receptor. *Cell Res*. 2006;16(2):162-8.

Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*. 2003;197(11):1467-76.

Li H, Niederkorn JY, Neelam S, Mayhew E, Word RA, McCulley JP, Alizadeh H. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(3):900-7.

Liao H, Bucala R, Mitchell RA. Adhesion-dependent signaling by MIF. *J Biol Chem.* 2003;278:76-81.

Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG: Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol.* 1993;151(9):4562-73.

Lue H, Kapurniotu A, Fingerle-Rowson G, Roger T, Leng L, Thiele M, Calandra T, Bucala R, Bernhagen J. Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity. *Cell Signal.* 2006;18(5):688-703.

Lue H, Thiele M, Franz J, Dahl E, Speckgens S, Leng L, Fingerle-Rowson G, Bucala R, Lüscher B, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene.* 2007;26(35):5046-59.

Magalhães ES, Paiva CN, Souza HS, Pyrrho AS, Mourão-Sá D, Figueiredo RT, Vieira-de-Abreu A, Dutra HS, Silveira MS, Gaspar-Elsas MI, Xavier-Elsas P, Bozza PT, Bozza MT. Macrophage migration inhibitory factor is critical to interleukin-5-driven eosinophilopoiesis and tissue eosinophilia triggered by *Schistosoma mansoni* infection. *FASEB J.* 2009;23(4):1262-71.

Malassiné A, Frendo JL, Evain-Brion D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update.* 2003;9(6):531-9.

Maltepe E, Bakardjiev AI, Fisher SJ. The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1016-25. doi: 10.1172/JCI41211.

Manaseki S, Searle RF. Natural killer (NK) cell activity of first trimester human decidua. *Cell Immunol.* 1989;121(1):166-73.

Marzusch K, Buchholz F, Ruck P, Handgretinger R, Geiselhart A, Engelmann L, Dietl J. Interleukin-12- and interleukin-2-stimulated release of interferon-gamma by uterine CD56++ large granular lymphocytes is amplified by decidual macrophages. *Hum Reprod.* 1997;12(5):921-4.

Miller EJ, Li J, Leng L, McDonald C, Atsumi T, Bucala R, Young LH. Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature*. 2008;451:578-83.

Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh 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*. 2002;99:345-50.

Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) and Cytoplasmic Phospholipase A2 Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *J Biol Chem*. 1999;274(25):18100-6.

Morand EF, Leech M, Weedon H, Metz C, Bucala R, Smith MD. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: clinical correlations. *Rheumatology (Oxford)*. 2002;41(5):558-62.

Mossman, H W. Comparative morphogenesis og the fetal membranes and accessory uterine structures. *Contr Embryol Carneg Metab*. 1937;79:237-44.

Müntener M, Hsu YC. 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)*. 1977;98(3):241-52.

Nemajerova A, Moll UM, Petrenko O, Fingerle-Rowson G. Macrophage migration inhibitory factor coordinates DNA damage response with the proteasomal control of the cell cycle. *Cell Cycle*. 2007;6(9):1030-4.

Nguyen MT, Lue HQ, Kleeman R, Thiele M, Tolle G, Finkelmeier D, Wagner E, Braun A, Bernhagen J. The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. *J Immunol*. 2003;170:3337-47.

Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. *J Interferon Cytokine Res*. 2000;20(9):751-62.

Noels H, Bernhagen J, Weber C. Macrophage migration inhibitory factor: a noncanonical chemokine important in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2009;19(3):76-86.

Paffaro VA Jr, Bizinotto MC, Joazeiro PP, Yamada AT. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta*. 2003;24(5):479-88.

Paulesu L, Cateni C, Romagnoli R, Ietta F, Dantzer V. Variation in macrophage-migration-inhibitory-factor immunoreactivity during porcine gestation. *Biol Reprod*. 2005;72(4):949-53.

Plaisier M. Decidualisation and angiogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2010 Dec 8. [Epub ahead of print]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Plaisier%20M.%20Decidualisation%20and%20angiogenesis>.

Ponta H, Sherman L, Herrlich A. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(1):33-45.

Renaud SJ, Graham CH. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunol Invest*. 2008;37(5):535-64.

Reyes JL, Terrazas LI, Espinoza B, Cruz-Robles D, Soto V, Rivera-Montoya I, Gómez-García L, Snider H, Satoskar AR, Rodríguez-Sosa M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*. 2006;74(6):3170-9.

Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of toll-like receptor 4. *Nature*. 2001;414:920-4.

Rossi AG, Haslett C, Hirani N, Greening AP, Rahman I, Metz CN, Bucala R, Donnelly SC. Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J Clin Invest*. 1998;101(12):2869-74.

