KAREN MATIAS DO PRADO

**ANÁLISE COMPARATIVA DO MECANISMO IMUNORREGULADOR
GERADO PELA INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE (IDO) E INTERFERON-
GAMA (IFN- γ) NA INTERFACE MATERNO-PLACENTÁRIA ENTRE MÃES
QUE RECEBERAM TRANSPLANTE RENAL E MÃES SAUDÁVEIS**

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

São Paulo
2012

KAREN MATIAS DO PRADO

**ANÁLISE COMPARATIVA DO MECANISMO IMUNORREGULADOR
GERADO PELA INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE (IDO) E INTERFERON-
GAMA (IFN- γ) NA INTERFACE MATERNO-PLACENTÁRIA ENTRE MÃES
QUE RECEBERAM TRANSPLANTE RENAL E MÃES SAUDÁVEIS**

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

Versão original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Prado, Karen Matias do.

Análise comparativa do mecanismo imunorregulador gerado pela indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e interferon-gama (IFN- γ) na interface materno placentária entre mães que receberam transplante renal e mães saudáveis / Karen Matias do Prado. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevlacqua.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia do Trofoblasto e interação materno-fetal com ênfase na fisiologia trofoblástica

Versão do título para o inglês: Comparative analysis of the immunoregulatory mechanism generated by indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) and interferon-gamma (IFN- γ) in maternal-placental interface between mothers who received kidney transplants and healthy mothers.

1. Placenta 2. Gestação 3. Tolerância 4. IDO 5. IFN- γ 6. Imunossupressão
I. Bevlacqua, Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Biologia celular e tecidual III. Título.

ICB/SBIB0118/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karen Matias do Prado.

Título da Dissertação: Análise comparativa do mecanismo imunorregulador gerado pela indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e interferon-gama (IFN- γ) na interface materno placentária entre mães que receberam transplante renal e mães saudáveis.

Orientador(a): Profa. Dra. 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:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 27 de julho de 2010.

PARECER 943/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 26.05.2010 **APROVOU** o projeto intitulado: "*Análise comparativa do mecanismo imunorregulador gerado pela indoleamina 2,3 dioxigenase (ido) e interferon-gama (INF-g) na interface materno-placentária entre mães que receberam transplante renal e mães saudáveis*" sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. **Estela Bevilacqua** e a aluna **Karen Matias do Prado**.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **26.05.2011**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M. A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho

À DEUS

À minha família, meu porto seguro

Minha mãe Sheeley e meu pai Agnaldo pelo apoio e confiança

À minha irmã Jessyka, pela sua alegria e vontade de vencer que me contagia

Ao meu irmão recém chegado João Pedro, seu sorriso me fortalece

**Ao meu noivo Hudson, pelas horas de confiança e conselhos ímpares,
que me levaram a onde estou**

**A toda minha família que compreendeu minha ausência no almoço aos
domingos, sem nunca deixar me apoiar**

Tive tudo o que precisei para realizar este sonho graças a vocês: AMOR

OBRIGADA!!!

À Profa. Dra Estela Bevilacqua

Que me recebeu em seu laboratório de braços abertos e me ensinou o que é excelência na pesquisa, tornando-se o meu referencial de profissionalismo. Obrigada por acreditar que eu iria conseguir, apesar de todas as pedras que encontramos pela frente e que dificultavam o caminho. As decisões às vezes são difíceis, mas além de tudo isso a Sra. soube como ninguém a hora certa de dar força e encorajar, orientar o caminho.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais, minha irmã e irmão por estarem sempre comigo nos momentos em que mais precisei de um apoio, ou simplesmente desabafar. Foram vocês que me fizeram o que sou;

Ao Hudson, meu eterno amor. Com você ao meu lado aprendo a cada dia como ser uma pessoa melhor. Obrigada por compreender os desafios que pelos quais passei, por me apoiar e ficar ao meu lado durante vários finais de semana, quando eu precisei trabalhar. Pelos inúmeros momentos de felicidade e tudo mais;

À Dra. Simone, que me co-orientou neste trabalho, com a maior paciência do mundo. Muito obrigada por sempre me ajudar e fazer entender “o porquê” das coisas. Não foram somente os experimentos, seminários e reuniões, das quais participamos que possibilitaram a realização deste trabalho, mas a amizade que surgiu nesse meio tempo;

À Rose Farias, muito além de técnica de laboratório (minha “mãe da USP”). Sua inquestionável compreensão das coisas, os ensinamentos aplicáveis dentro e fora do ambiente de trabalho, sua alegria e amizade foram igualmente indispensáveis para o sucesso deste trabalho e também desta aluna. Não imagino como seria minha vida sem que você tivesse aparecido. Obrigada pelas orações e pelas palavras que me marcaram para sempre;

Às colegas de laboratório Fernanda e Carla por estarem sempre dispostas a ajudar de todas as formas possíveis. Obrigada por estarem comigo até os últimos momentos. Carla, pelos experimentos em cima da hora e Fernanda pela ajuda que você me deu na finalização da tese...Obrigada pelos bons momentos que tivemos, todas as risadas, as besteiras, as conversas, enfim;

À colega Karoll que já passou pelo laboratório. Foi e está sendo muito difícil de me acostumar com sua ausência, afinal nós temos uma ligação muito forte. Dividimos muitos momentos tristes e muitos mais momentos divertidos como a nossa aventura pelo deserto do Atacama!!! Até hoje não sei como você me convenceu a ir até lá, mas não me arrependo de forma alguma, foi uma experiência fantástica. A amizade fica embora a convivência tenha diminuído um pouco. Você é muito especial;

Aos colegas que já passaram pelo laboratório: Mariane e Camila que também foram “arrastadas” para o Atacama pela Karoll...foi muito divertido tê-las como colegas nessa viagem!!!

Aos colegas de laboratório: Miriam, Rodrigo, Adriana, Sara, Alexandre e Aline Lorenzon pelo companheirismo, pelas ótimas sugestões que colaboraram para a melhoria deste trabalho. Vocês são partes igualmente importantes para realização deste presente trabalho;

Aos estagiários que me ajudaram nos momentos finais: Alex, Ariadne, Paola e especialmente à Aline Paixão que foi a pessoa que me salvou quando eu precisei de

vários cortes, reações e muito mais. Eu sei que vai sair bem caro! Você tem um futuro brilhante;

A todos os colegas e amigos do departamento, especialmente Maraísa e Ana Paula, companheiras do PAE;

Ao Professor Sérgio Ferreira por disponibilizar seu tempo e atenção sempre que precisei. Por abrir as portas de seu laboratório e contribuir com a melhoria da minha imunohistoquímica e também das fotos;

À Professora Ana Campa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP) e suas alunas Melissa e Sabrina, pelos experimentos de atividade enzimática e uso do HPLC;

Ao Professor Cristóforo do Departamento de Farmacologia do ICB e a Larissa pela realização dos experimentos de atividade de NF-κB;

Ao Professor Niels do Departamento de Imunologia do ICB pela ajuda e interpretação dos resultados;

Ao Dr Leandro, pelas coletas de placenta das minhas queridas gestantes transplantadas;

À Dra. Silvana, pela contínua contribuição durante a execução do meu projeto de mestrado;

À secretária do departamento Celiana, pelo suporte e orientação nos momentos mais confusos da entrega de muitos documentos;

Aos funcionários da biblioteca, principalmente à Eva e a Tereza, por me ajudarem neste momento decisivo;

A CAPES, pelo apoio financeiro ao projeto;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente.

Às gestantes que concordaram e colaboraram para a realização deste sonho, que sem dúvida contribuirá para o sucesso gestacional de outras mulheres.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.
(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

PRADO, K. M. **Análise comparativa do mecanismo imunorregulador gerado pela indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e interferon-gama (IFN- γ) na interface materno-placentária entre mães que receberam transplante renal e mães saudáveis.** 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Muitos mecanismos protegem o feto contra a resposta imunológica materna. Dentre eles, especial atenção foi atribuída neste estudo ao catabolismo do triptofano pela enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) em gestantes que receberam transplante renal e que fazem uso de imunossupressores. No contexto da tolerância gestacional, ganha destaque a possibilidade de que a imunossupressão induzida em gestantes receptoras de transplante renal comprometa a expressão e ativação de IDO alterando o perfil de tolerância gestacional e contribuindo para intercorrências gestacionais. Neste estudo examinou-se a expressão da IDO e sua atividade nos diferentes compartimentos placentários de gestantes saudáveis e portadoras de transplante renal submetidas a terapia imunossupressora de manutenção. Células produtoras de IDO e IFN- γ foram imunolocalizadas na região vilosa e região decidual em ambos os grupos analisados. Entretanto, houve mudança no tipo celular envolvido com esta expressão, nas gestantes transplantadas. Nos vilos a reatividade a IDO deixou de ser observada no sinciotrofoblasto, região de interface com o sangue materno, mas se manteve nos demais componentes vilosos a onde a IDO tem sido associada a mecanismos antimicrobianos e ao controle do fluxo sanguíneo local. Na região decidual, a reatividade à IDO presente em algumas células estromais e em endotélio foi substituída nas gestantes transplantadas por uma marcação predominante nas células do citotrofoblasto extraviloso. Quantitativamente os níveis de IDO e sua atividade, assim como de seus possíveis fatores de regulação NF- κ B, IFN- γ e IL-10 estavam diminuídos na região vilosa. No compartimento decidual ao contrário a atividade enzimática da IDO estava aumentada nas gestantes transplantadas, mas não os de NF- κ B, IFN- γ e IL10. Em face dos resultados obtidos neste estudo, parece plausível especular que o eixo de imunorregulação gerado por IDO - IFN- γ /IL-10 na interface materno-fetal de gestantes portadoras de transplante renal responde diferencialmente a insultos ocasionados pela utilização de imunossupressores durante a gestação. O aumento nos níveis e atividade da IDO na região decidual pode indicar uma tentativa de compensação frente aos baixos níveis expressos na região vilosa ou ainda um mecanismo independente de resposta frente a imunossupressão materna que preserva a tolerância imunológica na interface materno-fetal, mesmo em condições adversas como as que enfrentam as gestantes transplantadas e imunossuprimidas.

Palavras-chave: Placenta. IDO. Drogas imunossupressoras. Quinurenina, IFN- γ . IL10. NF- κ B

ABSTRACT

PRADO, K. M. Comparative analysis of the immunoregulatory mechanism generated by indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) and interferon-gamma (IFN- γ) in maternal-placental interface between mothers who received kidney transplants and healthy mothers. 2012. 88 f. Dissertation (master thesis in Sciences in Tissue and Cell Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Many mechanisms protect the fetus against maternal immune response. Among them, special attention was given in this study to the catabolism of tryptophan by the enzyme indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) in patients who received kidney transplants and who make use of immunosuppressive drugs. In the context of pregnancy tolerance, points out the possibility that the immunosuppression induced in pregnant renal transplant recipients compromise the activation of IDO expression and altering the profile of tolerance and gestational contributing to pregnancy complications. In this study we examined the expression of IDO and its activity in different placental compartments of healthy pregnant women and women with renal transplantation undergoing immunosuppressive therapy. IDO and IFN- γ producing cells were immunolocalized in villous and decidual region in both groups. However, there was changes in cell type involved in this expression in the transplanted pregnant women. Reactivity to IDO is no longer observed in the villi in the syncytiotrophoblast interface region with maternal blood, but remained in other villous components to where the IDO has been associated with antimicrobial mechanisms and control of local blood flow. In the decidual region, the reactivity to IDO was present in some stromal cells and endothelium, but was replaced in the transplanted pregnant by marking predominantly in extravillous cytotrophoblast cells. Quantitatively, the levels of IDO and its activity, as well as their possible regulatory factors NF- κ B, IFN- γ and IL-10 were decreased in the villous region. Decidual compartment unlike the enzymatic activity of IDO was increased in pregnant patients transplanted, but not NF- κ B, IFN- γ and IL10. From the results obtained in this study, it seems plausible to speculate that the axis of immunoregulation generated by IDO - IFN- γ / IL-10 in maternal-fetal interface of pregnant women with renal transplantation responds differently to insults caused by the use of immunosuppressive drugs during pregnancy. Increased levels and activity of IDO in decidual region may indicate an attempt to offset the low levels expressed in the villous region or an independent mechanism of response in the face of immunosuppression that preserves the maternal immune tolerance at the maternal-fetal interface, even in adverse as those faced by pregnant transplanted and immunosuppressed.

Keywords: Placenta. IDO. Immunosuppressive drugs. Kynurenine. IFN- γ . IL10. NF- κ B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das características estruturais da placenta humana a termo.....	20
Figura 2 – População de células trofoblásticas presentes na placenta humana.	22
Figura 3 – Imunolocalização de IDO na região decidual de placentas de gestantes saudáveis transplantadas.....	48
Figura 4 - Imunolocalização de IDO na região vilosa de placentas de gestantes saudáveis e transplantadas.....	50
Figura 5 - Quantificação da intensidade de imunomarcção para IDO.....	51
Figura 6 - Atividade da IDO.....	52
Figura 7 - Imunolocalização de IFN- γ na região decidual da placenta.....	53
Figura 8 - Imunolocalização de IFN- γ na região vilosa da placenta.....	54
Figura 9 - Estimativa quantitativa da intensidade de imunoreatividade para IFN- γ	55
Figura 10 - Níveis placentários de IFN- γ em gestantes saudáveis e transplantadas	56
Figura 11 - Níveis placentários de IL-10 em gestantes saudáveis e transplantadas.....	57
Figura 12 - Atividade nuclear de NF-kB da interface materno-fetal de gestantes saudáveis e portadoras de transplante renal.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados clínicos geral das gestantes saudáveis e receptoras de transplante renal.....	45
Tabela 2 – Tratamento imunossupressor das gestantes receptoras de transplante renal.....	46
Tabela 3 - Valores referentes à correlação das dosagens dos medicamentos das gestantes portadoras de transplante renal.....	47

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

5-HT – Serotonina

APCs – (*Antigen presenting cells*) Células apresentadoras de antígeno

BSA – (*Bovine serum albumin*) Albumina de soro bovino

CT – Citotrofoblasto

CTEV – Citotrofoblasto extraviloso

CTLA-4 – (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) Linfócito T citotóxico associado ao antígeno 4

DCs – (*Dendritic cells*) Células dendríticas

DTT – Dithiothreitol

EDTA – (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) Ácido etilenodiaminotetracético

Fas-L – Proteína Fas ligante

HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HLA-G – Antígeno leucocitário humano G

HPLC – (High-performance liquid chromatography) Cromatografia de alta eficiência

IDO – Indoleamina 2,3 dioxogenase

IFN- γ – Interferon gama

IL-1 – Interleucina 1

IL-10 – Interleucina 10

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

JAK-STAT1 - (*Janus kinase and signal transducer and activator of transcription*)

Quinase janus e sinais transdutores e ativadores de transcrição 1

KCl – Cloreto de potássio

kDa – kilodaltons

KH₂PO₄ - Hidrogenofosfato de Potássio

KIR – (*Killer-cell immunoglobulin-like receptors*) Receptores com domínios semelhantes às imunoglobulinas da célula matadora

Kyn – Quinurenina

LPS – Lipopolisacarídeo

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

Na₃VO₄ – Ortovanadato de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

NAD⁺ - Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo

Na-desoxicolato - desoxicolato de sódio

NaF – Fluoreto de sódio

NFK – N-formil quinurenina

NF-κB – Fator de transcrição nuclear kappa B

NK – Células *Natural Killer*

PBS – (*Phosphate buffer saline*) Tampão fosfato

PMSF – (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*) Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

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

SC – Sinciotrofoblasto

TBE – Tampão Tris/Ácido bórico/EDTA)

TBS – (*Tris phosphate buffer saline*) Tampão Tris-salina (hidroximetil aminometano)

TDO – Triptofano 2,3 dioxigenase

TGF-β – Fator transformador do crescimento beta

Th1 –T helper 1

Th2 –T helper 2

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Treg – Linfócitos T reguladores CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

Trp – Triptofano

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

uNK – Célula *Natural Killer* uterina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 A interface materno-placentária.....	18
1.2 Tolerância Gestacional	22
1.3 Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO)	25
1.3.1 <i>Atividades funcionais da IDO</i>	<i>27</i>
1.3.2 <i>Localização da IDO placentária.....</i>	<i>28</i>
1.4 Transplante renal e gestação	28
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo geral	33
2.1.1 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>33</i>
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Reagentes, equipamentos e procedências.....	35
3.2 Pacientes.....	36
3.3 Critérios de inclusão	36
3.3.1 <i>Protocolo de imunossupressão</i>	<i>36</i>
3.4 Coleta das amostras de placenta humana	37
3.5 Imunolocalização de IDO e IFN-γ e caracterização das células da interface materno-fetal.....	37
3.5.1 <i>Localização imunohistoquímica de citoqueratina-7 e vimentina.....</i>	<i>38</i>
3.5.2 <i>Imunolocalização de IDO e IFN-γ.....</i>	<i>38</i>
3.6 Avaliação da atividade da enzima IDO	39
3.6.1. <i>Homogenato do tecido e ensaio proteico</i>	<i>39</i>
3.6.2 <i>Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....</i>	<i>40</i>
3.7 Dosagens de IFN-γ e IL10.....	40
3.8 Atividade nuclear de NF-kB.....	41
3.8.1 <i>Extração de proteína nuclear</i>	<i>41</i>
3.8.2 <i>Marcação da Sonda</i>	<i>42</i>
3.8.3 <i>Reação de ligação e corrida do gel</i>	<i>42</i>
3.9 Análise estatística	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Dados clínicos das pacientes	45
4.2 A interface materno-fetal	47
4.3 Expressão de IDO na interface materno fetal	47

4.4 Atividade da IDO na interface materno-fetal	51
4.5 Imunolocalização de IFN-γ na interface materno-fetal	52
4.6 Níveis placentários de IFN-γ	55
4.7 Níveis placentários de IL-10	56
4.8 Atividade nuclear de NF-kB	57
5 DISCUSSÃO	59
5.1 A expressão e atividade da IDO na placenta de gestantes receptoras de transplantes renais e sob terapia imunossupressora	62
5.2 A produção de IFN-γ na interface materno-fetal como fator de indução da IDO decidual	65
5.3 O perfil de IL-10 placentário não sofre alterações na interface materno fetal	67
5.4 A atividade de NF-kB	67
5.5 Considerações finais	69
6. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO I – Características individuais das gestantes transplantadas.	88

1.1 A interface materno-placentária

A formação da interface materno-fetal se inicia precocemente durante a gestação com o processo de implantação embrionária. A implantação embrionária que em primatas e roedores leva à completa intrusão do embrião na parede endometrial inclui fases específicas tais como: aposição e adesão do blastocisto à superfície do endométrio seguida por uma fase de invasão regulada e modulada por diferentes e múltiplos processos. Graças a este processo invasivo o embrião ultrapassa a barreira epitelial uterina e atinge o interstício do estroma endometrial e seus vasos sanguíneos. As células embrionárias que participam ativamente deste processo são as células trofoblásticas que revestem o blastocisto e que, ao aderirem ao epitélio uterino, diferenciam-se em citotrofoblasto e sinciciotrofoblasto. O citotrofoblasto, forma uma camada de células individualizadas com alta capacidade proliferativa que dá origem ao sinciciotrofoblasto, cuja formação ocorre por fusão das células oriundas do citotrofoblasto (BENIRSCHKE et al., 2006).

