

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ALTERAÇÕES EM LINHAGENS DE CÉLULAS PLACENTÁRIAS E
CONVERSÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS POR FÁRMACOS**

JÉSSICA DE OLIVEIRA SOUZA

VILA VELHA
ABRIL / 2018

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ALTERAÇÕES EM LINHAGENS DE CÉLULAS PLACENTÁRIAS E
CONVERSÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS POR FÁRMACOS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

JÉSSICA DE OLIVEIRA SOUZA

VILA VELHA
ABRIL / 2018

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S729a Souza, Jéssica Oliveira de.
Alterações em linhagens de células placentárias e conversão de células reguladoras por fármacos / Jéssica Oliveira de Souza. - 2018
45 f.: il
Orientador: Carlos Eduardo Tadokoro.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2018.
Inclui bibliografias.
1. Farmacologia e terapêutica. 2. Sistema imunológico. 3. Medicamentos. I. Tadokoro, Carlos Eduardo. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

JÉSSICA DE OLIVEIRA SOUZA

**ALTERAÇÕES EM LINHAGENS DE CÉLULAS PLACENTÁRIAS E
CONVERSÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS POR FÁRMACOS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 23 de Abril de 2018,

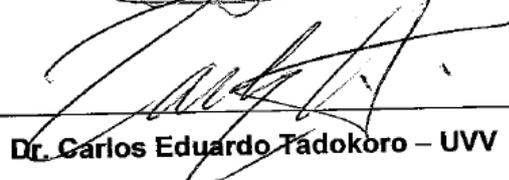
Banca Examinadora:



Dr. Frederico Jacob Eutrópio – MULTIVIX



Dr. Marcelo Renan de Deus Santos – UVV



Dr. Carlos Eduardo Tadokoro – UVV

Orientador

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças, meios e coragem nos momentos mais difíceis, para prosseguir em minha vida e conseguir a concretização desse sonho.

Agradeço ao meu orientador professor Doutor Carlos Eduardo Tadokoro, por ter me dado a grande oportunidade de ser sua aluna, por sua paciência, dedicação, compreensão e competência na orientação deste estudo, por ser referência profissional para o meu crescimento. Obrigada por acreditar em mim!

À Fernanda Busato, pelos momentos divididos juntos e por ter se tornado uma verdadeira amiga. Pela parceria nos procedimentos executados desta pesquisa. Foi muito bom poder contar com você!

Também sou muito grata a Isadora Duarte, pelo companheirismo e ajuda na pesquisa.

Agradeço também aos membros do Núcleo de Doenças Infecciosas – UFES, em especial: Prof. Daniel, Lorenzo e Luciana, pelo uso incondicional do citômetro de fluxo. E também aos professores do PPGCF, pela contribuição na minha formação.

Aos meus pais, Rosenilda e Antônio, meu infinito agradecimento. Pelo amor e carinho que sempre dedicaram e confiança depositada em mim.

Às minhas irmãs, Érica e Giselle meu agradecimento especial, pois, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho.

Aos meus amigos, por sempre quererem o meu bem e compreenderem minha ausência.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	5
2.1. OS TROFOBLASTOS E A GRAVIDEZ.....	5
2.2. A GRAVIDEZ E O SISTEMA IMUNE MATERNO DURANTE A GESTAÇÃO	6
2.3. AS CÉLULAS T REGULADORAS (Tregs).....	8
2.4. OS MEDICAMENTOS E A GRAVIDEZ.....	10
2.4.1. <i>Ibuprofeno</i>	12
2.4.2. <i>Paracetamol</i>	13
2.4.3. <i>Cefalexina</i>	13
2.5. OS MEDICAMENTOS, AS Tregs, E A GRAVIDEZ	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	4
5.1. CAMUNDONGOS E COMITÊ DE ETICA ANIMAL	4
5.2. CULTURAS CELULARES.....	4
5.3. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR NA PRESENÇA DOS MEDICAMENTOS.....	5
5.4. TESTE DE MANUTENÇÃO/CONVERSÃO DE Tregs.....	6
5.5. CITOMETRIA DE FLUXO.....	6
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	7
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
6.1. CITOTOXICIDADE DOS MEDICAMENTOS SOBRE CÉLULAS SM9.1	9
6.2. EFEITO DOS MEDICAMENTOS SOBRE MANUTENÇÃO/CONVERSÃO DE Tregs.....	13
.....	Erro! Indicador não definido.
5. CONCLUSÕES.....	19
6. REFERÊNCIAS.....	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular dos medicamentos utilizados por gestantes. (A) Ibuprofeno; (B) Paracetamol; (C) Cefalexina.

Figura 2. Exemplo da análise celular feita em citometria de fluxo. Células retiradas de culturas que receberam células do timo (A), ou células do baço (B), foram analisadas em citômetro de fluxo.

Figura 3. Citotoxicidade de medicamentos sobre trofoblastos da linhagem SM9.1. Os medicamentos ibuprofeno (A), paracetamol (B) e cefalexina (C).

Figura 4. Expressão da concentração de Tregs presentes no timo e baço e SM9-1 com paracetamol.

Figura 5. Expressão da concentração de Tregs presentes no timo e baço e SM9-1 com ibuprofeno.

Figura 6. Expressão da concentração de Tregs presentes no timo e baço e SM9-1 com cefalexina.

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES – Anti-inflamatórios não esteroidais

CDs – Células Dendríticas

COX-1 – Ciclooxigenase 1

COX-2 – Ciclooxigenase 2

CTLA-4 – “*Intracellular Cytotoxic T-lymphocyte-Associated Antigen-4*”

DMSO – Dimetilsulfóxido

FDA – “*Food and Drug Administration*”

FoxP3 – “*Forkhead Box P3*”

GILZ – “*Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper*”

GITR – “*Glucocorticoid-Induced Tumour Necrosis Factor Receptor*”

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

IDO – Indolamina 2,3 – Dioxigenase

INF- γ – Interferon gama

IPEX – “*Immuno Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrome*”

iTregs – Células T reguladoras induzidas

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

MMP-9 – Metaloproteinase-9

NFAT – “*Nuclear Factor of Activated T*”

NF- κ B – “*Nuclear Factor Kappa B*”

nTregs – Células T reguladoras naturais

OTC – Medicamentos de Venda Livre

pCDs – Células Dendríticas Plasmocitóides

PDL-1 – Ligante de Morte Programada -1

TGF- β – “*Transforming Growth Factor Beta*”

Tregs – Células T reguladoras

uDC – Células dendríticas uterinas

uNK – Células “*Natural Killer*” uterinas

VEGF – “*Vascular Endothelial Growth Factor*”

OLIVEIRA SOUZA, JÉSSICA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Abril de 2018.
Alterações em linhagens de células placentárias e conversão de células T reguladoras por fármacos. Orientador: Carlos Eduardo Tadokoro.

RESUMO

A gravidez exige que o sistema imunológico materno reconheça, mas não rejeite, os antígenos paternos expressados no embrião. As evidências apontam que as células T reguladoras desempenham papéis importantes no estabelecimento e manutenção da tolerância imune ativa essencial para que não haja rejeição do feto semi-alogênico em desenvolvimento. Algumas substâncias são capazes em induzir a conversão de células T convencionais em células T reguladoras. Com isso, foi avaliado se os medicamentos ibuprofeno, paracetamol e cefalexina, que são de uso comum das grávidas, geram efeito sob a linhagem de trofoblastos de camundongos (SM9-1), tanto tóxicos quanto na influência da manutenção/conversão de células T reguladoras. As análises de toxicidade dos medicamentos sob as células SM9-1 foram feitas utilizando o método de conversão de MTT em formazam; já para os testes de conversão, foram utilizadas co-culturas de timo e baço de camundongos fêmeas da linhagem Swiss com SM9-1. Nossos resultados mostram que tanto o paracetamol quanto o ibuprofeno foram tóxicos nas concentrações 50,0; 25,0 e 12,5 mg/ml; a cefalexina apenas foi tóxica na concentração de 50 mg/ml. Com relação aos efeitos exercidos pelos medicamentos sobre as células T reguladoras, o paracetamol não interferiu em sua manutenção/conversão, enquanto o ibuprofeno (na dose 3,13 mg/ml) e cefalexina (na dose 6,25 mg/ml) demonstraram elevar a sua porcentagem. Apesar destas doses serem elevadas, quando comparadas às concentrações disponíveis *in vivo* nos seres humanos, é preciso levar em consideração as particularidades do metabolismo murino. Os efeitos supostamente benéficos (aumento da porcentagem de células T reguladoras) para prevenção de rejeição do feto pelo sistema imune materno também devem ser considerados com cautela, devido ao aumento de supressão do sistema imune.

Palavras chaves: medicamentos, gravidez, toxicidade, tolerância imunológica

OLIVEIRA SOUZA, JÉSSICA, M.Sc, University of Vila Velha – ES, April de 2018.
Alterations in placental cell lines and conversion of drug regulatory T cells.
Advisor: Carlos Eduardo Tadokoro.

ABSTRACT

Pregnancy requires the maternal immune system to recognize, but not reject, the paternal antigens expressed in the embryo. Evidence suggests that regulatory T cells play important roles in establishing and maintaining active immune tolerance so that there is no rejection of the developing semi-allogeneic fetus. Some substances are capable of inducing the conversion of conventional T cells into regulatory T cells. Therefore, it was evaluated whether the drugs ibuprofen, paracetamol and cephalexin, which are commonly used by pregnant women, have an effect on the trophoblasts line of mice (SM9-1), both toxic and on the influence of maintenance / conversion of regulatory T cells . Toxicity analyzes of the drugs under SM9-1 cells were made using the MTT conversion method in formazam; already for the conversion tests, thymus and spleen co-cultures of Swiss mice with SM9-1 were used. Our results show that both paracetamol and ibuprofen were toxic at concentrations of 50.0; 25.0 and 12.5 mg / ml; cefalexin was only toxic at the concentration of 50 mg / ml. Regarding the effects of the drugs on the regulatory T cells, paracetamol did not interfere in its maintenance / conversion, whereas ibuprofen (in the dose 3,13 mg / ml) and cefalexina (in dose 6,25 mg / ml) demonstrated to elevate your percentage. Although these doses are elevated, when compared to the concentrations available in vivo in humans, the particularities of murine metabolism need to be taken into account. The supposedly beneficial effects (increased percentage of regulatory T cells) to prevent fetal rejection by the maternal immune system should also be considered with caution due to increased suppression of the immune system.

Keywords: medications, pregnancy, toxicity, immunological tolerance.

1. INTRODUÇÃO

A gravidez representa um desafio para o sistema imune, uma vez que requer o desenvolvimento da tolerância imunológica materna ativa para não montar uma resposta contra antígenos paternos expressos pela placenta e pelo feto em desenvolvimento. Os mecanismos pelos quais a rejeição ao feto é evitada ainda não são completamente compreendidos. Entretanto, sabe-se que o sistema imunológico equilibrado é essencial para implantação do embrião, sendo extremamente importante o papel supressor das células T reguladoras (Tregs) para prevenção da imunidade destrutiva e manutenção da integridade dos tecidos (GUERIN; PRINS e ROBERTSON, 2009). Portanto, para a correta embriogênese e manutenção da gravidez, é imprescindível a homeostasia da grávida, incluindo as alterações fisiológicas do sistema imune, sem que perturbações ocorram. Infelizmente, a manutenção desta situação ideal as vezes não é possível, por exemplo, quando há a necessidade de intervenção medicamentosa para sanar problemas indesejados.

O uso de medicamentos durante a gravidez se torna necessário diante de situações como dores, inflamações e infecções. Entre os medicamentos mais utilizados pelas gestantes então os analgésicos, anti-inflamatórios e antimicrobianos (SMEDBERG et al., 2016). Os objetivos destas intervenções farmacológicas são controlar os sintomas e evitar efeitos adversos, usando doses que garantam a eficácia do tratamento e, concomitantemente, minimizem a exposição fetal aos fármacos (JEONG, 2010).

