ANA CAROLINA FURLANETTO MANÇANARES

**O estudo das células T $\gamma\delta$ na manutenção da tolerância materna em
vacas gestantes**

São Paulo

2016

ANA CAROLINA FURLANETTO MANÇANARES

**O estudo das células T γ δ na manutenção da tolerância materna em
vacas gestantes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Daniele, dos Santos Martins

De acordo:
Orientador

São Paulo
2016

Obs.: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3285
FMVZ

Mançanares, Ana Carolina Furlanetto
O estudo das células T $\gamma\delta$ na manutenção da tolerância materna em vacas gestantes
/ Ana Carolina Furlanetto Mançanares. -- 2016.
93 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Dra. Daniele dos Santos Martins

Co-orientador: Dra. Lilian Jesus de Oliveira.

1. Células T $\gamma\delta$. 2. Endométrio. 3. PBMC. 4. Linfócitos T. 5. Citocinas. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "O estudo das células T gama delta na manutenção da tolerância materna em vacas gestantes", protocolado sob o CEUA nº 4922220415, sob a responsabilidade de **Daniele Dos Santos Martins e equipe; Ana Carolina Furlanetto Mançanares** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 01/07/2015.

We certify that the proposal "The study of gamma delta T cells in maintaining maternal tolerance in pregnant cows", utilizing 35 Bovines (35 females), protocol number CEUA 4922220415, under the responsibility of **Daniele Dos Santos Martins and team; Ana Carolina Furlanetto Mançanares** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 07/01/2015.

Vigência da Proposta: de 02/2012 a 02/2016

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Procedência: Abatedouro

Espécie: Bovino

Gênero: Fêmeas

idade: idade reprodutiva

N: 15

Linhagem: Holandesa

Peso: 550

Procedência: E os animais utilizados no experimento II e III são provenientes do setor de Bovinos de Leite do Campus Administrativo de Pirassununga.

Espécie: Bovino

Gênero: Fêmeas

idade: idade reprodutiva

N: 20

Linhagem: Holandesa

Peso: 550

São Paulo, 02 de julho de 2015

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MANÇANARES, Ana Carolina Furlanetto

Título: O estudo das células T γ δ na manutenção da tolerância materna em vacas gestantes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Humberto e Marina, por representarem os maiores exemplos da minha vida e pelos esforços imensuráveis! Amo vocês!

Ao meu irmão Daniel, que me apoiou em todos os momentos e por sempre me ajudou nos meus sonhos!

Agradecimentos

É exatamente disso que a vida é feita: de momentos! Momentos os quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso próprio aprendizado, por algum motivo. Nunca esquecendo do mais importante: nada na vida é por acaso.

Chico Xavier

Agradeço a Deus, pelos caminhos da vida, sendo eles bons ou não, e por ter me mostrado todo o meu potencial e a capacidade de crescer!

A minha família, que me proporcionou uma formação repleta de bons princípios. Meu Pai Humberto, que durante toda a minha vida foi a minha inspiração; um exemplo de vida e dignidade, que eu espero honrar sempre. Minha mãe, que sempre foi a voz da emoção; que riu e chorou comigo, todas as felicidades e tristezas; sua força me ensinou a vencer obstáculos. Meu irmão e nada por acaso, meu melhor amigo! Que segurou todas as pontas em todos os momentos e é meu maior exemplo de bondade e simplicidade. E por último e não menos importante, Tati Magalhães que foi escolhida para fazer parte da minha família e será minha eterna amiga e confidente. Vocês são o melhor de mim!

Tenha um orientador. Viver sem é decidir na neblina, sabendo que o resultado só será conhecido, quando pouco resta a fazer. Procure alguém de confiança, de preferência mais experiente e mais bem-sucedido, para lhe orientar nas decisões, caso precise.

O doutorado me deu duas orientadoras, e só tenho de agradecer pela oportunidade, pelo incentivo, por toda a ajuda. Dra. Lilian de Jesus Oliveira, me deu ferramentas, me ajudou a crescer e amadurecer, entender, pensar e discutir, sempre me guiando nos momentos necessários. Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins, obrigada por todo suporte, atenção e confiança depositada durante o desenvolvimento desse projeto e por todas as brigas compradas e vencidas. Serei eternamente grata a vocês.

Como uma tese não se faz sozinha, eu agradeço a todos que me ajudaram e que contribuíram de alguma forma para essa tese.

Prof. Carlos Eduardo Ambrósio, sei que as coisas não aconteceram do jeito que eu quis, mas que tudo foi um ótimo aprendizado e posso dizer com toda a certeza, que por tudo o que passei, fui vencedora.

Prof. Felipe Perecin, Prof. Flavio Meirelles e Prof. Heidge Fukumasu, que fizeram parte dessa caminhada e me ajudaram sempre que necessário.

Prof. Rennó, Sr. Diogo, Guilherme do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, que me ajudaram com todas as coletas de sangue.

Prof. Mario Binelli, Everton e colegas do LFEM, que sempre me ajudaram e me receberam com muito carinho e atenção.

Funcionárias do Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, ao Diretor Presidente Dimas Tadeu Covas e em especial à querida Patricia Vianna Bonini Palma; foi um enorme prazer trabalhar e aprender citometria com você.

Minha querida PIBIC Gabriela Figueiredo, que me ajudou muito desde o estágio até a iniciação científica, a primeira “orientada” a gente nunca esquece!

*Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores,
mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!*

Vinícius de Moraes

Meus eternos amigos do USPício, Marina, André e Phelipe, prova mais concreta de que para estar junto não precisa estar perto.

Naira e Arina, que são minhas parceiras e companheiras de todos os momentos. Somos o trio do vinho, da coxinha da quarta e da janta de quinta. E se tem uma frase que nos define, é essa: “Delicada como coice de mula; Doce como limão; tranquila igual furacão”, ninguém segura esse trio!

Não poderia deixar de agradecer minha eterna *roommate* Gabi MyNerd e meus amigos do LMMD, LOCT e GDTI: Ramon, Ju, Léo Xuxu, Rafa, Tiaguinho, Juliano (Tchê), Pedrinho, Lais, Martini, Katia, Léo Amaral, Yonara, Pamela, Pedro, Chico, Lídia, Ju Casals, Cury, Atanásio, Vanessa, Natalia, Luciana. Ufa!!!! Espero não ter esquecido ninguém. Vocês me ajudaram a tornar esse caminho mais fácil! E quem fala que ser pós-graduando é não ter vida social não conhece vocês, pois mesmo passando horas dentro do laboratório, conseguimos cantar e dançar até mesmo pelos corredores.

Barretinho, só tenho a agradecer por tudo o que passamos juntos, por ter me ensinado imuno, citometria, PCR, e muitas outras coisas e por estar do meu lado sempre!

Thiago Vendramini, que me ajudou nas coletas de sangue, que foi sempre um grande amigo e eterno vizinho!

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), e ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres por todo o suporte necessário para o desenvolvimento deste doutorado.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (2012/11212-6).

E só para nunca esquecer, vida de pós-graduando não é para qualquer um. Venci e faria tudo novamente!!

If you can dream it, you can do it

Walt Disney

RESUMO

MANÇANARES, A. C. F. **O estudo das células $T\gamma\delta$ na manutenção da tolerância materna em vacas gestantes.** [Study of gamma delta t cells in maintenance of maternal tolerance in pregnancy in cattle]. 2016. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O sistema imunológico materno desempenha um papel importante no estabelecimento da gestação e desenvolvimento de concepto até início do parto. A hipótese deste projeto é que há um recrutamento de células $T\gamma\delta$ para o endométrio ao longo da gestação que expressam citocinas que favorecem o estabelecimento e manutenção da tolerância materna a antígenos fetais durante a gestação em bovinos. Experimento I – Para estudar a dinâmica populacional das células do sistema imune no sangue periférico de não lactantes não prenhes (NLNP), vacas lactantes no 1º trimestre e vacas no 3º trimestre da gestação, as PBMCs foram separadas por gradiente de densidade de Ficoll, seguido por protocolo de imunocitoquímica e analisadas em citômetro de fluxo para os anticorpos $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD14^+$, $CD25^+$ e $WC1^+$. As células analisadas tanto na região de linfócitos quanto na região de monócitos, não apresentaram diferença significativa entre os grupos analisados. Experimento II – Para análise do perfil de expressão gênica das células $T\gamma\delta$ foram coletadas amostras de sangue de vacas no 1º trimestre da gestação, vacas lactantes não prenhes (LNP) e vacas não lactantes não prenhes (NLNP). As células mononucleares foram separadas por gradiente de densidade de Ficoll e células $T\gamma\delta$ foram analisadas quanto ao perfil de citocinas por qRT-PCR para os genes *IFNG*; *IL10*; *IL15*; *IL17*; *IL18*; *IL1B*; *IL4*; *IL-6*; *ISG15*; *PFR*; *TGFB2* e *TNFA*. A análise de expressão gênica mostrou tendência no aumento na expressão de *IL1B*, *IL6* e *TGFB2* em células PBMC em vacas NLNP quando comparado com vacas LNP e no 1º trimestre da gestação, enquanto que os outros genes analisados não apresentaram diferença significativa. Experimento III – Fragmentos de endométrio, provenientes de abatedouro, foram coletados de vacas em 1º trimestre (33 a 35 dias de gestação), 2º trimestre (143 a 182 dias de gestação) e 3º trimestre de gestação (228 a 247 dias de gestação). Cortes congelados foram imunolocalizados e quantificados para as células do sistema imune $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD14^+$, $CD18^+$, $CD25^+$, $CD62L^+$ e $WC1^+$ por imunofluorescência. Nossos estudos mostraram aumento das células $CD25^+$ e $CD62L^+$ no endométrio no início da gestação. No meio da gestação, há um aumento das células $WC1^+$ e $CD14^+$. No final da gestação, observamos o aumento de $CD14^+$, $CD25^+$, $CD18^+$ e $CD62L^+$. Em suma, nossos dados sugerem que a modulação do sistema imune materno é específica para cada estágio da gestação, sendo que no início da gestação há um envolvimento de células T ativadas ($CD25^+$) provavelmente para o estabelecimento de uma resposta ativa para tolerância dos

antígenos fetais. Já no meio da gestação, há um recrutamento massivo de células $T\gamma\delta$ para o endométrio gravídico provavelmente para manter um microambiente de tolerância para o desenvolvimento fetal e no final da gestação células efetoras como macrófagos são recrutadas para o endométrio para auxiliar no processo do parto e involução uterina.

Palavras-chave: Células $T\gamma\delta$. Endométrio. PBMC. Linfócitos T. Citocinas.

ABSTRACT

MANÇANARES, A. C. F. **Study of gamma delta t cells in maintenance of maternal tolerance in pregnancy in cattle.** [O estudo das células $\gamma\delta$ na manutenção da tolerância materna em vacas gestantes]. 2016. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The maternal immune system plays an important role on the establishment and maintenance of pregnancy until the onset of parturition in mammals. Our hypothesis is that there is a recruitment of $\gamma\delta$ T-cell to the endometrium during pregnancy. These cells express a particular cytokine profile that is important to the establishment and maintenance of maternal tolerance to fetal antigens in cattle. Experiment I - To study the population dynamics of immune cells in the peripheral blood of NLNP, 1st and 3rd trimester of pregnancy, PBMCs were separated by Ficoll density gradient and the abundance of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD25⁺ and WC1⁺ was analyzed by single-color flow cytometry. There was no statistical difference of the abundance of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD25⁺ among groups of cows. Experiment II - To analyze the gene expression profile of 1st trimester, LNP and NLNP. PBMCs were isolated by Ficoll density gradient and $\gamma\delta$ T-cells (WC1⁺) were enriched by magnetic cell sorting. Both PBMC and WC1⁺ cells gene expression was analyzed for *IFNG*; *IL10*; *IL15*; *IL17*; *IL18*; *IL1B*; *IL4*; *IL-6*; *ISG15*; *PFR*; *TGFB2* and *TNFA* by qRT-PCR. Gene expression analysis showed increased expression of the *IL1B*, *IL6* and *TGFB2* in PBMC in NLNP compared with 1st trimester of pregnancy and LNP cows, while other genes analyzed showed no significant difference. Experiment III – fragments of endometrium were collected from cows at the early (33 to 35 days of pregnancy), mid (143 to 182 days of pregnancy) and late pregnancy (228 to 247 days of pregnancy). Endometrial immune cells were quantified (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD18⁺, CD25⁺, CD62L⁺, and WC1⁺) by single-color immunofluorescence. There was an increase CD25⁺ and CD62L⁺ cells in the endometrium in early pregnancy. In the mid of pregnancy, there was an increase of WC1⁺ and CD14⁺ cells. At the end of pregnancy, there was an increase of CD14⁺, CD25⁺, CD18⁺ and CD62L⁺. In conclusion, our data suggest that the maternal immune system is modulated according to the stage of pregnancy in the cow. In early pregnancy, there is an increased number of endometrial CD25⁺ cells that may reflect the activation of local immune response and recruitment of putative T-reg cells to the endometrium for an active establishment of maternal tolerance to fetal antigens. While, in mid pregnancy there is a massive recruitment of $\gamma\delta$ T-cells and CD14⁺ to the pregnant endometrium perhaps to maintain an tolerogenic microenvironment and to promote tissue remodeling for proper fetal development and growth. Finally, in late pregnancy, there is a recruitment of effector immune

cells such as CD62L⁺, CD18 and CD14⁺ cells associated with an increased expression of proinflammatory cytokines (i.e. *IFNG*, *IL-6*) to play a role on induction of parturition and uterine involution in the cow.