O sinciciotrofoblasto é responsável pela invasão inicial do embrião no endométrio e abertura dos capilares subepiteliais uterinos, estabelecendo uma precoce, mas eficiente, superfície de trocas materno-fetais, que pode ser observada a partir do 7º dia pós-fecundação (CHARNOCK-JONES et al., 2004; PARIA et al., 2001).

Na medida em que a gestação progride, o sinciciotrofoblasto sempre mantendo sua posição em contato com o sangue materno é invadido internamente pelo citotrofoblasto e mais tardiamente pelo mesoderma extra embrionário dando origem às vilosidades coriônicas (BOYD; HAMILTON, 1970). O desenvolvimento das vilosidades coriônicas inclui a vascularização do mesoderma a partir de angiogênese induzida pelo endoderma alantoideano na região de formação do cordão umbilical. O sinciciotrofoblasto constitui o principal componente da barreira placentária através da qual ocorrem as trocas moleculares entre mãe e feto (BOYD ; HAMILTON, 1970). A renovação desta camada ocorre pela incorporação de novas células provenientes do citotrofoblasto e pela exclusão de aglomerados de núcleos em processo de morte celular por apoptose, conhecidos como nós sinciciais, na circulação materna. Na medida em que a gestação evolui, diminui a incorporação de células citotrofoblásticas ao sinciciotrofoblasto e aumenta a formação de nós sinciciais

(HUPPERTZ, 2008). À termo, a população de células do citotrofoblasto viloso é praticamente inexistente (GUIBOURDENCHE et al., 2009; VON RANGO, 2008).

Em humanos, a placenta é do tipo hemocorial, o que se traduz no estabelecimento de uma superfície de trocas e interações diretas entre o sangue materno e as células de revestimento embrionário, o trofoblasto (BOYD; HAMILTON, 1970; CHARNOCK-JONES et al., 2004).

Durante a formação das vilosidades coriônicas, o citotrofoblasto prolifera, forma colunas celulares maciças que invadem o sinciotrofoblasto até ultrapassam seu limites e alcançam a decídua basal, formando os vilos de ancoragem (Figura 1). Nesta interface inicia-se um processo de invasão decidual e de artérias espiraladas por parte deste citotrofoblasto extraviloso. Em conjunto estas células formam a população de células citotrofoblásticas extravilosas endovasculares e intersticiais (HUPPERTZ, 2008). As células extravilosas endovasculares constituem uma população de extrema relevância funcional e clínica na medida em que passam a substituir as células musculares e endoteliais destes vasos, transformando-os em vasos de baixa resistência (PARIA et al., 2001), essenciais para a fisiologia gestacional. As células extravilosas intersticiais perdem contato com o vilo de ancoragem, invadem ativamente a decídua basal e interagem com diferentes populações de células maternas, entre as quais as células imunológicas (WICHEREK et al., 2009).

Figura 1 – Células trofoblásticas presentes na placenta humana.

Células trofoblásticas presentes na placenta humana. CT, citotrofoblasto; CETV, citotrofoblasto extraviloso.

Fonte: Adaptado de Guibourdenche et al., 2009

Células deciduais são oriundas da diferenciação de fibroblastos endometriais, são células volumosas e poligonais, com núcleos de cromatina frouxa e grande atividade sintética (DUNN et al., 2003). Estas células acumulam glicogênio, produzem prolactina e fatores de regulação e participam da imunoregulação gestacional. Entre estas células está presente um grande número de células do sistema imunológico tais como macrófagos, células natural killer uterinas (uNK) e células T regulatórias (Treg). Evidências experimentais mostram que 70% dos leucócitos da decídua são uNK, 20 a 25% são macrófagos, 1,7% são células dendríticas uterinas (uDC) e 3 a 10% são linfócitos T; não há evidências da presença de linfócitos B (WICHEREK et al., 2009).

Com a evolução da gestação e o estabelecimento da placenta a interface materno-fetal assume novas formas de interação; caracteriza-se pela presença de uma zona juncional, na qual células trofoblásticas extravilosas e os componentes da decídua basal interagem intimamente e pela maturação da região vilosa formada pelo sinciciotrofoblasto banhado pelo sangue materno. As células trofoblásticas de

origem fetal expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) também de origem paterna, representando um alvo em potencial para as células do sistema imunológico materno presentes na decídua (VON RANGO, 2007). A interface materno-fetal, entretanto, é um ambiente imunologicamente privilegiado, imunorregulado e capaz de ativar mecanismos de tolerância protegendo o embrião alogênico implantado de uma resposta imunológica materna (GULERIA; SAYEGH, 2007; PICCINNI, 2002).

A placenta humana a termo (Figura 2) é discoide com um diâmetro de 15 a 25 cm; tem aproximadamente 3 cm de espessura e pesa cerca de 500 a 600 g (SADLER, 2004). Macroscopicamente são distinguíveis duas regiões: a superfície materna com 15 a 20 áreas ligeiramente salientes (os cotilédones), recoberta por uma fina camada de decídua basal. O sulco entre os cotilédones são formados por septos deciduais. Na superfície fetal, a placenta é recoberta pela placa coriônica, apresentando também grandes artérias e veias (vasos coriônicos) que convergem a partir ou em direção ao cordão umbilical, respectivamente. O cório, por sua vez, é recoberto pelo âmnio. A fixação do cordão umbilical é geralmente excêntrica e ocasionalmente até mesmo marginal. Entre as placas coriônica e decidual, encontram-se os espaços intervilosos, onde corre o sangue materno extravasado a partir da invasão de vasos endometriais pelo sinciciotrofoblasto e pelo citotrofoblasto endovascular (HUPPERTZ, 2008).

Dentre as funções placentárias destaca-se a ancoragem do conceito, transporte de nutrientes, metabólitos e gases entre a mãe e o conceito, proteção, produção de hormônios e sinalização materno fetal, entre outras.

Figura 2 – Características estruturais da placenta humana.

Representação das características estruturais da placenta humana a termo.

Fonte: Adaptado de Kierszenbaum, A. L., Histologia e Biologia Celular 2004

1.2 Tolerância Gestacional

Durante o processo de desenvolvimento placentário, o íntimo contato entre citotrofoblasto extraviloso e as células deciduais e entre o sinciotrofoblasto e o sangue materno caracterizam uma associação entre células de organismos genética e antigenicamente diferentes. Em uma gestação saudável, entretanto, o feto – mesmo expressando antígenos paternos – não é rejeitado pelo sistema imune

materno, o que faz com que a gestação seja considerada um processo natural de tolerância imunológica (VON RANGO, 2007).

A ideia de tolerância materno-fetal foi primeiramente reconhecida e discutida em profundidade por Peter Medawar em meados de 1953. Medawar propôs três explicações para a tolerância imunológica materna: a separação física entre os tecidos fetais e maternos, imaturidade antigênica do tecido fetal e um sistema imunológico materno inerte (MEDAWAR, 1953). Estudos posteriores, no entanto, demonstraram que o sistema imunológico materno é ativo e é capaz de reconhecer antígenos paternos presentes nas células da placenta. Ao contrário do esperado, este reconhecimento não ativa mecanismos de rejeição, mas mecanismos de tolerância sistêmica ou local na interface materno-fetal (THELLIN; HEINEN, 2003).

Três décadas após, em 1984, Wegmann propôs um modelo de regulação imunológica para implantação embrionária, que preconizava a prevalência de produção de moléculas reguladoras por linfócitos Th (*helper*)-2 para garantir o sucesso gestacional e, a exacerbação de respostas do tipo Th1 exercendo efeito contrário e consequentemente deletério à gestação.

Ressalte-se que citocinas do tipo Th1 tais como o interferon-gama (IFN- γ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-(IL)2 possuem um perfil pró-inflamatório, sendo detectadas somente nos períodos iniciais da implantação (LIN et al., 1993) e nas fases que antecedem o parto, enquanto que citocinas do tipo Th2 como IL-4, IL-5 e IL-10 se caracterizam por apresentar um perfil anti-inflamatório sendo detectáveis por todo o período gestacional (VON RANGO, 2007).

O paradigma Th1/Th2 como é designado a proposta de Weigmann, no entanto, não consegue explicar a incidência abortos espontâneos e recorrentes em pacientes que desenvolvem um perfil Th2 dominante durante a gestação (CHAOUAT et al., 2003).

Atualmente acredita-se que o sucesso gestacional dependa de um equilíbrio entre os diferentes tipos de citocinas produzidas pelas células decíduais e trofoblásticas, capaz de manter a homeostase imunológica (NARUSE et al., 2010). Se esse delicado balanço é afetado e não é compensado por mecanismos imunorreguladores, este desequilíbrio pode resultar em perdas gestacionais (BATES et al., 2002; DENNEY et al., 2011; SAINI et al., 2011).

Um amplo espectro de mecanismos de tolerância tem sido descritos tanto por parte fetal (trofoblasto) quanto materna (decídua) para explicar o sucesso imunológico gestacional.

Guller e LaChapelle (1999) demonstraram que a expressão de Fas-L por células trofoblásticas extravilosas, presentes na região decidual, promove a apoptose de linfócitos T ativados na interface materno-fetal, e que este fato contribui para um privilégio imunológico placentário. Em modelo animal, o cruzamento de camundongos homozigotos que não expressam Fas-L funcional devido a uma mutação (camundongos *gld*) provoca um infiltrado leucocitário intenso na interface materno-fetal culminando em morte celular na região de interface entre componente materno (decídua) e fetal (vilosidades) e restrição de crescimento fetal (HUNT et al., 1997; VACCHIO; HODES, 2005).

A expressão de HLA-G (*human leukocyte antigen*, molécula de classe IB não polimórfica) pelas células trofoblásticas extravilosas permite a interação com os receptores inibitórios (KIR) de um tipo especial de célula NK, a NK uterina (uNK), modulando a atividade citotóxica desta população celular e a produção de citocinas e fatores de crescimento adequados à gestação (GONEN-GROSS et al., 2010; LASH et al., 2011).

Outro mecanismo associado à tolerância imunológica na interface materno-fetal é o aumento em número da população de linfócitos T reguladores $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Treg). Estes linfócitos constituem um subtipo especializado de células T envolvidas na prevenção da autoimunidade e tolerância imunológica (SAKAGUCHI, 2004). Diversos estudos têm demonstrado que as células Treg desempenham um papel de extrema relevância na sobrevivência de um enxerto alogênico, indicando uma ação supressora da resposta imunológica mediada por células T (BATTAGLIA, 2010; BENGHIAT et al., 2005; HAANSTRA et al., 2007; KOENEN; VELÁSQUEZ et al., 2007; JOOSTEN, 2006; XIA et al., 2009). A função supressora das células Treg ocorre através de contato célula-célula ou através da secreção de citocinas imunossupressoras tais como IL-10 e TGF- β . Células Treg circulantes aumentam em número no início da gestação atingindo concentrações máximas durante o segundo trimestre, o que coincide com a maior atividade invasiva do trofoblasto na decídua materna. A concentração destas células declina após o parto coincidindo com a retirada do estímulo imunológico do enxerto semi-alógeno (HEIKKINEN et al., 2004; SOMERSET et al., 2004). A tolerância aos aloantígenos

fetais parece ainda, ser mantida após o nascimento através da presença de células Treg de longa duração (MOLD et al., 2008). Em comparação com o perfil sanguíneo, a porcentagem dessas células é maior na decídua. A ocorrência de abortos espontâneos tem sido correlacionada à redução na porcentagem destas células (VON RANGO, 2007).

A expressão da enzima indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) responsável pelo catabolismo inicial do aminoácido triptofano tem sido associada ao papel regulador das células Tregs na interface materno-fetal (MELLOR; MUNN, 2001). Evidências experimentais mostraram que a inibição da IDO leva ao aborto de conceptos alogênicos, mas não de singênicos, em camundongos (MUNN et al., 1998). Estes achados sugerem fortemente que a atividade da IDO no catabolismo do triptofano é um mecanismo chave envolvido na tolerância materno-fetal.

1.3 Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO)

O triptofano pode ser metabolizado através de duas vias principais: a serotoninérgica e a das quinureninas. A via serotoninérgica sintetiza a serotonina (5-HT) que atua como neurotransmissor e está associada ao controle do sistema gastrointestinal e dos transtornos comportamentais (CHRISTMAS et al., 2010; DENERIS; WYLER, 2012; JUDY et al., 2012). A via das quinureninas converte o triptofano em NAD⁺ (*nicotinamide adenine dinucleotide*) e forma N-formilquinurenina (ALLEGRI et al., 2003), através das enzimas triptofano 2,3 dioxigenase (TDO), indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) e indoleamina 2,3 dioxigenase 2 (IDO-2). A N-formilquinurenina é adicionalmente metabolizada em uma cascata de reações originando diferentes metabólitos com propriedades neuroativas e imunológicas (GROHMANN et al., 2003; RAFICE et al., 2009; SCHWARCZ; PELLICCIARI, 2002; TERNESS et al., 2002).

A enzima IDO é uma hemeproteína monomérica de aproximadamente 45 kDa codificada a partir de gene localizado no cromossomo 8 em humanos (BURKIN et al., 1993). Sua estrutura cristalográfica foi recentemente mostrada por Sugimoto e colaboradores (2006) que identificaram dois domínios distintos: um maior, helicoidal e apresentando 13 α -hélices e duas 3_{10} hélices, e um menor composto de 6 α -hélices, duas folhas β curtas e três 3_{10} hélices. A IDO cataliza a clivagem oxidativa do anel pirrólico do núcleo indólico do aminoácido essencial triptofano, através da

inserção de dois átomos de oxigênio neste aminoácido (YOSHIDA; HAYASHI, 1987).

A indução da expressão de IDO ocorre através da ligação das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 também conhecidas como B7-1 e B7-2 respectivamente, (PETROFF et al., 2003) presentes nas células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos) com a molécula CTLA-4, presente em linfócitos Tregs. A produção de IDO pelas células apresentadoras de antígenos promove a degradação do triptofano, o que interrompe o ciclo celular na fase G1 comprometendo a proliferação celular e suprimindo desta forma a ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos T efetores (GROHMANN et al., 2002; MUNN et al., 1999).

São indutores da transcrição da IDO citocinas inflamatórias como o IFN- γ , IL-1 e TNF- α , através da via de sinalização mediada pelo receptor do tipo *Janus kinase* (JAK) e do sinal transdutor e ativador de transcrição STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Lipopolisacarídeo (LPS) e também tem se mostrado um potente indutor da expressão de IDO *in vitro* (BABCOCK; CARLING, 2000; ROBINSON et al., 2003).

A indução da expressão de IDO também pode ocorrer através da ativação da via não canônica do fator de transcrição nuclear kB (NF-kB), devido à presença de um domínio putativo de ligação para os dímeros p52-Rel-B na região promotora *INDO* (GHROMANN et al., 2007; ROBINSON et al., 2006).

Uma função sinalizadora para a IDO em resposta ao TGF- β também tem sido sugerida, através da qual esta enzima induziria um perfil tolerogênico em células dendríticas plasmocitóides; o exato mecanismo envolvido nesta sinalização entretanto não foi ainda elucidado (PALLOTA et al., 2011).

A IDO é expressa no trato gastro intestinal, sistema reprodutor masculino, feminino e urinário, além das células do sistema imunológico (dendríticas, macrófagos e polimorfonucleares). Sua significância biológica, no contexto gestacional, começou a ser explorada em maior profundidade no final da década de 90 com os trabalhos pioneiros de Munn e colaboradores (1998).

1.3.1 Atividades funcionais da IDO

A IDO é considerada parte da imunidade inata como mecanismo de defesa contra infecções causadas por microorganismos que dependem de triptofano exógeno como, por exemplo, a infecção por *Chlamydia pneumoniae*, *Toxoplasma gondii* e outras bactérias pertencentes ao grupo de estreptococos e micobactéria (GUPTA et al., 1994; HAYASHI et al., 2001; MACKENZIE et al., 1998; PFEFFERKORN, 1984). De forma similar, durante uma infecção viral, a IDO inibe a replicação de citomegalovírus e melhora o prognóstico de miocardite viral aguda (BODAGHI et al., 1999; HOSHI et al., 2012; LOPEZ et al., 2011; YEUNG et al., 2012).

Achados recentes também sugerem que a indução de IDO diminui os níveis séricos de triptofano ao mesmo tempo em que aumenta os níveis dos metabólitos gerados, controlando desta forma processos inflamatórios associados a alergias (VON BUBNOFF; BIEBER, 2012).

Além disto, a presença e ativação da IDO em alguns tipos tumorais têm sido cogitadas como um dos mecanismos através da qual as células tumorais podem escapar do sistema imunológico (MULLER et al., 2005).

A identificação da IDO em placentas com função protetora contra a rejeição do conceito alogênico foi o primeiro trabalho demonstrando a ação imunomodulatória desta enzima, que é expressa durante parte do ciclo menstrual e praticamente durante todo período gestacional (MUNN et al., 1998; VON RANGO et al., 2007). Células epiteliais glandulares e células do estroma endometrial expressam IDO no início na fase progestacional do ciclo menstrual, momento em que a implantação é esperada (VON RANGO et al., 2007). Adicionalmente, durante o processo de decidualização, há um aumento na expressão de IDO, em resposta ao estímulo de IFN- γ secretado pelos leucócitos uterinos (KUDO et al., 2004b). A presença de IDO em blastocistos humanos de 6 dias de gestação e em células trofoblásticas vilosas e extravilosas evidenciam uma ação cooperativa por ambos os organismos materno e fetal em favor de um ambiente tolerogênico (HÖNIG et al., 2004; KUDO et al., 2004a).