Entre os medicamentos que são utilizados pelas gestantes, então os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), sendo considerados como primeira escolha para tratamento de dores de cabeça, dores no corpo e inflamações que são muito comuns devido a mudanças fisiológicas geradas pela gestação. Dentre os AINES, ibuprofeno e paracetamol tem uso frequente na gravidez (NEZVALOVÁ-HENRIKSEN; SPIGSET e NORDENG, 2013). Outros medicamentos que podem ser necessários são os antimicrobianos. Em gestantes pode ocorrer a bacteriúria assintomática ou sintomática, uma vez que o crescimento bacteriano é favorecido pelo aumento da taxa de filtração glomerular aumentando concentração de aminoácidos, vitaminas e outros nutrientes na urina. Nestas infecções, *Escherichia coli* é o patógeno mais frequentemente encontrado, porém outras bactérias como *Streptococcus agalactiae* e *Micrococcaceae* sp também são encontradas. Se a bacteriúria não for tratada, ela pode evoluir para

pielonefrite aguda (infecção bacteriana que causa inflamação nos rins e ureteres) em 20 a 30% dos casos. Esta, por sua vez, pode resultar em pré-eclâmpsia, hipertensão, anemia, baixo peso de neonatos, nascimento prematuro e morte fetal. Para evitar estas complicações, a pielonefrite pode ser tratada com cefalosporinas, sendo a cefalexina a mais utilizada entre elas (CHRISTENSEN, 2000).

Apesar da utilização de ibuprofeno, paracetamol e cefalexina, pouco se sabe sobre os efeitos diretos nos tecidos placentários e na geração de Tregs. Portanto, nosso estudo teve como objetivo quantificar os efeitos de ibuprofeno, paracetamol e cefalexina sob linhagens trofoblásticas de camundongos, quanto a toxicidade e capacidade de conversão de células T CD4 convencionais em Tregs.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. OS TROFOBLASTOS E A GRAVIDEZ

A placenta é composta por uma rede vascular interna e por vários tecidos compostos por um sinciciotrofoblasto e citotrofoblastos, todos derivados dos trofoblastos presentes no blastocisto em implantação. Durante esta invasão dos trofoblastos ao endométrio e parte do miométrio materno, quando estas células alcançam as artérias espirais maternas, o fluxo sanguíneo uterino é iniciado, colocando o sangue materno em contato direto com os trofoblastos e assegurando a entrega suficiente de nutrientes maternos e oxigênio na placenta. É importante ressaltar que as circulações materna e fetal não se misturam (GELLERSEN e BROSENS, 2014). Entretanto, a placenta humana e de murinos são do tipo hemocorial, em que as células trofoblásticas estão em contato direto com o sangue e, eventualmente, medicamentos tomados pela mãe (CROSS, 2000). Muitas mulheres são expostas a diferentes fármacos ou poluentes ambientais durante a gravidez. O transporte seletivo de nutrientes, oxigênio e de outras substâncias é considerado como a principal importância da placenta. As substâncias atravessam a placenta dependendo de suas propriedades físico-químicas e estruturais (tamanho, pKa e lipossolubilidade) e fatores farmacocinéticos (transporte ativo, ligação placentária e metabolismo) e características físicas da unidade materno-placentária (área superficial da membrana de troca, espessura da membrana, fluxo do sangue materno, pressão arterial em capilares fetais e a diferença na pressão osmótica materna e compartimentos fetais), moléculas com peso até 600 Da, não ionizadas e lipossolúvel apresenta difusão direta, já compostos hidrofílicos, ionizados e maiores encontram resistência e atravessa a placenta de forma mais lenta (BOURGET, ROULOT e FERNANDEZ, 1995). A placenta metaboliza e transfere diversas moléculas farmacologicamente ativas, pois contém uma maquinaria enzimática rica capaz de realizar reações de fase I e II (MARIN, BRIZ e SERRANO, 2004). Várias proteínas do citocromo P450 incluindo CYP1, CYP2 e CYP3 foram isoladas da placenta, e elas são amplamente responsáveis nos mecanismos na desintoxicação de drogas e toxinas (PASANEN e PELKONEN, 1994). A transferência de compostos se deve por quatro tipos de mecanismos como: difusão passiva, difusão facilitada, transporte ativo e pinocitose (PLONAIT e NAU, 2004).

2.2. A GRAVIDEZ E O SISTEMA IMUNE MATERNO DURANTE A GESTAÇÃO

A gravidez é um processo complexo, que compreende diversos eventos, incluindo implantação, decidualização e, finalmente, o nascimento (CHA; SUN e DEY, 2012). Durante a implantação do embrião, o endométrio uterino torna-se decidualizado, um processo inflamatório controlado que envolve a transformação de células estromais endometriais em células secretoras especializadas, onde também há o aumento da quantidade de células imunológicas como: macrófagos, células naturais killer uterinas (uNK), células dendríticas uterinas (uDC) e Tregs (GELLERSEN; BROSENS e BROSENS, 2007). Estas células imunológicas desempenham um papel central na determinação do equilíbrio entre a tolerância imune e as respostas pró-inflamatórias, que são fundamentais na implantação adequada e no estabelecimento de uma gravidez viável. A falha da manutenção deste equilíbrio é prejudicial ao desenvolvimento placentário, implantação ou formação da decídua. O sistema imunológico na gestação é ativo e funcional, entretanto, é cuidadosamente controlado por várias células para que haja sucesso na gravidez (MOR; CARDENAS e ABRAHAMS, 2011).

De todas as populações de leucócitos uterinos, as mais abundantes são as células uNK. Essas células aumentam drasticamente em número após a ovulação representando 70% da população total de leucócitos. Foi demonstrado que a ausência de células uNK incapacita as células trofoblásticas de atingirem o endométrio vascularizado, provando serem críticas para a invasão do trofoblasto no útero (MOR; CARDENAS e ABRAHAMS, 2011). Além das células uNK, os macrófagos são relativamente abundantes, compreendendo cerca de 20% da população de leucócitos uterinos. A maioria dos macrófagos na interface materno-fetal são do fenótipo M2 (imunomodulador), que não levam a um aumento da inflamação, mas sim a uma reestruturação tecidual. Portanto, estes macrófagos trabalham na remodelação precoce da artéria espiral, produzindo fatores associados à remodelação tecidual e como a metaloproteinase-9 (MMP-9) e à angiogênese, o “*Vascular Endothelial Growth Factor*” (VEGF). Eles também fagocitam as células apoptóticas decorrentes das remodelações vasculares e de células trofoblásticas mortas, evitando assim a liberação de substâncias pró-inflamatórias no local (GELLERSEN e BROSENS, 2014).

O endométrio também contém células T, sendo 30 – 45% células T CD4+ e 45 – 75% células T CD8+ (GELLERSEN e BROSENS, 2014). A diferenciação e a função de células imunes infiltradas no local de implantação depende em grande parte do microambiente criado pelas células da placenta, demonstrando sua importância no desenvolvimento fetal (MOR; CARDENAS e ABRAHAMS, 2011).

Uma das questões mais importantes relacionadas à gestação é sobre como o feto semi-alógeno é capaz de sobreviver e não ser rejeitado pelo organismo materno. Os antígenos leucocitários humanos (HLAs) ou seja, as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano, que são expressos nas membranas do feto e nos trofoblastos, induzem tolerância e não a ativação do sistema imune. Também verificou-se que a expressão de moléculas do MHC em trofoblastos é reprimida na maioria das espécies, uma estratégia para evitar seu reconhecimento e destruição pelas células imunes maternas (GELLERSEN e BROSENS, 2014).

Os genes do MHC são divididos em classes I e II, sendo responsáveis pelo controle dos antígenos que serão apresentados para as células T. Por sua vez, os genes da classe I são subdivididos nas classes Ia e Ib, sendo que na classe Ia encontramos os genes HLA-A, HLA-B e HLA-C, e na classe Ib os genes HLA-E, HLA-F e HLA-G. Os trofoblastos humanos expressam a molécula HLA-C e todas as moléculas de classe Ib, mas não expressam moléculas HLA-A e HLA-B. Isto é interessante, uma vez que estes últimos são os mais importantes na rejeição de aloenxertos em seres humanos. As interações entre HLA-C e as células uNK também podem causar infiltração dos trofoblastos no tecido materno e foi observado que gestantes com HLA-C fetal incompatível exibem maior número de células T ativadas e Tregs funcionais em tecidos decíduais. Há um outro gene do MHC classe II, o HLA-D, que não é expresso em trofoblastos humanos, também colaborando para que antígenos paternos passem despercebidos pelo sistema imune da mãe (GELLERSEN e BROSENS, 2014).

Há várias fases que ocorrem no sistema imune materno durante a gravidez. No primeiro trimestre da gestação, a reação materna é predominantemente inflamatória, ou seja, perfil Th1 de citocinas (IL-6, IL-8 e TNF- α). Nesta etapa, o blastocisto rompe o revestimento epitelial do útero para implantação, invadindo o tecido endometrial. Todo processo envolvido define a fase inflamatória do início da gestação, podendo gerar desconforto como náuseas e febre. Nos meses seguintes ocorre o período em que há rápido desenvolvimento e crescimento fetal, sendo predominantemente uma fase anti-inflamatória (MOR; CARDENAS e ABRAHAMS,

2011). Por fim, ao final da gestação e no trabalho de parto, há inversão para predominância do perfil inflamatório, sendo essencial para o termo. Este ambiente pró-inflamatório promove a contração do útero e expulsão do bebê e rejeição da placenta (MOR; CARDENAS e ABRAHAMS, 2011).

2.3. AS CÉLULAS T REGULADORAS (Tregs)

As Tregs “clássicas” foram descobertas em 1984 por Sakaguchi e colaboradores, como uma célula reguladora da resposta imune e ativação celular. São uma subpopulação de linfócitos T CD4 que desempenham um papel essencial na regulação de respostas antígeno-específicas das células T CD4 e CD8. São identificadas com os marcadores CD25⁺ e FoxP3⁺ (*Forkhead box p3*) e compreendem cerca de 5% de células T CD4 nos órgãos linfóides secundários em seres humanos e 5 - 10% de células T CD4 em roedores (JANIKASHVILI et al., 2011). Já nas décadas seguintes, as Tregs foram divididas em dois grupos: naturais ou induzidas. As Tregs naturais (nTregs) compreendem estas desenvolvidas no timo como um subconjunto de células T CD4⁺ que adquirem sua capacidade supressiva como resultado do microambiente, estando presentes na circulação sanguínea, antes de uma exposição prévia ao antígeno, e são reconhecidas pela expressão de CD25, FoxP3, CCR4, PD-1 e baixos níveis de CD127 (TREHANPATI e VYAS, 2017). Já as células Tregs induzidas (iTregs) se desenvolvem através de células T CD4 *naive* na periferia dos órgãos, se diferenciando em FoxP3⁺ e adquirindo uma função reguladora através de sinais externos como estresse fisiológico ou em condições de doenças. Sua atividade reguladora é feita através da produção de IL-10, IL-35 e TGF- β (ADALID-PERALTA et al., 2011).

Sobre a expressão de CD25 e FoxP3, sabemos que o CD25 corresponde a cadeia α do receptor de Interleucina-2 (IL-2), um marcador de ativação das células T; entretanto, a maioria das células T ativadas também expressam CD25, com intensidade baixa a moderada, dificultando a identificação das Tregs pela expressão de CD25 em animais imunizados (JANIKASHVILI et al., 2011; TREHANPATI e VYAS, 2017). Já em relação ao gene FoxP3, ele está localizado no braço curto do cromossomo X, consistindo de 11 exons que codificam para uma proteína de 431 aminoácidos chamada FOXP3. Sua expressão é decisiva no controle do desenvolvimento e função das Tregs CD4⁺ CD25⁺ (PEREIRA, et al., 2017). Sua importância foi descoberta através da identificação de uma doença humana

denominada “IPEX”, um distúrbio autoimune raro e hereditário, relacionado ao cromossomo X, onde os pacientes possuem uma disfunção de FoxP3 e passam a desenvolver uma série de respostas autoimunes (GUERIN, PRINS e ROBERTSON, 2009). O FoxP3 é um fator de transcrição e sua função é exercida sobre regiões reguladoras específicas dentro do DNA, aumentando ou suprimindo a transcrição de genes específicos (PEREIRA, et al., 2017). A sinalização nuclear através do FoxP3 nas Tregs ainda não está totalmente definida; entretanto, estudos experimentais indicam que, após a ligação do complexo MHC classe II-peptídeo com o receptor de células T das Tregs, há uma acentuação na sinalização celular em decorrência da interação física dos fatores nucleares NF- κ B e NFAT com o fator FoxP3, reprimindo os genes de transcrição das citocinas IL-2, IL-4 e INF- γ , e aumentando da expressão de CD25 e CTLA-4. Alternativamente ocorre a ativação de um co-fator com a função de liberar sinais inibitórios, que ocorre após a ligação do receptor de células T com o MHC II-peptídeo que leva a regulação de genes expressos nas Tregs (PEREIRA, et al., 2017).