Salgado RM, Capelo LP, Favaro RR, Glazier JD, Aplin JD, Zorn TM. Hormone-regulated expression and distribution of versican in mouse uterine tissues. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:60.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

Satoskar AR, Bozza M, Rodriguez Sosa M, Lin G, David JR. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infect Immun*. 2001;69(2):906-11.

Schwartz V, Lue H, Kraemer S, Korbiel J, Krohn R, Ohl K, Bucala R, Weber C, Bernhagen J. A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett.* 2009 Sep 3;583(17):2749-57.

Shachar I, Flavell RA. Requirement for invariant chain in B cell maturation and function. *Science.* 1996;274(5284):106-8.

Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, McDonald C, Chen Z, Murphy JW, Lolis E, Noble P, Knudson W, Bucala R. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor – CD74 receptor complex. *Immunity.* 2006;25:594-606.

Soares MJ. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004;2:51.

Sugimoto H, Taniguchi M, Nakagawa A, Tanaka I, Suzuki M, Nishihira J. Crystal structure of human D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution. *Biochemistry.* 1999;38(11):3268-79.

Suthanthiran M, Strom TB. Immunobiology and immunopharmacology of organ allograft rejection. *J Clin Immunol.* 1995;15(4):161-71.

Suzuki H, Kanagawa H, Nishihira J. Evidence for the presence of macrophage migration inhibitory factor in murine reproductive organs and early embryos. *Immunol Lett.* 1996;51:141-7.

Swant JD, Rendon BE, Symons M, Mitchell RA. Rho GTPase-dependent signaling is required for macrophage migration inhibitory factor-mediated expression of cyclin D1. *J Biol Chem.* 2005;280:23066-72.

Takahashi K, Koga K, Linge HM, Zhang Y, Lin X, Metz CN, Al-Abed Y, Ojamaa K, Miller EJ. Macrophage CD74 contributes to MIF-induced pulmonary inflammation. *Respir Res.* 2009 May 4;10:33.

Todros T, Bontempo S, Piccoli E, Ietta F, Romagnoli R, Biolcati M, Castellucci M, Paulesu L. Increased levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;123(2):162-6.

Torry DS, Leavenworth J, Chang M, Maheshwari V, Groesch K, Ball ER, Torry RJ. Angiogenesis in implantation. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24(7):303-15.

Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens*. 2004 Jan;63(1):1-12.

Veillat V, Carli C, Metz CN, Al-Abed Y, Naccache PH, Akoum A. Macrophage migration inhibitory factor elicits an angiogenic phenotype in human ectopic endometrial cells and triggers the production of major angiogenic factors via CD44, CD74, and MAPK signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(12):E403-12.

Vestweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol*. 2009;19(1):8-15.

Viganò P, Cintoni M, Schatz F, Lockwood CJ, Arcuri F. The role of macrophage migration inhibitory factor in maintaining the immune privilege at the fetal-maternal interface. *Semin Immunopathol*. 2007;29(2):135-50.

Wada S, Fujimoto S, Mizue Y, Nishihira J. *Biochem Mol Biol Int*. Macrophage migration inhibitory factor in the human ovary: presence in the follicular fluids and production by granulosa cells. 1997;41(4):805-14.

Wang B, Goff AK. Interferon-tau stimulates secretion of macrophage migration inhibitory factor from bovine endometrial epithelial cells. *Biol Reprod*. 2003;69(5):1690-6.

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*. 2003;60(4):420-9.

Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993;14(7):353-6.

Yabunaka N, Nishihira J, Mizue Y, Tsuji M, Kumagai M, Ohtsuka Y, Imamura M, Asaka M. Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2000;23(2):256-8.

Yu WH, Woessner JF Jr, McNeish JD, Stamenkovic I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4

and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev.* 2002 Feb 1;16(3):307-23.

Xie L, Qiao X, Wu Y, Tang J. β -Arrestin1 Mediates the Endocytosis and Functions of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *PLoS One.* 2011 Jan 25;6(1):e16428.

Zavan B, Paffaro AM, Joazeiro PP, Yamada AT, Paffaro VA Jr. Immunocytochemical studies of adhesion molecules on mouse UNK cells and their extracellular matrix ligands during mouse pregnancy. *Anat Rec (Hoboken).* 2010;293(6):1081-8.

Zenclussen AC, Schumacher A, Zenclussen ML, Wafula P, Volk HD. Immunology of pregnancy: cellular mechanisms allowing fetal survival within the maternal uterus. *Expert Rev Mol Med.* 2007;9(10):1-14.

Zeng FY, Weiser WY, Kratzin H, Stahl B, Karas M, Gabius HJ. The major binding protein of the interferon antagonist sarcolectin in human placenta is a macrophage migration inhibitory factor. *Arch Biochem Biophys.* 1993;303(1):74-80.