Blaschitz e colaboradores (2011) relataram recentemente a existência de um gradiente endovascular da expressão IDO, que aumenta conforme a zona de

contato com o feto semi-alogênico. Segundo os autores, essa expressão pode contribuir para a proteção fetal contra infecções, impedindo o extravasamento de patógenos da circulação sanguínea através da degradação local de triptofano na região adjacente ao embrião. Wang e colaboradores (2010) também mostraram um possível papel não-imunológico para a expressão IDO por parte de células endoteliais, onde os metabólitos originados a partir da atividade da IDO contribuiriam para o relaxamento da parede dos vasos arteriais e desta forma, para o controle da pressão sanguínea, através da ativação das vias adenilato e guanilato ciclase solúvel.

1.3.2 Localização da IDO placentária

Em placentas de primeiro trimestre gestacional a IDO foi imunolocalizada principalmente no epitélio glandular uterino, enquanto que em gestações a termo, sua expressão nesta região é discreta (provavelmente devido à redução contínua das glândulas ao longo da gestação) (SEDLMAYR et al., 2002).

No primeiro trimestre, a expressão de IDO também tem sido discretamente detectada nas vilosidades coriônicas (células de Hofbauer e do estroma viloso) e em células citotrofoblásticas extravilosas (KUDO et al., 2004a). A partir do segundo trimestre e a termo, entretanto, a expressão de IDO é mais evidente nas células trofoblásticas (SEDLMAYR et al., 2002; VON RANGO et al., 2007).

Nas fases iniciais da gestação, a atividade enzimática da IDO parece estar mais relacionada aos processos de não rejeição fetal. À medida que a gestação evolui, esta enzima também participa do controle das funções placentárias como, por exemplo, regulando o tônus vascular através da ação direta dos metabólitos originados pelo catabolismo do triptofano (KUDO et al., 2004a; SEDLMAYR et al., 2002; WANG et al., 2010).

1.4 Transplante renal e gestação

Mulheres com insuficiência renal crônica apresentam infertilidade relacionada à anovulação crônica e uremia. A taxa de gestação entre essas pacientes gira em torno de 1:200. Após o transplante renal, nota-se importante aumento das possibilidades reprodutivas e a taxa de gestação eleva-se para 1:50. O Departamento de Obstetria

da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), juntamente com o Hospital do Rim e Hipertensão, que representa o centro que realiza o maior número de transplantes no mundo, vem acumulando experiência clínica com o binômio transplante e gestação (OLIVEIRA, 2007).

Em 1963, Murray e colaboradores reportaram a primeira gestação de sucesso em uma mulher que recebeu transplante renal. Nos anos subsequentes, no entanto, muitos estudos enfatizaram o aumento da incidência de hipertensão, pré-eclampsia, parto pré-termo e restrição de crescimento fetal nestas gestantes (DAVISON, 1991; DAVISON; BAILEY, 2003; MCKAY; JOSEPHSON, 2006; MIRANDA et al., 2002).

Embora sejam principalmente as citocinas Th1 que estão envolvidas na rejeição aguda, citocinas do tipo Th2 envolvidas na tolerância imunológica podem também ser deletérias para a sobrevida de enxertos através do recrutamento de eosinófilos (PICCOTTI et al., 1997). Na tentativa de conter essa rede de citocinas que podem levar a rejeição, imunossupressores cada vez mais poderosos vêm sendo utilizados na terapia pós-transplante (ROSTAIG et al., 1999). Entre os principais imunossupressores utilizados encontram-se os inibidores da calcineurina (ciclosporina e tacrolimus) que consistem atualmente na base da terapia imunossupressora em transplantes de órgãos. Sua introdução foi associada com uma dramática diminuição na incidência da rejeição aguda (BRUNET et al., 2003). Estes medicamentos atuam bloqueando a produção de citocinas necessárias para a ativação e proliferação das células T (ARMENTI et al., 2002). Tacrolimus e ciclosporina, geralmente são administrados em combinação com azatioprina e/ou prednisona como adjuvantes.

As doses dos medicamentos desta forma devem ser finamente ajustadas para prevenir a rejeição do órgão transplantado e tratar comorbidades ao mesmo tempo em que permita o sucesso gestacional e a saúde fetal (CARDONICK et al., 2004; JANSSEN; GENTA, 2000). Gestantes transplantadas, entretanto apresentam maior susceptibilidade a infecções (FISHMAN; RUBIN, 1998), maior incidência de alterações no desenvolvimento placentário e fetal (JANSSEN; GENTA, 2000; UMANS, 2007) e riscos aumentados de perdas gestacionais devido à complicações como a hipertensão (CABERO et al., 1988; SOLÁ et al., 1998) e pré-eclâmpsia (GORGULU et al., 2010; PÉRGOLA et al., 2001).

A azatioprina é um antimetabólito que é convertido em 6-mercaptopurina no fígado, inibindo a proliferação clonal dos linfócitos T. Seus efeitos adversos podem

incluir anemia e leucopenia (DE BOER et al., 2006). Prednisona é um esteróide que atua no sistema imunológico induzindo a prevalência da resposta Th2 com características antiinflamatórias e tem sido relatado que seu uso durante a gestação prolonga o tempo estimado para o parto, com riscos de hemorragias (ARMENTI et al., 2002).

A ciclosporina inibe a função da célula T *helper*, afetando somente os linfócitos circulantes sem resultar em uma supressão da medula óssea. Efeitos adversos incluem hipertensão, nefrotoxicidade, tremor, hirsutismo e hiperlipidemia (ARMENTI et al., 2002). O tacrolimus, um antibiótico macrolídeo, possui um mecanismo de ação similar ao da ciclosporina, porém é mais eficiente. Provoca hipertensão, nefrotoxicidade, neurotoxicidade e diabetes na mãe (ARMENTI et al., 2002; ARMENTI et al., 2005). Os efeitos neonatais do tacrolimus incluem hipercalcemia e cardiomiopatia (ARMENTI et al., 2002; ARMENTI et al., 2005; CARDONICK et al., 2004). Este não pode ser administrado em combinação com a ciclosporina devido à nefrotoxicidade sinérgica (MASTROBATTISTA; KATZ, 2004).

A ciclosporina e o tacrolimus têm a mesma capacidade de inibir a enzima calcineurina fosfatase, inibindo de forma dose-dependente a produção de citocinas envolvidas na rejeição do transplante como IL-2, IFN- γ e TNF- α . Em contrapartida, estudos mostram que a ciclosporina é capaz de aumentar a produção de TGF- β , assim como a sinalização de seu receptor. Essa mesma capacidade não é observada no tacrolimus (AYATOLLAHI et al., 2007; ROSTAIG et al., 1999).

Recentemente, evidências sugeriram que a ciclosporina exerce seu efeito imunomodulador não somente em linfócitos T, mas também em células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas (TAJIMA et al., 2003; WASOWSKA et al., 2001). Du e colaboradores em 2007 também levantaram a questão de que a predominância fisiológica Th1/Th2 da gestação não é alterada com a administração de ciclosporina. Estes autores sugeriram que a administração de baixas doses deste fármaco não interferiria no crescimento e invasão de células citotrofoblásticas de primeiro e segundo trimestre e que este efeito é mediado pela diminuição de IL-2 e IFN- γ induzida pela ciclosporina.

Os inibidores da calcineurina, entretanto, são capazes de diminuir a porcentagem de células Treg no sangue periférico (CHU et al., 2010; ZEISER et al., 2006), assim como a ativação daIDO em leucócitos periféricos (BRANDACHER et

al., 2005). Paralelamente, este efeito pode alterar os mecanismos imunorreguladores mediados pela IDO que estabilizam e aumentam o fenótipo supressor (BABAN et al., 2009; SHARMA et al., 2009).

Neste contexto, ganha destaque a possibilidade de que a imunossupressão induzida em gestantes receptoras de transplante renal possa comprometer a expressão e ativação de IDO alterando o perfil de tolerância gestacional e contribuindo para desordens durante a gestação.

Neste espectro de possibilidades, este estudo foi conduzido para examinar a expressão de IDO e sua atividade nos diferentes compartimentos da interface materno-fetal de mulheres gestantes portadoras de transplante renal e submetidas a terapia imunossupressora de manutenção.

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo analisar a produção e atividade de IDO e seu principal indutor, IFN- γ , na interface materno-placentária de gestantes sob terapia imunossupressora após transplante renal.

2.1.1 Objetivos específicos

Este estudo visa especificamente:

- a. Analisar a presença de células produtoras de IDO e IFN- γ na placenta fetal (trofoblasto) e materna (decídua) em gestantes transplantadas e saudáveis.
- b. Quantificar a expressão e atividade de IDO e IFN- γ na placenta fetal (trofoblasto) e materna (decídua) de gestantes transplantadas e saudáveis.
- c. Quantificar a expressão de IL-10 na placenta fetal (trofoblasto) e materna (decídua) de gestantes transplantadas e saudáveis.
- d. Avaliar a atividade nuclear de NF-kB na interface materno-fetal de gestantes saudáveis e transplantadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes, equipamentos e procedências.

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

Adobe Systems Inc. (EUA): Software Adobe Photoshop CS5 versão 12.0. **BD Bioscience** (Franklin Lakes, NJ, EUA): kit de ELISA OptEia™ para IFN- γ e IL-10, placas de 96 poços, tubo falcon, membranas de 0,22 μ m, tetrametilbenzidina (TMB). **Biolegend Inc.** (San Diego, CA, EUA): *Human* TruStain FcX, cat. 42230. **Cell Marque** (Rocklin, CA, EUA): anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti-citoqueratina de baixo peso molecular (LMW) clone AE1, anticorpo monoclonal anti-vimentina clone V9 produzido em camundongo. **Dako** (Carpinteria, CA, USA): Liquid DAB + Substrate Chromogen System e ready-to-use peroxidase-based ADVANCE™ kit compatível com anticorpos primários feitos em camundongo e coelho. **KPL** - Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Washington, DC, EUA): anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com peroxidase produzido em cabra (cat. 074-1506), anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em cabra (cat. 04.18.06), **GLSciences** (Tokyo, Japão): Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High Performance Liquid Chromatography – SHIMADZU) acoplado a um detector FRC-10A coletor de fração e UV-Vis, coluna de fase reversa (Pack Shim C18 Shimadzu), todo o sistema é controlado pelo software Class VP. **Merck KGaA** (Darmstadt, Alemanha): cloreto de sódio, etanol, Histosec®, peróxido de hidrogênio, metanol, entellan, acetonitrila. **MICROM International GmbH** (Alemanha): MicrótoMO HM200 Ergostar. **Bioamerica Inc.** (Miami, EUA): homogeneizador *Precellys*® e kit de homogeneização CK14 *Precellys* 24, esferas de cerâmica de 1,4 mm (03961CK-14). **Sigma Chemical Co.** (St Louis, MO, EUA): ácido etilenodiamonotetraacético (EDTA), albumina sérica bovina (BSA), glicerol, kit revelador *SIGMAFAST*™ 3,3'-Diaminobenzidine, paraformaldeído, Poli-L lisina, tampão fosfato salina (PBS), tampão tris (TBS), inibidor de protease (# P8340) anticorpo primário policlonal anti-IDO humano feito em coelho (cat. HPA-023072), IFN- γ humano (cat. I9284), ácido ascórbico, ácido tricloroacético, azul de metileno, catalase, quinurenina, triptofano. **Synth** (Diadema, SP, Brasil): Xilol, etanol. **Thermo Scientific / Nunc Brand Products** (Rockford, IL, EUA): Pierce® Protein Assay Kit

BCA, microplacas para ELISA 96 poços. **Zeiss** (Mannheim, Alemanha): microscópio Axioshop 2, sistema de captura Axio Vision 4.7.

3.2 Pacientes

Gestantes imunossuprimidas foram selecionadas a partir de mulheres que receberam transplantes de rim e foram acompanhadas no Setor de Hipertensão Arterial e Nefropatias do Departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Escola Paulista de Medicina. O grupo de gestantes saudáveis foi selecionado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) a partir de mulheres que passaram por cesárea eletiva. Todos os procedimentos experimentais foram submetidos à apreciação das Comissões de Ética das Instituições envolvidas ICB-USP, HU-USP e UNIFESP-EPM (em anexo).

3.3 Critérios de inclusão

O grupo de gestantes imunossuprimidas constou de mulheres com idade entre 18 e 35 anos, portadoras de transplante renal, com reações sorológicas negativas para HIV e sífilis, sem infecções clinicamente diagnosticadas. O acompanhamento pré-natal foi integralmente realizado no Setor de Hipertensão Arterial e Nefropatias do Departamento de Obstetrícia da UNIFESP-EPM. O protocolo de imunossupressão utilizado pelas gestantes incluiu o uso de um inibidor de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus), azatioprina e prednisona.

Gestantes saudáveis com idade entre 18 e 35 anos, sem uso de drogas sistêmicas, sem história pregressa de doenças atópicas, com reações sorológicas negativas para HIV e sífilis e com parto realizado por cesárea eletiva foram selecionadas no Centro Obstétrico do Departamento de Obstetrícia do HU-USP.

3.3.1 Protocolo de imunossupressão

O esquema de administração dos medicamentos foi estabelecido de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Transplantes Renais- Medicamentos Imunossupressores (Ministério da Saúde, 2008). As doses utilizadas na imunossupressão inicial consistiram em duas doses diárias de ciclosporina 3 a 6 mg/kg e tacrolimus 0,1 a 0,15 mg/kg. Azatioprina 1 a 3 mg/kg e prednisona 2 a 20

mg/kg foram administradas em apenas uma dose diária. As doses dos mesmos medicamentos utilizados para a imunossupressão de manutenção são variáveis e levam em conta principalmente o tipo de doador e sua compatibilidade imunológica com o receptor. A dose destes medicamentos foi ajustada mensalmente nas gestantes com intuito de manter doses mínimas.

3.4 Coleta das amostras de placenta humana

A coleta das amostras foi realizada de acordo com os princípios éticos, práticos e de biossegurança estipulados pelo Ministério da Saúde e condizentes com as exigências impostas pela Comissão de Ética envolvendo Pesquisa em Seres Humanos das instituições envolvidas. As considerações éticas baseiam-se no uso do material para fins científicos, com sigilo da identidade do paciente, sem que estes venham a constranger instituições ou pessoas envolvidas.

Os fragmentos de placenta humana a termo (38-41 semanas) foram obtidos após cesárea eletiva ainda no centro cirúrgico. Cotilédones placentários foram removidos e acondicionados em tubo Falcon (BD) contendo tampão fosfato-salina (PBS 0,1M, pH 7.4) a 4 °C e suplementado com estreptomicina/ penicilina a 1%, gentamicina a 0,5%, anfotericina B a 0,25% e glucose 25 mM. Nas dependências do laboratório, os cotilédones foram fragmentados em regiões representativas da interface materno-fetal (decídua e trofoblasto) e sucessivamente lavados em PBS (0,2M, pH 7,4) estéril para remoção do sangue. Fragmentos isolados foram imediatamente fixados em solução de paraformaldeído 4% (em PBS 0,1M, pH 7.4) ou congelados em nitrogênio líquido.

3.5 Imunolocalização de IDO e IFN- γ e caracterização das células da interface materno-fetal

Para esta análise as amostras fixadas em paraformaldeído 4% seguiram os procedimentos rotineiros para inclusão em Histosec® (Merck). Cortes de 5 μ m foram obtidos em micrótomo Microm (Microm, Alemanha) e aderidos à lâminas de vidro tratadas com Poli-L lisina diluída em água destilada (0,1%). Tomou-se o cuidado de utilizar sempre cortes transversais ao plano decídua-cório a fim de ter se sempre exposta a interface materno-fetal.

3.5.1 Localização imunohistoquímica de citoqueratina-7 e vimentina

Após desparafinização e hidratação dos preparados histológicos com sucessivas lavagens em concentrações decrescentes de etanol (Synth, Brasil), as amostras obtidas ao acaso ao longo das coletas seguiu os seguintes abaixo descritos.

Realizou-se o bloqueio da atividade enzimática endógena da peroxidase com peróxido de hidrogênio 3% em metanol. Após este procedimento realizou-se o bloqueio de ligação não específica com BSA 1% por 1 hora em câmara úmida. A incubação com o anticorpo primário anti-citoqueratina-7 na concentração de 1:350 (Cell Marque) e anti-vimentina (Cell Marque) na concentração de 1:100 foi realizada *overnight*. No dia seguinte foi utilizado o kit Advance™ (DAKO) segundo as recomendações do fabricante. Entre cada etapa do processo foram realizadas lavagens de 5 minutos com tampão TBS. A revelação da atividade enzimática foi realizada utilizando-se o kit revelador do próprio kit (DAB, DAKO). Em seguida foi realizada a contra coloração com Hematoxilina de Mayer. Grupos controles negativos foram submetidos ao mesmo protocolo, mas não receberam o anticorpo primário.

Ao final das reações, as lâminas foram montadas com lamínula de vidro e Entellan (Merck).

As amostras foram analisadas em microscópio de luz convencional (Axioskop 2, Zeiss, Alemanha) acoplado a um sistema de captura de imagens (Axio Vision 4.8, Zeiss, Alemanha).