Além da expressão de CD25 e FoxP3, outros marcadores de superfície expressos de forma constitutiva nas células Tregs foram descritos, entre eles: GITR, CTLA-4, alta expressão de CD95, e baixa expressão de CD45RB e CD127. Entretanto, esses marcadores não são específicos das células Tregs, podendo ser expressos na superfície de outras populações de células (GUERIN; PRINS e ROBERTSON, 2009).

Sobre o mecanismo imunossupressor das Tregs, todas as tentativas de unificação ou de procura de um mecanismo único falharam; ou seja, há evidências que mostram vários mecanismos que são utilizados pelas Tregs para levar a imunossupressão. Entre eles, verificamos que foram descritos mecanismos que dependem da secreção de citocinas imunossupressoras, como IL-10, TGF- β e IL-35; mecanismos dependentes de contato direto com as células, envolvendo CTLA-4 e CD80/CD86; morte celular das células ativadas, pela expressão de proteínas pró-apoptóticas, como as granzimas; empobrecimento das condições para expansão de células T, através do consumo de IL-2 ou pela redução de triptofano (via ativação da Indolamina 2,3- dioxigenase, ou “IDO”, em células dendríticas); e transferência de AMPc para células ativadas (JANIKASHVILI et al., 2011).

Para finalizar este tópico, não podemos deixar de descartar o papel crucial do FoxP3 na gravidez. A gravidez é um dos mais fortes indutores de tolerância imunológica. Para garantir uma gravidez bem-sucedida, o organismo materno

estabelece uma ampla tolerância imunológica, fornecendo um ambiente seguro para o desenvolvimento fetal. Vários mecanismos evoluíram com o intuito de evitar respostas imunes dirigidas ao feto. No contexto da gravidez, estudos mostraram que as Tregs se expandem para prevenir a rejeição fetal (ENGLER et al., 2017). Esta tolerância induzida por Tregs é considerada um processo essencial, que se inicia nos primeiros estágios da gravidez, já no momento da invasão dos trofoblastos no revestimento uterino. Ela impede o reconhecimento e rejeição de células fetais estranhas, como demonstrado em experimentos onde houve a deleção destas células e indução de aborto (ROWE et al., 2013). Vários estudos confirmaram um aumento de Tregs no sangue, linfonodos e timo durante a gestação. Esta expansão de Tregs na decidua suprime a atividade de células Th1/Th17 maternas contra o feto semi-alogênico (GELLERSEN e BROSENS, 2014).

2.4. OS MEDICAMENTOS E A GRAVIDEZ

A gravidez é um processo dinâmico, no qual mudanças anatômicas e fisiológicas ocorrem desde a fertilização até o parto. Por causa destas mudanças, às vezes se torna necessário o uso de medicamentos durante a gravidez.

As bulas de alguns medicamentos incluem informações sobre os níveis de risco para o feto e, quando necessário, cautela na sua utilização. A FDA (*"Food and Drug Administration"*, EUA), em 1979, definiu categorias de medicamentos baseados em evidências sobre o uso durante a gravidez (LAW et al, 2010). Há, portanto, cinco grupos de risco: A, B, C, D e X. O grupo A incluem os medicamentos que os estudos em mulheres grávidas falharam em demonstrar risco para o feto; o grupo B os que passaram por estudos em animais e que não demonstraram riscos para o feto (entretanto, não existem estudos bem controlados em seres humanos); o grupo C corresponde àqueles que estudos em animais demonstram efeitos adversos ao feto, mas não existem estudos controlados em seres humanos, devendo, portanto, serem utilizados após análise de risco-benefício; o grupo D engloba os medicamentos nos quais existem evidências de risco fetal em seres humanos, mas o seu benefício é aceitável; por fim, o grupo X refere-se àqueles medicamentos que há evidências em estudos animais e que também foi observado em seres humanos a ocorrência de anormalidades e riscos ao feto, sendo portanto seu uso proibido (LAW et al, 2010).

Apesar destes cuidados, há medicamentos de venda livre (OTC), que pelo fácil acesso são amplamente utilizados na automedicação e no tratamento de problemas comuns de saúde relacionados à gravidez, como náuseas, vômitos, azia,

dor nas costas, constipação ou mesmo enxaqueca. Entretanto, os efeitos destes medicamentos na gravidez podem ser diferentes daqueles desejados, dependendo das doses e/ou do estágio de desenvolvimento embrionário e fetal. A automedicação leva a exposição do feto a diferentes efeitos toxicológicos provocados pelos fármacos. Foi demonstrado que, entre os medicamentos OTC mais comuns utilizados pelas mulheres grávidas, então os anti-inflamatórios e analgésicos e, quando avaliamos a utilização destes por prescrição médica, observamos uma incidência que varia de 40% a 93% (ABDYELKAREN e MUSTAFA, 2017). Portanto, há a necessidade de aprofundamento nos estudos sobre vários destes medicamentos.

Entre os OTC que são utilizados por gestantes os AINES são considerados como tratamento de primeira escolha para as condições de dores de cabeça, dores no corpo e inflamação. Entre os AINES, foi demonstrado que o ibuprofeno e paracetamol estão em maior frequência no uso na gravidez (NEZVALOVÁ-HENRIKSEN; SPIGSET e NORDENG, 2013). Há também o uso de antibióticos, uma vez que há evidências de benefícios tanto para a mãe, quanto para o feto, quando infecções que podem ocorrer durante a gravidez são controladas (MEERAUS; PETERSEN e GILBERT, 2015). Entre elas estão a bacteriúria devido às mudanças fisiológicas causadas por alterações hormonais e compressão uterina. A bacteriúria é um fator de risco para complicações graves, como pielonefrite aguda, que pode levar ao parto prematuro e ao baixo peso ao nascer (GUINTO et al., 2010). Nestes casos, os agentes sugeridos como primeira linha de tratamento são a ampicilina/amoxicilina, a nitrofurantoína e as cefalosporinas orais, pela alta taxa de cura, segurança e níveis altos na urina. A escolha do antibiótico difere para cada país. Nos Estados Unidos, o uso de amoxicilina é comum e, no Reino Unido, eles defendem o uso de penicilinas e cefalosporinas (GUINTO et al., 2010).

Portanto, há o uso de ibuprofeno, paracetamol e cefalexina (Figura 1) durante algumas gestações e vamos descrever as características de cada um destes medicamentos a seguir.

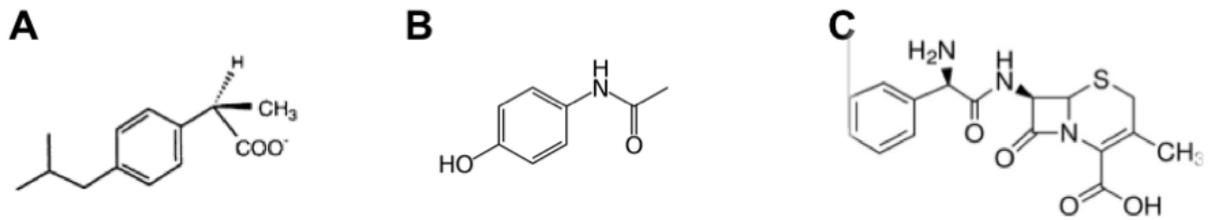


Figura 1. Estrutura molecular dos medicamentos utilizados por gestantes. (A) Ibuprofeno; (B) Paracetamol; (C) Cefalexina.

2.4.1. Ibuprofeno

O ibuprofeno é um fármaco AINE derivado de ácido propiônico, desenvolvido em 1960 por Stewart Adams, no Reino Unido (Figura 1A). Sua fórmula química é $C_{13}H_{18}O_2$ e sua nomenclatura padrão pela IUPAC é [dl 2- (4-isobutilfenil) ácidopropiônico] (ADATIA; RAINSFORD; KEAN, 2012). Possui ação central e periférica e é amplamente utilizado em todo o mundo como anti-inflamatório e para alívio da dor (DERRY et al., 2009). Ele age inibindo de forma rápida, reversível e competitiva as enzimas COX-1 e COX-2, sendo a supressão da síntese de prostaglandinas considerada a base de seus efeitos (RABBIE et al., 2010). Em um estudo feito por Cavero-Carbonella *et al.* (2016), o ibuprofeno foi o medicamento mais prescrito e dispensado para gestantes.

Após ser administrado oralmente, é absorvido ao longo do trato gastrointestinal, atingindo seu pico de concentração após 1,5 - 3 horas. Seus metabólitos são eliminados pela urina (CATTANEO e CLEMENTI, 2010), sendo o nível sérico em humanos atingido 1 hora após a ingestão de 800 mg de ibuprofeno, chegando a 44,6 $\mu\text{g/ml}$ (LOCKWOOD et al., 1983).

Entre seus efeitos adversos pela utilização crônica, temos a lesão hepática aguda, lesão renal aguda, e a insuficiência cardíaca. (HERNANDEZ-DIAZ, 2001). Considerando a sua utilização durante a gravidez, não foram encontradas associações significativas entre o seu uso durante o primeiro trimestre e riscos de malformação congênita, entretanto é de classificação C no uso durante a gestação e existe uma associação do uso de ibuprofeno durante o segundo e terceiro trimestre da gravidez com a asma infantil (NEZVALOVÁ-HENRIKSEN; SPIGSET e NORDENG, 2013).

2.4.2. Paracetamol

O paracetamol ou acetaminofeno [acetamida, N-(4-hydroxyfenyl)] de fórmula $C_8H_9NO_2$ (Figura 1B), foi descoberto por dois cientistas na universidade de Strasburg: Arnold Cahn e Paul Hepp em 1884, mas somente entrou para o mercado em 1955 e passou a ser o medicamento analgésico e antitérmico mais utilizado. Embora seja um medicamento antigo, seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, entretanto, sabe-se que suprime a produção de prostaglandinas como os outros medicamentos na classificação de AINEs, mas não possui ação anti-inflamatória e em doses usuais não causam efeitos gastrointestinais secundários. Os efeitos colaterais são observados no uso de doses elevadas e também ao uso sequente, apresentando um potente efeito hepatotóxico. O seu uso não deve ultrapassar de 4g em 24 horas por ser considerado sobredose e de alto risco (JÓZWIAK-BEBENISTA e NOWARK, 2014).

É definido de uso seguro na gravidez, considerado analgésico de primeira escolha e de classificação A, embora atravesse facilmente a barreira placentária através de difusão (foram isoladas porções do medicamento no líquido amniótico, sangue e urina fetal) e haja estudos que associam o seu uso ao desenvolvimento de asma, transtorno de déficit de atenção e o desenvolvimento infantil de fertilidade masculina (BRUNE, RENNER, TIEGS e 2014).

Após ingestão, 90% do medicamento ingerido é metabolizado no fígado e sua eliminação é predominantemente renal (JÓZWIAK-BEBENISTA e NOWARK, 2014). A concentração sérica em humanos após ingestão de 1,5 g do medicamento após 30 minutos foi de 5-20 $\mu\text{g/ml}$, atingindo todos os líquidos orgânicos e meia vida de 1-3 horas e a farmacocinética do medicamento é semelhante tanto em grávidas e mulheres não grávidas (SMITH et al, 1991).

