

**KAROLLINA FERREIRA DO NASCIMENTO**

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

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Estela Maris Andrade Forell Bevilacqua

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

São Paulo  
2012

## RESUMO

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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



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

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



## REFERÊNCIAS\*

- ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. Implantation and decidualization in rodents. **J. Exp. Zool.**, v. 266, p. 603-628, 1993.
- ADAMS, K. M.; LUCAS, J.; KAPUR, R. P.; STEVENS, A. M. LPS induces translocation of TLR4 in amniotic epithelium. **Placenta**, v. 28, p. 477-481, 2007.
- ADAMSON, S. L.; LU, Y.; WHITELEY, K. J.; HOLMYARD, D.; HEMBERGER, M.; PFARRER, C.; CROSS, J. C. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. **Dev. Biol.**, v. 25, p. 358-373, 2002.
- ADOBE. Photoshop CS5 extended. Version 12.0. EUA: Adobe Systems Inc. Software.
- AIN, R.; CANHAM, L. N.; SOARES, M. J. Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. **Dev. Biol.**, v.260, p. 176-190, 2003.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783-801, 2006.
- ALBIERI, A.; BEVILACQUA, E. Induction of erythrophagocytic activity in cultured mouse trophoblastic cells by phorbol myristate acid and all-trans-retinal. **Placenta**, v. 17, p. 507-512, 1996.
- AMOROSO, E. C. Endocrinology of pregnancy. **Br. Med. Bull.**, v. 11, p. 117-125, 1955.
- ANSON-CARTWRIGHT, L.; DAWSON, K.; HOLMYARD, D.; FISHER, S. J.; LAZZARINI, R. A.; CROSS, J. C. The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. **Nat. Genet.**, v. 25, p. 311-314, 2000.
- APLIN, J. D. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. **Reprod. Biomed.**, v. 13, p. 833-839, 2006.
- ARCE, R. M.; BARROS, S. P.; WACKER, B.; PETERS, B.; MOSS, K.; OFFENBACHER, S. Increased TLR4 expression in murine placentas after oral infection with periodontal pathogens. **Placenta**, v. 30, p. 156-162, 2009.
- ARCE, R.M.; DIAZ, P.I.; BARROS, S. P.; GALLOWAY, P.; BOBETSIS, Y.; THREADGILL, D.; OFFENBACHER, S. Characterization of the invasive and inflammatory traits of oral *Campylobacter rectus* in a murine model of fetoplacental growth restriction and in trophoblast cultures. **J. Reprod. Immunol.**, v. 84, p. 145-153, 2010.
- ARCURI, F.; CINTORINO, M.; VATTI, R.; CARDUCCI, A.; LIBERATORI, S.; PAULESU, L. Expression of macrophage migration inhibitory factor transcript and protein by first-trimester human trophoblast. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 1299-1303, 1999.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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