3.5.2 Imunolocalização de IDO e IFN- γ

Cortes seqüenciais àqueles utilizados para a caracterização celular com citoqueratina e vimentina submetidas a protocolo semelhante ao detalhado no item 4.4.1, com exceção de:

- a. O bloqueio da atividade enzimática endógena foi realizado para a enzima peroxidase: utilizou-se então o peróxido de hidrogênio 3% em álcool metílico (ambos da Merck) por 10 minutos a temperatura ambiente

- b. O bloqueio dos sítios de ligação não específica foi realizado com BSA 3% acrescido do bloqueador para a porção Fc de imunoglobulina (422301 *Human TruStain* FcX, Biolegend) na concentração de 0,05 µg/µL por 1 hora, a temperatura ambiente
- c. Foi utilizado como anticorpo primário o anticorpo policlonal anti-IDO humano feito em coelho diluído 1:250 em TBS e o anticorpo monoclonal anti IFN-γ humano feito em camundongo na concentração de 5 µg/mL (ambos da Sigma).
- d. Como anticorpo secundário para a IDO foi utilizado o anticorpo produzido em cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, na concentração de 1:250 em TBS. Para o IFN-γ, o anticorpo secundário utilizado foi o cabra anti-IgG de camundongo na concentração de 1:250 em TBS (ambos da KPL) por 1 hora à temperatura ambiente.
- e. A revelação da atividade enzimática utilizou o kit revelador *SIGMAFAST™* e 3,3'-diaminobenzidina (Sigma) como cromógeno

As imagens foram capturadas e digitalizadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop (Microsoft USA). As áreas de imunoreatividade foram segmentadas utilizando-se o *pluggin Color Deconvolution* (Gabriel Landini, <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html>) e analisadas pelo *software* ImageJ 1.43 (NIMH, NHI, 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 quadrados (µm²).

3.6 Avaliação da atividade da enzima IDO

3.6.1. Homogenato do tecido e ensaio proteico

Para análise do conteúdo proteico o tecido placentário previamente congelado em nitrogênio líquido foi imerso e macerado em tampão RIPA (NP-40 1%, Na-desoxicolato 0,25%, NaF 1mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, Na₃VO₄ 1mM, Tris-HCl 50mM, pH7,4) acrescido de inibidores de protease (Sigma) em tubos CK14 (Precellys®) contendo microesferas de cerâmica e homogeneizadas mecanicamente (Precellys®) em 2 ciclos de 20 segundos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4 °C e o sobrenadante coletado e congelado a -80 °C para posterior quantificação.

A concentração de proteína total foi determinada através da utilização de kit específico (Pierce® Protein Assay Kit BCA, Thermo Scientific) de acordo com instruções do fabricante.

3.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A atividade enzimática de IDO foi analisada através do monitoramento da formação de quinurenina por um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Prominence SHIMADZU HPLC, GLSciences, Tokyo, Japan, acoplado a um detector FRC-10A coletor de fração e UV-Vis [365]) de acordo com Yamamoto e Hayaishi (1967) com pequenas modificações (OKADA, 2010). Resumidamente, 200 µg de extrato de proteína total foi adicionada a solução tampão KH_2PO_4 (50 mM, pH 6,5) contendo triptofano (200 mM), ascorbato (20 mM), azul de metileno (10 µM) e catalase (100 µg/mL) e incubada durante 30 minutos a 37 °C. As amostras foram então mantidas em gelo e a reação cessada com ácido tricloroacético 6% em metanol. N-formilquinurenina, o primeiro produto da via das quinureninas a ser formado, foi degradado após incubação adicional de 15 minutos a 65° C. As amostras foram então centrifugadas a 13.000g a 4 °C por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em membranas de 0,22 µm para posterior análise no sistema de HPLC. Foi injetado 40 µL de cada amostra na coluna de fase reversa (Pack Shim C18 Shimadzu) utilizando acetonitrila:H₂O (25:75 v/v) como fase móvel no modo isocrático, com um caudal de 10 mL/min. O tempo de retenção foi determinado empiricamente utilizando soluções padrão de quinurenina. A atividade da IDO foi referida como a concentração de quinurenina produzida.

3.7 Dosagens de IFN-γ e IL10

Kits para ELISA (BD Pharmigen) foram utilizados para a dosagem de IFN-γ e IL10 no extrato proteico de placenta (item 3.6.1) de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações conforme descrito por Yang et al. (2009). Placas de 96 poços foram revestidas com o anticorpo de captura utilizando anticorpos específicos para IFN-γ e IL-10 para medir e comparar títulos dessas citocinas nos compartimentos placentários (região decidual e vilosa) de cada grupo. As placas foram incubadas por uma noite em câmara úmida e a temperatura de 4

°C. Na sequência, foram lavadas com PBS contendo 0,1% Tween e tiveram seus sítios antigênicos inespecíficos bloqueados com PBS contendo 5% de BSA por 1 hora, a temperatura ambiente. As amostras foram então diluídas seriadamente, colocadas nas placas e incubadas por uma noite em câmara úmida e a temperatura de 4 °C. Após lavagens prosseguiu-se com a adição e incubação com o anticorpo conjugado a estrepto-avidina a temperatura ambiente por 1 hora. Tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio foram utilizados como substratos na reação de peroxidase. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico e as placas lidas em leitor óptico (SpectraMax Plus 384, MicroPlace leitor®) utilizando-se filtro de 450 nm. A concentração de cada citocina presente no homogenato foi calculada em picogramas/mL, utilizando-se uma curva padrão de 2.000 pg.

3.8 Atividade nuclear de NF-kB

Os procedimentos para a extração de proteína nuclear e ensaio de alteração da mobilidade eletroforética foram realizados de acordo com Lappas et al. (2002).

3.8.1 Extração de proteína nuclear

As amostras, previamente congeladas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e homogeneizadas em tampão fosfato-salina (PBS) gelado acrescido de inibidores de protease (PMSF 0,5 M; DTT 0,5 M; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL) e EDTA (0,1 mM). Em seguida o homogenato foi centrifugado a 12.000g por 30 segundos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensionado em tampão de lise (HEPES 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL) e incubado em gelo durante 10 minutos. Após, foi adicionado NP-40 10% e então centrifugado a 12.000g por 30 segundos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* resultante foi ressuspensionado em tampão de extração (HEPES 20 mM; Glicerol 25%; MgCl₂ 1,5 mM; NaCl 300 mM; EDTA 0,25 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 µg/mL; antipaína 2 µg/mL) e incubado por 20 minutos em gelo, sendo em seguida centrifugado a 12.000g (20 minutos, 4 °C). Nesta etapa, o sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteínas nucleares determinadas pelo método de Bradford. As amostras permaneceram a -80 °C até o momento de uso.

3.8.2 Marcação da Sonda

O oligonucleotídeo de DNA contendo a sequência (5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C – 3') foi marcado com a adição de γ - ^{32}P ATP numa solução contendo Tampão T_4 quinase e água. Após incubação à 37 °C por 10 minutos, o excesso de γ - ^{32}P ATP foi retirado com resina sephadex G-25. A sonda marcada foi aplicada no centro da resina e após centrifugação o eluato foi recolhido. No dia do ensaio a atividade da sonda foi determinada, utilizando-se no ensaio aproximadamente 25.000 cpm/ μL .

3.8.3 Reação de ligação e corrida do gel

Em tubos de microcentrífuga foram adicionados 4 μL de tampão de ligação (MgCl_2 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 300 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; Poly dIdc 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; glicerol 20%), 10 μg de extrato nuclear e H_2O em quantidade suficiente para 20 μL de volume final.

Os tubos foram incubados por 20 minutos a temperatura ambiente, adicionando-se em seguida a sonda marcada; os tubos foram então novamente incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. A corrida foi visualizada com a adição de azul de bromofenol ao controle negativo. O conteúdo total do meio de reação foi aplicado a um gel de poliacrilamida 5,5%. Para a eletroforese foi utilizado um tampão de corrida TBE (TBE = Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 1 mM). A corrida eletroforética foi mantida por 2 horas a 150-160 V e ao final o gel foi secado e exposto a filme em cassete a -20 °C.

Após a revelação, o filme foi escaneado para a captura da imagem, sendo as bandas resultantes quantificadas pelo software ImageJ 1.43g.

3.9 Análise estatística

A intensidade da imunomarcção foi comparada por *one-way* ANOVA seguido pelo teste de Dunnett ou pelo teste *t* de *Student*. Valores foram apresentados como média $\pm$ SEM. Medidas de ELISA entre grupos de gestantes transplantadas e saudáveis foram comparados estatisticamente utilizando-se Mann-Whitney U-test. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *GraphPad Prism* para Windows, versão 3.0. Adotou-se o limite de 5% para a significância estatística ($p < 0,05$).

4.1 Dados clínicos das pacientes

As características gerais das pacientes receptoras de transplante renal e saudáveis estão sumarizadas na tabela 1.

Tabela 1 - Dados clínicos gerais das gestantes saudáveis e receptoras de transplante renal

	Gestantes transplantadas n=12	Gestantes Saudáveis n=12
Paridade (média)	0,8	2,8
Idade gestacional (sems)	37,7 ± 1,33	38,1 ± 1,36
Idade materna (anos)	29,24 ± 4,39	28,3 ± 6,02
Peso neonato (g)	2.761,25 ± 453,50 *	3257 ± 557,22
Peso placenta (g)	481 ± 71,94	501 ± 90,3

Os dados representam a porcentagem e média ± desvio padrão dos valores encontrados.

* Diferença significativa em relação ao grupo de gestantes saudáveis ($p < 0,05$). Teste *t* de Student.

Fonte: Prado (2012).

A paridade representa o total de partos pelos quais passaram as gestantes durante sua vida. No grupo das mulheres portadoras de transplante renal, a maioria das análises placentárias foi decorrente de uma primeira gestação, que ocorreu em média por volta de seus 29 anos de idade em 66,6% das gestantes. Nas gestantes saudáveis apenas 25% não apresentaram gestações prévias.

Como pode ser observado na tabela 1, as gestantes de ambos os grupos selecionados possuem características pareáveis em relação ao período gestacional e idade materna. Os partos em ambos os grupos ocorreram em média durante a 38ª semana de gestação, através de cesárea eletiva.

Em relação à média do peso dos neonatos das gestantes transplantadas observaram-se valores semelhantes aos encontrados para as gestantes saudáveis. Entretanto, apenas neste grupo foram encontrados três neonatos (25%) com menos do que 2.500 g ao nascimento que, segundo a World Health Organization (WHO, 1961) deve ser considerado baixo peso independentemente da idade gestacional.

O tratamento imunossupressor e as intercorrências gestacionais encontradas no grupo transplantado estão compilados na tabela 2. Não foram observadas intercorrências nas gestantes saudáveis.

Em relação ao protocolo de imunossupressão, quatro (4) das gestantes receberam em média 137,5 mg/dia de CsA como parte do protocolo inicial, enquanto que as demais receberam dosagem em média 5,8 mg/dia de tacrolimus. A mediana das doses diárias de azatioprina e prednisona foram de 75 mg (50-150 mg/dia) e 5,45 mg (5-10 mg/dia), respectivamente. Não foram relatados casos de rejeição aos órgãos transplantados durante o período gestacional. Três (3) pacientes apresentaram hipertensão e apenas uma (1) apresentou infecção do trato urinário durante a gestação.

Tabela 2 – Tratamento imunossupressor das gestantes receptoras de transplante renal

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Tacrolimus (mg/dia)	8	10	-	3	4	3	7	-	-	-	-	-
Azatioprina (mg/dia)	50	125	75	100	150	100	75	75	100	75	50	75
Prednisona (mg/dia)	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5	-	5
Ciclosporina A (mg/dia)	-	-	-	-	-	-	-	75	150	250	-	75
Ocorrências	S/O	HS	S/O	S/O	S/O	HS	HS	S/O	S/O	ITU	S/O	S/O

Tratamento recebido pelas gestantes receptoras de transplante renal. O traço encontrado em algumas dosagens dos imunossupressores significa que o medicamento foi suspenso ou não administrado. S/O: sem ocorrência. HS: hipertensão. ITU: infecção do trato urinário.

Fonte: Prado (2012)

A administração de azatioprina, tacrolimus e prednisona durante a gestação apresentou correlação negativa com o peso dos neonatos e suas respectivas placentas. Doses maiores dos imunossupressores correlacionaram-se à diminuição no peso do neonato e placenta. Ao contrário, houve correlação positiva entre o uso de ciclosporina A e o peso do neonato e sua placenta, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Valores referentes à correlação das dosagens dos medicamentos das gestantes portadoras de transplante renal.

	Neonato	Placenta
Azatioprina	-0,03991	-0,13851
Tacrolimus	-0,09257	-0,13361
Prednisona	-0,26146	-0,34108
CsA	0,761435	0,698454

Valores referentes à correlação encontrada entre as dosagens dos medicamentos utilizados por cada gestante em relação ao peso (g) do neonato e sua respectiva placenta (g) ao nascimento.

Fonte: Prado (2012)

4.2 A interface materno-fetal

As placentas de ambos os grupos estudados foram analisadas morfológicamente sob microscopia de luz convencional em preparados histológicos. Não foram observadas alterações morfológicas degenerativas em nenhuma das amostras analisadas. De modo geral, os tecidos materno e fetal não continham infiltrado leucocitário, degenerações vasculares ou fibrosantes (dados não mostrados). A estrutura vilosa estava preservada assim como os componentes da interface com a decidua basal, aparentemente íntegros e preservados.

A localização de células produtoras de IDO e IFN- γ na interface materno-fetal e na região vilosa placentária foi realizada por meio de reações imunohistoquímicas. A natureza das células reativas na interface materno-fetal foi avaliada pela localização de biomarcadores específicos (filamentos intermediários) para as células trofoblásticas (citoqueratina-7) e para células de origem mesenquimal (vimentina), em cortes semi-seriados.

4.3 Expressão de IDO na interface materno fetal

Células reativas para a presença de IDO foram observadas na interface materno-fetal de gestantes saudáveis (Figuras 3A-B) e transplantadas (Figuras 3C-D). Os perfis de marcação, entretanto foram diferentes em relação aos tipos celulares reativos no compartimento decidual da placenta a termo. Na placenta do grupo controle a localização de IDO foi observada predominantemente nas células endoteliais e em células de pequenas dimensões nas proximidades dos vasos endometriais (Figuras 3A-B). Na placenta das gestantes transplantadas o perfil de

reatividade endotelial não foi observado (Figura 3C). Também houve modificação do tipo celular reativo na decídua. Nestas placentas as células reativas ao anticorpo apresentavam características de células trofoblásticas extravilosas, com grandes dimensões, citoplasma abundante e distribuição em aglomerados em regiões próximas aos vasos endometriais. Quando realizadas as reações para componentes diferenciais do citoesqueleto, observamos que as células de grandes dimensões eram citoqueratina-7 positivas (Figuras E-F) e vimentina negativas (Figuras 3G-H), características diferenciais das células trofoblásticas extravilosas.

Figura 3 - Imunolocalização de IDO na região decidual de placentas de gestantes saudáveis e transplantadas

Imunolocalização de IDO (A-D) na placenta de gestantes saudáveis (A-B) e receptoras de transplante renal (C-D). Imunoreatividade à citoqueratina 7 (E-F) e ausência de reatividade ao anticorpo anti-vimentina (G-H) identificam células trofoblásticas extravilosas. Notar que células de grandes dimensões presentes na decídua (d, cabeça de setas) são IDO-negativas e que as células endoteliais presentes nos vasos endometriais (ve) são IDO-reativas (setas) nas placentas de gestantes saudáveis (B). Nas placentas das gestantes transplantadas (D) há uma inversão desta reatividade: as células de grandes dimensões tornam-se IDO-reativas enquanto que o endotélio perde sua reatividade. Imunoperoxidase, contra coloração com Hematoxilina de Mayer. Aumento: A, C, E, G – 10X; B, D, F, H – 40X.

Fonte: Prado (2012)

Nas vilosidades coriônicas da placenta das mães saudáveis também se observou reatividade para a IDO (Figura 4). Esta reatividade foi intensa no sinciciotrofoblasto e nas células mesenquimais, particularmente nas células endoteliais. Nos troncos vilosos ou nos vilos mais calibrosos, as células endoteliais também se mostraram fortemente reativas (Figura 4a1). Na região vilosa das

placentas de gestantes transplantadas a reatividade quando observada foi muito discreta no sinciotrofoblasto. Células endoteliais dos troncos vilosos mostraram reatividade semelhante à de placentas do grupo controle (Figura 4c1), mas não nos vilos terminais onde a reação imunohistoquímica pareceu muito mais discreta em todos os componentes vilosos exceto em células com morfologia compatível com células de Hofbauer (Figura 4D).

A intensidade de imunomarcção foi quantificada em relação à área analisada em μm^2 (Figura 5). Embora os valores encontrados para a intensidade de marcação para IDO na região decidual das placentas de mães transplantadas tenha sido menor do que o observado em região equivalente nas gestantes saudáveis, estes valores não foram estatisticamente diferentes. Já em relação a região vilosa, os valores encontrados mostraram diferenças significativas, sendo a reatividade das placentas de gestantes transplantadas mais baixa do que as de gestantes saudáveis ($p=0,0260$).

Figura 4 - Imunolocalização de IDO na região vilosa de placentas de gestantes saudáveis e transplantadas

Imunolocalização de IDO na região vilosa (v) de placentas de mães saudáveis (A e B) e imunossuprimidas pós-transplante renal (C e D). Nas amostras de placenta das mulheres saudáveis (B) observar a reatividade no sinciotrofoblasto e em células endoteliais (b1) e mesenquimais (setas). Nas placentas de mulheres transplantadas (D) observar a reatividade limitada ao anticorpo anti-IDO no sinciotrofoblasto e a forte reatividade em células mesenquimais morfológicamente semelhantes a macrófagos fetais (setas). Imunoperoxidase, contracoloração Hematoxilina de Mayer. Aumento: a1, b1 e c1 = 100X.

Fonte: Prado (2012).

Figura 5 - Quantificação da intensidade de imunomarcção para IDO

Quantificação da intensidade de imunomarcção para IDO no compartimento decidual (D) e viloso (V) de placentas de gestantes saudáveis (S) e de gestantes transplantadas (T). A escala do gráfico representa unidades arbitrárias em relação à área analisada (μm^2). Diferenças significativas em relação ao grupo de gestantes saudáveis ($p=0,05$). Mann-Whitney U-test e Teste t de Student.

Fonte: Prado (2012)

4.4 Atividade da IDO na interface materno-fetal

Níveis placentários de quinurenina foram avaliados a partir dos fragmentos representativos da região decidual e vilosa de mães saudáveis e transplantadas (Figura 6). Nenhuma diferença foi observada em relação aos níveis de quinurenina entre a decídua e a região vilosa de placentas de gestantes saudáveis. Nos fragmentos placentários das gestantes transplantadas por outro lado observou-se uma significativa redução de atividade da IDO na região vilosa em comparação com a região decidual ($p=0,0104$). Por outro lado, quando os compartimentos placentários de ambos os grupos foram comparados entre si, a região decidual das gestantes transplantadas exibiu níveis maiores ($p=0,0036$) de atividade enquanto que a região vilosa mostrou níveis menores ($p=0,0275$ em relação às respectivas regiões das placentas de gestantes saudáveis).