2.4.3. Cefalexina

Foi desenvolvida no Reino Unido, pela Glaxo Research, Ltd. (Figura 1C). Tem o mesmo "núcleo" de ácido cefalosporânico como cefaloridina, mas difere na substituição da cadeia lateral. Portanto, a cefalexina [7- (D- α -amino- α - fenilacetamido) -3-metil-3-cefem-4- ácido carboxílico] é um antibiótico semi-sintético, cefalosporina de primeira geração, pertencente ao grupo dos antibióticos β -lactâmicos clássicos, que apresentam as mesmas características estruturais das penicilinas, contendo um anel β -lactâmico e um anel dihidrotiazino no núcleo bicíclico. É um antibiótico de amplo espectro e possui boa atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas,

amplamente utilizado no Brasil pelo seu perfil de segurança e possui classificação B no uso durante a gravidez (SAMMETA; VAKA e MURTHY, 2009).

O nível sérico em humanos, após 1 hora da ingestão de 1 g de cefalexina em jejum, foi de 9 à 31 µg/ml e, após a refeição, foi de 9 à 20 µg/ml, quando mostrou absorção mais lenta em comparação com absorção na ingestão em jejum (GOWER e DASH, 1969). Não há indícios que este medicamento penetre nas células do tecido hospedeiro, sendo isto utilizado para explicar sua baixa incidência de efeitos colaterais. A ligação às proteínas séricas humanas também é baixa e não há destruição mensurável ou metabolismo da cefalexina durante a sua permanência nos fluidos corporais. É rapidamente eliminada do corpo pelos rins e cerca de 70 à 100 % da dose é encontrada na urina, 6 à 8 horas após cada dose (GRIFFITH, 1983).

A cefalexina é definida como de excelente absorção oral e utilizada especialmente em infecções no trato urinário, sistema respiratório superior e inferior, e em várias outras infecções ginecológicas e de tecidos moles em gestantes. Nestes casos, sua concentração no líquido amniótico e no cordão umbilical foi considerada adequada para inibição da infecção por *Staphylococcus aureus* (CREATSAS et al., 1980). Foi observado que a cefalexina atravessa a placenta e pôde ser encontrada nos fluidos fetais sem que estes apresentassem danos aparentes. Alguns estudos descreveram sua utilização em pacientes grávidas durante os vários estágios da gestação, sem nenhuma correlação entre o seu uso e defeitos congênitos ou toxicidade aos neonatos. Deste modo, as penicilinas e cefalosporinas são medicamentos antimicrobianos considerados seguros em qualquer etapa da gestação.

2.5. OS MEDICAMENTOS, AS Tregs, E A GRAVIDEZ

São escassos os trabalhos que detalham os efeitos dos medicamentos na geração de Tregs durante a gravidez. Entretanto, os efeitos de alguns medicamentos e vitaminas (dexametasona, rapamicina, ácido acetil salicílico e a vitamina D) já foram descritos, em que foram observadas a indução de diferenciação de Tregs e também a inibição das células apresentadoras de antígenos para estimularem a ativação dos linfócitos T, ambas com efeito tolerogênico (ADALID-PERALTA et al., 2011; QU et al., 2007; JAVEED et al., 2009). Portanto, há a necessidade de mais investigação científica sobre o assunto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. CAMUNDONGOS E COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL

Todos os procedimentos foram executados seguindo as diretrizes e normas do CONCEA, que foram avaliadas e aprovadas pelo comitê de ética em experimentação animal da UVV 387/2016. Foram utilizados por experimento, 5 camundongos fêmeas da linhagem Swiss, com 4 semanas de idade, para retirada do timo e baço. Todos os camundongos utilizados foram criados em condições livres de patógenos específicos, mantidos em racks ventiladas (Alesco Ltda., Brasil).

5.2. CULTURAS CELULARES

Foram utilizadas culturas de células estabelecidas (SM9-1) e primárias (células retiradas de timos e baços de camundongos Swiss). A obtenção e manutenção de cada uma destas culturas estão abaixo descritas.

Cultivo da linhagem celular SM9.1 (trofoblastos de camundongos da linhagem Swiss no 9º dia de gestação): estas células foram cultivadas em frascos de 25 cm² e 75cm² (Greiner Bio-One, Alemanha), contendo meio RPMI-1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 2mM de L-glutamina, 100 U/mL penicilina e 0,1 mg/mL estreptomicina, 0,11 mg/mL de piruvato sódico, 2 mg/mL de bicarbonato de sódio, 5 mM de 2-mercaptoetanol e 10% de soro fetal bovino). Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Inc. EUA. As células foram cultivadas a 37º C, com 5% de CO₂, em ar umidificado. As células foram repicadas a cada 3 dias ou quando atingiam 80-90% de confluência. Para avaliar a quantidade de células que seria mais adequada nos experimentos de citotoxicidade, foi feito um teste de viabilidade e confluência celular, em cultura de 3 dias, com diferentes concentrações celulares. Foram testadas as seguintes concentrações em triplicatas de cultura: 10⁴; 1,5 x 10⁴; 2 x 10⁴; 4 x 10⁴ e 5 x 10⁴. A dose que teve um resultado de confluência e viabilidade melhor foi a de 2 x 10⁴ células/poço, numa placa de 96 poços, contendo 100 µl de meio completo por poço (dados não apresentados).

Para obtenção das culturas primárias de células de timo e baço, foram utilizadas fêmeas da linhagem de camundongos Swiss. Cada animal foi eutanaziado pela injeção intravenosa de 20 µL de ketamina (10 g/mL). Após o isolamento do timo e baço, os mesmos foram adicionados a uma placa de 6 poços, contendo PBS, e triturados manualmente por fricção em lâminas histológicas, na parte jateada. Em

seguida, as células to timo foram transferidas para um tubo de 15 mL (Greiner One Inc., Alemanha), contendo PBS, e centrifugadas à 390 G, 10 min, 4°C. Foi retirado o sobrenadante e adicionado 5 mL de meio RPMI e, após a contagem das células em câmara de Neubauer, foram utilizadas 3×10^6 células por poço. Para obter as células do baço, inicialmente foi necessário lisar todos eritrócitos utilizando 0,5 mL de tampão de lise (8,26g de NH_4Cl ; 1,19g de NaHCO_3 ; 200 μL de EDTA 0,5M; 100mL de água destilada – pH 7,3) e 4,5 mL de água destilada. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas à 390 G, 10 min, 4°C, e o sobrenadante foi descartado após centrifugação. As células foram então ressuspensas em 5mL de meio RPMI. Após a contagem em câmara de Neubauer, foram utilizadas 3×10^6 células por poço nos ensaios de manutenção/conversão de Tregs.

5.3. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR NA PRESENÇA DOS MEDICAMENTOS

Como o nível de concentração dos fármacos é um determinante para a sua toxicidade, foram testadas várias doses de medicamentos nas células SM9.1, para que fosse possível encontrar as dosagens que apresentasse efeito deletério. As doses iniciais dos medicamentos utilizados nos testes foram 50 mg/ml, sendo diluídas sequencialmente na razão 1:2, utilizando como diluente 0,5% de DMSO (Dimetilsulfóxido) em meio RPMI-1640 suplementado. Os medicamentos utilizados, assim como o DMSO, foram todos adquiridos da Sigma-Aldrich Inc., EUA. DMSO à 0,5% não tem efeito tóxico sobre as células (dados não mostrados).

Para avaliar o efeito citotóxico dos medicamentos, foi feito o ensaio de viabilidade celular com MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Dyphenyltetrazolium Bromide), segundo Mosmann (1983). Foram plaqueadas 2×10^4 células/poço, em placas de 96 poços, com meio RPMI completo. Depois de um período de 24 horas, foram adicionados 50 μL dos medicamentos sob as células, e aguardou-se mais 24 horas para adição de 100 μL de MTT (5 mg/mL), por poço. Após aguardar 4 horas de incubação com MTT, os sobrenadantes foram retirados e 100 μL de DMSO foram acrescentados a cada poço para dissolver os cristais de formazam formados durante o processo. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância de cada poço em um leitor de placas (Celer, Ltda), à 595 nm. Se trata de um teste colorimétrico em que avalia a viabilidade celular. Como controle positivo de morte celular, foi utilizado 50 μL de DMSO à 100%, e para o controle negativo de morte celular, foi utilizado 50 μL de meio RPMI suplementado.

5.4. TESTE DE MANUTENÇÃO/CONVERSÃO DE Tregs

Para analisar a interferência dos medicamentos sob a população de células Tregs que também estavam na presença de linhagem de trofoblastos, foram plaqueadas 10^6 células SM9-1/poço, com meio RPMI, em placa de 24 poços, com volume final de 1 ml por poço. Foram acrescentadas também as células de timo ou baço nas placas, na quantidade de 3×10^6 células por poço. De acordo com os resultados dos testes de citotoxicidade, as doses dos medicamentos foram escolhidas: uma dose letal para cerca de metade das células SM9.1, e outra dose sem efeito citotóxico sobre estas células. Como controle positivo de proliferação, utilizamos o mitógeno Fitohemaglutinina (PHA; Sigma-Aldrich Inc., EUA), na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; como controle negativo, utilizamos timócitos e células do baço acrescentadas de meio de cultura. As placas foram incubadas por períodos de 24, 48 e 72 h, à 5% CO_2 , 37 °C, em estufa umidecida.

5.5. CITOMETRIA DE FLUXO

Para quantificar o efeito dos fármacos sobre a conversão/manutenção das Tregs, as amostras foram marcadas com anticorpos e analisadas por citometria de fluxo. Todos os conteúdos dos poços das placas foram retirados, nos tempos específicos para cada análise (24, 48 ou 72h), e adicionados em microtubos de 1,5 mL, centrifugados à 390g, 10 minutos, à 4°C. As células receberam 50 μL de uma solução de tampão para marcação celular (tampão de FACS que contém PBS, 1% de azida e 2% de FCS) contendo anticorpos anti-CD4 (BD Bioscience Inc., EUA, nº catálogo 12-0441-83) e anti-CD8 (BD Bioscience Inc., EUA, nº catálogo 12-0081-83). Aguardou-se 30 min, a 4°C, ao abrigo da luz, após adição dos anticorpos. Após esta primeira incubação, os microtubos foram centrifugados por 5 min, 390 G, 10 °C, e adicionado 100 μL /tubo do tampão *cytofix/cytoperm* (BD Bioscience Inc., EUA). Após incubação por 30 min, a temperatura ambiente e em câmara escura, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes removidos. Um novo ciclo de permeabilização foi realizado com adição de 100 μL /tubo de tampão de permeabilização (PBS contendo 1% de paraformaldeído e 0,5% de Tween-20), por 30 min, a temperatura ambiente, em câmara escura. Novamente, foram submetidos ao processo de centrifugação e, após este período, houve adição de 100 μL /tubo de uma solução contendo o anticorpo anti-Foxp3 (eBioscience Inc., EUA, nº catálogo 12-5773-82), incubado por 1h em temperatura ambiente, câmara escura. As amostras foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de FACS e guardadas à 4 °C até leitura

em citômetro de fluxo (FACS Calibur, BD Bioscience Inc., EUA) no Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Na Figura 2 estão representadas as regiões que foram delimitadas para análise da população de Tregs CD4⁺Foxp3⁺, tanto em culturas que receberam células do timo (Figura 2A), quanto em culturas que receberam células do baço (Figura 2B).

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparação entre as doses testadas de cada medicamento, quanto aos seus efeitos citotóxicos sobre os trofoblastos SM9.1, assim como para comparação entre as diferenças dos efeitos dos medicamentos sobre a manutenção/conversão de Tregs, testes de análises de variância (ANOVA), com correção de Tukey, foram aplicadas para verificar diferenças significativas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os gráficos e cálculos foram realizados no programa Prism Graphics 5.0 (GraphPad Software Inc., EUA) e representam dados adquiridos em pelo menos 2 experimentos independentes.