Key words: T $\gamma\delta$ cells. Endometrium. PBMC. Lymphocytes. Cytokine.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1– REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DESENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS TAB E TTΔ	20
FIGURA 2– MECANISMOS DE AÇÃO DAS CÉLULAS TTΔ	24
FIGURA 3– DESENHO ESQUEMÁTICO DO EXPERIMENTO I	29
FIGURA 4 – GRÁFICO DE PONTOS REPRESENTATIVOS DA AQUISIÇÃO DE AMOSTRAS POR CITOMETRIA DE FLUXO, PARA ANÁLISE DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO DAS VACAS VAZIAS E EM 1º TRIMESTRE E 3º TRIMESTRE DA GESTAÇÃO	32
FIGURA 5– DIFERENÇA NAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO ENTRE VACAS NÃO PRENHES, 1º TRIMESTRE E 3º TRIMESTRE DE GESTAÇÃO, DETERMINADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	35
FIGURA 6– DESENHO ESQUEMÁTICO EXPERIMENTO II	38
FIGURA 7 – PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM PBMC E CÉLULAS WC1 ISOLADAS EM BOVINOS	46
FIGURA 8 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO EXPERIMENTO III	49
FIGURA 9 – IMUNOFLUORESCÊNCIA EM TECIDO ENDOMETRIAL PARA WC1 ⁺	54
FIGURA 10 – IMUNOFLUORESCÊNCIA EM TECIDO ENDOMETRIAL PARA CD3 ⁺	55
LEGENDA: IMAGEM DE IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA CD3 (VERDE) NO 1º TRIMESTRE (A-B), 2º TRIMESTRE (C-D) E 3º TRIMESTRE DE GESTAÇÃO (E-F) NO ESTROMA SUPERFICIAL (SS) E ESTROMA PROFUNDO (DS) DO ENDOMÉTRIO BOVINO (NÚCLEO CORADO COM DAPI [AZUL]), CONTROLE (G-H). AUMENTO DE 40X. FIGURA 11 – IMUNOFLUORESCÊNCIA EM TECIDO ENDOMETRIAL PARA CD8 ⁺	55
FIGURA 12 – IMUNOFLUORESCÊNCIA EM TECIDO ENDOMETRIAL PARA CD14 ⁺	59
FIGURA 13 – IMUNOFLUORESCÊNCIA EM TECIDO ENDOMETRIAL PARA CD4 ⁺	60
FIGURA 14 – IMUNOFLUORESCÊNCIA EM TECIDO ENDOMETRIAL PARA CD25 ⁺	61
FIGURA 15 – IMUNOFLUORESCÊNCIA EM TECIDO ENDOMETRIAL PARA CÉLULA LEUCÓCITO (CD18)	63
FIGURA 16 – IMUNOFLUORESCÊNCIA EM TECIDO ENDOMETRIAL PARA MONÓCITOS (CD62L) ..	64
FIGURA 17 – QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS SISTEMA IMUNE EM ENDOMÉTRIO DE VACAS EM 1º TRIMESTRE, 2º TRIMESTRE E 3º TRIMESTRE DE GESTAÇÃO	65
FIGURA 18 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA EXPRESSÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE PRESENTES NO ENDOMÉTRIO NO 1º TRIMESTRE, 2º TRIMESTRE E 3º TRIMESTRE DE GESTAÇÃO	67
FIGURA 19 – DESENHO ESQUEMÁTICO DE PROTEÍNAS E GENES EXPRESSOS NO SANGUE PERIFÉRICO E NO TECIDO ENDOMETRIAL EM DIFERENTES FASES DO CICLO REPRODUTIVO DE VACAS.	70

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1– ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	31
QUADRO 2– SEQUÊNCIA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR QUANTITATIVO.....	41
QUADRO 3– ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS UTILIZADOS NA IMUNOFLUORESCÊNCIA.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TCR	Receptores de células T
DN	Duplo negativo
DP	Duplo positivo
CD3	Linfócitos T
CD4	Linfócito T auxiliar
CD8	Linfócito T citotóxico
CD14	Macrófagos/Monócitos
CD25	Linfócito T regulatório
CD18	β 2-Integrina
CD62L	L-Selectina
WC1	Células T gama delta
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
<i>IFNG</i>	<i>Interferon gamma</i>
<i>IL10</i>	<i>Interleukin 10</i>
<i>IL17</i>	<i>Interleukin 17^a</i>
<i>IL18</i>	<i>Interleukin 18</i>
<i>IL4</i>	<i>Interleukin 4</i>
<i>IL-6</i>	<i>Interleukin 6</i>
<i>ISG15</i>	<i>Interferon-stimulated protein 15 kDa</i>
<i>TGFB2</i>	<i>Transforming growth factor beta 2</i>
<i>TNFA</i>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
<i>PFR</i>	<i>Perforin 1 (pore forming protein)</i>
<i>PPIA</i>	<i>Peptidylprolyl isomerase A</i>
<i>YWHAZ</i>	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta</i>
OCT	do inglês <i>Optimal cutting temperature compound</i>
CR	do inglês <i>Crown-rump</i>
TBS	solução salina tamponada com Tris
DPBS	Tampão Dulbecco Salina Fosfato
FSC	do inglês <i>Forward Scatter</i>
FL1-H	Intensidade de fluorescência
SSC	do inglês <i>Side Scatter</i>

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	ONTOGENIA DAS CÉLULAS T $\gamma\delta$	19
2.2	IMUNOLOGIA DA GESTAÇÃO	21
2.3	CÉLULAS T $\gamma\delta$ NA GESTAÇÃO	23
3	HIPÓTESE E OBJETIVO	27
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	EXPERIMENTO I –DINÂMICA POPULACIONAL DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE DURANTE A GESTAÇÃO EM BOVINOS	29
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL	29
4.2	MATERIAL E MÉTODO	29
4.2.1	Animais	29
4.2.2	Isolamento das células mononucleares do sangue periférico	30
4.2.3	Análise de imunofenotipagem por Citometria de Fluxo	30
4.3	RESULTADOS	31
4.3.1	Dinâmica populacional das células do sistema imune em PBMC	31
4.4	CONCLUSÃO	36
5	EXPERIMENTO II – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE REGULADOS EM SANGUE PERIFÉRICO DE BOVINOS	38
5.1	DESENHO EXPERIMENTAL	38
5.2	MATERIAL E MÉTODO	38
5.2.1	Animais	39
5.2.2	Isolamento de células T $\gamma\delta$	39
5.2.3	Extração de RNA e transcrição reversa para cDNA	39
5.2.4	PCR quantitativo (qPCR)	40
5.2.5	Análise estatística	41
5.3	RESULTADOS	42
5.3.1	Análise de expressão gênica de células T $\gamma\delta$ isoladas de sangue periférico em bovinos	42
5.4	CONCLUSÃO	47
6	EXPERIMENTO III – IMUNOLocalização e Quantificação de Células do Sistema Imune no Endométrio de Vacas em 1º	

	TRIMESTRE, 2º TRIMESTRE E 3º TRIMESTRE DE GESTAÇÃO EM BOVINOS	49
6.1	DESENHO EXPERIMENTAL I	49
6.2	MATERIAL E MÉTODO.....	50
6.2.1	Coleta de Amostras	50
6.2.2	Imunofluorescência em corte congelado	50
6.2.3	Obtenção das imagens e análise estatística	51
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6.4	CONCLUSÃO	66
7	CONCLUSÃO GERAL	69
	REFERENCIAS	72

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A maior parte dos problemas de saúde dentro do ciclo produtivo de uma vaca leiteira ocorre durante o período de transição, que corresponde as três últimas semanas pré-parto e às três primeiras semanas de lactação (GRUMMER, 1995). Durante esse período, as alterações metabólicas, hormonais e imunológicas refletem diretamente na saúde, na produção e na fertilidade do rebanho (KIMURA et al., 2002b). Neste momento de alta produção, o balanço energético negativo, ou seja o animal não consegue ingerir a energia necessária para manter a produção leiteira, contribui para um aumento da frequência de aparecimento de afecções como a retenção de placenta, metrite, mastite e endometrite no período de transição levando a uma menor eficiência reprodutiva desses animais (RAJALA; GROHN, 1998).

Aproximadamente 75% das doenças em vacas leiteiras acontecem no primeiro mês após o parto, que coincide um período de acentuado estado imunossupressivo do animal (LEBLANC et al., 2006), já que a lactação tem um papel importante na manutenção do estado imunossupressivo após o parto (KIMURA et al., 2002a), o que interfere produção leiteira do animal (DRACKLEY, 1999). Ainda, há evidência que o sistema imune tem um papel importante no processo de indução do parto e liberação das membranas fetais, visto que o aumento da retenção de placenta em vacas foi associada à diminuição da atividade dos macrófagos na região do endométrio caruncular (MIYOSHI; SAWAMUKAI; IWANAGA, 2002). Esses estudos sugerem, que o estabelecimento da gestação modularia o sistema imune materno para tolerar antígenos fetais, e que no momento do parto o sistema imune materno produziria uma resposta inflamatória aos tecidos fetais auxiliando na expulsão das membranas fetais.

O sucesso da gestação está ligado com o balanço entre as CÉLULAS Th1 e Th2 na interface materno-fetal (WEGMANN et al., 1993; SAITO, 2000; NAGAEVA; JONSSON; MINCHEVA-NILSSON, 2002; FAN et al., 2011). As células Th1, citocinas como interleucina (IL)1B, interferon-gama (*IFNG*) e fator de necrose tumoral-alfa (*TNFA*), são responsáveis por ativarem células T citotóxicas e macrófagos para estimular a imunidade celular e inflamação, enquanto que as células Th2, citocinas como *IL4*, *IL-5*, *IL6* e *IL10*, estimulam a produção de anticorpos por células B e agem como antagonistas às citocinas Th1 (MOSMANN; SAD, 1996; WALIA et al., 2008). A tolerância materna aos antígenos fetais era explicada pela predominância de Th2 durante a gestação, protegendo o feto das respostas de Th1 (DEALTRY; O'FARRELL; FERNANDEZ, 2000). Foram observadas que em mulheres que sofriam abortos

recorrentes, havia uma predominância de respostas de Th1 (RAGHUPATHY, 1997; PICCINNI et al., 1998), sugerindo que o sucesso da gestação depende da resposta de citocinas do tipo Th2, enquanto que as perdas gestacionais podem estar associadas com o aumento de Th1 (WEGMANN et al., 1993; RAGHUPATHY, 2013).

As células $T\gamma\delta$ são um importante componente do sistema imune inato, no reconhecimento de antígenos próprios ou alo antígenos em células após uma infecção ou estresse (MINCHEVA-NILSSON, 2003). Uma das possíveis funções da célula $T\gamma\delta$ seria manter a homeostase dos tecidos onde residem (CARDING; EGAN, 2002). Estas células estão presentes na interface materno-fetal durante a gestação em ovelhas (MEEUSEN et al., 1993; MAJEWSKI; TEKIN; HANSEN, 2001; FOX et al., 2010), humanos (SZEKERES-BARTHO et al., 2001; NAGAEVA; JONSSON; MINCHEVA-NILSSON, 2002) e em bovinos (OLIVEIRA; HANSEN, 2008; OLIVEIRA et al., 2013), podendo sofrer alterações na quantidade de células positivas de acordo com o estágio da gestação, sugerindo um possível papel na modulação do sistema imune materno durante a gestação (MINCHEVA-NILSSON, 2003).

As células $T\gamma\delta$ parecem desempenhar um papel importante no estabelecimento e manutenção da gestação, uma vez que há um aumento significativo no número de células $T\gamma\delta$ durante a gestação em humanos (MINCHEVA-NILSSON; HAMMARSTROM; HAMMARSTROM, 1992; MINCHEVA-NILSSON et al., 1997) e ovelhas (MEEUSEN et al., 1993; LIU, W. J.; GOTTSALL; HANSEN, 1997; FOX et al., 2010). As células $T\gamma\delta$ podem secretar citocinas, como *IL10* e TGF-B, promovendo um microambiente de tolerância no útero gestante ou diretamente regulando células ativadas contra os antígenos fetais (SUZUKI et al., 1995; NAGAEVA; JONSSON; MINCHEVA-NILSSON, 2002). Em humanos, as células $T\gamma\delta$ estavam significativamente aumentadas em gestações saudáveis, quando comparados com abortos recorrentes (SZEKERES-BARTHO et al., 1999; SZEKERES-BARTHO et al., 2001), porém pouco se sabe sobre a presença destas células na manutenção da gestação em bovinos.

Dentro desse contexto, este estudo tem por objetivo principal estudar a ocorrência de células $T\gamma\delta$ ao longo da gestação e o perfil de expressão de citocinas destas células para entender o papel das células $T\gamma\delta$ na interface materno-fetal em bovinos. A hipótese central é de que células $T\gamma\delta$ são recrutadas da periferia para o endométrio gravídico ao longo da gestação e secretam citocinas para promover e manter um estado de tolerância materna aos antígenos fetais em bovinos.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

O sistema imune materno tem sido foco no entendimento do estabelecimento e da manutenção da gestação em várias espécies (MAJEWSKI; TEKIN; HANSEN, 2001; ABRAHAMS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2013), e neste contexto, o papel das células $T\gamma\delta$ nestes processos ainda não está completamente esclarecido.

2.1 ONTOGENIA DAS CÉLULAS $T\gamma\delta$

Os linfócitos T são formados no timo e geram duas linhagens, que podem ser definidas basicamente pela expressão de receptores de células T (TCR – *T cell receptor*) do tipo $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (MINCHEVA-NILSSON, 2003). Inicialmente os linfócitos são formados a partir de células precursoras conhecidas como timócitos duplo-negativos (DN), que não expressam os co-receptores CD4 e CD8 (CIOFANI; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2010).

Os timócitos DN são divididos em subconjuntos de células precursoras (DN1, DN2 e DN3) (HOFFMAN et al., 1996; PORRITT et al., 2004; TAGHON et al., 2006), sendo que os estágios DN1 e DN2 marcam o início do rearranjo dos genes, gerando TCR β , TCR γ e TCR δ . Após esse processo, as células DN3 estão completas (LIVAK, F. et al., 1999), entram em proliferação e por fim sofrem diferenciação (MICHIE; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2002). As linhagens de células T $\alpha\beta$ apresentam a expressão de CD4 e CD8, gerando as células duplo-positivo (DP) que constituem a maioria dos timócitos (cerca de 80%), enquanto que a linhagem de células $T\gamma\delta$ permanecem DN (CIOFANI; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2010) (Figura 1).

As subpopulações timo-dependentes de células $T\gamma\delta$ completam sua maturação dentro do timo, deixam o órgão e se alojam em locais diferentes no animal adulto (ITOHARA et al., 1989; RAULET, 1989; HAAS; PEREIRA; TONEGAWA, 1993). Alguns trabalhos sugerem que na maioria das espécies, as células $T\gamma\delta$ são as primeiras células T a se desenvolver durante a ontogenia (HAVRAN; ALLISON, 1988; HAAS; PEREIRA; TONEGAWA, 1993; DE ROSA et al., 2004). Estas células foram detectadas em timo de embrião murino por volta do dia 13 (CARDING et al., 1990) e por volta da 8ª semana de gestação em humanos (MCVAY et al., 1998).

Figura 1– Representação esquemática do desenvolvimento das células T $\alpha\beta$ e T $\gamma\delta$

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: As células DN (duplo negativo) são divididas em linhagens (DN1 a DN3) que vão sofrer rearranjos no TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$. Quando as células DN3 sofrem rearranjo na cadeia TCR β , há a seleção- β e as células se tornam duplo positivas (DP) para CD4 e CD8. Em seguida, a cadeia TCR α sofre um novo rearranjo e os sinais TCR $\alpha\beta$ induzem a diferenciação das células DP em CD8 $^{+}$, CD4 $^{+}$, NKT e Treg. As células DN3 que sofrem rearranjo nas cadeias TCR $\gamma\delta$ e seleção- $\gamma\delta$, permanecem duplo negativas para CD4 e CD8 e tornam-se as células T $\gamma\delta$. Adaptado de Ciofani et al. (CIOFANI; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2010)

Desde sua descoberta há 30 anos atrás, as células T $\gamma\delta$ são consideradas uma população de linfócito conservado entre as espécies com uma amplitude funcional, variando conforme a espécie, tecido e microambiente (HAYDAY et al., 1985; VANTOUROUT; HAYDAY, 2013; CHIEN; MEYER; BONNEVILLE, 2014).

Em humanos e murinos, as células T $\gamma\delta$ circulantes representam cerca de 5% a 10 % das células T circulantes (CARDING; EGAN, 2002), enquanto que em bovinos podem chegar a constituir cerca de 60% das células T circulantes (DAVIS et al., 1996), sugerindo um papel crítico para a imunidade bovina, talvez mais que em outros animais (GUZMAN et al., 2012).