Figura 6 - Atividade da IDO em placentas de gestantes saudáveis e transplantadas

Atividade da IDO, reportada em concentração de quinurenina em micromolar (μM), na região decidual (D) e vilosa (V) de placentas de gestantes saudáveis (S) e transplantadas (T). Diferenças significativas em relação ao grupo de gestantes saudáveis ($p < 0,05$). Mann-Whitney U-test e Teste t de Student ($n=10$).

Fonte: Prado (2012)

4.5 Imunolocalização de IFN- γ na interface materno-fetal

A imunolocalização de IFN- γ foi observada em placentas de mães transplantadas e saudáveis, em ambos os compartimentos placentários (Figura 7). Na região decidual a reatividade ao IFN- γ foi observada principalmente em células de grandes dimensões espalhadas por todo o endométrio tanto nas placentas de gestantes saudáveis (Figuras 7A-B) quanto nas de gestantes transplantadas (Figuras 7C-D). A reatividade, entretanto foi menos intensa nas placentas do grupo transplantado. A morfologia das células citoqueratina 7-reativas (Figuras E,G) muito diferente das células vimentina positivas (Figuras 7F,H) sugerem que as células IFN- γ positivas são células trofoblásticas extravilosas.

Figura 7 - Imunolocalização de IFN- γ na região decidual da placenta

Imunolocalização de IFN- γ (A-D) na região decidual de placentas de mães saudáveis (A-B) e imunossuprimidas pós-transplante renal (C-D). Notar que as células reativas (coloração marrom) apresentam caracteristicamente grandes dimensões com núcleos esféricos semelhantes às células citoqueratina-7 positivas (E,G). Ao contrário, as células deciduais vimentina positivas (F,H) são em geral fusiformes com núcleos achatados (em destaque no quadrado), lembrando a morfologia de fibroblastos. Imunoperoxidase, contracoloração com Hematoxilina de Mayer. Aumento: A, C, E-F - 10X; B, D, G-H - 40X.

Fonte: Prado (2012)

A análise imunohistoquímica da região vilosa (Figura 8) mostrou padrões semelhantes para a reatividade ao IFN- γ entre as placentas de gestantes saudáveis (Figuras 8A-B) e transplantadas (Figuras 8C-D). A reação foi predominantemente

nuclear tanto no sinciciotrofoblasto como em células mesenquimais e eventualmente em células do revestimento capilar fetal (detalhe, Figura 8D).

Figura 8 - Imunolocalização de IFN- γ na região vilosa da placenta

Imunolocalização de IFN- γ (A-D) na região vilosa de placentas de mães saudáveis (A-B) e imunossuprimidas pós-transplante renal (C-D). Notar que o padrão de reatividade é semelhante nas amostras de vilos dos dois grupos estudados, com núcleos IFN- γ reativos (coloração marrom) na região do sinciciotrofoblasto (seta, D, detalhe) e nas células mesenquimais e endoteliais (cabeça de seta, D, detalhe). Imunoperoxidase, contracoloração Hematoxilina de Mayer. Aumento: A, C – 10X; B, D – 40X; detalhe em D – 100X.

Fonte: Prado (2012)

A quantificação da reatividade para IFN- γ nos tecidos placentários dos grupos mostrou diferenças estatisticamente significativas entre a região vilosa e a decidual das placentas de mães saudáveis, com valores menores no compartimento viloso ($p=0,0157$). Comparando a expressão de IFN- γ entre os compartimentos placentários equivalentes de mães saudáveis e transplantadas, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre as regiões decduais. Níveis menores de intensidade de IFN- γ foram encontrados no grupo de mães transplantadas em comparação ao grupo de mães saudáveis ($p=0,0214$) (Figura 9).

Figura 9. Estimativa quantitativa da intensidade de imunoreatividade para IFN- γ

Estimativa quantitativa da intensidade de imunoreatividade para IFN- γ na região decidual (D) e vilosa (V) de placentas de gestantes saudáveis (S) e transplantadas (T). Diferenças significativas em relação ao grupo de gestantes saudáveis ($p=0,05$). Mann-Whitney U-test e Teste t de Student.

Fonte: Prado (2012)

4.6 Níveis placentários de IFN- γ

Diferença estatisticamente significativa entre vilosidade coriônica e decídua, em relação aos níveis de IFN- γ , foram encontrados somente na placenta de mães saudáveis, com menores valores no compartimento viloso ($p=0.0002$). Comparando a expressão de IFN- γ entre os compartimentos placentários equivalentes de mães saudáveis e transplantadas, verificou-se que existe diferença significativa na região decidual. Níveis menores de expressão de IFN- γ foram encontrados no grupo de

mães transplantadas em comparação ao grupo de mães saudáveis ($p=0.0433$) (Figura).

Figura 10. Níveis placentários de IFN- γ em gestantes saudáveis e transplantadas

Níveis placentários de IFN- γ foram estimados na região decidual (D) e vilosa (V) em placenta de mães saudáveis (S) e transplantadas (T). Diferenças significativas em relação ao grupo de gestantes saudáveis ($p=0,05$). Mann-Whitney U-test e Teste t de Student.

Fonte: Prado (2012)

4.7 Níveis placentários de IL-10

A análise dos níveis de IL-10 nos compartimentos placentários não mostrou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Decídua e vilosidade coriônica exibiram níveis similares de IL10 (Figura 11).

Figura 11 - Níveis placentários de IL-10 em gestantes saudáveis e transplantadas

Níveis placentários de IL-10 foram estimados na região decidual (D) e vilosa (V) de placentas de mães saudáveis (S) e transplantadas (T). Nenhuma diferença significativa em relação ao grupo de gestantes saudáveis. Mann-Whitney U-test e Teste *t* de Student.

Fonte: Prado (2012)

4.8 Atividade nuclear de NF-kB

A análise dos níveis de atividade de NF-kB nos compartimentos placentários entre o grupo de gestantes saudáveis e transplantadas evidenciou diferenças estatisticamente significativa entre os grupos estudados. A região das vilosidades da placenta de gestantes transplantadas apresentou menores níveis de translocação deste fator para o núcleo ($p=0,0286$) em relação ao grupo de gestantes saudáveis. (Figura 12).

Quando analisados os compartimentos de cada paciente dentro de cada grupo (compartimento decidual e viloso) um aspecto interessante em relação à ativação de NF-kB pode ser observado. Nas gestantes saudáveis quando havia aumento da atividade de NF-kB em um dos compartimentos (viloso ou decidual) o outro (viloso ou decidual) mostrava-se diminuído (correlação $-0,93101$) e vice-versa. O mesmo não foi observado em relação aos compartimentos da placenta das gestantes portadoras de transplante renal. A atividade de ligação nuclear do NF-kB aumenta ou diminui simultaneamente em ambos os compartimentos placentários (correlação $0,599495$). Analisado o grupo de gestantes transplantadas observou-se que os espécimes que apresentavam aumento de atividade NF-kB pertenciam às gestantes que tiveram intercorrências durante a gestação.

Figura 12 - Atividade nuclear de NF- κ B da interface materno-fetal de gestantes saudáveis e portadoras de transplante renal

Atividade nuclear de NF- κ B da interface materno-fetal do grupo de gestantes saudáveis e portadoras de transplante renal. Diferenças significativas em relação ao grupo de gestantes saudáveis ($p < 0,05$). Mann-Whitney U-test e Teste t de Student.

FONTE: Prado (2012)

Inúmeras evidências apontam a importância da IDO sob diferentes aspectos na indução de tolerância imunológica após transplante, na resposta contra infecções, na autoimunidade, no câncer e também fisiologicamente durante a gestação (CURTI et al., 2009). Em algumas situações estas condições podem ainda ser superpostas como no caso da gestação em mulheres receptoras de transplantes, muitas vezes ainda na presença de infecções. Destaca-se ainda a obrigatória administração de imunossupressores cuja ação muitas vezes pode conflitar com o processo de adaptação imunológica preconizada como fundamental para o sucesso gestacional.

Apesar de vitais para o sucesso do transplante, o efeito destes imunossupressores muitas vezes administrados sob a forma de complexos de múltiplas ações imunológicas não é totalmente compreendido no contexto gestacional em que intercorrências são frequentes e as taxas de mortalidade e morbidade perinatal aumentadas.

Neste contexto, este estudo pretendeu avaliar o perfil da enzima IDO e dos fatores capazes de regular sua atividade, tais como IFN- γ (MELLOR; MUNN, 1999) e IL-10 (GROHMANN et al., 2002; MUNN et al., 2002) na interface materno-fetal em gestantes transplantadas sob a ação de imunossupressores em uma tentativa de compreender melhor os efeitos desta terapia sobre um dos principais mecanismos de tolerância imunológica gestacional.

A condição de imunossupressão foi averiguada através de gestantes receptoras de transplante renal sem disfunção diagnosticada do enxerto previamente ou durante a gestação. A terapia consistiu na administração diária de inibidores da calcineurina (ciclosporina A, tacrolimus), um agente anti-proliferativo (azatioprina) e um corticóide (prednisona).

Dentro do grupo de gestantes transplantadas selecionadas para este estudo três (25%) apresentaram hipertensão crônica e uma, quadro infeccioso ao longo da gestação. A hipertensão arterial representa uma das mais comuns complicações maternas diagnosticadas neste grupo (PERALES-PUCHALT et al., 2011), o que determina que estas pacientes tenham monitoramento da pressão sanguínea de forma bastante rigorosa (MCKAY; JOSEPHSON, 2006). Além da hipertensão, gestantes transplantadas também apresentam risco aumentado para desenvolver pré-eclâmpsia, diabetes gestacional e parto pré-termo, comparado com a população em geral (HIRACHAN et al., 2012), no entanto estas patologias não foram

observadas no nosso grupo de estudo. Neste contexto, pelo menos para a grande maioria das gestantes selecionadas a terapia imunossupressora, a doença de base que levou ao transplante renal e a resposta orgânica gerada por estas condições aparentemente não repercutiu nos mecanismos homeostáticos das pacientes.

Outros fatores relevantes que corroboram esta possibilidade são os valores encontrados para o peso fetal e placentário, que foram discretamente mais baixos nas gestantes transplantadas, mas dentro do intervalo observado para as gestantes saudáveis. Este achado nos remete a duas possíveis interpretações: 1. Fatores restritivos ou facilitadores podem estar envolvidos no crescimento fetal, além dos genéticos. Entre estes se destacam o uso de determinados medicamentos além de doenças maternas e/ou obstétricas e intercorrentes, como a própria hipertensão (BATTAGLIA; LUBCHENCO, 1967). Sob este ponto de vista, o baixo peso ao nascimento relatado em neonatos de pacientes transplantadas (THOMPSON et al., 2003) pode ser a consequência da dosagem da terapia medicamentosa ou das múltiplas intercorrências sofridas pelas gestantes ou ainda ser devida à sobreposição e gravidade de cada um destes fatores. Ao mesmo tempo, a ausência de intercorrências na maioria das gestantes selecionadas para este estudo pode estar associada a vários fatores individuais e a uma terapia compatível com a gestação. 2. Apesar da ausência de diferenças estatísticas em relação aos pesos fetal e placentário entre as gestantes transplantadas e saudáveis, os valores absolutos foram menores. Quando os dados obtidos foram analisados em função da terapia utilizada observou-se uma correlação negativa em relação ao peso do neonato e sua respectiva placenta quando a terapia medicamentosa incluía a administração de tacrolimus, azatioprina e prednisona. Ao contrário com o uso de ciclosporina A correlação foi positiva, o que manteve os valores de feto e placenta mais altos do que os demais tratamentos. Não existem dados na literatura que possam explicar a correlação encontrada; entretanto, a capacidade da ciclosporina A em promover invasividade e crescimento trofoblástico (DU et al., 2007; 2008) talvez seja um fator relevante no processo de placentação e justifique o crescimento encontrado. Du e colaboradores (2007) demonstraram que o tratamento de fêmeas CBA/J prenhes com ciclosporina A reduz significativamente a taxa de reabsorção e reverte a diminuição da proliferação e invasividade do trofoblasto observada no início da gestação proveniente de acasalamientos propensos a abortos. O referido estudo providenciou evidências de que a proliferação e invasividade trofoblástica

regulada pela ciclosporina A pode contribuir para a melhoria do quadro gestacional proveniente de um modelo animal propenso a aborto.

5.1 A expressão e atividade da IDO na placenta de gestantes receptoras de transplantes renais e sob terapia imunossupressora

O papel da IDO na regulação da tolerância materno-fetal é atribuído às suas propriedades imunossupressoras, as quais são baseadas na inibição da proliferação das células T pelo catabolismo do triptofano (MELLOR et al., 2002). No presente estudo, a atividade e expressão desta enzima foi estudada isoladamente nos compartimentos placentários materno e fetal de mães saudáveis e transplantadas com o objetivo de avaliar o efeito da terapia imunossupressora sobre este sistema de tolerância gestacional.

Nossos achados corroboraram trabalhos prévios (KAMIMURA e al., 1991; LIGAM et al., 2005; SANTOSO et al., 2002; SEDLMAYR et al., 2002) e mostraram a expressão de IDO em células semelhantes a macrófagos fetais (Hofbauer) no estroma da vilosidade coriônica, no endotélio vascular e em áreas isoladas do sinciciotrofoblasto. A imunolocalização de IDO no sinciciotrofoblasto foi realizada mediante a utilização de um agente bloqueador do receptor para Fc nestas células o que garantiu a especificidade da reação. Este aspecto, havia sido mencionado nos estudos de Honig e colaboradores (2005) ao se depararem com reatividade aparentemente específica nas células placentárias, mas decorrente da presença de receptor para a fração Fc de imunoglobulina na superfície das células trofoblásticas (associado ao transporte de IgG através da barreira placentária) e não da presença do antígeno realmente pesquisado.

Nas vilosidades coriônicas da placenta das gestantes transplantadas a presença de IDO também foi constatada, predominando nas células estromais semelhantes a macrófagos e apresentando-se de forma bastante discreta nos demais componentes vilosos. A diminuição na expressão de IDO nas vilosidades foi confirmada nas avaliações quantitativas.

O papel da IDO na região vilosa foi mostrado por Kudo et al. (2001) e Honig et al. (2004). Vilos placentários cultivados são capazes de reduzir a proliferação de mononucleares, um efeito abolido com a presença de análogos não funcionais de triptofano (*1-methyl analogue of tryptophan*) e novamente obtido com a adição de

triptofano ao meio. Portanto, a expressão e atividade de IDO na região das vilosidades coriônicas parece contribuir com a tolerância ao feto semi-alógeno depletando localmente o triptofano do microambiente placentário (TERNESS et al., 2002). Sob este aspecto, a diminuição da produção desta enzima no sinciciotrofoblasto pode ser um mecanismo de diminuição da efetividade tolerogênica e aumento de susceptibilidade a falhas gestacionais.

A reatividade à IDO em células de morfologia semelhantes a macrófagos, entretanto, é digna de nota. Os macrófagos fetais, conhecidos como células de Hofbauer são células apresentadoras de antígenos que predominam no estroma das vilosidades coriônicas durante toda gestação. Desempenham funções críticas de defesa e também contribuem com a diferenciação do trofoblasto e angiogênese local produzindo fatores de crescimento e citocinas (KUDO et al., 2004; LIGAM et al., 2005; SEDLMAYR et al., 2002). A produção de IDO por estas células parece estar intimamente associada à defesa contra microorganismos e desta forma defesa fetal contra patógenos que consigam atravessar a barreira placentária (PFAFF et al., 2008). Uma ampla lista de patógenos são sensíveis à degradação de triptofano mediada pela IDO variando desde parasitas intracelulares como o *Toxoplasma gondii*, vírus como o da herpes, bactérias intracelulares como a Chlamydia, bactérias extracelulares como os estreptococos e enterococos (DINANOVIC et al., 2012; HESELER, et al., 2008; MACKENZIE et al., 2007; MAKALA, 2012). Neste contexto, a condição imunossupressora parece ter alterado a função tolerogênica da IDO desempenhada pelo sinciciotrofoblasto mas não alterou as funções primordiais de defesa dos macrófagos vilosos. Esta é sem dúvida uma condição interessante e de valor médico que merece ser estudada de forma mais detalhada em uma próxima etapa.

A presença de IDO nas células endoteliais principalmente de vasos estruturados dos vilos coriônicos também foi mantida nas placentas de gestantes transplantadas. Esta localização da IDO tem também sido associada em diferentes modelos ao controle do tônus vascular, além das atividades imunológicas. A administração de quinurenina, metabólito da degradação de triptofano pela IDO em ratos espontaneamente hipertensivos diminui a pressão sanguínea de forma dose-dependente (WANG et al., 2010). A manutenção da expressão IDO no endotélio dos vasos vilosos pode desta forma significar que suas funções associadas à regulação

do fluxo sanguíneo local (WANG et al., 2010) estão preservadas, apesar da imunossupressão materna.

Na decídua a quantificação da reatividade a IDO foi semelhante entre as gestantes saudáveis e transplantadas, mas houve modificação no perfil de distribuição das células reativas. Nas mães saudáveis a IDO foi observada predominantemente no endotélio vascular e ocasionais células de presentes na decídua, enquanto que nas gestantes transplantadas esta reatividade foi observada principalmente em células mononucleadas, globosas e de grandes dimensões em relação às demais células residentes. A imunolocalização de filamentos intermediários formados por citoqueratina do tipo 7 que caracterizam as células trofoblásticas mostrou células com características morfológicas únicas na decídua, ou seja, células globosas de grandes dimensões, dispostas em grupos ou isoladas. Desta forma, consideramos as células com estas características como células pertencentes ao citotrofoblasto extraviloso.