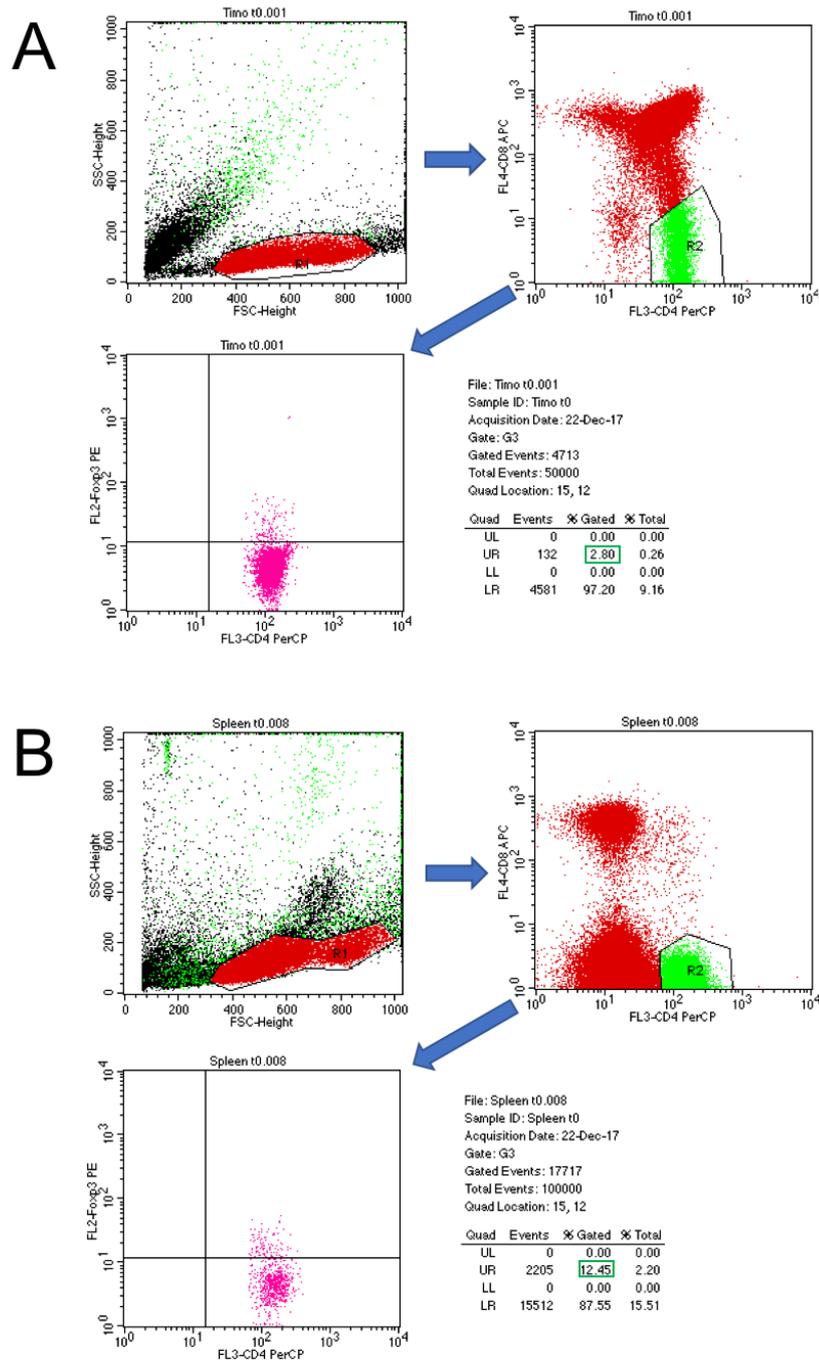


Figura 2. Exemplo da análise celular feita em citometria de fluxo. Células retiradas de culturas que receberam células do timo (A), ou células do baço (B), foram analisadas em citômetro de fluxo. A região R1 foi definida de acordo com o tamanho e granulosidade das células (linfócitos são pequenos e com pouca granulosidade); a região R2 para diferenciar as células T CD4 das demais; com as células da região R2 foram determinadas as populações de células T CD4+ Foxp3- (quadrante inferior direito) e T CD4+ Foxp3+ (quadrante superior direito); os resultados de porcentagens de Tregs estão destacados em quadrados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. CITOTOXICIDADE DOS MEDICAMENTOS SOBRE CÉLULAS SM9.1

Inicialmente, foram avaliados os efeitos tóxicos dos medicamentos sobre células da linhagem de trofoblastos estabelecidos SM9.1. Estas células foram obtidas de cones de implantação de camundongos no 9º dia de gestação. Os medicamentos testados foram o ibuprofeno, o paracetamol, e a cefalexina (Figura 3).

A relação entre a toxicidade para a placenta e o desenvolvimento fetal é de grande importância; uma vez que a toxicidade é dose-dependente, avaliada a viabilidade em diferentes concentrações dos medicamentos. Em relação ao paracetamol (Figura 3A), verificamos que na dose de 50 mg/ml houve redução de cerca da metade da população de células comparadas ao controle de células vivas. Nas dosagens subsequentes, de 25 e 12,5 mg/ml, houve redução progressiva da morte em relação às doses e, nas doses inferiores (6,2; 3,1; 1,6; 0,8 mg/ml), o medicamento não apresentou toxicidade. Em relação ao ibuprofeno (Figura 3B), verificamos que ele demonstrou ser tóxico nas concentrações de 50, 25 e 12,5 mg/ml, sendo a dose mais alta igual ao controle de células mortas. Nas concentrações menores que 12,5 mg/ml, ou seja, doses iguais ou menores à 6,2 mg/ml, não verificamos mais citotoxicidade contra as células SM9.1. Por fim, em relação à cefalexina (Figura 3C), verificamos que havia citotoxicidade na concentração inicial de 50 mg/ml, muito próxima à observada para o controle de células mortas; nas concentrações seguintes (a partir de 25 mg/ml), não houve citotoxicidade, mantendo-se a viabilidade celular próxima ou acima do controle de células vivas.

Há muitos estudos sobre os efeitos hepatotóxicos do paracetamol. Parte do medicamento ingerido é metabolizado no fígado em seu metabólito reativo tóxico (N-acetil-p-benzoquinona imina). Segundo Barker e col. (1977), doses únicas e elevadas e a administração contínua de paracetamol produzem lesões hepáticas como hepatite e necrose, alterando os estoques de glutatona e produzindo metabólitos tóxicos que interferem sobre o metabolismo lipídico glicídico e protéico, fatos de grande relevância no contexto gestacional que se trata de um período intensamente anabólico. O crescimento e desenvolvimento fetal dependem do metabolismo materno. Em um estudo de Stark e col. (1989), utilizando embriões de ratos Wistar no 9º dia de gestação, expostos com 0,5 mM de paracetamol por 24 horas, verificaram que houve embriotoxicidade, resultando em tubo neural defeituoso. Liew e col. (2014) observaram que gestantes que fizeram o uso do medicamento durante a gestação tiveram maior risco do bebê receber o diagnóstico de disordem

hipercinética ou vir a desenvolver déficit de atenção/hiperatividade. Embora haja estudos que relacionem o uso do medicamento durante a gestação a efeitos tóxicos, seu uso é considerado seguro em todas as etapas da gravidez (AMUNDSEN et al., 2015). A Agência Européia de Medicamentos (EMA) avaliou os resultados dos estudos de efeitos adversos nos fetos e concluiu que a evidência atual é insuficiente para definir a associação entre o uso do medicamento a esses efeitos adversos (European Medicines Agency, 2014). Com base nos resultados encontrados em nosso estudo, podemos observar que, mesmo em uma concentração elevada, se comparada às concentrações plasmáticas do medicamento em humanos (5-20 µg/ml) (SMITH et al., 1991), o medicamento apresentou bom perfil de segurança e baixa toxicidade; entretanto, as doses usuais de paracetamol utilizadas para tratamento em humanos (20 mg/kg) são cerca de 10 vezes menores que as doses utilizadas em camundongos (200 mg/kg) pela variação de metabolismo, o que pode ter interferido nos resultados de segurança em relação a toxicidade, levando em consideração que foram utilizadas células de camundongos e não de humanos em nosso experimento (CARPENTER, 2013).

Em relação ao ibuprofeno, Salcedo e col. (2010), observaram defeitos cardiovasculares e fendas palatinas em fetos nascidos de gestantes que estavam sob o uso do medicamento; porém outros fatores como doenças maternas, ou uso de outras drogas, não foram considerados e estes podem estar envolvidos nestas malformações. Foi relatado por Burdan e col. (2004) um retardo no crescimento intra-uterino e variação esquelética na dose de 600 mg/kg/dia em ratos Wistar, mas nenhum efeito teratogênico foi observado. O único efeito patológico significativo observado em um estudo feito com ratos e cães por Adams e col. (1969) foi ulceração do trato gastrointestinal (propriedade comum entre AINES). Em ratos, a dose mínima que passou a produzir lesões foi 180 mg/kg/dia (em cachorros a dose foi 8mg/kg/dia), sendo a variação causada principalmente por causa da diferença da concentração do fármaco na corrente sanguínea. Em um estudo de Damase-Michael e Hurault-Delarue (2014), com uma grande população de gestantes (5325 mulheres) que fizeram uso de ibuprofeno durante a gestação, não foi encontrado nenhuma associação do uso do medicamento a alguma má formação ou toxicidade fetal. Com base nos dados da literatura e com os resultados encontrados em nosso estudo, podemos observar que os efeitos tóxicos sobre as células são dose-dependentes e, em doses terapêuticas em humanos, a concentração plasmática do medicamento é de 44,6 µg/ml (LOCKWOOD et al., 1983); ou seja, bem abaixo das doses que apresentaram

toxicidade e a dose para tratamento de camundongos é cerca de 7-15 mg/kg, estando bem próxima da dose utilizada em humanos que é cerca de 8,5 mg/kg, sendo possível fazer uma correlação mais confiável dos dados e o uso do medicamento em humanos (CARPENTER, 2013).

A cefalexina, é considerada por Chien (2016) como segura e eficaz, não resultando o seu uso em efeitos tóxicos para gestante ou feto. É comprovado que o medicamento atravessa a barreira placentária e também pode ser encontrada no fluido amniótico e circulação fetal, sem produzir qualquer toxicidade (CREATSAS et al., 1980). Os resultados apresentados em nosso estudo demonstraram toxicidade nas células SM9-1, na dose de 50 mg/ml, que é uma concentração extremamente acima do que é encontrado no organismo humano após a absorção do medicamento (9-31 µg/ml) (GOWER; DASH, 1969); nas demais concentrações, não houve efeito tóxico, demonstrando ótimo perfil segurança, entretanto, as doses terapêuticas em humanos (7 mg/kg) são cerca de 8 vezes inferiores a dose para tratamento de camundongos (60 mg/kg) o que pode influenciar nos resultados de toxicidade (CARPENTER, 2013).