Geralmente, as células T $\gamma\delta$ apresentam fenótipo CD4 e CD8 duplo negativo (CD4 $^{-}$ CD8 $^{-}$) (KALYAN; KABELITZ, 2013), porém podem expressar o fenótipo CD8 $^{+}$, apresentando um perfil de células citotóxicas (MORITA et al., 1991; HAAS; PEREIRA; TONEGAWA, 1993), ou ainda CD4 $^{+}$, sugerindo que tais células podem ter atividade funcional auxiliar na imunidade adaptativa (MORITA et al., 1991; SPITS et al., 1991; HAYDAY, 2000).

As células $T\gamma\delta$ estão presentes em pequena quantidade nos tecidos linfoides periféricos, e são abundantes entre os linfócitos intraepiteliais da pele, intestino, língua e órgãos reprodutivos, como útero e vagina (KONING et al., 1987; GOODMAN; LEFRANCOIS, 1988; HAAS; PEREIRA; TONEGAWA, 1993; HAYDAY; TIGELAAR, 2003; XIONG; RAULET, 2007). Uma das diferenças entre as células circulantes e residentes é o uso de diferentes variáveis (V) da cadeia δ – as células residentes são $V\delta 1^+$, enquanto que as circulantes são $V\delta 2^+$ (CHEN, 2002).

As células $T\gamma\delta$ migram e podem utilizar os subtipos: $V\gamma 1$; $V\gamma 4$; $V\gamma 5$; $V\gamma 6$ e $V\gamma 7$. As células $T\gamma\delta$ que expressam o segmento $V\gamma 5$, se alojam especificamente na epiderme. O subtipo $V\gamma 6$ migra para o útero, vagina e língua, e são as primeiras células $T\gamma\delta$ que se desenvolvem no timo fetal (HAAS; PEREIRA; TONEGAWA, 1993; KAUFMANN; BLUM; YAMAMOTO, 1993; HAYDAY, 2000). Outros subtipos de células $T\gamma\delta$ que estão presentes no intestino, sofrem maturação extra tímica e utilizam os subtipos $V\gamma 1$ e $V\gamma 7$ (GUY-GRAND; VASSALLI, 1993). A função geral de células $T\gamma\delta$ é manter a homeostase dos tecidos onde residem, respondendo a danos teciduais, como infecção e inflamação (GOODMAN; LEFRANCOIS, 1988; HAYDAY, 2009).

2.2 IMUNOLOGIA DA GESTAÇÃO

Os linfócitos uterinos desempenham um papel no reconhecimento do feto, assim como na implantação e placentação controlando a invasão do trofoblasto (SZEREDAY et al., 2012). Os mecanismos pelos quais o feto é protegido do sistema imune materno durante a gestação ainda não são completamente entendidos.

O ambiente uterino passa por modificações em relação ao número de células do sistema imune, hormônios, secreção de citocinas, fatores de crescimento e outras proteínas, que favorecem a tolerância materna e a manutenção da gestação (PICCINNI, 2003). Em bovinos, foi demonstrado a expressão de genes relacionados ao sistema imune nos dias 5, 7, 13 e 16 da gestação, que é o período de chegada do embrião ao corno uterino, formação do blastocisto e início do alongamento (MANSOURI-ATTIA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

Além disso, a gestação é caracterizada por um aumento no número de populações de leucócitos no útero (OLIVEIRA; HANSEN, 2008). Os linfócitos T podem ser funcionalmente

classificados de acordo com a expressão diferencial dos seus receptores, células $T\alpha\beta$ e $T\gamma\delta$ (KEDZIERSKA et al., 2008).

As células $T\alpha\beta$ são subdivididas em células $CD4^+$ (células T auxiliares) e células $CD8^+$ (células T citotóxicas) (TANAKA et al., 2008). As células $CD4^+$ são encontrados quase que em sua totalidade na região do estroma profundo do endométrio uterino, enquanto que as células $CD8^+$ estão presentes no endométrio no epitélio luminal e glandular (COBB; WATSON, 1995; OLIVEIRA et al., 2013).

Oliveira e Hansen (2008) relataram que aos 33-34 dias da gestação, há um aumento na porcentagem de células $CD4$ que expressam $CD25$ ($CD4^+CD25^+$), também reconhecidas como células T reguladoras (Treg) sem que ocorra uma alteração das células $CD4^+$ e $CD8^+$ circulantes. As células Treg são essenciais para o sucesso da gestação e o aumento de células circulantes ocorre no início da gestação em camundongos e humanos (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004; SOMERSET et al., 2004; YANG et al., 2008).

Os macrófagos ($CD14$) formam uma grande subpopulação de leucócitos residentes na decídua humana, e tem sido descrita por ter um importante papel na implantação e placentação. Seu recrutamento para o endométrio durante a gestação é observado em muitas espécies, incluindo em camundongos (HUNT et al., 1985), humanos (HEIKKINEN et al., 2003; KIM et al., 2007), ovinos (TEKIN; HANSEN, 2004) e macacos (DAMBAEVA et al., 2009). Além disso, estudos em bovinos mostram o aumento do número de macrófagos no útero entre os dias 13 e 16 de gestação (MANSOURI-ATTIA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013) e também no final da gestação (OLIVEIRA; HANSEN, 2008). Tem sido proposto que o recrutamento de macrófagos desempenha um importante papel na produção de citocinas que reduzem a inflamação e promovem a sobrevivência do conceito (MOR; STRASZEWSKI-CHAVEZ; ABRAHAMS, 2006).

Para que haja o recrutamento das células imunes para o útero gravídico a expressão de duas proteínas de adesão são essenciais o $CD18$ e o $CD62L$ (BURTON; KEHRLI, 1995). O $CD18$, da família das integrinas, está intimamente ligado ao deslocamento dos neutrófilos e linfócitos através do endotélio ao sítio de infecção (BURTON; KEHRLI, 1995). A ausência da expressão na superfície dos neutrófilos resulta em problemas no processo de adesão de linfócitos às células endoteliais e migração celular (ERRANTE; FRAZÃO; CONDINO-NETO, 2011). $CD62L$, um membro da família das selectinas (L-selectina) (BARKHAUSEN; KRETTEK; VAN GRIENSVEN, 2005), está presente na superfície de monócitos (MIKHAYLOVA et al., 2013) e em leucócitos (CROCKER; BAKER; FLETCHER, 2000). É

responsável pela interação inicial entre as células endoteliais dos vasos sanguíneos e os leucócitos (BARKHAUSEN; KRETTEK; VAN GRIENSVEN, 2005).

As células $T\gamma\delta$ são importantes elementos que compõem a população de células imune no útero ao longo de toda a gestação. Após 50 dias de gestação em ovinos, é possível observar um aumento na quantidade destas células, principalmente no epitélio luminal endometrial (LESLIE; HANSEN, 1991; LEE et al., 1992; MEEUSEN et al., 1993). Acredita-se que elas proporcionam um ambiente de tolerância materna, através da liberação de citocinas (HEYBORNE, K. et al., 1994), ou então através da regulação das células ativas do sistema imune contra os antígenos dos fetos (SUZUKI et al., 1995).

2.3 CÉLULAS $T\gamma\delta$ NA GESTAÇÃO

O feto expressa antígenos paternos que podem incitar o estabelecimento de uma resposta imune materna contra antígenos fetais. No entanto, o feto alogênico não é rejeitado, o que indica a existência de ativação de mecanismos de tolerância antígeno-específico que previnem a rejeição (CARDING; EGAN, 2002), sem comprometer a habilidade de combater infecções. Partindo desse ponto de vista, as células $T\gamma\delta$, que combinam a função de proteção contra infecções e imunorregulação, são alvo de interesse durante a gestação (MINCHEVA-NILSSON, 2003).

Apresentam-se como grandes linfócitos ricos em grânulos citoplasmático e normalmente não expressam CD4 e CD8 (duplo negativo) (MINCHEVA-NILSSON; HAMMARSTROM; HAMMARSTROM, 1992; MINCHEVA-NILSSON et al., 1994; MINCHEVA-NILSSON et al., 1997), e possuem potencial citotóxico, pela expressão de moléculas como perforina, granzima A e B (MINCHEVA-NILSSON et al., 2000)

Os mecanismos citotóxicos desempenham papel crucial contra infecção viral, prevenção de tumores, rejeição de transplantes, regulação de respostas imune e tolerância periférica (SPIELMAN; LEE; PODACK, 1998). Esses mecanismos parecem ter uma função importante na interface materno-fetal, protegendo contra patógenos, controlando a invasão do trofoblasto e criando um local de imuno-tolerância na qual os linfócitos não são ativados contra o conceito (MINCHEVA-NILSSON, 2003).

A expressão de citocinas no útero parece desempenhar papel importante no estabelecimento e manutenção da gestação (SAITO, 2000; FAN et al., 2011). Algumas

citocinas, como TGF- β , IL-1, *IL4*, *IL6* e *IL10*, favorecem a sobrevivência e o crescimento fetal (FAN et al., 2011).

Em humanos, foram descritos dois mecanismos possíveis através dos quais as células T $\gamma\delta$ da decídua podem induzir a tolerância materno-fetal. O primeiro mecanismo baseia-se no fato de que células T $\gamma\delta$, sob a influência de fatores associados à gestação, secretam citocinas específicas tais como de *IL10* e TGF- β que inibem diretamente as células efectoras (imunossupressão direta) (FAN et al., 2011). Por outro lado, *IL10* e TGF- β induzem a diferenciação de células T CD4⁺ supressoras/reguladoras, que por sua vez secretam *IL10* e/ou TGF- β que suprimem as células (imunossupressão indireta) (NAGAEVA; JONSSON; MINCHEVA-NILSSON, 2002) (Figura 2).

Figura 2– Mecanismos de ação das células T $\gamma\delta$.

Fonte: (NAGAEVA; JONSSON; MINCHEVA-NILSSON, 2002)

Legenda: Representação esquemática dos dois mecanismos possíveis na qual as células T $\gamma\delta$ podem induzir tolerância intrauterina em relação ao feto. Sob a influência de antígenos associados a gestação, as células T $\gamma\delta$ começam a produzir *IL10* e TGF- β , podendo inibir diretamente as células efectoras (imunossupressão direta). Por outro lado, *IL10* e TGF- β podem criar um ambiente de citocinas para geração de Tr1 e células Th3, que por sua vez produzem *IL10* e TGF- β , suprimindo as células efectoras (imunossupressão indireta).

Em ovelhas, há um aumento no número, tamanho e quantidade de grânulos nos linfócitos intraepiteliais $\gamma\delta^+$ durante a gestação (MEEUSEN et al., 1993) e esse aumento é mais pronunciado ipsilateral ao feto e parece ser regulado por fatores fetais (MAJEWSKI; TEKIN; HANSEN, 2001). O fenótipo $CD8^+$ e a quantidade de grânulos presentes em ovelhas gestantes indicam que estas células podem ter função citotóxica (FOX et al., 1998), uma vez que expressam perforina, uma enzima citolítica armazenada dentro de células citotóxicas (LIU, C. C.; WALSH; YOUNG, 1995), presente no epitélio uterino de ovelhas.

Estudos demonstraram que há um aumento do número de células $T\gamma\delta$ no útero gravídico de vacas gestantes no dia 13 e 16, enquanto que em vacas cíclicas, estas células estão pouco presentes no endométrio (MANSOURI-ATTIA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

Nos dias 33-34 da gestação em bovinos, não foram encontradas alterações no número células $T\gamma\delta$ no sangue periférico. No entanto, em vacas gestantes próximas ao parto, há um aumento do número de células expressando o receptor $\gamma\delta$ (clone 86D) , sugerindo uma recirculação destas células do endométrio uterino para a periferia (OLIVEIRA; HANSEN, 2008).

OBJETIVO E HIPOTESE

3 HIPÓTESE E OBJETIVO

Há um recrutamento de células do sistema imune para o endométrio ao longo da gestação, que expressam citocinas que favorecem o estabelecimento e manutenção da tolerância materna a antígenos fetais, durante a gestação em bovinos.

Imunolocalizar e quantificar as células do sistema imune presentes no endométrio e sangue periférico ao longo da gestação em bovinos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a dinâmica populacional das células CD3, CD4, CD8, CD14, CD25 e WC1 em PBMC em vacas não prenhes, 1º e 3º trimestre da gestação;
- ✓ Analisar o perfil de expressão dos genes *IFNG*; *IL10*; *IL15*; *IL17*; *IL18*; *IL-1β*; *IL4*; *IL-6*; *ISG15*; *PFR*; *TGFB2* e *TNFA*, por meio de qPCR, em células Tγδ isoladas do PBMC provenientes de vacas não lactantes não prenhes, vacas não prenhes e vacas no 1º trimestre da gestação;
- ✓ Imunolocalizar e quantificar as células CD3, CD4, CD8, CD14, CD25, CD18, CD62L e WC1 no endométrio uterino em vacas no 1º trimestre, 2º trimestre e 3º trimestre da gestação;

CAPÍTULO 1

4 EXPERIMENTO I –DINÂMICA POPULACIONAL DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE DURANTE A GESTAÇÃO EM BOVINOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Para analisar as populações do sistema imune presentes no sangue periférico, as PBMCs foram separadas por gradiente de densidade de Ficoll, seguido por protocolo de imunofenotipagem e analisadas em citômetro de fluxo para os anticorpos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD25⁺ e WC1⁺ (Figura 3), em vacas não prenhes, 1º e 3º trimestre da gestação. Esta análise permitirá identificar a flutuação de populações específicas, que podem estar relacionadas a manutenção da gestação.

Figura 3– Desenho esquemático do Experimento I.

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

4.2 MATERIAL E MÉTODO

4.2.1 Animais

Foram coletadas amostras de sangue periférico da veia caudal (20ml) de fêmeas da raça Holandesa (*Bos taurus*). Os grupos foram separados em vacas não prenhes (NP) (n=5); vacas no 1º trimestre (n=5) e 3º trimestre da gestação (n=5), pertencentes ao Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite – FMVZ/USP – Campus Pirassununga.

4.2.2 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico

O sangue foi coletado em tubos com EDTA e transportado em temperatura ambiente para o laboratório LMMD/FZEA/USP. Foram diluídos (v/v) em PBS e gentilmente adicionado sobre 15ml de Ficoll-Paque (cat. # 17144003, GE) em tubos cônicos de 50ml, para a formação do gradiente de densidade. Os tubos foram centrifugados a 600 x g por 30 minutos e o PBMC foi coletado na interface do Ficoll-Paque e ressuspensionado em DPBS (*Dubelco's phosphate buffer solution*). A concentração e a viabilidade celular foram estimadas pelo método de exclusão de azul de tripan e as células foram ressuspensas em DPBS a uma concentração final de 5×10^6 células/ml.