A diminuição da IDO no compartimento vascular decidual pode ter conseqüências funcionais para a gestação. Sua capacidade em promover vasodilatação tem sido considerada um dos mecanismos de aumentar o fluxo sanguíneo no espaço interviloso e manter os subsídios energéticos para o desenvolvimento fetal (WANG et al., 2010). Ainda, a diminuição de produção de quinurenina especificamente por células endoteliais na placenta tem sido correlacionada quadros hipertensivos gestacionais e pré-eclâmpsia (KUDO et al., 2003).

Neste estudo o significado funcional da diminuição de reatividade à IDO nas células endoteliais não foi aprofundado, deixando em aberta a questão se nas gestantes transplantadas a alteração no perfil de distribuição vascular da IDO não estaria associado aos quadros hipertensivos comuns a estas pacientes.

Por outro lado quando medida a atividade desta enzima na decídua encontramos um aumento significativo em relação às gestantes saudáveis. Este achado pode representar uma forma de compensar e manter o balanço geral de IDO na interface materno-fetal, uma vez que na região vilosa esta atividade está diminuída. O desequilíbrio encontrado entre a atividade enzimática na região decidual e vilosa da placenta das gestantes transplantadas sugere que os efeitos da terapia imunossupressora afetam diferencialmente a expressão e atividade da IDO placentária e, aparentemente de forma mais contundente o compartimento fetal da

placenta. A participação das células trofoblásticas extravilosas neste processo pode ser relevante, uma vez que ocupam posição estratégica em contato com uma ampla gama de células imunológicas e com o sangue materno.

Como a imunossupressão age sobre a atividade da IDO tem sido estudado em outros modelos. Mackler e colaboradores (2003) sugerem que um dos significados funcionais para a presença de IDO na decídua é estabelecer um mecanismo de contenção de infecções na ausência de resposta imunológica citotóxica ocasionada, o que ocorre, por exemplo, nas infecções por *Listeria monocytogenes*. Sob esta perspectiva se por um lado há uma restrição de aminoácidos para o crescimento patogênico, a atividade aumentada da IDO também pode reduzir drasticamente a presença de leucócitos, desprotegendo a mãe e, conseqüentemente o feto contra outros agentes infecciosos (GROEBNER et al., 2011).

5.2 A produção de IFN- γ na interface materno-fetal como fator de indução da IDO decidual

A citocina IFN- γ desempenha um importante papel na defesa do hospedeiro contra vírus e bactérias e, também, na imunidade contra tumores (DUNN et al., 2006). Esta citocina possui capacidade moduladora das respostas imunológicas, podendo minimizar possíveis danos a tecidos ou órgãos no contexto da auto-imunidade e infecções. Dependendo da idade gestacional, tipo de indução e estágio de diferenciação celular, as células trofoblásticas da placenta humana tornam-se potentes produtoras de IFN- γ . Esta citocina desempenha funções antivirais características de IFN do tipo I, regula a proliferação e diferenciação trofoblástica, regula a expressão de uma grande variedade de moléculas de superfície e tem funções imunomodulatórias na unidade feto-placentária (ABOAGYE-MATHIESEN et al., 1993). Esta citocina também modula a atividade e expressão de IDO para a regulação da tolerância imunológica durante a gestação (WOOD; SAWITZKI, 2006). Neste contexto a redução da expressão e atividade da IDO na região vilosa poderia ser resultado de um desbalanço no perfil de IFN- γ diminuindo a produção local de IDO nas gestantes transplantadas.

Tanto no compartimento decidual quanto no viloso de gestantes saudáveis e

transplantadas houve expressão de IFN- γ . Na decídua, as principais células reativas ao anticorpo foram as de morfologia compatível com células trofoblásticas extravilosas. Nos vilos coriônicos, áreas do sinciciotrofoblasto e células mesenquimais mostraram-se reativas. No grupo transplantado, a presença de IFN- γ prevaleceu nos mesmos tipos celulares. A intensidade de reatividade, entretanto foi diferente entre os compartimentos deciduais quando gestantes saudáveis e transplantadas foram comparadas. IFN- γ diminuiu na decídua das gestantes transplantadas. Também o perfil de IFN- γ não foi alterado pela condição imunossupressora na região vilosa, onde baixos níveis de IDO correlacionaram-se a baixos níveis de IFN- γ , sugerindo que não houve a ação dos medicamentos ter ocorrido diretamente sobre esta citocina.

A indução da atividade da IDO constitui parte das funções anti-microbidas, antivirais e anti-proliferativa exibidas pelo IFN- γ . Depletando células alvo de triptofano, o menos abundante de todos os aminoácidos essenciais, a indução de IDO via IFN- γ é capaz de conter uma infecção materna para que não atinja o feto, ao mesmo tempo em que pode inibir a proliferação de células T e contribuir para um estado de tolerância imunológica (KLEIN et al., 1976 REMINGTON; DESMONTS 1976; YAMAUCHI et al., 1974). Nas gestantes transplantadas chama a atenção, a diminuição da expressão de IFN- γ na decídua, o que pode contribuir para uma maior susceptibilidade a infecções. Por outro lado estes valores diminuídos de IFN- γ correlacionam-se a uma maior atividade de IDO, sugerindo um mecanismo de ativação de IDO independente desta citocina.

A inibição de IFN- γ como produto da terapia imunossupressora tripla (ciclosporina A, azatioprina e prednisona) utilizada nos protocolos de transplante, foi já descrita no soro de pacientes transplantados (LUNSFORD et al., 2011). Estes medicamentos parecem limitar a produção local de IFN- γ por células NK uterinas e outros tipos celulares da interface materno-fetal, o que leva ao comprometimento da expressão da IDO e suas respectivas atividades funcionais. Sob este prisma, é possível que a atividade aumentada de IDO no compartimento decidual das gestantes transplantadas esteja respondendo a outro fator local.

Dentre o universo de fatores capazes de induzir a IDO, destacam-se o TGF- β e a IL-10, cuja produção poderia ser induzida através da imunossupressão medicamentosa baseada na administração de inibidores de calcineurina e conferir

efeitos reguladores na atividade de IDO, independentemente IFN- γ (EIWEGGER et al., 2010; PALLOTA et al., 2011).

5.3 O perfil de IL-10 placentário não sofre alterações na interface materno fetal

A IL-10 expressa atividade imunossupressora indiretamente, através das células apresentadoras de antígenos e da regulação da expressão de complexo de histocompatibilidade (MHC) (DE WAAL MALEFYT et al., 1991) e de moléculas co-estimuladoras da família B7 (B7-H1) (CURIEL et al., 2003). Esta interleucina pode ainda limitar a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias nestas células, afetando diretamente a ativação, proliferação e produção de citocinas pelas células T CD4⁺ (COUPER et al., 2008; JOSS et al., 2000; MOORE et al., 2001; SCHANDENE et al., 1994).

A resposta dominante de IL-10 no período de implantação (WU et al., 2001) e durante a gestação é de fundamental importância para a supressão de respostas de perfil Th1 e também para a expressão específica de HLA de classe I na barreira placentária, colaborando com a proteção fetal contra rejeição (DENNEY et al., 2011; HANNA et al., 2000; MOREAU et al., 1999). Esta citocina foi também recentemente associada à produção de IDO ao se observar que sua secreção por células Tregs aumenta o catabolismo do triptofano pela IDO (FINGER; BLUESTONE, 2002).

Os níveis de IL-10 placentários foram então avaliados neste estudo como um mecanismo adicional da indução da expressão de IDO. Neste estudo, entretanto a produção de IL-10 não variou entre os grupos de gestantes saudáveis e transplantadas, sugerindo não haver correlação entre esta citocina e a expressão e atividade de IDO decidual.

5.4 A atividade de NF-kB

A ausência de uma correlação direta entre IFN- γ /IL-10 e IDO, enfraquecendo a possibilidade de uma ativação da IDO por sua via canônica, nos levou a questionar como uma gestante sistemicamente imunossuprimida, com baixos níveis de citocinas inflamatórias na interface materno-fetal mantém ativada a IDO nas gestantes transplantadas. Obviamente, este é um sistema de relevância para a gestação que sobrepuja vias regulares mesmo em condições de imunossupressão

que se fazem sentir nos níveis de citocinas, mas não na atividade desta enzima. Em outras palavras, a interface materno-fetal destas gestantes mostrou-se comprometida com os efeitos da imunossupressão em relação às citocinas, mas não em relação à IDO.

Em 2010, Dharane-Neé Ligam e colaboradores descreveram a influência de um imunossupressor (sulfasalazina) na atividade da IDO de forma dependente de NF-kB, demonstrando um papel fundamental para este fator de transcrição nesta via de regulação.

A translocação do NF-kB para o núcleo pode ser ativada por diferentes vias e é responsável pelo aumento na transcrição de cerca de 400 genes que codificam citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e outras moléculas que perpetuam a resposta inflamatória e favorecem a sobrevivência celular (CHENOWETH et al., 2012; CHOI et al., 2012; ROBINSON et al., 2006; VARFOLOMEEV et al., 2012). Na gestação o NF-kB também tem sido relacionado com a expressão de diversas citocinas necessárias para a manutenção de um ambiente favorável (HADFIELD et al., 2011). Neste contexto, como uma forma mais abrangente de avaliar um possível desequilíbrio local na indução de produção de moléculas de regulação imunológica, a translocação nuclear de NF-kB foi avaliada entre na interface materno-fetal das gestantes saudáveis e transplantadas.

Os níveis de translocação e, portanto de ativação deste fator mostraram se diminuídos na região vilosa das placentas das gestantes transplantadas o que pode representar uma diminuição na expressão de inúmeras citocinas e fatores de regulação que estão direta e indiretamente relacionados á ativação da IDO. Uma possibilidade é o efeito da terapia imunossupressora sobre este mecanismo de regulação de fatores imunologicamente ativos.

Surpreendentemente, na região decidual os valores de ativação do NF-kB não se mostraram alterados em relação às gestantes saudáveis, dificultando a compreensão de um possível mecanismo de indução da IDO. A presença de diferentes tipos celulares fetais e maternos que na decídua são capazes de produzir uma gama muito ampla de fatores de atividade imunológica dificulta a busca de mecanismos alternativos de regulação para os resultados encontrados. Na literatura, foram descritas recentemente vias alternativas e independentes de IFN- γ para a ativação da IDO. Uma delas envolve o fator de transcrição Forkhead box OA3 (Fox OA3) e a enzima mitocondrial superóxido dismutase 2 (BLES et al., 2007; DEJEAN

et al., 2009). Ainda, não podemos descartar a possibilidade de uma ação mediada pelos próprios imunossuppressores. Recentemente, Schmidt et al. (2011, 2012) sugeriram que a ciclosporina A e o tacrolimus, inibidores da calcineurina podem suprimir a atividade do NF- κ B, através de um mecanismo ainda não elucidado.

Em face dos resultados obtidos neste estudo, parece plausível especular que o eixo de imunoregulação gerado por IDO-IFN- γ -IL10 na interface materno-fetal de gestantes portadoras de transplante renal responde diferencialmente nos compartimentos placentários a insultos ocasionados pela utilização de imunossuppressores durante a gestação.

Mais precisamente, a região vilosa parece responder aos imunossuppressores diminuindo a atividade e expressão da IDO nas células que fazem a interface com o organismo materno, enquanto que a na decídua, parece haver uma tentativa de compensação elevando a atividade de IDO de forma independente de IFN- γ , IL-10 e da sinalização através do NF- κ B.

5.5 Considerações finais

Os resultados obtidos mostram células IDO-positivas detectadas por imunohistoquímica e alta atividade de IDO na decídua de gestantes transplantadas, entretanto com baixos níveis de produção de IFN- γ e nenhuma alteração na produção de IL-10. Embora esta relação não assegure uma correlação casual, os dados sugerem que os níveis aumentados de atividade de IDO estão associados com outras vias de ativação.

A associação inversa entre os baixos níveis de IFN- γ e o aumento da atividade de IDO também sugerem que nas gestantes transplantadas outra citocina pode estar assumindo um papel de destaque na modulação da IDO através de uma via alternativa.

Esses dados favorecem a possibilidade de que os compartimentos placentários podem responder diferencialmente à influencia das drogas imunossupressoras após o transplante renal. A redução na atividade de IDO na vilosidade coriônica nas gestantes transplantadas pode representar o efeito direto da terapia imunossupressora das células placentárias ou ainda uma estratégia de prevenir os efeitos da superexposição à quinurenina. Enquanto que os níveis aumentados de atividade da IDO na região decidual parecem garantir mecanismos

de tolerância independente da terapia imunossupressora.

Em suma, a diversidade da resposta placentária em relação à atividade da IDO e conseqüentemente aos mecanismos de tolerância gestacional apresentada pelos compartimentos placentários em gestantes transplantadas sugerem vias específicas e diferenciais na interface materno-fetal, cuja compreensão poderá contribuir para minimizar o risco de desordens gestacionais nessas mulheres e as possíveis implicações da aplicação clínica dos imunossupressores.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

- a. Gestantes transplantadas apresentam diferenças na expressão e atividade da IDO na interface materno-fetal, possivelmente devido ao uso de imunossupressores.
- b. Na região vilosa a expressão e atividade da IDO mostraram-se diminuídas, assim como a transcrição nuclear de NF- κ B, o que foi acompanhado de valores inalterados de IFN- γ e IL10 nas gestantes transplantadas.
- c. A diminuição da expressão da IDO na região vilosa na interface com o sangue materno (sinciciotrofoblasto), mas não nos componentes intra-vilosos sugere uma resposta diferencial e tecido-dependente com a terapia utilizada.
- d. Na região decidual a expressão e a atividade da IDO em gestantes transplantadas estão aumentadas, mas não associadas aos níveis de IFN- γ e IL-10 e de ativação do NF- κ B, o que indica a ativação por meio de mecanismos alternativos.
- e. Os níveis aumentados de atividade da IDO na região decidual parecem garantir mecanismos de tolerância independente da terapia imunossupressora.

REFERÊNCIAS*

- ABOAGYE-MATHIESEN, G.; TOTH, F. D.; HAGER, H.; ZDRAVKOVIC, M.; PETERSEN, P. M.; VILLADSEN, J. A.; ZACHAR, V.; EBBESEN, P. Human trophoblast interferons. **Antiviral Res.**, v. 22, p. 91-105, 1993.
- ALLEGRI, G.; RAGAZZI, E.; BERTAZZO, A.; COSTA, C. V.; ROCCHI, R. Tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in rats. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 527, p. 481-496, 2003.
- ARMENTI, V. T.; MORITZ, M. J.; CARDONICK, E. H.; DAVISON, J. M. Immunosuppression in pregnancy: choices for infant and maternal health. **Drugs.**, v. 62, n. 16, p. 2361-2375, 2002.
- ARMENTI, V. T.; RADOMSKI, J. S.; MORITZ, M. J.; GAUGHAN, W. J.; GULATI, R.; MCGRORY, C. H.; COSCIA, L. A. Report from the National Transplantation Pregnancy Registry (NTPR): outcomes of pregnancy after transplantation. **Clin. Transpl.**, p. 69-83, 2005.
- AYATOLLAHI, M.; GERAMIZADEH, B.; YAZDANI, M.; AZARPIRA, N. Effect of the immunoregulatory cytokines on successful pregnancy depends upon the control of graft rejection mechanisms. **Transplant. Proc.**, v. 39, n. 1, p. 244-245, 2007.
- BABCOCK, T. A.; CARLIN, J. M. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. **Cytokine**, v. 12, n. 6, p. 588-594, 2000.
- BABAN, B.; CHANDLER, P. R.; SHARMA, M. D.; PIHKALA, J.; KONI, P. A.; MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. **J. Immunol.**, v. 15, n. 4, p. 2475-2483, 2009.
- BATTAGLIA, F. C.; LUBCHENCO, L. O. A practical classification of newborn infants by birthweight and gestational age. **J. Pediatr.**, v. 71, p. 159-169, 1967.
- BATTAGLIA, M. Potential T regulatory cell therapy in transplantation: how far have we come and how far can we go? **Transpl. Int.**, v. 3, n. 8, p. 761-770, 2010.
- BATES, M. D.; QUENBY, S.; TAKAKUWA, K.; JOHNSON, P. M.; VINCE, G. S. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss? **Hum. Reprod.**, v. 17, n. 9, p. 2439-2444, 2002.
- BENGHIAT, F. S.; GRACA, L.; BRAUN, M. Y.; DETIENNE, S.; MOORE, F.; BUONOCORE, S.; FLAMAND, V.; WALDMANN, H.; GOLDMAN, M.; LE MOINE, A. Critical influence of natural regulatory CD25+ T cells on the fate of allografts in the absence of immunosuppression. **Transplantation**, v. 27, n. 6, p. 648-654, 2005.

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

BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P.; BAERGEN, R. Microscopic Survey. In - -----
Pathology of human placenta. 5. ed. Local: New York. Springer, 2006. p. 16-24.

BLASCHITZ, A.; GAUSTER, M.; FUCHS, D.; LANG, I.; MASCHKE, P.; ULRICH, D.; KARP, E.; TAKIKAWA, O.; SCHIMEK, M. G.; DOHR, G.; SEDLMAYR, P. Vascular endothelial expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 forms a positive gradient towards the feto-maternal interface. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21774, 2011.

BLES, N.; HORCKMANS, M.; LEFORT, A.; LIBERT, F.; MACOURS, P.; EL HOUSNI, H.; MARTEAU, F.; BOEYNAEMS, J. M.; COMMUNI, D. Gene expression profiling defines ATP as a key regulator of human dendritic cell functions. **J. Immunol.**, v. 179, n. 6, p. 3550-3558, 2007.

BODAGHI, B.; GOUREAU, O.; ZIPETO, D.; LAURENT, L.; VIRELIZIER, J. L.; MICHELSON, S. Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. **J. Immunol.**, v. 162, n. 2, p. 957-964, 1999.

BOYD, J. D.; HAMILTON, W. J. **The human placenta**. Cambridge: W Heffer & Sons, 1970.

BRANDACHER, G.; WINKLER, C.; SCHNEENERGER, S.; WERNER, E. R.; WERNER-FELMAYER, G.; MARGREITER, R. Calcineurin inhibitors but not rapamycin abrogate activation of the immunomodulatory enzyme Indoleamine 2,3-dioxygenase, In: Congresso da Sociedade Alemã de Cirurgia. <http://www.egms.de/en/meetings/dgch2005/05dgch561.shtml>, 2005, Munique.