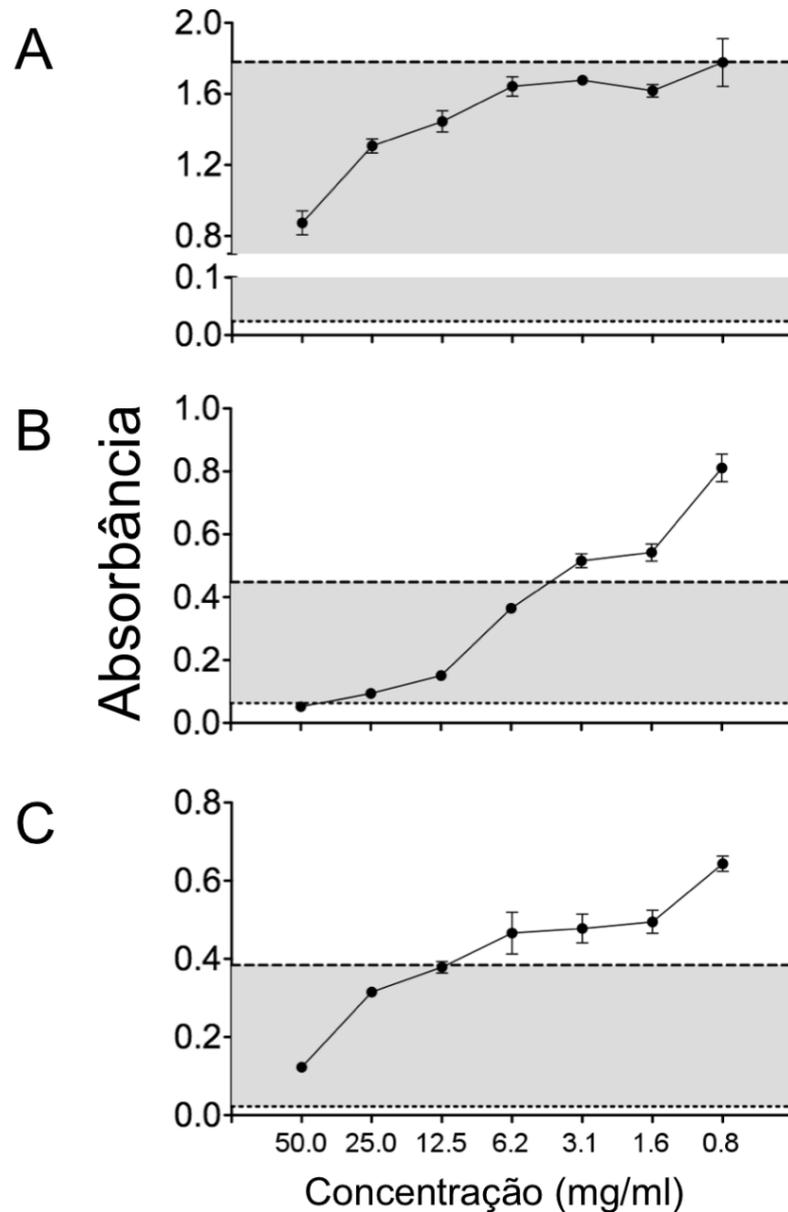


Figura 3. Citotoxicidade de medicamentos sobre trofoblastos da linhagem SM9.1. Os medicamentos ibuprofeno (A), paracetamol (B) e cefalexina (C). Foram adicionados em culturas de células SM9.1, em diferentes concentrações, por 24 h. Em seguida, a viabilidade celular foi medida pela capacidade de conversão de MTT (3- (4,5-dimetilazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) em cristais de formazam; esta conversão depende de atividade mitocondrial, que é diretamente proporcional a quantidade de células vivas. Os dados foram comparados com o controle negativo de viabilidade celular (linhas pontilhadas), que consistia em células tratadas com 100% de DMSO, e controle positivo de viabilidade celular (linhas tracejadas), no qual as células foram tratadas apenas com meio RPMI suplementado. Os dados são representativos de 2 experimentos, feitos em quadruplicatas.

6.2. EFEITO DOS MEDICAMENTOS SOBRE MANUTENÇÃO/CONVERSÃO DE Tregs

Na presença de paracetamol (Figura 4), a análise de manutenção/conversão de Tregs do timo em SM9-1, por 24 horas (Figura 4a), demonstrou que na presença da dose maior de paracetamol (50mg/ml), a quantidade de Tregs era semelhante ao controle de timo e meio. O paracetamol na menor dose (6,25 mg/ml), em 24 h (Figura 4a) levou a uma quantidade de Tregs inferior a todos os controles de células do timo. Em 48 h (Figura 4c), as duas doses levaram a contagem inferior de Tregs comparadas aos controles. As análises de manutenções/conversões de Tregs de baço (Figura 4, b e d), na presença de paracetamol e SM9-1, mostraram que na maior e menor dose ocorriam manutenção de células. Com isso, mostramos que, independente da dose de paracetamol, os níveis de Tregs não se alteraram.

Com relação ao ibuprofeno (Figura 5), a análise de conversão de Tregs do timo em 24 horas (Figura 5a), na dose menos concentrada do ibuprofeno (3,13 mg/ml), comparadas aos controles de células do timo com meio, com PHA, e com SM9-1, demonstrou uma maior porcentagem de Tregs, próxima a 3%, identificando alteração na contagem de Tregs. Esta concentração de Tregs estava próxima ao controle de células do timo 0h (Figura 5a). No tempo de 48h (Figura 5c), houve um aumento na porcentagem de Tregs na presença de ibuprofeno, na menor dose (3,13 mg/ml), de 3% para cerca de 10%.

A análise de conversão com células de baço, no período de 24h e 48h (Figura 5b e 5d), não houve aumento de Tregs. Na maior concentração de ibuprofeno (6,25 mg/ml), houve morte celular tanto em 24 h quanto em 48h em células do timo (Figura 5, a e c) e também do baço (Figura 5, b e d).

Com relação a cefalexina (Figura 6), na análise de manutenção/conversão de Tregs de timo, no período de 24 horas de cultura (Figura 6a), a menor dose de cefalexina (6,25 mg/ml) demonstrou uma elevada capacidade de manutenção/conversão de Tregs, com porcentagem ao redor de 6%, bem acima de todos os controles de células do timo. Também observamos que, na presença de cefalexina (dose maior), houve um aumento da porcentagem de Tregs para 4% em comparação aos controles de células de timo com meio e PHA e SM9-1 (Figura 6a). Em 48 horas (Figura 6c), a maior dose de cefalexina (12,5 mg/ml) houve morte celular, já na menor dose, houve aumento maior da porcentagem de Tregs, demonstrando um

efeito na manutenção/conversão dessas células. Nas células de baço (Figura 6, b e d), a análise demonstrou que, na menor dose de cefalexina não houve aumento na porcentagem de Tregs em 24 (Figura 6b) e 48 horas (Figura 6d). Na maior concentração (12,5 mg/ml), em 24 horas houve aumento da porcentagem de Tregs com cerca de 17% (Figura 6b) comparadas ao controle de baço 0h com 5%. Em 48 horas (Figura 6d), houve manutenção na quantidade de Tregs, reduzindo sua porcentagem. Nos casos em que foram apresentadas alta indução de manutenção/conversão de Tregs e, posteriormente, uma redução na sua quantidade, pode ter ocorrido a morte das células pela redução de nutrientes do meio.

As células no período de 72 horas, independente do medicamento presente, apresentaram morte celular. O que supomos que ocorreu foi a morte por redução de nutrientes do meio.

Este estudo demonstra que, na concentração 3,13 de ibuprofeno e 6,5 de cefalexina há o aumento significativo dos níveis de Tregs em culturas de células oriundas do timo, e na dose 12,5 mg/ml de cefalexina houve aumento de Tregs no período de 24 horas quando co-cultivadas com células SM9-1. Estas constatações são interessantes porque sabemos que o aumento dos níveis dessas células, durante a gestação, implica na tolerância imunológica essencial para regulação do sistema imune e manutenção do feto. Ou seja, é interessante supor que estes medicamentos poderiam auxiliar na implantação e manutenção da gravidez, do ponto de vista imunológico. Mas, devemos sempre levar em consideração que uma gravidez de sucesso é resultado de uma série de processos fisiológicos e não exclusivamente da tolerância imunológica.

A capacidade de estimular a produção de Tregs é apresentada por alguns medicamentos e vitaminas. Por exemplo, já foi descrito que a vitamina D (BAKDASH et al., 2014), a rapamicina (medicamento imunossupressor) (QU et al., 2007), o ácido acetil salicílico (medicamento pertencente ao grupo de AINES) (JAVEED et al., 2009), a indirubin (substância utilizada na medicina tradicional chinesa com propriedades anti-inflamatórias) (ZHANG et al., 2007) e a dexametasona (glicocorticoide) (CHEN, et al., 2004) têm capacidade de induzir a formação de iTregs. Segundo Yokoyama e col. (2005), a administração de inibidores da COX-2 induz a sobrevivência de enxertos cardíacos incompatíveis com o nível de células T CD4 através da geração de Tregs. Uma vez que o ibuprofeno exerce farmacologicamente seus efeitos anti-inflamatórios principalmente através da inibição da enzima COX, levando a uma redução de prostaglandinas pró-inflamatórias e, de acordo com os resultados de Yokoyama,

podemos inferir que tem efeito sobre a geração de iTregs. Portanto, de acordo com esta literatura, a variação de expressão de Tregs nas diferentes doses de ibuprofeno que encontramos podem ser devidas a dois fatores: positivo, quando estimula a geração de iTregs e negativo quando atinge uma dose tóxica às células, conforme observado nas culturas de SM9-1 (Figura 3B).

Em relação ao paracetamol, este é bem conhecido por não apresentar ação anti-inflamatória, o que pode justificar não ter demonstrado ação no aumento de expressão de Tregs. Seu mecanismo de ação não foi totalmente definido ainda, entretanto, acredita-se que exerça sua ação analgésica/antitérmica através de outra forma, sendo sugerido estar dentro do grupo de AINES atípicos (JÓZWIAK-BEBENISTA, NOWAK, 2014).

A cefalexina é um antibiótico pertencente ao grupo de cefalosporinas que, segundo Forsgren (1981), apresenta efeito imunossupressor; este, em seu estudo, demonstrou que há inibição da resposta linfocitária e, assim como no estudo de Chaperon e Sanders (1978). Entretanto, não é possível de se determinar se a redução da resposta proliferativa se devia a um efeito direto do medicamento sobre as células T efectoras ou as Tregs (ROUVEIX, GROULT, LEVACHER, 1987). O aumento da resposta imunossupressora também justifica a baixa incidência de reações de hipersensibilidade em comparação com as penicilinas, quando a cefalexina é utilizada.

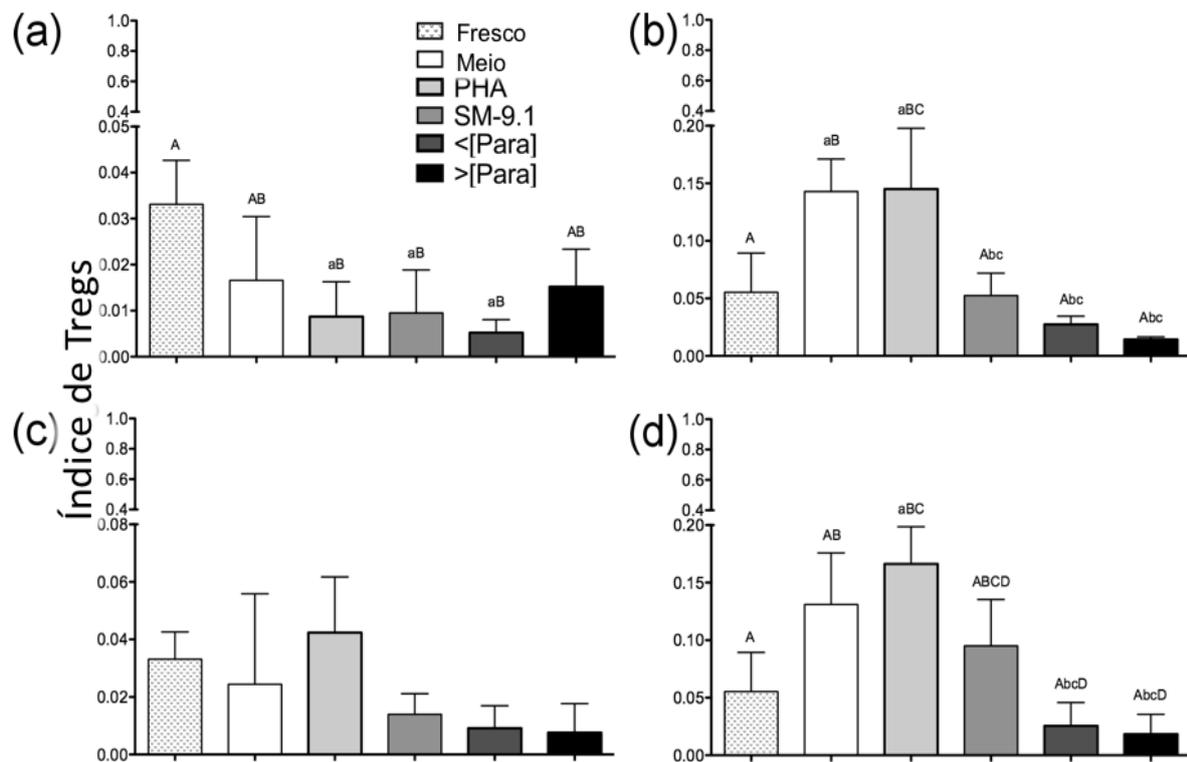


Figura 4. Expressão da concentração de Tregs presentes no timo e baço e SM9-1 com paracetamol. (a) timo com SM9-1 e paracetamol 24 horas (c) concentração de Tregs no timo e SM9-1 com paracetamol 48 horas (b) concentração de Tregs no baço e SM9-1 com paracetamol 24 horas (d) concentração de Tregs no baço e SM9-1 com paracetamol 48 horas. Como controle foram usadas células do timo e baço 0h, 24h e 48h, células do timo e baço com PHA 24h e 48h e células do timo e baço com SM9-1 24h e 48h. A dose menos concentrada do paracetamol foi 6,25 mg/ml e a mais concentrada foi 50 mg/ml.