4.2.3 Análise de imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

Alíquotas de 10^5 cel/ml de PBMC foram distribuídos em microtubo para cada um dos anticorpos analisados. Em seguida, as PBMC foram lavadas com 1ml de tampão FACS (DPBS contendo 0,1% de BSA) e centrifugadas a 600 x g por 8 minutos. As amostras foram incubadas com os anticorpos primários (diluídos 1:100) para análise da expressão de cada uma das populações de células do sistema imune (Quadro 1) por 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação, PBMC foram lavadas com 1ml de tampão FACS para a retirada do excesso de anticorpo e incubadas com anticorpo secundário (Quadro 1) (diluído a 1:500) por 1 hora. O controle da autofluorescência foi realizado pela omissão apenas da incubação com anticorpo primário em uma amostra de cada animal. Após a incubação, as células foram novamente lavadas com tampão FACS fixadas com solução 4% de paraformaldeído tamponado. As populações foram estimadas pela porcentagem de células que expressam cada um dos anticorpos em relação ao total de células adquiridas na região de linfócitos e monócitos. Os

eventos foram adquiridos pelo citômetro de fluxo BD-Excalibur (BD- Becton Dickinson, U.S.A) e a análise foi realizada no Software FCS Express 4 Flow research Edition.

Quadro 1– Anticorpos primários e secundários utilizados na análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo

Anticorpo	Célula	Isotipo	Clone	Fabricante
<i>Anticorpo Primário</i>				
Anti-CD3	Linfócitos Totais	IgG1	MM1A	VRMD
Anti-CD4	T auxiliares	IgG2a	IL-A11	VRMD
Anti-CD8	T citotóxicas	I IgG1	CACT80C	VRMD
Anti-CD14	Macrófagos	IgG1	MM61A	VRMD
Anti-CD25	T reguladora/T ativadas	IgG2a	CACT-108 ^a	VRMD
Anti-WC1	T $\gamma\delta$	IgG2a	GB-54 ^a	VRMD
<i>Anticorpo Secundário</i>				
FITC Goat anti-mouse		IgG1	F0479	Dako
Alexa Fluor® 568 Goat Anti-Mouse		IgG2a	A21134	Life Tech.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Dinâmica populacional das células do sistema imune em PBMC

Durante a gestação, o sistema imune materno é desafiado pela presença do feto semi-alogênico e adaptações do sistema imune materno acontecem sistêmica e localmente (TANG et al., 2015).

A imunofenotipagem analisada por citometria de fluxo, baseado no tamanho celular (FSC – *Forward Scatter*) e na granulosidade (SSC - *Side Scatter*), permitiu a identificação de duas populações distintas no sangue periférico em vacas. A população de linfócitos (gate 1) é representada por células de menor tamanho e pouca granulosidade, enquanto que a população de monócitos (gate 2), se apresenta de forma mais complexa, sendo de maior tamanho e maior granulosidade. Os anticorpos foram analisados a partir da intensidade de fluorescência (FL1-H) na população de linfócitos (CD3, CD4, CD8, CD25 e WC1) e nas populações de monócitos (CD14) (Figura 4).

Figura 4 – Gráfico de pontos representativos da aquisição de amostras por citometria de fluxo, para análise das células mononucleares do sangue periférico das vacas vazias e em 1º trimestre e 3º trimestre da gestação

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Em (A) Gráfico de pontos representativo, onde o eixo x representa o tamanho celular (FSC) e eixo y a granulosidade (SSC), separando as populações em linfócitos (gate 1 – vermelho) e monócitos (gate 2 – azul). Em (B-G), população de células positivas para cada anticorpo analisado pela intensidade de fluorescência (FL1-H). Representações de população selecionadas pelo gate 1, WC1⁺ (B), CD3⁺ (C), CD8⁺ (D), CD4⁺ (E) e CD25⁺ (F). Em (G) populações de CD14 selecionadas pelo gate 2.

A proporção de células $T\gamma\delta$ ($WC1^+$) na circulação periférica de ruminantes é muito maior do que em outros mamíferos, o que sugere um papel importante para as células $T\gamma\delta$ na imunologia bovina (KIMURA et al., 1999a). A porcentagem de células $T\gamma\delta$ ($WC1^+$) na região de linfócitos mostrou-se altamente expressa no sangue periférico em vacas, porém não apresentou diferença significativa entre vacas não prenhes ($72,4\% \pm 8,7$), vacas no 1º trimestre ($65,4\% \pm 6,8$) e vacas no 3º trimestre da gestação ($66,4\% \pm 6,2$) ($P=0,7$) (Figura 5A). A semelhança na porcentagem de células $T\gamma\delta$ (clone 86D) entre vacas não prenhes e início da gestação (33-34 dias de gestação) também foram observados por Oliveira e Hansen (2008), aumentando a quantidade de células circulantes em vacas no período pré-parto (VAN KAMPEN; MALLARD, 1997; OLIVEIRA; HANSEN, 2008). Em mulheres no entanto, foi mostrado um aumento na porcentagem de células $T\gamma\delta$ no início de gestação quando comparado com mulheres não gestantes (POLGAR et al., 1999).

As células $CD3^+$, analisadas na região de linfócitos, mostrou semelhança entre a porcentagem de células em vacas não prenhes ($42,9\% \pm 9,6$), no 1º ($44,6\% \pm 3,2$) e no 3º trimestre da gestação ($45,1\% \pm 9,3$) ($P=0,98$) (Figura 5C). Esses resultados estão de acordo com achados da literatura, uma vez que não houve diferença entre a porcentagem de células $CD3^+$ durante o primeiro, segundo e terceiro trimestre da gestação, quando comparado com mulheres não gestantes (LUPPI et al., 2002a; MEGGYES et al., 2014). Entretanto, Kimura et al. (1999b) mostra diminuição de até 25% na população $CD3^+$ circulantes em vacas no final de gestação antes do parto, sendo que duas semanas após o parto, a porcentagem destas células volta gradualmente ao nível.

A porcentagem de células $CD4^+$ foram semelhantes entre os grupos estudados na região de linfócitos, não havendo diferença significativa entre vacas não prenhes ($30,7\% \pm 7,7$ e $27,9\% \pm 6,5$), vacas no 1º ($32,5\% \pm 3,4$ e $25,2\% \pm 3,9$) e no 3º trimestre da gestação ($32,0\% \pm 6,4$ e $30,5\% \pm 5,1$) (Figura 5D) ($P=0,97$ e $P=0,78$, respectivamente) (Figura 5), assim como previamente descrito em humanos, onde não foram encontradas diferença significativa em sangue periférico de mulheres gestantes e não gestantes (KÜHNERT et al., 1998; MEGGYES et al., 2014). Entretanto, Luppi et al. (2002b) descrevem que a proporção de células $CD4^+$ diminui significativamente em mulheres gestantes, enquanto que as células $CD8^+$ aumentam significantemente quando comparado com não gestantes. Em vacas, Oliveira e Hansen (2008), citaram que não há diferença na porcentagem de $CD4^+$ e $CD8^+$ entre 1º trimestre de gestação e vacas não prenhes, porém no final da gestação há aumento da porcentagem de células $CD4^+$.

Não foram observadas diferença significativa ($P=0,97$) para células $CD25^+$ quando comparadas vacas não prenhes ($18,5\% \pm 6,0$) vacas no 1º trimestre ($19,9\% \pm 4,7$) e 3º trimestre

da gestação ($19,5\% \pm 5,0$) ($P = 0,97$) (Figura 5F). Estas células tem sido descritos como secretoras de *IL4*, que inibe a ativação de células T citotóxicas contra alo antígenos (MJÖSBERG et al., 2007). A depleção de $CD25^+$ em camundongos, diminui a capacidade da fêmea de manter a gestação (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004), enquanto que em humanos, a baixa porcentagem de $CD4^+CD25^+$ em sangue periférico é encontrada em mulheres que sofrem de abortos recorrentes (YANG et al., 2008). Estas células $CD4^+CD25^+$ podem ser análogas com as células T reguladoras descritas durante a gestação em humanos e camundongos (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004; SOMERSET et al., 2004) e aparecem aumentadas no sangue periférico durante a gestação (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004; SOMERSET et al., 2004).

Os macrófagos ($CD14^+$) analisados na região de monócitos, não apresentou diferença significativa entre vacas não prenhes ($29,5\% \pm 9,4$), vacas no 1º trimestre ($38,4\% \pm 7,3$) e vacas no 3º trimestre da gestação ($37,0\% \pm 9,6$) ($P = 0,75$) (Figura 5G). Oliveira e Hansen (2008) descrevem a diminuição na porcentagem de macrófagos ($CD68$) no sangue periférico de vacas no final da gestação quando comparado com vacas não prenhes. Estes resultados podem refletir no recrutamento de macrófagos para o útero no final da gestação, sugerindo um papel importante destas células para o útero, como a participação dos macrófagos no parto, promovendo o descolamento da placenta (OLIVEIRA; HANSEN, 2008). A baixa atividade de macrófagos em placentônio no final da gestação, tem sido relacionada com a retenção de placenta em bovinos (MIYOSHI; SAWAMUKAI; IWANAGA, 2002)

Lashley et al. (2011) encontraram uma alta porcentagem de $CD14^+$ em mulheres gestantes quando comparada com não gestantes. Estudos sugerem que no momento do parto, os leucócitos circulantes são recrutados para o útero, o número de $CD14^+$ e a produção de citocinas pró-inflamatórias são significativamente aumentadas, indicando um papel importante destas células no útero no momento do parto (TANG et al., 2015).

Figura 5– Diferença nas populações de células mononucleares do sangue periférico entre vacas não prenhes, 1º trimestre e 3º trimestre de gestação, determinadas por citometria de fluxo.

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Porcentagem de células positivas em sangue periférico de vacas não prenhes (NP), 1º e 3º trimestre da gestação na população de linfócitos: (A) Porcentagem de células WC1⁺; (B) Porcentagem de células CD3⁺; (C) Porcentagem de células CD8⁺; (D) Porcentagem de células CD4⁺; (E) Porcentagem de células CD25⁺; Na população de monócitos: (F) Porcentagem de células CD14⁺. Barras com letras diferentes representam significância ($p \leq 0,05$).

4.4 CONCLUSÃO

Nossos resultados não mostraram diferença significativa nas células do sistema imune no sangue periférico de vacas não prenhes e em vacas no 1º e 3º trimestre da gestação. Apesar da literatura mostrar flutuação em algumas populações do sistema imune, as divergências nos resultados podem estar relacionadas com a diferença na idade gestacional dos grupos estudados e também no clone dos anticorpos utilizados para as marcações de imunocitoquímica.

CAPÍTULO 2

5 EXPERIMENTO II – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE REGULADOS EM SANGUE PERIFÉRICO DE BOVINOS

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Para análise do perfil de expressão gênica, foram utilizadas vacas no 1º trimestre da gestação, vacas lactantes não prenhes (LNP) e vacas não lactantes não prenhes (NLNP). As células mononucleares do sangue periférico foram separadas por gradiente de densidade de Ficoll, em seguida as células $WC1^+$ foram enriquecidas por separação magnética e as frações $WC1^+$ e $WC1^-$ foram analisadas quanto ao perfil de citocinas por qRT-PCR em células $T\gamma\delta$ isoladas para os genes *IFNG*; *IL10*; *IL15*; *IL17*; *IL18*; *IL1B*; *IL4*; *IL-6*; *ISG15*; *PFR*; *TGFB2* e *TNFA* (Figura 6).

Figura 6– Desenho esquemático experimento II

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

5.2 MATERIAL E MÉTODO

5.2.1 Animais

Foram coletadas amostras de sangue da veia caudal (20ml) de 15 fêmeas bovinas da raça Holandesa (*B. taurus*) pertencentes ao setor de Bovinos de Leite do Campus Administrativo de Pirassununga. Os grupos de 5 animais foram separados de acordo COM lactação e gestação, sendo eles: vacas no 1º trimestre da gestação (25 dias de gestação), vacas lactantes não prenhes (LNP – 25 dias após a IA) e vacas não lactantes não prenhes (LNPN).

5.2.2 Isolamento de células T $\gamma\delta$

Após a separação de PBMC através do gradiente de Ficoll-Paque, as células WC1⁺ foram isoladas usando o sistema MiniMACS (Miltenyi Biotec, Auburn, California, USA) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas com 100µl de anticorpo para células T $\gamma\delta$ (WC1, clone GB-54a; IgG2a; VRMD, USA) diluído na concentração de 1:500, 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas em PBS, e incubadas em 80 µl de tampão MiniMACS (PBS, 2 mM EDTA, 0.5% BS A) e 20 µl de anticorpo anti-Mouse IgG2a⁺b para 10⁷ células (cat. # 130-047-202, Miltenyi Biotec, Auburn, California, USA). As células foram contadas, lavadas em PBS e ressuspensas em 1 ml de tampão MiniMACS. A suspensão de células foi aplicada nas colunas magnéticas (cat#130-042-201, Miltenyi Biotec, Auburn, California, USA) e lavadas 3 vezes com tampão MiniMACS. As células T $\gamma\delta$ foram eluídas em 1 ml de tampão. A metodologia foi previamente descrita para isolamento de células CD4⁺ em gestação de bovinos (PAIBOMESAI et al., 2013).

As frações celulares, células T $\gamma\delta$ isolada (WC1⁺) e o controle (PBMC) foram contadas e congeladas em freezer -80°C para posterior análise por qPCR.

5.2.3 Extração de RNA e transcrição reversa para cDNA

O RNA das células congeladas, fração WC1⁺ e PBMC, foram extraídos com o kit RNeasy Plus Mini (cat. #74136, Qiagen, Valencia, CA, USA); de acordo com recomendações do fabricante.

Em seguida 1,0 µg de RNA foi submetido a digestão de DNA com 1,0µL de DNase I (1U/µL); 1,0 µL de solução tampão da DNase I; 1,0µL de RNaseOut; e água tratada com dietilpirocarbonato (água DEPC - *diethylpyrocarbonate*) para completar um volume total de 10µL. Essa solução foi incubada por 15 minutos a 25°C, em seguida foi adicionado 1,0µL de EDTA em cada, tubo para inativar a DNase I, seguido de incubação por 10 minutos a 65°C.

Após a digestão do DNA, o RNA foi submetido a conversão para DNA complementar (cDNA) utilizado o kit High Capacity (cat. # 4374967, Invitrogen, Calsbad, CA, USA), de acordo com recomendações do fabricante.

5.2.4 PCR quantitativo (qPCR)

Os genes PPIA e YWHAZ foram utilizados como controles endógenos (MANSOURI-ATTIA et al., 2012) na análise estatística dos dados.

O kit para amplificação SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e o termociclador Step One Fast real-time PCR system (Applied Biosystems) foram usados para quantificar as concentrações de mRNA. Após a primeira etapa de ativação (95°C por 10 min) foram realizados 45 ciclos de 2 etapas de amplificação (95°C por 15 seg.; 60°C por 1 min). As reações de amplificação foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, em placas de 96 poços contendo 15 µl da reação, sendo 7,5 µl de Power SYBR Green® PCR Master Mix (#4344463, Invitrogen), 4,75 µl de água DEPC, 1µl de cDNA diluído (1 µl de cDNA e 5 µl de DEPC) e 1 µl de primers específicos (Quadro 2). A amplificação de um único produto será verificada através da curva de dissociação (65-95°C) do termociclador.