BRUNET, M.; CAMPISTOL, J. M.; MILLÁN, O. Pharmacokinetic and pharmacodynamic correlations of cyclosporine therapy in stable renal transplant patients: evaluation of long-term target C2. **Int. Immunopharmacol.**, v. 3, n. 7 p. 987-999, 2003.

BURKIN, D. J.; KIMBRO, K. S.; BARR, B. L.; JONES, C.; TAYLOR, M. W.; GUPTA, S. L. Localization of the human indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) gene to the pericentromeric region of human chromosome 8. **Genomics**, v. 17, n. 1, p. 262-263, p. 1993.

CABERO, L.; SOLA, R.; BALLARIN, J. A.; ESTEBAN-ALTIRRIBA, J. Renal transplantation during pregnancy--a case report. **J. Perinat. Med.**, v. 16, n. 2, p. 149-151, 1988.

CARDONICK, E.; MORITZ, M.; ARMENTI, V. Pregnancy in patients with organ transplantation: a review. **Obstet. Gynecol. Surv.**, v. 59, n. 3, p. 214-222, 2004.

CHAOUAT, G.; LÉDÉE-BATAILLE, N.; ZOURBAS, S.; OSTOJIC, S.; DUBANCHET, S.; MARTAL, J.; FRYDMAN R. Cytokines, implantation and early abortion: re-examining the Th1/ Th2 paradigm leads to question the single pathway, single therapy concept. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 50, n. 3, p. 177-186, 2003.

CHARNOCK-JONES, D. S.; KAUFMANN, P.; MAYHEW, T. M. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular recognition. **Placenta**, v. 25, p. 103–113, 2004.

CHENOWETH, M. J.; MIAN, M. F.; BARRA, N. G.; ALAIN, T.; SONENBERG, N.; BRAMSON, J.; LICHTY, B. D.; RICHARDS, C. D.; MA, A.; ASHKAR, A. A. IL-15 can signal via IL-15R α , JNK, and NF- κ B to drive RANTES production by myeloid cells. **J Immunol.**, v. 1, n. 9, 4149-57, 2012.

CHOI, Y. S.; PARK, J. A.; KIM, J.; RHO, S. S.; PARK, H.; KIM, Y. M.; KWON, Y. G. Nuclear IL-33 is a transcriptional regulator of NF- κ B p65 and induces endothelial cell activation. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 4, n. 421, p. 305-311, 2012.

CHRISTMAS, D. M.; BADAWY, A. A.; HINCE, D.; DAVIES, S. J.; PROBERT, C.; CREED, T.; SMITHSON, J.; AFZAL, M.; NUTT, D. J.; POTOKAR, J. P. Increased serum free tryptophan in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. **Nutr. Res.**, v. 30, n. 10, p. 678-688, 2010.

CHU, Z.; ZHANG, J.; ZHAO, Y.; JI, Q.; ZHONG, J.; ZHANG, C.; ZHANG, B. Influence of immunosuppressive drugs on the development of CD4(+) CD25 (high) Foxp3(+) T cells in liver transplant recipients. **Transplant. Proc.**, v. 42, n. 7, p. 2599-2601, 2010.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **J. Immunol.**, v. 1, n. 9, p. 5771-5777, 2008.

CURIEL, T. J.; WEI, S.; DONG, H.; ALVAREZ, X.; CHENG, P.; MOTTRAM, P.; KRZYSIEK, R.; KNUTSON, K. L.; DANIEL, B.; ZIMMERMANN, M. C.; DAVID, O.; BUROW, M.; GORDON, A.; DHURANDHAR, N.; MYERS, L.; BERGGREN, R.; HEMMINKI, A.; ALVAREZ, R. D.; EMILIE, D.; CURIEL, D. T.; CHEN, L.; ZOU, W. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. **Nat. Med.**, v.9, n.5, p. 562-567, 2003.

CURTI, A.; TRABANELLI, S.; SALVESTRINI, V.; BACCARANI, M.; LEMOLI, R. M. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance focus on hematology. **Blood**, v. 113, p. 2394-2401, 2009.

DAVISON, J. M. Dialysis, transplantation, and pregnancy. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 17, n. 2, p. 127-132, 1991.

DAVISON, J. M.; BAILEY, D. J. Pregnancy following renal transplantation. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 29, n. 4, p. 227-233, 2003.

DE BOER, N. K.; JARBANDHAN, S. V.; DE GRAAF, P.; MULDER, C. J.; VAN ELBURG, R. M.; VAN BODEGRAVEN, A. A. Azathioprine use during pregnancy: unexpected intrauterine exposure to metabolites. **Am. J. Gastroenterol.**, v.101, n.6, p. 1390-1392, 2006.

DEJEAN, A. S.; BEISNER, D. R.; CHEN, I. L.; KERDILES, Y. M.; BABOUR, A.; ARDEN, K. C.; CASTRILLON, D. H.; DE PINHO, R. A.; HEDRIC, S. M. Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses bymodulating the function of dendritic cells. **Nat. Immunol.** v.10, p. 504-513, 2009.

DENERIS, E. S.; WYLER, S. C. Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health. **Nat. Neurosci.**, v. 15, n. 4, p. 519-527, 2012.

DENNEY, J. M.; NELSON, E. L.; WADHWA, P. D.; WATERS, T. P.; MATHEW, L.; CHUNG, E. K.; GOLDENBERG, R. L.; CULHANE, J. F. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. **Cytokine**, v. 53, n. 2, p. 170-177, 2011.

DE WALL MALEFYT, R.; HAANEN, J.; SPITS, H.; RONCAROLO, M. G.; TE VELDE, A.; FIGDOR, C.; JOHNSON, K.; KASTELEIN, R.; YSSEL, H.; DE VRIES, J. E. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J. Exp. Med.**, v. 1, n. 4, p. 915-24, 1991.

DHARANE NEÉ LIGAM, P.; MANUELPIILLAI, U.; WALLACE, E.; WALKER, D. W. NFkB-dependent increase of kynurenine pathway activity in human placenta: inhibition by sulfasalazine. **Placenta**, v. 31, n. 11, p. 997-1002, 2010.

DIVANOVIC, S.; SAWTELL, N. M.; TROMPETTE, A.; WARNING, J. I.; DIAS, A.; COOPER, A. M.; YAP, G. S.; ARDITI, M.; SHIMADA, K.; DUHADAWAY, J. B.; PRENDERGAST, G. C.; BASARABA, R. J.; MELLOR, A. L.; MUNN, D. H.; ALIBERTI, J.; KARP, C. L. Opposing biological functions of tryptophan catabolizing enzymes during intracellular infection. **J. Infect. Dis.**, v. 1, n. 205, p. 152-161, 2012.

DU, M. R.; DONG, L.; ZHOU, W. H.; YAN, F. T.; LI, D. J. Cyclosporin a improves pregnancy outcome by promoting functions of trophoblasts and inducingmaternal tolerance to the allogeneic fetus in abortion-prone matings in the mouse. **Biol. Reprod.**, v. 76, n. 5, p. 906-914, 2007.

DU, M. R.; ZHOU, W. H.; DONG, L.; ZHU, X. Y.; HE, Y. Y.; YANG, J. Y.; LI, D. J. Cyclosporin A promotes growth and invasiveness in vitro of human first-trimester trophoblastcells via MAPK3/MAPK1-mediated AP1 and Ca2+/calcineurin/NFAT signaling pathways. **Biol. Reprod.**, v. 78, n. 6, p. 1102-1110, 2008.

DUNN, C. L.; KELLY, R. W.; CRITCHLEY, H. O. Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. **Reprod. Biomed.**, v. 7, n. 2, p. 151-161, 2003.

DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n.11, p. 836-848, 2006.

EIWEGGER, T.; GRUBER, S.; GEIGER, C.; MAYER, E.; DEHLINK, E.; BANNERT, C.; FRISCHER, T.; KASPER, D.; JAKSCH, P.; KLEPETKO, W.; AKDIS, C.; SZÉPFALUSI, Z. Impact of systemic immuno-suppression after solid organ transplantation on allergen-specific responses. **Allergy**, v. 66, n. 2, p. 271-278, 2011.

FINGER, E. B.; BLUESTONE, J. A. When ligand becomes receptor--tolerance via B7 signaling on DCs. **Nat. Immunol.**, v.3, n.11, p.1056-1057, 2002.

FISHMAN, J. A.; RUBIN, R. H.; Infection in organ-transplant recipients. **N. Engl. J. Med.** v. 338, n. 24, p. 1741-1751, 1998.

GONEN-GROSS, T.; GOLDMAN-WOHL, D.; HUPPERTZ, B.; LANKRY, D.; GREENFIELD, C.; NATANSON-YARON, S.; HAMANI, Y.; GILAD, R.; YAGEL, S.; MANDELBOIM, O. Inhibitory NK receptor recognition of HLA-G: regulation by contact residues and by cell specific expression at the fetal-maternal interface. **PLoS One**, v. 28, p. e8941, 2010.

GORGULU, N.; YELKEN, B.; CALISKAN, Y.; TURKMEN, A.; SERVER, M. S. Does pregnancy increase graft loss in female renal allograft recipients? **Clin Exp. Nephrol.**, v. 14, n. 3, p. 244-247, 2010.

GROEBNER, A. E.; SCHULKE, K.; SCHEFOLD, J. C.; FUSCH, G.; SINOWATZ, F.; REICHENBACH, H. D.; WOLF, E.; MEYER, H. H.; ULBRICH, S. E. Immunological mechanisms to establish embryo tolerance in early bovine pregnancy. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 23, n. 5, p. 619-632, 2011.

GROHMANN, U.; ORABONA, C.; FALLARINO, F.; VACCA, C.; CALCINARO, F.; FALORNI, A.; CANDELORO, P.; BELLADONNA, M. L.; BIANCHI, R.; FIORETTI, M. C.; PUC CETTI, P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 11, p. 1097-1101, 2002.

GROHMANN, U.; FALLARINO, F.; PUC CETTI, P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. **Trends Immunol.**, v. 24, n. 5, p. 242-248, 2003.

GROHMANN, U.; VOLPI, C.; FALLARINO, F.; BOZZA, S.; BIANCHI, R.; VACCA, C.; ORABONA, C.; BELLADONNA, M. L.; AYROLDI, E.; NOCENTINI, G.; BOON, L.; BISTONI, F.; FIORETTI, M. C.; ROMANI, L.; RICCARDI, C.; PUC CETTI, P. Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. **Nat. Med.**, v. 13, n. 5, p. 579-586, 2007.

GUPTA, S. L.; CARLIN, J. M.; PYATI, P.; DAI, W.; PFEFFERKORN, E. R.; MURPHY, M. J. JR. Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 6, p. 2277-2284, 1994.

GUIBOURDENCHE, J.; FOURNIER, T.; MALASSINÉ, A.; EVAIN-BRION, D. Development and hormonal functions of the human placenta. **Folia Histochem. Cytobiol.**, v. 47, n. 5, p. S35-S40, 2009.

GULERIA, I.; SAYEGH, M. H. Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance. **J. Immunol.**, v. 178, n. 6, p. 3345-3351, 2007.

GULLER, S.; LACHAPELLE, L. The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces. **Semin. Reprod. Endocrinol.**, v. 17, n. 1, p. 39-44, 1999.

HAANTRA, K. G.; WUBBEN, J. A.; KOREVAAR, S. S.; KONDOVA, I.; BAAN, C. C.; JONKER, M. Expression patterns of regulatory T-cell markers in accepted and rejected nonhuman primate kidney allografts. **Am. J. Transplant.**, v. 7, n. 10, p. 2236-2246, 2007.

HADFIELD, K. A.; MCCRAKEN, S. A.; ASHTON, A. W.; NGUYEN, T. G.; MORRIS, J. M. Regulated suppression of NF- κ B throughout pregnancy maintains a favourable cytokine environment necessary for pregnancy success. **J. Reprod. Immunol.**, v. 89, n. 1, p. 1-9, 2011.

HANNA, N.; HANNA, I.; HLEB, M.; WAGNER, E.; DOUGHERTY, J.; BALKUNDI, D.; PADBURY, J.; SHARMA, S.; Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. **J. Immunol.** v. 1, n. 11, p. 5721-5728, 2000.

HAYASHI, T.; RAO, S. P.; TAKABAYASHI, K.; VAN UDEN, J. H.; KORNBLUTH, R. S.; BAIRD, S. M.; TAYLOR, M. W.; CARSON, D. A.; CATANZARO, A.; RAZ, E. Enhancement of innate immunity against Mycobacterium avium infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 10, p. 6156-6164, 2001.

HEIKKINEN, J.; MÖTTÖNEN, M.; ALANEN, A.; LASSILA, O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 136, n. 2, p. 373-378, 2004.

HESELER, K.; SPEKKER, K.; SCHMIDT, S. K.; MACKENZIE, C. R.; DAUBENER, W. Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN-gamma-induced tryptophan degradation. **Immunol. Med. Microbiol.**, v.52, n. 2, p. 273-281, 2008.

HIRACHAN, P.; PANT, S.; CHHETRI, R.; JOSHI, A.; KHAREL, T.; ARAB, J. Renal transplantation and pregnancy. **Nephrol. Transplant.** v. 5, n. 1, p. 41-46. 2012.

HOSHI, M.; MATSUMOTO, K.; ITO, H.; OHTAKI, H.; ARIOKA, Y.; OSAWA, Y.; YAMAMOTO, Y.; MATSUNAMI, H.; HARA, A.; SEISHIMA, M.; SAITO, K. L-Tryptophan-Kynurenine Pathway Metabolites Regulate Type I IFNs of Acute Viral Myocarditis in Mice. **J. Immunol.**, v. 188, n. 8, p. 3980-3987, 2012.

HÖNIG A, RIEGER L, KAPP M, SÜTTERLIN M, DIETL J, KÄMMERER U. Indoleamine 2,3dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance. **J. Reprod. Immunol.**, v. 61, n. 2, p. 79-86, 2004.

HONIG, A.; RIEGER, L.; KAPP, M.; DIETL, J.; KAMMERER, U. Immunohistochemistry in human placental tissue--pitfalls of antigen detection. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 53, n. 11, p. 1413-1420, 2005.

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

HUPPERTZ, B. The anatomy of the normal placenta. **J. Clin. Pathol.**, v. 61, n. 12, p.1296-1302, 2008.

JANSSEN, N. M.; GENTA, M. S. The effects of immunosuppressive and anti-inflammatory medications on fertility, pregnancy, and lactation. **Arch. Intern. Med.**, v. 160, n. 5, p. 610-619, 2000.

JOSS, A.; AKDINS, M.; FAITH, A.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, n. 6, p. 1683-1690, 2000.

JUDY, J. T.; SEIFUDDIN, F.; MAHON, P. B.; HUO, Y.; GOES, F. S.; JANCIC, D.; SCHWEIZER, B.; MONDIMORE, F. M.; MACKINNON, D. F.; DEPAULO, J. R. JR.; GERSHON, E. S.; MCMAHON, F. J.; CUTLER, D. J.; ZANDI, P. P.; POTASH, J. B.; WILLOUR, V. L. Association study of serotonin pathway genes in attempted suicide. **Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.**, v. 159B, n. 1, p. 112-119, 2012.

KAMIMURA, S.; EGUCHI, K.; YOBIZAWA, M.; SEKIBA, K. Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. **Acta Med. Okayama**, v. 45, n.3, p. 135-139, 1991.

KIERSZENBAUM, A. L., Fertilização, Placentação e Lactação. In:____ **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2004. cap. 23, p 621-642.

KOENEN, H. J.; JOOSTEN, I. Antigen-specific regulatory T-cell subsets in transplantation tolerance regulatory T-cell subset quality reduces the need for quantity. **Hum. Immunol.**, v. 67, n. 9, p. 665-675, 2006.

KLEIN, J. O.; REMINGTON, J. S.; MARCY, S. M. An introduction to infection of the fetus and newborn infants. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O., (Eds) **Infectious diseases of the fetus and newborn**. Philadelphia: Saunders, 1976. p. 1-32.

KUDO, Y.; BOYD, C. A.; SARGENT, I. L.; REDMAN, C. W. Tryptophan degradation by human placental indoleamine 2,3-dioxygenase regulates lymphocyte proliferation. **J. Physiol.**, v. 15, n. 535, p. 207-215, 2001.

KUDO, Y.; BOYD, C.A.; SARGENT, I. L.; REDMAN, C. W. Decreased tryptophan catabolism by placental indoleamine 2,3-dioxygenase in preeclampsia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 188, n. 3, p. :719-726, 2003.

KUDO, Y.; BOYD, C. A.; SPYROPOULOU, I.; REDMAN, C. W.; TAKIKAWA, O.; KATSUKI, T.; HARA, T.; OHAMA, K.; SARGENT, I. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. **J. Reprod. Immunol.**, v. 61, n. 2, p. 87-98, 2004a.

KUDO, Y.; HARA, T.; KATSUKI, T.; TOYOFUKU, A.; KATSURA, Y.; TAKIKAWA, O.; FUJII, T.; OHAMA, K. Mechanisms regulating the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase during decidualization of human endometrium. **Hum. Reprod.**, v. 19, n. 5, p. 1222-1230, 2004b.

LAPPAS, M.; PERMEZEL, M.; GEORGIU, H. M.; RICE, G. E. Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro. **Biol Reprod.**, v. 2, n. 67, p. 668-673, 2002.

LASH, G. E.; NARUSE, K.; ROBSON, A.; INNES, B. A.; SEARLE, R. F.; ROBSON, S. C.; BULMER, J. N. Interaction between uterine natural killer cells and extravillous trophoblast cells: effect on cytokine and angiogenic growth factor production. **Hum. Reprod.**, v. 26, n. 9, p. 2289-2295, 2011.

LIGAM, P.; MANUELPIILLAI, U.; WALLACE, E. M.; WALKER, D. Localisation of indoleamine 2,3-dioxygenase and kynurenine hydroxylase in the human placenta and decidua: implications for role of the kynurenine pathway in pregnancy. **Placenta**, v. 26, n. 6. p. 498-504, 2005.

LIN, H.; MOSMANN, T. R.; GUILBERT, L.; TUNTIPOIPAT, S.; WEGMANN, T. G. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal–fetal interface. **J. Immunol.**, v. 151, n. 9, p. 4562–4573, 1993.