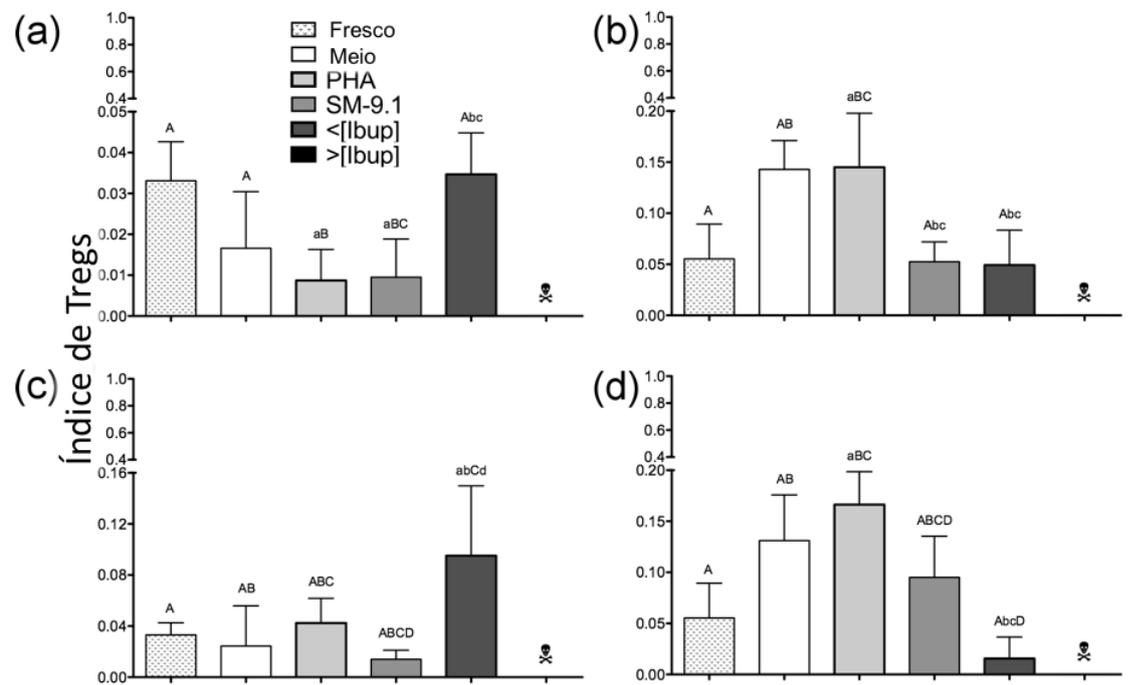


Figura 5. Expressão da concentração de Tregs presentes no timo e baço e SM9-1 com ibuprofeno. (a) timo e SM9-1 e ibuprofeno 24 horas (c) concentração de Tregs no timo e SM9-1 com ibuprofeno 48 horas (b) concentração de Tregs no baço e SM9-1 com ibuprofeno 24 horas (d) concentração de Tregs no baço e SM9-1 com ibuprofeno 48 horas. Como controle foram usadas células do timo e baço 0h, 24h e 42h, células do timo e baço com PHA 24h e 48h e células do timo e baço com SM9-1 24h e 48h. A dose menos concentrada do ibuprofeno foi 3,13 mg/ml e a mais concentrada foi 6,25 mg/ml.

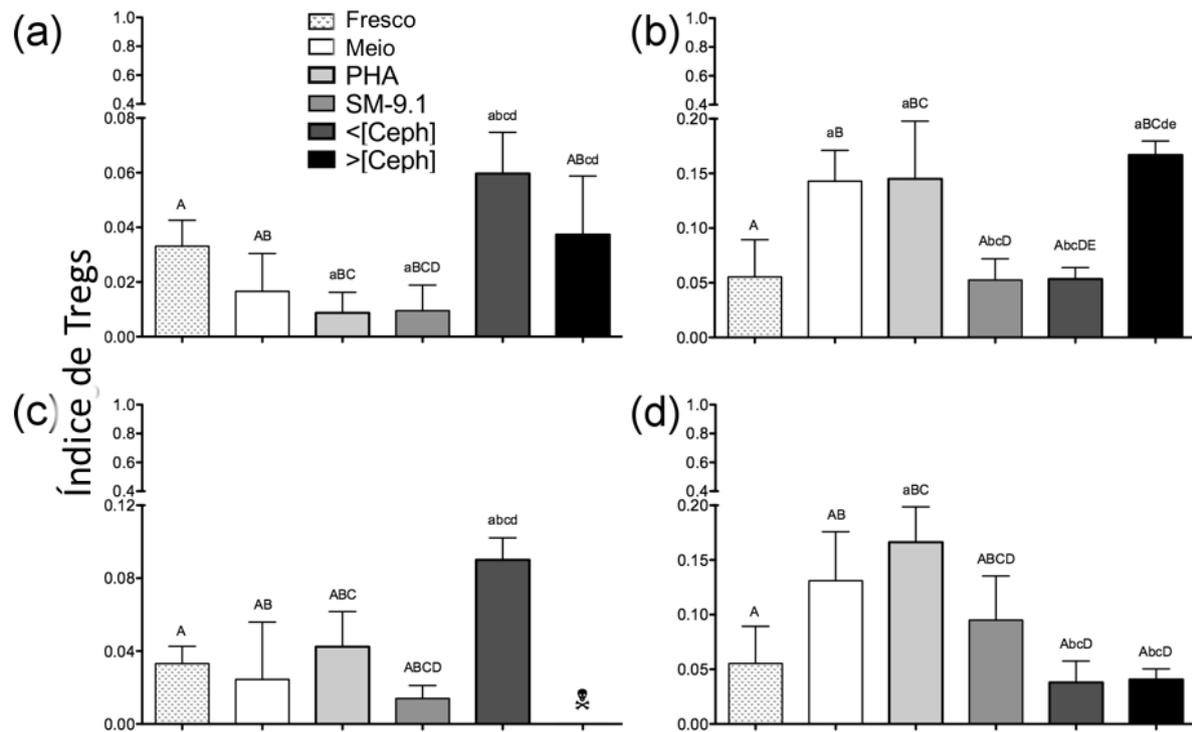


Figura 6. Expressão da concentração de Tregs presentes no timo e baço e SM9-1 com cefalexina. (a) timo com SM9-1 e cefalexina 24 horas (c) concentração de Tregs no timo e SM9-1 com cefalexina 42 horas (b) concentração de Tregs no baço e SM9-1 com cefalexina 24 horas (d) concentração de Tregs no baço e SM9-1 com cefalexina 42 horas. Como controle foram usadas células do timo e baço 0h, 24h e 42h, células do timo e baço com PHA 24h e 24h e células do timo e baço com SM9-1 24h e 42h. A dose menos concentrada de cefalexina foi 6,25 mg/ml e a mais concentrada foi 12,5 mg/ml.

5. CONCLUSÕES

O paracetamol gerou progressiva morte celular em células de trofoblastos (SM9-1), nas concentrações de 12,5, 25,0 e 50,0 mg/ml. O ibuprofeno causou morte de SM9-1 nas concentrações de 50,0, 25,0 e 12,5 mg/ml e a cefalexina levou à morte celular apenas na concentração de 50 mg/ml.

O paracetamol não interferiu na manutenção/conversão de Tregs. Já o ibuprofeno, na dose menor (3,13 mg/ml) sob células do timo influenciou na manutenção/conversão de Tregs e, por fim, a cefalexina, na dose de 6,25, influenciou na manutenção/conversão de Tregs do timo e na dose e 12,5 mg/ml aumentou a porcentagem de Tregs do baço.

Desta forma, podemos concluir que os tratamentos *in vitro* com ibuprofeno e cefalexina são positivos para manutenção/conversão de Tregs quando estão na presença de trofoblastos. Hipoteticamente, este efeito positivo poderia tornar as gestantes mais propensas à tolerância fetal, que seria benéfico para prevenção de rejeição do feto pelo sistema imunológico materno.

6. REFERÊNCIAS

7. ABDYELKAREN, A. R.; MUSTAFA, H. **Use of Over-the-Counter Medication among Pregnant Women in Sharjah, United Arab Emirates**. Hindawi: Journal of Pregnancy, 2017.
8. ADALID-PERALTA, L.; GLADIS, F.; FLEURY, A.; SCIUTTO, E. **Mechanisms Underlying the Induction of Regulatory T cells and Its Relevance in the Adaptive Immune Response in Parasitic Infections**. International Journal of Biological Sciences, v.7. n.9, p.1412–1426, 2011.
9. ADAMS, S.S.; BOUGH, R. G.; CLIFFE, E.E.; LESSEL, B.; MILLS, R. F. N. **Absorption, Distribution and Toxicity of Ibuprofen**. Toxicology and Applied Pharmacology, v. 15, p. 310-330, 1969.
10. ADATIA, A.; RAINSFORD, K. D.; KEAN, W. F. **Osteoarthritis of the knee and hip. Part II: therapy with ibuprofen and a review of clinical trials**. Journal of Pharmacy and Pharmacology., v. 64, p. 626 -636, 2012.
11. AMUNDSEN, S.; NORDENG, H.; NEZVALOVÁ-HENRIKSEN, K.; STOVNER, L. J.; SPIGSET, O. **Pharmacological treatment of migraine during pregnancy and breastfeeding**. Nature Reviews Neurology, v. 11, n. 4, p. 109-119, 2015.
12. BAKDASH, G.; VAN CAPEL, T. M.; MASON, L. M.; KAPSENBERG, M. L.; JONG, E. C. **Vitamin D3 metabolite calcidiol primes human dendritic cells to promote the development of immunomodulatory IL-10-producing T cells**. Vaccine, v. 32, n. 47, p. 6294-6302, 2014.
13. BARKER, J.D.; DE CARLE, D. I.; ANURAS, S. **Chronic excessive acetaminophen use and liver damage**. An. Int. Med., v. 87, p. 299-301, 1977.
14. BERREBI, D.; BRUSCOLI, S.; COHEN, N.; FOUSSAT, A.; MIGLIORATI, G.; BOUCHET-DELBOS, L.; MAILLOT, M.; PORTIER, A.; COUDERC, J.; GALANAUD, P.; PEUCHMAUR, M.; RICCARDI, C.; EMILIE, D. **Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10**. Journal Blood, v. 101, p.729-738, 2003.
15. BOURGET, P.; ROULOT, C.; FERNANDEZ, H. **Models for placental placental transfer studies of drugs**. Clin. Pharmacokinet., v. 28, n. 2, p. 161-180, 1995.
16. BRUNE, K.; RENNER, B.; TIEGS, G. **Acetaminophen/paracetamol: A history of errors, failures and false decisions**. European Journal of Pain, 2014.
17. BURDAN, F. **Developmental Toxicity Evaluation of Ibuprofen and Tolmetin Administered in Triple Daily Doses to Wistar CRL:(WI)WUBR Rats**. Birth Defects Research, v. 71, p. 321-330, 2004.
18. CARPENTER, J. W. **EXOTIC ANIMAL FORMULARY**, Elsevier, 4 ed., 2013.
19. CATTANEO, D.; CLEMENTI, E. **Clinical Pharmacokinetics of Ibuprofen Arginine**. Current Clinical Pharmacology, v. 5, p. 239-245, 2010.
20. CHA, J.; SUN, X.; DEY, S. K. **Mechanisms osimplatation: strategies for successful pregnancy**. Nature Medicine, v. 18, n.12, p. 1754-1767, 2012.
21. CHAPERON, E. A.; SANDERS, W. E. J. **Suppression of lymphocyte responses by cephalosporins**. Infection and Immunity, v. 19, n. 2, p. 378-384, 1978.
22. CHEN, X.; MURAKAMI, T.; OPPENHEIM, J. J.; HOWARD, Z. O. M. **Differential response of murine CD4+ CD25+ and CD4+ CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death**. Eur. J. Immunol., v. 34, p. 859-869, 2004.