Quadro 2– Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR quantitativo

Simbolo Gene	Nome gene	Gene ID	Strand	Sequência 5'-3'
IFNG	Interferon gamma	281237	F	TCAAATTCCGGTGGATGATCTGC
			R	GACCATTACGTTGATGCTCTCCG
IL10	Interleukin 10	281246	F	TGAAGGACCAACTGCACAGC
			R	TGTGGCATCACCTCTTCCAG
IL17	Interleukin 17 ^a	282863	F	CTTGACTCTCCACCGCAATG
			R	TGATGGTCCACCTTCCCTTC
IL18	Interleukin 18	281249	F	TCTTTGAGGATATGCCTGATTCTG
			R	CAGACCTCTAGTGAGGCTGTCCCTT
IL4	Interleukin 4	280824	F	GCATGGAGCTGCCTGTAGCA
			R	TTGTTCAAGCACGTGTGGCT
IL-6	Interleukin 6	280826	F	ATCAGAACACTGATCCAGATCC
			R	CAAGGTTTCTCAGGATGAGG
ISG15	Interferon-stimulated protein 15 kDa	281871	F	GTCCTGCTGGTGGTGCAGAA
			R	TTTGGCACACCTGCTGCTT
TGFB2	Transforming growth factor beta 2	534069	F	ACTCGGCCTTCACCAAATTG
			R	CCGTCCTTCTTACCCCTCGGA
TNFA	Tumor necrosis factor alpha	280943	F	AACCAGAGGGCTGTTGATGG
			R	GCTCCAGAAGTTGCTTGTGC
PFR	Perforin 1 (pore forming protein)	369025	F	TTCGCCGCCCAGAAGAC
			R	CACTCCACTAAGTCCATGCTGAA
PPIA	Peptidylprolyl isomerase A	281418	F	CATACAGGTCCTGGCATC
			R	CACGTGCTTGCCATCCAA
YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta	287022	F	GCATCCACAGACTATTTCC
			R	GCAAAGACAATGACAGACCA

5.2.5 Análise estatística

Os dados foram calculadas pela equação: razão de expressão = $[1 + (\text{eficiência média da PCR})^{\text{Ct médio do grupo testado} - \text{Ct médio do grupo referência}}]$ (LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, 2001). As razões de expressão serão normalizadas pela razão de expressão do controle endógeno (PPIA e YWHAZ). A análise estatística foi realizada pela análise da variância de quadrados mínimos (LSMeans = *least square means*) usando o procedimento de modelos lineares gerais (GLM = *General Linear Models*) do programa SAS (versão 5.1). O modelo incluiu os efeitos principais (grupo de animais e tipo celular) e erro padrão.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Análise de expressão gênica de células $T\gamma\delta$ isoladas de sangue periférico em bovinos

O período de transição entre o final da gestação até o início da lactação em vacas, é caracterizado principalmente por alterações metabólicas (DRACKLEY et al., 2005; LEBLANC, 2010) e um período que a vaca passa por um estado de imunossupressão importante (GOFF; HORST, 1997; INGVARTSEN; MOYES, 2013), que aumentam a predisposição do animal à doenças e outras enfermidades (JONSSON et al., 2013), como a mastite, retenção de placenta, metrite, cetose (KELTON; LISSEMORE; MARTIN, 1998; INGVARTSEN; DEWHURST; FRIGGENS, 2003; INGVARTSEN, 2006).

As citocinas desempenham um papel crucial no estabelecimento e manutenção de uma gestação normal (MINCHEVA-NILSSON, 2003), sendo expressas por diversos tipos celulares e tecidos, agindo como mediadores imunológicos entre a mãe e o feto (MORELI et al., 2012).

Neste estudo reportamos pela primeira vez, o perfil de expressão de citocinas em células $T\gamma\delta$ isoladas de PBMC em vacas em diferentes estágios (vacas lactantes prenhes, vacas lactantes não prenhes e vacas não lactantes não prenhes), através de análise por qPCR. Neste estudo revelou uma modulação da expressão das citocinas *IFNG*; *IL10*; *IL15*; *IL17*; *IL18*; *IL1B*; *IL4*; *IL-6*; *ISG15*; *PFR*; *TGFB2* e *TNFA* em vacas em diferentes estágios de gestação.

A expressão de *IL10* e *TGFB2* apresentou semelhança tanto entre as amostras de PBMC para os grupos de vacas não lactantes não prenhes, lactantes não prenhes e vacas no 1º trimestre da gestação ($P=0,52$ e $P=0,15$), quanto para as amostras de $WC1^+$ isoladas ($P=0,43$ e $P=0,65$) (Figura 7).

Diferente dos nossos resultados, Fan et al. (2011) mostram altos níveis de expressão de *IL10* em células $T\gamma\delta$ decíduais em mulheres no início da gestação quando comparada com mulheres não gestantes. Estudos sugerem que a expressão de *IL10* em células $T\gamma\delta$ decíduais mulheres gestantes, juntamente a expressão de *TGFB*, podem estar relacionadas com mecanismos de indução da tolerância materna em relação ao feto (NAGAEVA; JONSSON; MINCHEVA-NILSSON, 2002). Entretanto, esse aumento na expressão de *IL10* observados em vacas prenhes, está de acordo com estudos que relacionam a produção de citocinas com perfil Th2, que desempenham papel na inibição das células Th1 ou pro-inflamatórias, responsáveis

pela ativação de células citotóxicas e macrófagos, que estimulam a imunidade celular e inflamação (BASHYAM, 2007), podendo assim comprometer a gestação (PICCINNI et al., 2015). Além disso, o *TGFB* é uma citocina que tem função pleiotropica nos processos fisiológicos, incluindo a regulação de proliferação celular e apoptose (SIEGEL; MASSAGUE, 2003; PICKUP; NOVITSKIY; MOSES, 2013), e já foi descrito estar presente no trofoblasto e em células epiteliais carunculares em gestação de bovinos (MUNSON et al., 1996), podendo estar envolvido no descolamento das membranas fetais através da regulação da proliferação celular (HIRAYAMA et al., 2015).

A expressão de *IFNG* foi semelhante em células PBMC e WC1⁺, não havendo diferença significativa entre os grupos estudados ($P=0,27$ e $P=0,11$, respectivamente) (Figura 7). Loisel et al. (2009) demonstraram a presença de *IFNG* em sangue periférico em vacas pós-parto, logo no início da lactação, sugerindo que essa citocina induz um estado antiviral que promove a expressão de antígenos do complexo de histocompatibilidade e aumenta a ativação de macrófagos. Porém, alguns estudos mostram a diminuição de *IFNG* durante o período pós-parto (AMETAJ et al., 2000). Estudos mostraram que a produção de *IFNG* foi menor em mulheres gestantes do que em mulheres não gestantes (FAN et al., 2011), e esses números são ainda menores em mulheres com aborto recorrente (BATES et al., 2002).

No grupo de vacas não prenhes não lactantes, houve tendência no aumento nos níveis de expressão de *IL1B* tanto em células PBMC ($P=0,06$) quanto em células WC1⁺ isoladas ($P=0,07$) quando comparado ao grupo de vacas lactantes não prenhes e vacas no 1º trimestre da gestação (Figura 7). Esses resultados são diferentes dos encontrados em humanos (ROBERTSON et al., 1994) e em bovinos (OLIVEIRA et al., 2013), onde descrevem o aumento de *IL1B* na interface materno-fetal durante o início da gestação. *IL1B* pode ser expressa por monócitos, macrófagos e células epiteliais (NAIR; KHANNA; SINGH, 2014), e estão presentes durante a implantação do blastocisto no útero, agindo na regulação da expressão de moléculas de adesão (SALAMONSEN; DIMITRIADIS; ROBB, 2000) e crescimento e invasão do trofoblasto em camundongos (LIBRACH et al., 1994). Além disso, os baixos níveis de *IL1B* são reportados em casos de mulheres com histórico de abortos recorrentes (VON WOLFF et al., 2000).

A interleucina-4 (*IL4*) não apresentou diferença significativa na expressão em células PBMC e WC1⁺ entre os três grupos estudados ($P=0,93$ e $P=0,54$, respectivamente) (Figura 7). Diferente dos nossos resultados, Maeda et al. (2013) mostrou aumento no nível de expressão de *IL4* em células T $\gamma\delta$ isoladas de vacas prenhes quando comparado com o grupo de vacas não

prenhe. Corroborando com esses resultados, estudos em humanos mostram a presença de *IL4* em sangue periférico de mulheres gestantes (HILL; POLGAR; ANDERSON, 1995)

A expressão de *IL6* apresentou tendência no aumento da expressão em células PBMC em vacas do grupo não lactantes não prenhe quando comparada aos grupos de vacas lactantes não prenhes e vacas no 1º trimestre da gestação ($P=0,08$). Enquanto que em células WC1⁺ não foram observadas diferença significativa entre os grupos estudados ($P=0,37$) (Figura 7). Corroborando com nossos resultados, Curry et al. (2008) mostraram aumento nos níveis de *IL6* circulantes durante o início da gestação em mulheres. No entanto, Trevisi et al. (2012) mostraram aumento de expressão de *IL6* em vacas pós-parto e início de lactação, sugerindo um importante papel de citocinas pro-inflamatórias no período de transição em vacas leiteiras. Estudos tem reportado um aumento na concentração de *IL6* em vacas que apresentam retenção de placenta, laminite e febre do leite (ZHANG, 2014a; b; ZHANG et al., 2015), sugerindo um bom indicador de processos inflamatórios em vacas leiteiras no período de transição (DERVISHI et al., 2016).

A expressão de *TNFA* foi semelhante nos três grupos estudados e não houve interação entre as células PBMC ($P=0,7$) e WC1⁺ ($P=0,4$) dentro de um mesmo grupo (Figura 7). Apesar de não encontrarmos diferença, Dervishi et al. (2016) tem relacionado o aumento dos níveis de *TNFA* em processos inflamatórios, influenciando a separação e expulsão das membranas fetais em vacas pré-parto. Em humanos, tem sido associado com desordens durante a gestação, como o aumento de *TNFA* em mulheres com pré-eclâmpsia (SERIN et al., 2002), ou ainda em mulheres que sofrem abortos recorrentes (MUELLER-ECKHARDT et al., 1994; JENKINS et al., 2000).

Os níveis de expressão de perforina (*PFR*) em PBMC ($P=0,4$) e em células T $\gamma\delta$ isoladas ($P=0,3$) foram semelhantes nos três grupos estudados e não mostrou interação dentro de um mesmo grupo (Figura 7). A *PFR* já foi descrita em células T $\gamma\delta$ isoladas de útero gestante em ovinos (FOX; MEEUSEN, 1999) e em bovinos foi descrito um aumento de *PFR* no período pré-implantacional (OHTA et al., 2014), sugerindo um potencial citotóxico para as células T $\gamma\delta$ (MEEUSEN et al., 1993).

O *ISG5* não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados, tanto em amostras de PBMC ($P=0,6$) quanto em amostras de WC1 ($P=0,3$) (Figura 7). No entanto, autores descrevem que leucócitos do sangue periféricos, apresentam altos níveis de *ISG15* em vacas prenhes após 18-20 dias de inseminação artificial, do que em vacas não prenhes (FOX et al., 1998; HAN et al., 2006; GIFFORD et al., 2007). A identificação de baixos níveis de *ISG15* em vacas de leite não prenhe, tem sido usado como marcador que precoce de perda de

gestação, permitindo a ressincronização da vaca para o próximo estro (LUCY; MCDOUGALL; NATION, 2004). O *ISG15* também foi identificado em análise de microarranjo como um importante gene regulado durante o início da gestação em tecido endometrial de bovinos (MANSOURI-ATTIA et al., 2009), que coincide com a liberação de INFT pelo conceito (AUSTIN et al., 1996; HANSEN, T. R. et al., 1999), uma vez que o INFT induz a síntese e secreção de genes da família ISG (GIFFORD et al., 2007).

Os genes *IL15* e *IL18* mostraram nível de expressão semelhante em células PBMC ($P=0,5$ e $P=0,5$) e WC1⁺ ($P=0,1$ e $P=0,3$) (Figura 7). Em contraste com nossos resultados, Mansouri-Attia et al. (2012) descreve a expressão desses dois genes em endométrio bovinos, sendo que o *IL15* está aumentado em vacas de início de gestação, enquanto que o *IL18* está pouco expresso no início da gestação. Entretanto, estudos mostram aumento na expressão de *IL15* na decídua em mulheres com aborto recorrente quando comparado com gestações normais (TOTH et al., 2010).

Nossos dados não mostram diferença significativa entre os níveis de expressão de *IL17* em PBMC ($P=0,3$) e WC1 ($P=0,5$) entre os grupos estudados (Figura 7). No entanto, estudos tem sugerido que o *IL17* pode ter influência na tolerância durante a gestação. Os baixos níveis de expressão de *IL17* encontrados por Nakashima et al. (2010) durante a gestação podem estar ligados a fatores de rejeição, corroborando com dados encontrados em modelos de rejeição, onde baixos níveis previne a rejeição de aloenxertos cardíacos (LI et al., 2006). Em humanos, foi mostrado alto nível de expressão de *IL17* em pacientes com pré-eclâmpsia quando comparado com mulheres com gestações normais ou não gestantes (CAO et al., 2015; MOLVAREC et al., 2015).

De um modo geral, sabe-se do potencial dos linfócitos T em produzir múltiplas citocinas, de modo a aumentar a resposta inflamatória do sistema imune e comunicar-se com as células residentes no sangue periférico dependendo da estimulação (SHIRASUNA et al., 2012). As citocinas não agem de forma isoladas, mas formam uma complexa rede de interações que mantem a homeostase entre o feto e o sistema imune materno (BATES et al., 2002).

Nossos resultados e dados anteriores, sugerem que as células T $\gamma\delta$ agem na produção de citocinas e criam um ambiente de tolerância ao feto (NAGAEVA; JONSSON; MINCHEVA-NILSSON, 2002). Porém, os mecanismos de como isso ocorre ainda estão longes de serem completamente compreendidos, e estudos futuros são necessários para tal entendimento.

Figura 7 – Perfil de expressão gênica em PBMC e células WC1 isoladas em bovinos

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Expressão gênica apresentados em valores de dCT em sangue periférico de vacas NLNP (Não lactante não prenhe), LNP (Lactante Não Prenhe) e vacas no 1º trimestre da gestação. (*) Representam significância ($p \leq 0,05$).

5.4 CONCLUSÃO

Nossos estudos mostraram a presença dos genes *IFNG*; *IL10*; *IL15*; *IL17*; *IL18*; *IL1B*; *IL4*; *IL-6*; *ISG15*; *PFR*; *TGFB2* e *TNFA* nos três grupos analisados. No entanto, foi possível analisar uma tendência no aumento dos genes *IL1B* e *IL6* em amostras de PBMC e somente *IL1B* em amostras de WC1⁺ isoladas.

CAPÍTULO 3

6 EXPERIMENTO III – IMUNOLOCALIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO ENDOMÉTRIO DE VACAS EM 1º TRIMESTRE, 2º TRIMESTRE E 3º TRIMESTRE DE GESTAÇÃO EM BOVINOS

6.1 DESENHO EXPERIMENTAL I

Fragmentos de endométrio, provenientes de abatedouro, foram coletados de vacas em 1º trimestre (31 a 35 dias de gestação), 2º trimestre (143 a 182 dias de gestação) e 3º trimestre da gestação (228 a 247 dias de gestação). As amostras foram embebidas em meio de congelamento, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C. Em seguida, foram cortadas em criostato e quantificadas as células do sistema imune CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD18⁺, CD25⁺, CD62L⁺ e WC1⁺ por imunofluorescência (Figura 8).