LOPEZ, H.; BENARD, M.; SAINT-AUBERT, E.; BARON, M.; MARTIN, H.; AL SAATI, T.; PLANTAVID, M.; DUGA-NEULAT, I.; BERREBI, A.; CRISTINI, C.; ARNAUD, C.; DAVRINCHE, C.; DAVIGNON, J.L.; CASPER, C. Novel model of placental tissue explants infected by cytomegalovirus reveals different permissiveness in early and term placentae and inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. **Placenta**, v. 32, n. 7, p. 522-530, 2011.

LUNDSFORD, K. E.; BARBAS, A. S.; BRENNAN, T. V. Recent advances in immunosuppressive therapy for prevention of renal allograft rejection. **Curr Opin. Organ. Transplant.**, v. 16, n.4, 390-397, 2011.

LUNGUI, L.; FERRETTI, M, E.; MEDICO, S.; BIONDI, C. VESCE, F. Control of human trophoblast function. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 8, p. 5-6, 2007.

MACKENZIE, C. R.; HADDING, U.; DÄUBENER, W. Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 3, p. 875-878, 1998.

MACKENZIE, C. R.; HESELER, K.; MULLER, A.; DAUBENER, W. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. **Curr. Drug Metab.**, v. 8, n. 3, p. 237-244, 2007.

MACKLER, A. M.; BARBER, E. M.; TAKIKAWA, O.; POLLARD, J. M. Indoleamine 2,3-dioxygenase is regulated by IFN-gamma in the mouse placenta during *Listeria monocytogenes* infection. **J. Immunol.**, v. 15, n. 2, p. 823-830, 2003.

MCKAY, D. B.; JOSEPHSON, M. A. Pregnancy in recipients of solid organs-effects on mother and child. **N. Engl. J. Med.**, v. 23, n. 12, p. 1281-1293. 2006.

MAKALA, L. H. The role of indoleamine 2, 3 dioxygenase in regulating host immunity to leishmania infection. **J. Biomed. Sci.**, v.9, n.19, 2012.

MASTROBATTISTA, J. M.; KATZ, A. R. Pregnancy after organ transplant. **Obstet. Gynecol. Clin. North Am.**, v. 31, n. 2, p. 415-428, 2004.

MEDAWAR, P. B. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. **Symp. Soc. Exp. Biol.**, v.7, p. 320-338, 1953.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? **Immunol. Today**, v. 20, n.10, p. 469-473, 1999.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal anti-fetal immuneresponses. **J. Reprod. Immunol.**, v. 52, n. 1-2, p. 5-13, 2001.

MELLOR, A. L.; CHANDLER, P.; LEE, G. K.; JOHNSON, T.; KESKIN, D. B.; LEE, J.; MUNN, D. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy. **J. Reprod. Immunol.**, v. 57, p. 143-150, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil); **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Transplantes Renais-Medicamentos Imunossupressores**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pcdt_transplante_renal.pdf Acesso: 05.07.09.

MIRANDA, C. T.; MELARANGNO, C.; CAMARA, N. O.; PACHECO-SILVA, A.; MEDINA-PESTANA, P. J. Adverse effects of pregnancy on renal allograft function. **Transplant. Proc.**, v. 34, n. 2, p. 506-507, 2002.

MOLD, J. E.; MICHAELSSON, J.; BURT, T. D.; MUENCH, M. O.; BECKERMAN, K. P.; BUSCH, M. P.; LEE, T. H.; NIXON, D. F.; MCCUNE, J. M. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. **Science**, v. 5, p. 1562-1565, 2008.

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

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

MULLER, A. J.; DUHADAWAY, J. B.; DONOVER, P. S.; SUTANTO-WARD, E.; PRENDERGAST, G. C. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. **Nat. Med.**, v. 11, n. 3, p. 312-319, 2005.

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

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

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; LEE, J. R. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. **Science**, v.297, p. 1867-1870, 2002.

MURRAY, J. E.; REID, D. E.; HARRISON, J. H.; MERRILL, J. P. Successful pregnancies after human renal transplantation. **N. Engl. J. Med.**, v. 269, p. 341-343, 1963.

NARUSE, K.; INNES, B. A.; BULMER, J. N.; ROBSON, S. C.; SEARLE, R. F.; LASH, G. E. Secretion of cytokines by villous cytotrophoblast and extravillous trophoblast in the first trimester of human pregnancy. **J. Reprod. Immunol.**, v. 86, n. 2, p. 148-150, 2010.

OKADA, S. S. **Regulação cruzada entre peroxidases e indolamina 2, 3 dioxigenase no controle da metabolização do triptofano.** 2010. 165 f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, L. G.; SASS, N.; SATO, J. L.; OZAKI, K. S.; MEDINA-PESTANA, J. O. Pregnancy after renal transplantation--a five-year single-center experience. **Clin. Transplant.**, v.21, n. 3, p. 301-304, 2007.

PALLOTTA, M. T.; ORABONA, C.; VOLPI, C.; VACCA, C.; BELLADONNA, M. L.; BIANCHI, R.; SERVILLO, G.; BRUNACCI, C.; CALVITTI, M.; BICCIATO, S.; MAZZA, E. M.; BOON, L.; GRASSI, F.; FIORETTI, M. C.; FALLARINO, F.; PUC CETTI, P.; GROHMANN, U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. **Nat. Immunol.**, v. 12, n. 9, p. 870-878, 2011.

PARIA, B. C.; MA, W.; TAN, J.; RAJA, S.; DAS, S. K.; DEY, S. K.; HOGAN, B. L. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, n. 3, p. 1047-1052. 2001.

PERALES-PUCHALT, A.; VILA VIVES, J. M.; LÓPEZ MONTES, J.; DIAGO ALMELA, V. J.; PERALES, A. Pregnancy outcomes after kidney transplantation-immunosuppressive therapy comparison. **J. Matern. Fetal Neonatal Med.**, v. 25, n. 8, p.1363-1366, 2011.

PETROFF, M. G.; CHEN, L.; PHILLIPS, T. A.; AZZOLA, D.; SEDLMAYR, P. HUNT, J. S. B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. **Biol. Reprod.**, v. 68, n. 5, p. 1496-1504, 2003.

PÉRGOLA, P. E.; KANCHARLA, A.; RILEY, D. J. Kidney transplantation during the first trimester of pregnancy: immunosuppression with mycophenolate mofetil, tacrolimus, and prednisone. **Transplantation**, v. 71, n. 7, p. 994-997, 2001.

PF AFF, A. W.; MOUSLI, M.; SENEGAS, A.; MARCELLIN, L.; TAKIKAWA, O.; KLEIN, J. P.; CANDOLFI, E. Impact of foetus and mother on IFN-gamma-induced indoleamine 2,3-dioxygenase and inducible nitric oxide synthase expression in murine placenta following *Toxoplasma gondii* infection. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, n. 2, p. 249-258, 2008.

PFEFFERKORN, E. R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 81, n. 3, p. 908-912, 1984.

PICCINNI, M. P. T-cell cytokines in pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 47, n.5, p. 289-294, 2002.

PICCOTTI, J. R.; CHAN, S. Y.; VANBUSKIRK, A. M.; EICHWALD, E. J.; BISHOP, D.K. Are Th2 helper T lymphocytes beneficial, deleterious or irrelevant in promoting allograftsurvival? **Transplantation**, v.63, n. 5, p. 619-624, 1997.

RAFICE, S. A.; CHAUHAN, N.; EFIMOV, I.; BASRAN, J.; RAVEN, E. L. Oxidation of L-tryptophan in biology: a comparison between tryptophan 2,3-dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase. **Biochem. Soc.Trans.**, v. 37, n. pt. 2, p.408-412, 2009.

REMYNGTON, J. S.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. **Infectious diseases of the foetus and the newborn** In_____ REMYNGTON, J. S.; KLEIN, J. O., (Eds). Philadelphia: Saunders, 1976. p. 191- 332.

ROBINSON, C. M.; SHIREY, K. A.; CARLIN, J. M. Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 23, n. 8, p. 413-421 2003.

ROBINSON, C. M.; HALE, P. T.; CARLIN, J. M. NF-kappa B activation contributes to indoleamine dioxygenase transcriptional synergy induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **Cytokine**, v. 35, n.1-2, p. 53-61, 2006.

ROSTAING, L.; PUYOO, O.; TKACZUK, J. Differences in type 1 and type 2 intracytoplasmic cytokines, detected by flow cytometry, according to immunosuppression (Cyclosporine A vs. Tacrolimus) in stable renal allograft recipients. **Clin. Transplant.**, v. 13, p. 400-409, 1999.

SADLER, T. W. Embriologia geral. In:_____ **Langman Embriologia médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan; 2004. p 3-99.

SAINI, V.; ARORA, S.; YADAV, A.; BHATTACHARJEE, J. Cytokines in recurrent pregnancy loss. **Clin. Chim. Act.**, v. 412, n. 9-10, p. 702-708, 2011.

SCHANDENÉ, L.; ALONSO-VEGA, C.; WILLEMS, F.; GÉRARD, C.; DELVAUX, A.; VELU, T.; DEVOS, R.; DE BOER, M.; GOLDMAN, M. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. **J. Immunol.**, v. 152, n. 9, p. 4368-4374, 1994.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell.**,v. 101, n.5, p. 455-458, 2004.

SANTOSO, D. I.; ROGERS, P.; WALLACE, E. M.; MANUELPIILLAI, U.; WALKER, D.; SUBAKIR, S. B. Localization of indoleamine 2,3-dioxygenase and 4-hydroxynonenal in normal and pre-eclamptic placentae. **Placenta**, v. 23, n. 5, p. 373-379. 2002.

SCHMIDT, A.; OBERLE, N.; WEISS, E. M.; VORBIS, D.; FRISCHBUTTER, S.; BAUMGRASS, R.; FALK, C. S.; HAAG, M.; BRUGGER, B.; LIN, H.; MAYR, G. W.; REICHARDT, P.; GUNZER, M.; SURI-PAYER, E.; KRAMMER, P. H. Human regulatory T cells rapidly suppress T cell receptor-induced Ca(2+), NF-κB, and NFAT signaling in conventional T cells. **Sci. Signal.**, n. 4, ra90, 2011.

SCHMIDT, A.; OBERLE, N.; KRAMMER, P. H. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. **Front. Immunol.**, v. 3, n. 51, 2012.

SCHWARCZ, R.; PELLICCIARI, R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 303, n. 1, p. 1-10, 2002.

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

SHARMA, M. D.; HOU, D. Y.; LIU, Y.; KONI, P. A.; METZ, R.; CHANDLER, P.; MELLOR, A. L.; HE, Y.; MUNN, D. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes.

Blood, v. 113, n. 24, p. 6102-6111, 2009.

SOLÁ, R.; ALARCÓN, A.; JIMÉNEZ, C.; OSUNA, A. The influence of delayed graft function. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 19 Suppl 3, p. 32-37, 2004.

SOMERSET, D. A.; ZHENG, Y.; KILBY, M. D.; SANSOM, D. M.; DRAYSON, M. T. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. **Immunology**, v. 112, n. 1, p. 38-43, 2004.

SUGIMOTO, H.; ODA, S.; OTSUKI, T.; HINO, T.; YOSHIDA, T.; SHIRO, Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 8, p. 2611-2616, 2006.

TAJIMA, K.; AMAKAWA, R.; ITO, T. Immunomodulatory effects of cyclosporin A on human peripheral blood dendritic cell subsets. **Immunology**, v. 108, p. 321-328, 2003.

TERNESS, P.; BAUER, T. M.; RÖSE, L.; DUFTER, C.; WATZLIK, A.; SIMON, H.; OPELZ, G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **J. Exp. Med.**, v. 196, n. 4, p. 447-457, 2002.

THELLIN, O.; HEINEN, E. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. **Toxicology**, v. 185, n. 3, p. 179-184, 2003.

THOMPSON, B. C.; KINGDON, E. J.; TUCK, S. M.; FERNANDO, O. N.; SWENY, P. Pregnancy in renal transplant recipients: the Royal Free Hospital experience. **Q. J. Med.**, v. 96, n. 11, p. 837-844, 2003.

UMANS, J. G. Medications during pregnancy: antihypertensives and immunosuppressives. **Adv. Chronic Kidney Dis.**, v. 14, n. 2, p. 191-198, 2007.

VACCHIO, M. S.; HODES, R. J. Fetal expression of Fas ligand is necessary and sufficient for induction of CD8 T cell tolerance to the fetal antigen H-Y during pregnancy. **J. Immunol.**, v. 174, n. 8, p. 4657-4661, 2005.

VARFOLOMEEV, E.; GONCHROY, T.; MAECKER, H.; ZOBEL, K.; KOMUVES, L. G.; DESHAYES, K.; VUCIC, D. Cellular inhibitors of apoptosis are global regulators of NF- κ B and MAPK activation by members of the TNF family of receptors. **Sci Signal.**, v. 5, ra22, 2012.

VELÁSQUEZ, S. Y.; GARCÍA, L. F.; ALVAREZ, C. M. Regulatory T cells and their influence in kidney allograft survival. **Medicina**, v. 67, n. 5, p. 491-501, 2007.

VON BUBNOFF, D.; BIEBER, T. The indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) pathway controls allergy. **Allergy**, v.67, n.6, p. 718-725, 2012.

VON RANGO, U.; KRUSCHE, C. A.; BEIER, H. M.; CLASSEN-LINKE, I. Indoleamine-dioxygenase is expressed in human decidua at the time maternal tolerance is established. **J. Reprod. Immunol.**, v. 74, n. 1-2, p. 34-45, 2007.

VON RANGO, U. Fetal tolerance in human pregnancy--a crucial balance between acceptance and limitation of trophoblast invasion. **Immunol. Lett.**, v. 115, n. 1, p. 21-32, 2008.

XIA, G.; SHAH, M.; LUO, X. Prevention of allograft rejection by amplification of Foxp3(+)CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **Transl. Res.**, v. 153, n. 2, p. 60-70, 2009.

WANG, Y.; LIU, H.; MCKENZIE, G.; WITTING, P. K.; STASCH, J. P.; HAHN, M.; CHANGSIRIVATHANATHAMRONG, D.; WU, B. J.; BALL, H. J.; THOMAS, S. R.; KAPOOR, V.; CELERMAJER, D. S.; MELLOR, A. L.; KEANEY, J. F. JR.; HUNT, N. H.; STOCKER, R. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. **Nat. Med.**, v. 16, n. 3, p. 279-285. Erratum in: *Nat. Med.*, v. 16, n. 5, p. 607, 2010.

WASOWSKA, B. A.; ZHENG, X. X.; STROM, T. B. Adjunctive rapamycin and CsA treatment inhibits monocyte/ macrophage associated cytokines/ chemokines in sensitized cardiac graft recipients. **Transplantation**, v. 71, p. 1179-1183, 2001.

WEGMANN, T.G. Foetal protection against abortion: is it immunosuppression or immunostimulation? **Ann. Immunol.**, v. 135D, n. 3, p. 309-312, 1984.

WICHEREK, L.; BASTA, P.; PITYSKI, K.; MARIANOWSKI, P.; KIJOWSKI, J.; WIATR, J.; MAJKA, M. The characterization of the subpopulation of suppressive B7H4(+) macrophages and the subpopulation of CD25(+) CD4(+) and FOXP3(+) regulatory T-cells in decidua during the secretory cycle phase, Arias Stella reaction, and spontaneous abortion - a preliminary report. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 61, p. 303-312, 2009.

WOOD, K. J.; SAWITZKI, B. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. **Trends Immunol.**, v. 27, n.4, p. 183-187, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Public health aspects of low birth weight:** third report of the Expert Committee on Maternal and Child Health. Geneva: World Health Organization; 1961, 217 p.

YAMAMOTO, S.; HAYAISHI, O. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. **J. Biol. Chem.**, v. 242, n. 22, p. 5260-5266, 1967.

YANG, S. H.; PARK, M. J.; YOON, I. H.; KIM, S. Y.; HONG, S. H.; SHIN, J. Y.; NAM, H. Y.; KIM, Y. H.; KIM, B.; PARK, C. G. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. **Exp. Mol. Med.**, v. 41, n. 5, p. 315-324, 2009.

YEUNG, A. W.; WU, W.; FREEWAN, M.; STOCKER, R.; KING, N. J.; THOMAS S. R. Flavivirus infection induces indoleamine 2,3-dioxygenase in human monocyte-derived macrophages via tumor necrosis factor and NF- κ B. **J. Leukoc. Biol.**, v. 91, n. 4, p. 657-666, 2012.

YAMAUCHI, T., WILSON, C.; AND ST. GEME, J.W. JR. Transmission of live. attenuated mumps virus to the human placenta. **N. Engl. J. Med.**, v. 290, p. 710-712, 1974.

YOSHIDA, R.; HAYAISHI, O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. **Methods Enzymol.**, v. 142, p.188-195, 1987.

ZEISER, R.; NGUYEN, V. H.; BEILHACK, A.; BUESS, M.; SCHULZ, S.; BAKER, J.; CONTAG, C. H.; NEGRIN, R. S. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. **Blood**, v. 108, n. 1, p. 390-399, 2006.

ANEXO I – Características individuais das gestantes transplantadas.

	TX 1	TX 2	TX 3	TX 4	TX 5	TX 6	TX 7	TX 8	TX 9	TX 10	TX 11	TX 12
Paridade	4	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	0
Idade gestacional (semanas)	37,4	37,3	39,4	37,6	36,9	38,7	37,7	38,6	37,7	41	35,7	37,7
Idade materna (anos)	30,5	31,2	28,7	27,2	28,2	26,6	17,3	29,9	32,9	32,9	32,6	32,9
Tacrolimus (mg/dia)	8	10	-	3	4	3	7	-	-	-	-	-
Azatioprina (mg/dia)	50	125	75	100	150	100	75	75	100	75	50	75
Prednisona (mg/dia)	5	5	5	5	10	5	5	5	5	5	-	5
Ciclosporina A (mg/dia)	-	-	-	-	-	-	-	75	150	250	-	75
Peso neonato (g)	2970	2820	2545	3550	2470	2585	2750	2685	2305	3685	2185	2585
Peso placenta (g)	492	480	470	650	410	420	470	450	420	590	430	490
Ocorrências	S/O	HS	S/O	S/O	S/O	HS	HS	S/O	S/O	ITU	S/O	S/O