23. CHIEN, A. L.; QI, J.; RAINER, B.; SACHS, D. L.; HELFRICH, Y. R. **Treatment of Acne in Pregnancy.** Journal of the American Board of Family Medicine, v. 29, n. 2, p. 254-262, 2016.
24. CHRISTENSEN, B. **Which antibiotics are appropriate for treating bacteriuria in pregnancy?** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 46, p. 29-34, 2000.
25. COHEN, N.; MOULY, E.; HAMDI, H.; MAILLOT, M.; PALLARDY, M.; GODOT, V.; CAPEL F.; BALIAN A.; NAVEAU, S.; GALANAUD, P.; LEMOINE, F. M.; DOMINIQUE, E. **GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response.** Journal Blood, v. 107, p. 2037-2044, 2006.
26. CREATSAS, G.; PAVLATOS, M.; LOLIS, D.; KLISKARELIS, D. **A study of the kinetics of cephapirin and cephalixin in pregnancy.** Current Medical Research and Opinion, v.7, n.1, 1980.
27. DAMASE-MICHEL, C.; HURAUULT-DELARUE, C. **Ibuprofen does not seem to increase global malformation risk but NSAID use in late pregnancy remains a concern.** Evid. Based Med., v. 19, n. 2, p. 74, 2014.
28. DERRY, C. J.; DERRY, S.; MOORE, R. A.; MCQUAY, H. J. **Single dose oral ibuprofen for acute postoperative pain in adults.** The Cochrane Database of Systematic Reviews, v.3, 2009.
29. DERRY, S.; MOORE, R. A.; MCQUAY, H. J. **Paracetamol (acetaminophen) with or without an antiemetic for acute migraine headaches in adults.** Cochrane Database of Systematic Reviews, v. 11, 2010.
30. ENGLER, J. B.; KURSAWE, N.; SOLANO, M. E.; PATAS, K.; WEHRMANN, S.; HECKMANN, N.; LUHDER, F.; REICHARDT, H. M.; ARCK, P. C.; OURO, S. M.; FRIESE, M. A. **Glucocorticoid receptor in T cells mediates protection from autoimmunity in pregnancy.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 114, n. 3, p. 181-190, 2017.
31. European Medicines Agency. **Pharmacovigilance Risk Assessment Committee (PRAC): minutes of the meeting on 5–8 May 2014.** PRAC: Agendas, minutes and highlights, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Minutes/2014/06/WC500169468.pdf.
32. FORSGREN, A. **The immunosuppressive effect of cephalosporins and cephalosporin-gentamicin combinations.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 8, p. 183-186, 1981.
33. GELLERSEN, B.; BROSENS, J. J. **Cyclic Decidualization of the Human Endometrium in Reproductive Health and Failure.** Endocrine Reviews, v. 35, n. 6, p. 851-905, 2014.
34. GELLERSEN, B.; BROSENS, I. A.; BROSENS, J. J. **Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives.** SeminReprod Med., v. 25, n. 6, p. 445-453, 2007.
35. GOWER, P. E.; DASH, C. H. **Cephalexin: Human studies of absorption and excretion of a new cephalosporin antibiotic.** British Journal of Pharmacology, v. 37, n. 3, p. 738-747, 1969.
36. GRIFFIN, M. D.; LUTZ, W.; PHAN, V. A.; BACHMAN, L. A.; MCKEAN, D. J.; KUMAR, R. **Dendritic cell modulation by 1 α , 25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: A vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistente state of immaturity *in vitro* and *in vivo*.** Proceeding of the National academy of Sciences of the United States of America, v. 98, n. 12, p. 6800-6805, 2001.
37. GRIFFITH, R. S. **The pharmacology of cephalixin.** Postgraduate Medical Journal, v. 59, n. 5, p. 16-27, 1983.

38. GUERIN, L. R.; PRINS J. R.; ROBERTSON, S. A. **Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment?** Human Reproduction Update, v. 15, n. 5, p. 517-535, 2009.
39. GUINTO, V. T.; GUIA, B.; FESTIN, M. R.; DOWSWELL, T. **Different antibiotic regimens for treating asymptomatic bacteriuria in pregnancy.** The Cochrane database of systematic reviews, v. 9, 2010.
40. JANIKASHVILI, N.; BONNOTTE, B.; KATSANIS, E.; LARMONIER N. **The Dendritic Cell-Regulatory T Lymphocyte Crosstalk Contributes to Tumor-Induced Tolerance.** Clinical and Developmental Immunology, 2011.
41. JAVEED, A.; ZHANG, B.; QU, Y.; ZHANG, A.; SUN, C.; ZHANG, L.; LIU, J.; ZENG, C.; ZHAO, Y. **The significantly enhanced frequency of functional CD4+ CD25+ Foxp3+ T regulatory cells in therapeutic dose aspirin-treated mice.** Transplant Immunology, v. 20, p. 253-260, 2009.
42. JEONG, H. **Altered drug metabolism during pregnancy: Hormonal regulation of drug-metabolizing enzymes.** Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, v.6, n. 6, p. 689-699, 2010.
43. JÓZWIAK-BEBENISTA, M.; NOWARK, J. **PARACETAMOL: MECHANISM OF ACTION, APLICATIONS AND SAFETY CONCERN.** Acta. Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, v. 71, n. 1, p 11-23, 2014.
44. LAW, R.; BOZZO, P.; KOREN, G.; EINARSON, A. **FDA pregnancy risk categories and the CPS: Do they help or are they a hindrance?** Canadian Family Physician, v.56, n.3, p.239–241, 2010.
45. LIEW, Z.; RITZ, B.; REBORDOSA, C.; LEE, P. C.; OLSEN, J. **Acetaminophen use during pregnancy, behavioral problems, and hyperkinetic disorders.** JAMA Pediatrics, v. 168, n. 4, p. 313-320, 2014.
46. MARIN, J. J.; BRIZ, O.; SERRANO, M.A. **A review on the molecular mechanisms involved in the barrier for drugs.** Curr. Drug. Deliv., v. 1, n. 3, p. 275-289, 2004.
47. MOR, G.; CARDENAS, L.; ABRAHAMS, V.; GULLER, S. **Inflammation and pregnancy: the role of the imune system at the implantation site.** Annals of the New York academy of sciences, n. 1221, p. 80-87, 2011.
48. MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J. Immunol. Methods 65, p. 55–63, 1983.
49. NEZVALOVÁ-HENRIKSEN, B.; SPIGSET, O; NORDENG, H. **Effects of Ibuprofen, Diclofenac, Naproxen and Piroxicam on the Course of Pregnancy Outcome: A prospective Study.** BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology, v. 120, n. 8, p. 948-959, 2013.
50. PASANEM, M.; PELKENEN, O. **The expression and enviromental regulation of P450 enzymes in human placenta.** Crit. Rev. Toxicol., n. 24, v. 3, p. 211-229, 1994.
51. PEREIRA, L. M. S.; GOMES, S. T. M.; ISHAK, R.; VALLINOTO, A. C. R. **Regulatory T Cell and Forkhead Box Protein 3 as Modulators of Immune Homeostasis.** Frontiers in Immunology, v. 8, n. 605, 2017.
52. PLONAIT, S. L.; NAU, H. **Physiochemical and structural properties regulating placental drug transfer.** In: Polin, R.A., Fox, W.W., Abman, S.H. (Eds.), Fetal and Neonatal Physiology. Saunders, London, p-197-211, 2004.
53. QU, Y.; ZHANG, B.; ZHAO, L.; LIU, G.; MA, H.; RAO, E.; ZENG, C.; ZHAO, Y. **The effect of immunosuppressive drug rapamycin on regulatory CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells in mice.** Transplant Immunology, v. 17, n. 3, p. 153-161, 2007.

54. RABBIE, R.; DERRY, S.; MOORE, R. A.; MCQUAY, H. J. **Ibuprofen with or without an antiemetic for acute migraine headaches in adults.** The Cochrane database of systematic reviews, v.10, 2010.
55. ROUVEIX, B.; GROULT, F. LEVACHER, M. **BETA-LACTAM ANTIBIOTICS AND HUMAN LYMPHOCYTE FUNCTION: THE IN VITRO EFFECT ON BLASTOGENESIS, LYMPHOKINE PRODUCTION AND SUPPRESSOR CELL FUNCTIONS.** *Internacional Journal of immunopharmacology*, v. 9, n. 5, p. 567-575, 1987.
56. ROWE, J. H.; ERTELT, J. M.; XIN, L.; WAY, S. S. **Regulatory T cells and the immune pathogenesis of prenatal infection.** *Reproduction (Cambridge, England)*, v. 146, n. 6, p. 191-203, 2013.
57. SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. **Regulatory T Cells and Immune Tolerance.** *Cell*, v.133, n.5, p. 775-787, 2008.
58. SALCEDO, M. M. B. P.; BEITUNE, P. E.; SALIS, M. F.; JIMÉNEZ, M. F.; AYUB, A. C. K. **Infecção urinária na gestação.** *Grupo editorial Moreira JR*, v. 67, n. 8, p. 270-273, 2010.
59. SAMMETA, S.; VAKA, S.; MURTHY, S. N. **DERMAL DRUG LEVELS OF ANTIBIOTIC (CEPHALEXIN) DETERMINED BY ELECTROPORATION AND TRANSCUTANEOUS SAMPLING (ETS) TECHNIQUE.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 98, n.8, p.2677–2685, 2009.
60. SMEDBERG, J.; BRATHEN, M.; WAKA, M. S.; JACOBSEN, A. F.; GJERDALEN, G.; NORDENG, H. **Medication use and drug-related problems among women at maternity wards—a cross-sectional study from two Norwegian hospitals.** *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 72, p. 849-857, 2016.
61. SMITH, M.; WHITEHEAD, E.; O’SULLIVAN, G.; REYNOLDS, F. **A comparison of sérum and saliva paracetamol concentrations.** *British Journal of Clinical Pharmaceuticals*, v. 31, p. 553-555, 1991.
62. STARK, K. L.; HARRIS, C.; JUCHAU, M. R. **Modulation of the embryotoxicity and cytotoxicity elicited by 7-hydroxy-2-acetylaminofluorene and acetaminophen via deacetylation.** *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.97, n. 3, p. 548-560, 1989.
63. TREHANPATI, N.; VYAS, A. K. **Immune regulation by T regulatory cells in HBV related inflammation and cancer.** *Scandinavian Journal of Immunology*, 2017.
64. YOKOYAMA, T.; ARAMAKI, O.; TAKAYAMA, T.; TAKANO, S.; ZHANG. Q.; SHIMAZU, M.; KITAJIMA, M.; IKEDA, Y.; SHIRASUGI, N.; NIIMI, M. **Selective cyclooxygenase 2 inhibitor induces indefinite survival of fully allogeneic cardiac grafts and generates CD4+ regulatory cells.** *The Journal Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 130, n. 4, p. 1167-1174, 2005.
65. ZHANG, A.; QU, Y.; ZHANG, B.; ZHANG, L.; ZENG, C.; PENG, J.; JI, X.; HOU, M.; ZHAO, Y. **The different effects of indirubin on effector and CD4+ CD25+ regulatory T cells in mice: potential implication for the treatment of autoimmune diseases.** *Journal Mol. Med.*, v. 85, p. 1263-1270, 2007.