Figura 8 – Desenho esquemático do experimento III

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

6.2 MATERIAL E MÉTODO

Todos os procedimentos envolvendo animais foram conduzidos em concordância com o Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo número: 4922220415).

6.2.1 Coleta de Amostras

Foram coletados 15 úteros de vacas gestantes provenientes de abatedouro/frigorífico na região de Pirassununga – SP. Os animais foram distribuídos em três grupos de acordo com o estágio da gestação: 1º trimestre (33 ± 1.5 dias, N=5), 2º trimestre (170 ± 16.9 dias, N=5) e 3º trimestre da gestação (227 ± 10.8 dias, N=5). A idade fetal foi estimada pela medida cefalococcígea (CR – Crown-rump) (EVANS; SACK, 1973).

Os úteros coletados foram transportados em gelo, para o Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD – FZEA/USP), as amostras do endométrio intercaruncular foram embebidas em meio de congelamento (Tissue-tek O.C.T.) (cat. # 4583-1, Sakura, USA), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C .

6.2.2 Imunofluorescência em corte congelado

O protocolo de imunofluorescência foi adaptado de Oliveira e Hansen (2009). Crio-seções com espessura de $5\mu\text{m}$ foram obtidas e colocadas em lâminas de vidro silanizadas *Starfrost* (cat. # 112714, Knittel). Os cortes foram fixados em acetona gelada por 10 minutos e secas em temperatura ambiente por 1 hora, lavados em tampão de lavagem em solução salina de Tris (TBS, do inglês *Tris-buffered saline* – 2mM de Trizma base e 1,36 mM de Cloreto de Sódio, pH7.4) por 15 minutos e em seguida incubados com TBS suplementado com 10% soro de cabra (cat. # CS 0300S, Cripion Biotech) por 1 hora. Os cortes foram incubados em anticorpos primários (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) diluídos em 1:100 em TBS suplementado com 1% de soro de cabra *overnight* a 4°C em câmara úmida e posteriormente

lavados por 3 vezes em TBS com 1% de soro de cabra e incubados com anticorpo secundário (Quadro 3) por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados em TBS com 1% de soro de cabra por 3 vezes e montados com Prolong Gold antifade com DAPI (cat. # P36935, Lifetech), sendo armazenados a -4°C.

Quadro 3– Anticorpos primários e secundários utilizados na imunofluorescência.

Anticorpo	Especificidade	Isotipo	Código	Fabricante
<i>Anticorpo Primário</i>				
Anti-CD3	Linfócitos Totais	IgG1	MM1A	VRMD
Anti-CD4	T auxiliares	IgG2a	IL-A11	VRMD
Anti-CD8	T citotóxicas	IgM	BAQ111A	VRMD
Anti-CD18	Leucócitos	IgG1	BAQ30A	VRMD
Anti-CD14	Macrófagos	IgG1	MM61A	VRMD
Anti-CD25	T ativadas/ Treg	IgG2a	CACT-108A	VRMD
Anti-CD62L	Monócitos	IgG1	BAQ92A	VRMD
Anti-WC1	T $\gamma\delta$	IgG2a	GB-54 ^a	VRMD
<i>Anticorpo Secundário</i>				
Goat anti-mouse		IgG1	F0479	Dako
Goat anti-mouse		IgG2a	A21134	Life Tech.
Goat anti-mouse		IgM	115585020	Jackson Immuno Research

6.2.3 Obtenção das imagens e análise estatística

As imagens foram adquiridas usando microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan 2 (Zeiss, Göttingen, Alemanha), com filtros Zeiss 02 (DAPI), 03 (FITC) e 15 (rhodamine) sob magnificação de 40x. Foram contados manualmente o número total de células e o número de células positivas para cada anticorpo através do ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD), usando cinco campos randômicos. Após a contagem, os números de células foram normalizados para células por mm² para cada marcador.

A análise estatística foi realizada separadamente para cada anticorpo através da análise de variância de quadrados mínimos (LSMeans - least square means) usando o procedimento de modelos lineares gerais (GLM - General Linear Models) do programa SAS 5.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Nível de significância de $P \leq 0.05$ e $P \leq 0.08$ foi utilizado como tendência. O modelo incluiu os efeitos da gestação para cada anticorpo (Início vs 2º trimestre vs 3º

trimestre). As médias (“LSMeans”) e os erros padrões foram calculados e separados usando o “statement pdiff” ajustado pelo método de Tukey HSD.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sucesso da implantação em vacas requer uma adequada sinalização do embrião para o reconhecimento materno da gestação (THATCHER; MEYER; DANET-DESNOYERS, 1995; WATHES; LAMMING, 1995) e supressão da resposta imune materna (HANSEN, P. J., 1995; 1997). A falha de qualquer um destes processos pode resultar em perda precoce do embrião.

Nossos resultados mostraram que na gestação em vacas, assim como em humanos (HALLER et al., 1993; HEIKKINEN et al., 2004; BARTMANN et al., 2014) e ovelhas (FOX et al., 1998), há mudanças nas populações celulares do sistema imune materno.

As células WC1⁺ (células T $\gamma\delta$) foram a população mais proeminente encontrada no endométrio de bovinos. Estas células mais concentradas no estroma endometrial superficial, mas também podem ser encontradas no estroma profundo e no epitélio glandular (Figura 9). O número de células positivas foi maior durante o 2º trimestre da gestação (31,61% $\pm$ 2,47), quando comparada com o 1º trimestre (17,66% $\pm$ 2,47) e 3º trimestre da gestação (19,23% $\pm$ 2,47) (P=0.003) (Figura 17A). Em humanos, há evidências de que a população de células T $\gamma\delta$ está relacionada com o estabelecimento/manutenção imuno-tolerância materna em relação ao feto através da produção de citocinas no início da gestação (BARTMANN et al., 2014). Em ovinos, a população de células T $\gamma\delta$ apresenta sinais de ativação como aumento da granulocidade (LEE et al., 1992) e expressão de marcadores como CD25 e CD44 (MEEUSEN et al., 1993; LIU, W. J.; GOTTSALL; HANSEN, 1997) na segunda metade da gestação.

A população de células T $\gamma\delta$ estão em grande número na interface materno fetal no início da gestação em humanos (MINCHEVA-NILSSON; HAMMARSTROM; HAMMARSTROM, 1992; MINCHEVA-NILSSON et al., 1994; MINCHEVA-NILSSON et al., 1997) e murinos (HEYBORNE, K. D. et al., 1992) quando comparado com endométrio não gestante. Estudos tem demonstrado diferentes produções de citocinas pelas células T $\gamma\delta$ ao longo da gestação. Durante o período pré-implantacional em murinos, as células T $\gamma\delta$ produzem *TNFA* e *IFNG* e promovem a ativação de células NK e macrófagos. Posteriormente, durante a implantação e formação da placenta, as células T $\gamma\delta$ produzem moléculas *TGFB* e *IL10*, exercendo um efeito

de proteção à gestação (ARCK et al., 1997; ARCK et al., 1999), suprimindo a resposta imune aos antígenos fetais (SUZUKI et al., 1995).

As células $CD3^+$ (linfócitos T totais) foram abundantes no estroma superficial em vacas prenhes durante a gestação, enquanto que no estroma profundo apenas algumas células foram positivas, bem como na lamina própria e epitélio glandular (Figura 10). A distribuição das células no endométrio foi similar por toda a gestação, e nenhuma diferença significativa foi observada para células $CD3^+$ entre 1º ($11,25\% \pm 1,08$), 2º ($11,00\% \pm 1,08$) e 3º trimestre da gestação ($9,49\% \pm 1,08$) ($P=0,48$) (Figura 17B). No entanto, HALLER et al. (1993) descreve que em humanos as $CD3^+$ estão em menor número no endométrio no início da gestação e aumentam do terço final da gestação. Por outro lado, recentes estudos em bovinos mostram que durante o meio e final de gestação, o número de $CD3^+$ foi significativamente menor quando comparado com o início, sugerindo uma função na regulação do endométrio, importante para o estabelecimento da implantação e placentação (OHTA et al., 2013).

As células $CD8^+$ (linfócitos T citotóxico) apresentaram-se concentradas no estroma superficial e ocasionalmente estavam presentes no estroma profundo e glândulas endometriais (Figura 11). Apesar de não apresentaram diferença estatística, o número de células $CD8^+$ foram semelhantes durante o 1º ($2,85\% \pm 0,56$) e 2º trimestre da gestação ($2,97\% \pm 0,56$), seguido de uma leve queda no 3º trimestre ($1,83\% \pm 0,56$) ($P=0,3$) (Figura 17C), corroborando assim com os achados de Williams et al. (2009) em humanos. Ainda em humanos, estudos mostram o aumento das células $CD8^+$ no início da gestação, possivelmente capaz de exercer função citolítica e fonte de citocinas capazes de controlar o processo de invasão inicial do trofoblasto durante a implantação até que uma resposta imune adequada se desenvolva e perpetue ao longo da gestação (BARTMANN et al., 2014).

Figura 9 – Imunofluorescência em tecido endometrial para WC1⁺

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Imagem de imunofluorescência para células T $\gamma\delta$ (WC1⁺) (vermelho) no 1º trimestre (a-b), 2º trimestre (c-d) e 3º trimestre de gestação (e-f) no estroma superficial (SS) e estroma profundo (DS) do endométrio bovino (núcleo corado com DAPI [azul]), controle (g-h). Aumento de 40x.

Figura 10 – Imunofluorescência em tecido endometrial para CD3⁺

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Imagem de imunofluorescência para CD3 (verde) no 1º trimestre (a-b), 2º trimestre (c-d) e 3º trimestre de gestação (e-f) no estroma superficial (SS) e estroma profundo (DS) do endométrio bovino (núcleo corado com DAPI [azul]), controle (g-h). Aumento de 40x.

Figura 11 – Imunofluorescência em tecido endometrial para CD8+

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Imagem de imunofluorescência para CD8 (vermelho) no 1º trimestre (a-b), 2º trimestre (c-d) e 3º trimestre de gestação (e-f) no estroma superficial (SS) e estroma profundo (DS) do endométrio bovino (núcleo corado com DAPI [azul]), controle (g-h). Aumento de 40x.

Os monócitos (CD14⁺) estão presentes principalmente no estroma superficial, não sendo encontrado no estroma profundo do endométrio bovino (Figura 12). O número de células positivas no estroma superficial no 1º trimestre da gestação foi bem inferior ($3,65\% \pm 0,79$) quando comparado ao 2º trimestre ($12,29\% \pm 0,79$) e 3º trimestre da gestação ($16\% \pm 0,79$), mostrando um aumento significativo ao longo da gestação ($P < 0.01$) (Figura 17D). A dinâmica das populações de macrófagos tem sido descritas em espécies como humanos (HEIKKINEN et al., 2003; KIM et al., 2007; KWAN et al., 2014) e bovinos (LEUNG et al., 2000; OLIVEIRA; HANSEN, 2009). Em nossos estudos, observamos o aumento do número de células CD14⁺ nos períodos analisados, enquanto que em humanos foi descrito a diminuição destas células no terço final da gestação quando comparado com o início (WILLIAMS et al., 2009). Estudos sugerem que essa redução no final da gestação comparado com primeiro e segundo terço podem estar relacionado com o papel dos macrófagos na regulação do apoptose durante o processo de implantação e desenvolvimento da placenta (ABRAHAMS et al., 2004), e em vacas, as células CD14⁺ aumentadas no final da gestação podem estar envolvidas na expulsão das membranas fetais após parto. A retenção placentária, por exemplo, está relacionada com a diminuição do número de células CD14⁺ na placenta (MIYOSHI; SAWAMUKAI; IWANAGA, 2002).

As células CD4⁺ estão localizadas nas áreas superficiais do estroma endometrial (Figura 13), com poucas células positivas no estroma profundo e glândulas endometriais. O número de células positivas para CD4 foi similar durante o 1º trimestre ($8,38\% \pm 1,17$) e 2º trimestre ($9,30\% \pm 1,17$) de gestação, havendo uma tendência em diminuir no 3º trimestre da gestação ($5,45\% \pm 1,17$) ($P = 0,09$) (Figura 17E).

As células CD25⁺ também foram localizadas nas áreas superficiais do estroma endometrial (Figura 14), sendo ausentes no estroma profundo e glândulas endometriais. O número de células positivas para CD25 diminuiu no 2º trimestre da gestação ($2,83\% \pm 1,40$), quando comparado com o 1º trimestre ($6,93\% \pm 1,40$) e 3º trimestre de gestação ($7,25\% \pm 1,40$) ($P = 0.022$) (Figura 17F).

As células T reguladoras foram descritas em camundongos e em humanos como uma subpopulação de células T, caracterizadas pela expressão constitutiva de CD4⁺ CD25⁺ e FOXP3⁺, suas propriedades moduladoras da resposta imune e sua importância da tolerância materno fetal (TAYLOR; NOELLE; BLAZAR, 2001) e humanos (BAECHER-ALLAN et al., 2001; JONULEIT et al., 2001; NG et al., 2001). Em nossos estudos, não realizamos a dupla marcação das células CD4⁺CD25⁺, por isso avaliamos a presença destas células separadamente CD4⁺ e CD25⁺. Não foi observado diferença entre as células CD4⁺ durante a gestação, enquanto que o número de células CD25⁺ é menor no meio da gestação comparado com os outros

períodos da gestação. Nossos achados corroboram com o descrito por Aluvihare et al. (2004) e Yang et al. (2008) em sangue periférico de humanos, onde as células T reguladoras aumentam durante o início da gestação, caindo durante o meio da gestação; períodos em que há invasão do trofoblasto chegando ao seu máximo, seguida de declínio no pós-parto (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004; YANG et al., 2008), sugerindo que as células T reguladoras possuem papel no reconhecimento e estabelecimento da gestação, enquanto que próximo ao parto, a presença das células T reguladoras possam influenciar negativamente o descolamento e expulsão das membranas fetais.

Figura 12 – Imunofluorescência em tecido endometrial para CD14⁺.

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Imagem de imunofluorescência para CD8 (vermelho) no 1º trimestre (a-b), 2º trimestre (c-d) e 3º trimestre de gestação (e-f) no estroma superficial (SS) e estroma profundo (DS) do endométrio bovino (núcleo corado com DAPI [azul]), controle (g-h). Aumento de 40x.

Figura 13 – Imunofluorescência em tecido endometrial para CD4+.

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Imagem de imunofluorescência para CD8 (vermelho) no 1º trimestre (a-b), 2º trimestre (c-d) e 3º trimestre de gestação (e-f) no estroma superficial (SS) e estroma profundo (DS) do endométrio bovino (núcleo corado com DAPI [azul]), controle (g-h). Aumento de 40x.

Figura 14 – Imunofluorescência em tecido endometrial para CD25⁺.

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Imagem de imunofluorescência para CD8 (vermelho) no 1º trimestre (a-b), 2º trimestre (c-d) e 3º trimestre de gestação (e-f) no estroma superficial (SS) e estroma profundo (DS) do endométrio bovino (núcleo corado com DAPI [azul]), controle (g-h). Aumento de 40x.

As subpopulações de CD18 mostraram-se abundante no estroma superficial e profundo (Figura 15) aumentaram a expressão no 3º trimestre da gestação ($36,79\% \pm 2,91$) quando comparado ao 1º trimestre ($26,85\% \pm 2,91$) e 2º trimestre ($24,77\% \pm 2,91$) da gestação ($P=0,028$) (Figura 17G). Consistentes com os nossos resultados em bovinos, as células positivas para CD18 (β -integrina) mostraram aumento no número de células positivas ao longo da gestação em humanos, aumentando no final da gestação (HALLER et al., 1997), sugerindo assim o recrutamento destas células para o útero.

As células CD62L estão presentes no estroma superficial e profundo (Figura 16) O número de células CD62L⁺ aumentaram no 3º trimestre da gestação ($7,66\% \pm 0,57$), quando comparado ao 1º trimestre ($4,13\% \pm 0,57$) e 2º trimestre da gestação ($2,07\% \pm 0,57$) ($P<.0001$) (Figura 17H). As células positivas para CD62L (L-selectina), promovem interação entre leucócitos circulantes com células endoteliais (BARDEN et al., 1997). Em nossos estudos, encontramos uma pequena população de células positivas para CD62L, sendo mais abundantes no início e final da gestação. Em humanos, as células CD62L⁺ foram descritas no sangue periférico de mulheres gestantes e não gestantes, sugerindo que as mudanças no perfil dos monócitos para aumentar a adesão no endotélio de vasos sanguíneos no útero, possibilitando a migração destas células da periferia para o útero (MIKHAYLOVA et al., 2013). Esses resultados corroboram com os nossos, uma vez que estas células parecem estar envolvidos na sinalização do melhor local da implantação do blastocisto com a parede uterina (ACHACHE; REVEL, 2006).

Nossos estudos demonstram que no 1º trimestre da gestação, há predominância de células do sistema imune CD3, CD4 e CD8, envolvidos no estabelecimento e regulação do sistema imune para tolerância e sobrevivência do feto, enquanto que no meio da gestação, o número de células CD14 e WC1 estão aumentadas, permitindo o desenvolvimento da placenta e manutenção da gestação. No final da gestação, há um recrutamento de células envolvidas em resposta inflamatória induzindo o descolamento da placenta e auxiliando o parto propriamente dito (CD14, CD18, CD25 e CD62L) (Figura 18).

Figura 15 – Imunofluorescência em tecido endometrial para célula leucócito (CD18).

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Imagem de imunofluorescência para CD18 (verde) no 1º trimestre (a-b), 2º trimestre (c-d) e 3º trimestre de gestação (e-f) no estroma superficial (SS) e estroma profundo (DS) do endométrio bovino (núcleo corado com DAPI [azul]), controle (g-h). Aumento de 40x.

Figura 16 – Imunofluorescência em tecido endometrial para monócitos (CD62L)

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Imagem de imunofluorescência para CD62L (verde) no 1º trimestre (a-b), 2º trimestre (c-d) e 3º trimestre de gestação (e-f) no estroma superficial (SS) e estroma profundo (DS) do endométrio bovino (núcleo corado com DAPI [azul]), controle (g-h). Aumento de 40x.

Figura 17 – Quantificação das células sistema imune em endométrio de vacas em 1º trimestre, 2º trimestre e 3º trimestre de gestação

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Gráfico do número total de células do sistema imune no 1º trimestre, 2º trimestre e 3º trimestre de gestação em tecido endometrial. (A) Porcentagem de células WC1⁺; (B) Porcentagem de células CD3⁺; (C) Porcentagem de células CD8⁺; (D) Porcentagem de células positivas para CD14⁺; (E) Porcentagem de células positivas para CD4⁺; (F) Porcentagem de células CD25⁺; (F) Porcentagem de células CD18⁺; (F) Porcentagem de células CD62L⁺. Barras com letras diferentes representam significância ($p \leq 0,05$).

6.4 CONCLUSÃO

Nossos estudos mostraram que há um recrutamento de algumas células do sistema imune durante a gestação em bovinos (Figura 18). No início da gestação, há predominância de células do sistema imune $CD25^+$ e $CD62L^+$, que estão envolvidos no estabelecimento da gestação e sobrevivência do feto, sugerindo ativação das células T, promovendo um microambiente de tolerância aos antígenos fetais.

No meio da gestação, há aumento do número de células $T\gamma\delta$ ($WC1^+$), que sugere um ambiente anti-inflamatório importante na manutenção da gestação. Está correlacionado com a proteção contra patógenos, que pode causar danos ou injúria na placenta, e através da produção de citocinas que suprimem a resposta a antígenos fetais.

No final da gestação, há um aumento expressão de células $CD14^+$, $CD25^+$, $CD18^+$ e $CD62L^+$, que estão envolvidas principalmente na ativação de células T, migração e recrutamento de macrófagos para o endométrio, que indicam novamente uma resposta pró-inflamatória através da produção de citocinas, que auxiliam o parto.

Figura 18 – Desenho esquemático da expressão das células do sistema imune presentes no endométrio no 1º trimestre, 2º trimestre e 3º trimestre de gestação.

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

Legenda: Representação esquemática da população de células do sistema imune presentes no endométrio bovino ao longo da gestação. No início da gestação, observamos o aumento da expressão de $CD25^+$ e $CD62L^+$ no endométrio. No 2º trimestre da gestação, há um aumento das células $WC1^+$ e $CD14^+$. No 3º trimestre da gestação, observamos o aumento de $CD14^+$, $CD25^+$, $CD18^+$ e $CD62L^+$.

Conclusão Geral

7 CONCLUSÃO GERAL

A hipótese central proposta por essa tese de doutorado foi de que *há um recrutamento de células para o endométrio ao longo da gestação, que expressam citocinas que favorecem o estabelecimento e manutenção da tolerância materna a antígenos fetais, durante a gestação em bovinos.*

Para tanto, os Experimentos I e II foram realizados a fim de analisar por citometria de fluxo e expressão gênica, a expressão de proteínas e genes que poderiam estar relacionados com o estabelecimento e a manutenção da gestação no sangue periférico em vacas. No Experimento I, não foram observados diferença na população de células do sistema imune, mantendo-se semelhantes nos três períodos analisados. Esse fato pode estar relacionado com a idade gestacional estudada, visto que na literatura há relatos da flutuação das populações, principalmente de CD14, CD25 e WC1, no início e final da gestação.

As citocinas tem um papel crucial no estabelecimento e manutenção da gestação. No Experimento II, foi possível observar a tendência no aumento de *IL1B* e *IL6* em vacas não prenhes e não lactantes, quando comparado com vacas lactantes não prenhes e vacas no 1º trimestre da gestação. Nossos resultados sugerem uma modulação do sistema imune materno através da produção de citocinas onde no início da gestação, há uma menor produção de citocinas para o-inflamatórias provavelmente para inibir uma resposta inflamatória inicial deletéria ao embrião no início do seu desenvolvimento.

Apesar das células do sistema imune e da expressão de genes terem sido semelhantes nos períodos analisados, essa semelhança foi sistêmica. Para entendermos melhor no âmbito local, o Experimento III mostraram que há recrutamento de diferentes células do sistema imune ao longo da gestação. No início, foram observados a predominância de células com perfil de ativação de células T e remodelação de células de endométrio que promovem um microambiente que garantem o estabelecimento da gestação, inibindo a resposta materna contra o concepto. Em seguida, observamos a modulação do sistema imune para um ambiente anti-inflamatório através da produção de citocinas ou por comunicação célula-célula presentes no endométrio, que modulam a resposta aos antígenos fetais, importante para a manutenção da gestação. E por fim, há um recrutamento de células de perfil inflamatório que provavelmente auxiliam no processo de parto, descolamento das membranas fetais e involução uterina.

Figura 19 – Desenho esquemático de proteínas e genes expressos no sangue periférico e no tecido endometrial em diferentes fases do ciclo reprodutivo de vacas.

Legenda:

- Alta expressão no tecido;
- Alta expressão no sangue
- Não teve alteração no sangue.

Fonte: (MANÇANARES, A. C. F., 2016).

REFERENCIAS

REFERENCIAS

ABRAHAM, V. M.; KIM, Y. M.; STRASZEWSKI, S. L.; ROMERO, R.; MOR, G. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 51, n. 4, p. 275-282, 2004.

ACHACHE, H.; REVEL, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 6, p. 731-746, 2006.

ALUVIHARE, V. R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. **Nature Immunology**, v. 5, n. 3, p. 266-271, 2004.

AMETAJ, B. N.; NONNECKE, B. J.; HORST, R. L.; BEITZ, D. C. Effects of retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on IFN-gamma secretion by mononuclear leukocytes from nulliparous and postparturient dairy cattle. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 70, n. 3, p. 92-101, 2000.

ARCK, P. C.; FERRICK, D. A.; STEELE-NORWOOD, D.; CROITORU, K.; CLARK, D. A. Regulation of abortion by gamma delta T cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 1, p. 87-93, 1997.

ARCK, P. C.; FERRICK, D. A.; STEELE-NORWOOD, D.; EGAN, P. J.; CROITORU, K.; CARDING, S. R.; DIETL, J.; CLARK, D. A. Murine T cell determination of pregnancy outcome. **Cellular Immunology**, v. 196, n. 2, p. 71-79, 1999.

AUSTIN, K. J.; WARD, S. K.; TEIXEIRA, M. G.; DEAN, V. C.; MOORE, D. W.; HANSEN, T. R. Ubiquitin cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 3, p. 600-606, 1996.

BAECHER-ALLAN, C.; BROWN, J. A.; FREEMAN, G. J.; HAFLER, D. A. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 3, p. 1245-1253, 2001.

BARDEN, A.; GRAHAM, D.; BEILIN, L. J.; RITCHIE, J.; BAKER, R.; WALTERS, B. N.; MICHAEL, C. A. Neutrophil CD11B expression and neutrophil activation in pre-eclampsia. **Clinical Science (London)**, v. 92, n. 1, p. 37-44, 1997.

BARKHAUSEN, T.; KRETTEK, C.; VAN GRIENSVEN, M. L-selectin: adhesion, signalling and its importance in pathologic posttraumatic endotoxemia and non-septic inflammation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 57, n. 1, p. 39-52, 2005.

BARTMANN, C.; SEGERER, S. E.; RIEGER, L.; KAPP, M.; SUTTERLIN, M.; KAMMERER, U. Quantification of the predominant immune cell populations in decidua throughout human pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 71, n. 2, p. 109-119, 2014.

BASHYAM, H. Th1/Th2 cross-regulation and the discovery of IL-10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 2, p. 237, 2007.

BATES, M. D.; QUENBY, S.; TAKAKUWA, K.; JOHNSON, P. M.; VINCE, G. S. Aberrant cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in recurrent pregnancy loss? **Human Reproduction**, v. 17, n. 9, p. 2439-2444, 2002.

BURTON, J. L.; KEHRLI, M. E., JR. Regulation of neutrophil adhesion molecules and shedding of Staphylococcus aureus in milk of cortisol- and dexamethasone-treated cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 8, p. 997-1006, 1995.

CAO, W.; WANG, X.; CHEN, T.; ZHU, H.; XU, W.; ZHAO, S.; CHENG, X.; XIA, L. The Expression of Notch/Notch Ligand, IL-35, IL-17, and Th17/Treg in Preeclampsia. **Disease Markers**, v. 2015, n., p. 9, 2015.

CARDING, S. R.; KYES, S.; JENKINSON, E. J.; KINGSTON, R.; BOTTOMLY, K.; OWEN, J. J.; HAYDAY, A. C. Developmentally regulated fetal thymic and extrathymic T-cell receptor gamma delta gene expression. **Genes & Development**, v. 4, n. 8, p. 1304-1315, 1990.

CARDING, S. R.; EGAN, P. J. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 5, p. 336-345, 2002.

CHEN, Z. W. Comparative biology of $\gamma\delta$ T cells. **Science progress**, v. 85, n. 4, p. 347-358, 2002.

CHIEN, Y.; MEYER, C.; BONNEVILLE, M. $\gamma\delta$ T Cells: First Line of Defense and Beyond. **Annual Review of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 121-155, 2014.

CIOFANI, M.; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. Determining $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ T cell development. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 9, p. 657-663, 2010.

COBB, S. P.; WATSON, E. D. Immunohistochemical Study of Immune Cells in the Bovine Endometrium at Different Stages of the Estrous-Cycle. **Research in Veterinary Science**, v. 59, n. 3, p. 238-241, 1995.

CROCKER, I. P.; BAKER, P. N.; FLETCHER, J. Neutrophil function in pregnancy and rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 59, n. 7, p. 555-564, 2000.

CURRY, A. E.; VOGEL, I.; SKOGSTRAND, K.; DREWS, C.; SCHENDEL, D. E.; FLANDERS, W. D.; HOUGAARD, D. M.; THORSEN, P. Maternal plasma cytokines in early- and mid-gestation of normal human pregnancy and their association with maternal factors. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 77, n. 2, p. 152-160, 2008.

DAMBAEVA, S. V.; BREBURDA, E. E.; DURNING, M.; GARTHWAITE, M. A.; GOLOS, T. G. Characterization of decidual leukocyte populations in cynomolgus and vervet monkeys. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 80, n. 1-2, p. 57-69, 2009.

DAVIS, W. C.; BROWN, W. C.; HAMILTON, M. J.; WYATT, C. R.; ORDEN, J. A.; KHALID, A. M.; NAESSENS, J. Analysis of monoclonal antibodies specific for the gamma delta TcR. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 52, n. 4, p. 275-283, 1996.

DE ROSA, S. C.; ANDRUS, J. P.; PERFETTO, S. P.; MANTOVANI, J. J.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A.; ROEDERER, M. Ontogeny of gamma delta T cells in humans. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 3, p. 1637-1645, 2004.

DEALTRY, G. B.; O'FARRELL, M. K.; FERNANDEZ, N. The Th2 cytokine environment of the placenta. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 123, n. 2, p. 107-119, 2000.

DERVISHI, E.; ZHANG, G.; HAILEMARIAM, D.; GOLDANSAZ, S. A.; DENG, Q.; DUNN, S. M.; AMETAJ, B. N. Alterations in innate immunity reactants and carbohydrate and lipid metabolism precede occurrence of metritis in transition dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 104, n., p. 30-39, 2016.

DRACKLEY, J. K. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2259-2273, 1999.

DRACKLEY, J. K.; DANN, H. M.; DOUGLAS, G. N.; GURETZKY, N. A. J.; LITHERLAND, N. B.; UNDERWOOD, J. P.; LOOR, J. J. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. **Growth**, v. 7, n. 7.1, p., 2005.

ERRANTE, P. R.; FRAZÃO, J. B.; CONDINO-NETO, A. **Deficiência da adesão leucocitária tipo I**: secondary title, 2011. 34, 225-234 p.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 2, n. 1, p. 11-45, 1973.

FAN, D. X.; DUAN, J.; LI, M. Q.; XU, B.; LI, D. J.; JIN, L. P. The decidual gamma-delta T cells up-regulate the biological functions of trophoblasts via IL-10 secretion in early human pregnancy. **Clinical Immunology**, v. 141, n. 3, p. 284-292, 2011.

FOX, A.; LEE, C. S.; BRANDON, M. R.; MEEUSEN, E. N. Effects of pregnancy on lymphocytes within sheep uterine interplacentomal epithelium. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 40, n. 4, p. 295-302, 1998.

FOX, A.; MEEUSEN, E. Sheep perforin: identification and expression by $\gamma\delta$ T cells from pregnant sheep uterine epithelium. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, n. 2-4, p. 293-296, 1999.

FOX, A.; MADDOX, J. F.; DE VEER, M. J.; MEEUSEN, E. N. GammadeltaTCR+ cells of the pregnant ovine uterus express variable T cell receptors and contain granulysin. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 84, n. 1, p. 52-56, 2010.

GIFFORD, C. A.; RACICOT, K.; CLARK, D. S.; AUSTIN, K. J.; HANSEN, T. R.; LUCY, M. C.; DAVIES, C. J.; OTT, T. L. Regulation of Interferon-Stimulated Genes in Peripheral Blood Leukocytes in Pregnant and Bred, Nonpregnant Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 274-280, 2007.

GOFF, J. P.; HORST, R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1260-1268, 1997.

GOODMAN, T.; LEFRANCOIS, L. Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. **Nature**, v. 333, n. 6176, p. 855-858, 1988.

GRUMMER, R. R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 9, p. 2820-2833, 1995.

GUY-GRAND, D.; VASSALLI, P. Gut intraepithelial T lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**, v. 5, n. 2, p. 247-252, 1993.

GUZMAN, E.; PRICE, S.; POULSOM, H.; HOPE, J. Bovine gammadelta T cells: cells with multiple functions and important roles in immunity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, n. 1-2, p. 161-167, 2012.

HAAS, W.; PEREIRA, P.; TONEGAWA, S. Gamma/Delta Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 11, n. 1, p. 637-685, 1993.

HALLER, H.; RADILLO, O.; RUKAVINA, D.; TEDESCO, F.; CANDUSSI, G.; PETROVIC, O.; RANDIC, L. An immunohistochemical study of leucocytes in human endometrium, first and third trimester basal decidua. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 23, n. 1, p. 41-49, 1993.

HALLER, H.; ZIEGLER, E. M.; HOMUTH, V.; DRAB, M.; EICHHORN, J.; NAGY, Z.; BUSJAHN, A.; VETTER, K.; LUFT, F. C. Endothelial adhesion molecules and leukocyte integrins in preeclamptic patients. **Hypertension**, v. 29, n. 1 Pt 2, p. 291-296, 1997.

HAN, H.; AUSTIN, K. J.; REMPEL, L. A.; HANSEN, T. R. Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. **Journal of Endocrinology**, v. 191, n. 2, p. 505-512, 2006.

HANSEN, P. J. Interactions between the immune system and the ruminant conceptus. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 49, n., p. 69-82, 1995.

HANSEN, P. J. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 121-130, 1997.

HANSEN, T. R.; AUSTIN, K. J.; PERRY, D. J.; PRU, J. K.; TEIXEIRA, M. G.; JOHNSON, G. A. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 54, n., p. 329-339, 1999.

HAVRAN, W. L.; ALLISON, J. P. Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. **Nature**, v. 335, n. 6189, p. 443-445, 1988.

HAYDAY, A. C.; SAITO, H.; GILLIES, S. D.; KRANZ, D. M.; TANIGAWA, G.; EISEN, H. N.; TONEGAWA, S. Structure, organization, and somatic rearrangement of T cell gamma genes. **Cell**, v. 40, n. 2, p. 259-269, 1985.

HAYDAY, A. C. $\gamma\delta$ Cells: A Right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection. **Annual Review of Immunology**, v. 18, n., p. 975-1026, 2000.

HAYDAY, A. C.; TIGELAAR, R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 3, p. 233-242, 2003.

HAYDAY, A. C. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 184-196, 2009.

HEIKKINEN, J.; MOTTONEN, M.; KOMI, J.; ALANEN, A.; LASSILA, O. Phenotypic characterization of human decidual macrophages. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 131, n. 3, p. 498-505, 2003.

HEIKKINEN, J.; MOTTONEN, M.; ALANEN, A.; LASSILA, O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 136, n. 2, p. 373-378, 2004.

HEYBORNE, K.; FU, Y. X.; NELSON, A.; FARR, A.; O'BRIEN, R.; BORN, W. Recognition of trophoblasts by gamma delta T cells. **Journal of Immunology**, v. 153, n. 7, p. 2918-2926, 1994.

HEYBORNE, K. D.; CRANFILL, R. L.; CARDING, S. R.; BORN, W. K.; O'BRIEN, R. L. Characterization of gamma delta T lymphocytes at the maternal-fetal interface. **Journal of Immunology**, v. 149, n. 9, p. 2872-2878, 1992.

HILL, J. A.; POLGAR, K.; ANDERSON, D. J. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. **Jama**, v. 273, n. 24, p. 1933-1936, 1995.

HIRAYAMA, H.; KOYAMA, K.; SAWAI, K.; FUJII, T.; NAITO, A.; FUKUDA, S.; KAGEYAMA, S. Localization of TGF- β and TGF- β receptor in bovine term placentome and expression differences between spontaneous and induced parturition. **Placenta**, v. 36, n. 11, p. 1239-1245, 2015.

HOFFMAN, E. S.; PASSONI, L.; CROMPTON, T.; LEU, T. M.; SCHATZ, D. G.; KOFF, A.; OWEN, M. J.; HAYDAY, A. C. Productive T-cell receptor beta-chain gene rearrangement: coincident regulation of cell cycle and clonality during development in vivo. **Genes & Development**, v. 10, n. 8, p. 948-962, 1996.

HUNT, J. S.; MANNING, L. S.; MITCHELL, D.; SELANDERS, J. R.; WOOD, G. W. Localization and Characterization of Macrophages in Murine Uterus. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 38, n. 2, p. 255-265, 1985.

INGVARTSEN, K. L.; DEWHURST, R. J.; FRIGGENS, N. C. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. **Livestock Production Science**, v. 83, n. 2, p. 277-308, 2003.

INGVARTSEN, K. L. Feeding-and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3, p. 175-213, 2006.

INGVARTSEN, K. L.; MOYES, K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. **Animal**, v. 7 Suppl 1, n., p. 112-122, 2013.

ITOHARA, S.; NAKANISHI, N.; KANAGAWA, O.; KUBO, R.; TONEGAWA, S. Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor gamma delta: analysis of gamma delta T cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 13, p. 5094-5098, 1989.

JENKINS, C.; ROBERTS, J.; WILSON, R.; MACLEAN, M. A.; SHILITO, J.; WALKER, J. J. Evidence of a T(H) 1 type response associated with recurrent miscarriage. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 6, p. 1206-1208, 2000.

JONSSON, N. N.; FORTES, M. R.; PIPER, E. K.; VANKAN, D. M.; DE CISNEROS, J. P.; WITTEK, T. Comparison of metabolic, hematological, and peripheral blood leukocyte

cytokine profiles of dairy cows and heifers during the periparturient period. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 4, p. 2283-2292, 2013.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; STASSEN, M.; TUETTENBERG, A.; KNOP, J.; ENK, A. H. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 11, p. 1285-1294, 2001.

KALYAN, S.; KABELITZ, D. Defining the nature of human gammadelta T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 10, n. 1, p. 21-29, 2013.

KAUFMANN, S. H.; BLUM, C.; YAMAMOTO, S. Crosstalk between alpha/beta T cells and gamma/delta T cells in vivo: activation of alpha/beta T-cell responses after gamma/delta T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 20, p. 9620-9624, 1993.

KEDZIERSKA, K.; LA GRUTA, N. L.; STAMBAS, J.; TURNER, S. J.; DOHERTY, P. C. Tracking phenotypically and functionally distinct T cell subsets via T cell repertoire diversity. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 3, p. 607-618, 2008.

KELTON, D. F.; LISSEMORE, K. D.; MARTIN, R. E. Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 9, p. 2502-2509, 1998.

KIM, J. S.; ROMERO, R.; CUSHENBERRY, E.; KIM, Y. M.; EREZ, O.; NIEN, J. K.; YOON, B. H.; ESPINOZA, J.; KIM, C. J. Distribution of CD14+ and CD68+ macrophages in the placental bed and basal plate of women with preeclampsia and preterm labor. **Placenta**, v. 28, n. 5-6, p. 571-576, 2007.

KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI, M. E., JR.; HARP, J. A. Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 82, n. 2, p. 315-319, 1999a.

KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI, M. E., JR.; HARP, J. A. Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 315-319, 1999b.

KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI, M. E., JR.; HARP, J. A.; NONNECKE, B. J. Effects of mastectomy on composition of peripheral blood mononuclear cell populations in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 6, p. 1437-1444, 2002a.

KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI, M. E., JR.; REINHARDT, T. A. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 3, p. 544-550, 2002b.

KONING, F.; STINGL, G.; YOKOYAMA, W. M.; YAMADA, H.; MALOY, W. L.; TSCHACHLER, E.; SHEVACH, E. M.; COLIGAN, J. E. Identification of a T3-associated gamma delta T cell receptor on Thy-1+ dendritic epidermal Cell lines. **Science**, v. 236, n. 4803, p. 834-837, 1987.

KÜHNERT, M.; STROHMEIER, R.; STEGMÜLLER, M.; HALBERSTADT, E. Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 76, n. 2, p. 147-151, 1998.

KWAN, M.; HAZAN, A.; ZHANG, J.; JONES, R. L.; HARRIS, L. K.; WHITTLE, W.; KEATING, S.; DUNK, C. E.; LYE, S. J. Dynamic changes in maternal decidual leukocyte populations from first to second trimester gestation. **Placenta**, v. 35, n. 12, p. 1027-1034, 2014.

LASHLEY, L. E. E. L. O.; VAN DER HOORN, M. L. P.; VAN DER MAST, B. J.; TILBURGS, T.; VAN DER LEE, N.; VAN DER KEUR, C.; VAN BEELEN, E.; ROELEN, D. L.; CLAAS, F. H. J.; SCHERJON, S. A. Changes in cytokine production and composition of peripheral blood leukocytes during pregnancy are not associated with a difference in the proliferative immune response to the fetus. **Human Immunology**, v. 72, n. 10, p. 805-811, 2011.

LEBLANC, S.; LISSEMORE, K. D.; KELTON, D. F.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1267-1279, 2006.

LEBLANC, S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56 Suppl, n., p. S29-35, 2010.

LEE, C. S.; MEEUSEN, E.; GOGOLIN-EWENS, K.; BRANDON, M. R. Quantitative and qualitative changes in the intraepithelial lymphocyte population in the uterus of nonpregnant and pregnant sheep. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 28, n. 2, p. 90-96, 1992.

LESLIE, M. V.; HANSEN, P. J. Progesterone-regulated secretion of the serpin-like proteins of the ovine and bovine uterus. **Steroids**, v. 56, n. 12, p. 589-597, 1991.

LEUNG, S. T.; DERECKA, K.; MANN, G. E.; FLINT, A. P.; WATHES, D. C. Uterine lymphocyte distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 119, n. 1, p. 25-33, 2000.

LI, J.; SIMEONI, E.; FLEURY, S.; DUDLER, J.; FIORINI, E.; KAPPENBERGER, L.; VON SEGESSER, L. K.; VASSALLI, G. Gene transfer of soluble interleukin-17 receptor prolongs cardiac allograft survival in a rat model. **European Journal Cardio-Thoracic Surgery**, v. 29, n. 5, p. 779-783, 2006.

LIBRACH, C. L.; FEIGENBAUM, S. L.; BASS, K. E.; CUI, T. Y.; VERASTAS, N.; SADOVSKY, Y.; QUIGLEY, J. P.; FRENCH, D. L.; FISHER, S. J. Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 25, p. 17125-17131, 1994.

LIU, C. C.; WALSH, C. M.; YOUNG, J. D. Perforin: structure and function. **Immunology Today**, v. 16, n. 4, p. 194-201, 1995.

LIU, W. J.; GOTTSALL, S. L.; HANSEN, P. J. Increased Expression of Cell Surface Markers on Endometrial $\gamma\delta$ T-Cell Receptor⁺ Intraepithelial Lymphocytes Induced by the

Local Presence of the Sheep Conceptus. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 2, p. 199-205, 1997.

LIVAK, F.; TOURIGNY, M.; SCHATZ, D. G.; PETRIE, H. T. Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 5, p. 2575-2580, 1999.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOISELLE, M. C.; STER, C.; TALBOT, B. G.; ZHAO, X.; WAGNER, G. F.; BOISCLAIR, Y. R.; LACASSE, P. Impact of postpartum milking frequency on the immune system and the blood metabolite concentration of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1900-1912, 2009.

LUCY, M. C.; MCDOUGALL, S.; NATION, D. P. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, n., p. 495-512, 2004.

LUPPI, P.; HALUSZCZAK, C.; BETTERS, D.; RICHARD, C. A.; TRUCCO, M.; DELOIA, J. A. Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 72, n. 5, p. 874-884, 2002a.

LUPPI, P.; HALUSZCZAK, C.; TRUCCO, M.; DELOIA, J. A. Normal Pregnancy is Associated with Peripheral Leukocyte Activation. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 47, n. 2, p. 72-81, 2002b.

MAEDA, Y.; YAMAMOTO, K.; OHTSUKA, H.; ANDO, T.; TOMIOKA, M.; OIKAWA, M. Gene expression of T lymphocytes of gravid cows during preimplantation. **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 82, n. 2, p. 131-134, 2013.

MAJEWSKI, A. C.; TEKIN, S.; HANSEN, P. J. Local versus systemic control of numbers of endometrial T cells during pregnancy in sheep. **Immunology**, v. 102, n. 3, p. 317-322, 2001.

MANSOURI-ATTIA, N.; AUBERT, J.; REINAUD, P.; GIRAUD-DELVILLE, C.; TAGHOUTI, G.; GALIO, L.; EVERTS, R. E.; DEGRELLE, S.; RICHARD, C.; HUE, I.; YANG, X.; TIAN, X. C.; LEWIN, H. A.; RENARD, J. P.; SANDRA, O. Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation. **Physiological Genomics**, v. 39, n. 1, p. 14-27, 2009.

MANSOURI-ATTIA, N.; OLIVEIRA, L. J.; FORDE, N.; FAHEY, A. G.; BROWNE, J. A.; ROCHE, J. F.; SANDRA, O.; REINAUD, P.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Pivotal role for monocytes/macrophages and dendritic cells in maternal immune response to the developing embryo in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 5, p. 123, 2012.

MCVAY, L. D.; JASWAL, S. S.; KENNEDY, C.; HAYDAY, A.; CARDING, S. R. The generation of human gammadelta T cell repertoires during fetal development. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 12, p. 5851-5860, 1998.

MEEUSEN, E. N.; FOX, A.; BRANDON, M.; LEE, C. S. Activation of uterine intraepithelial $\gamma\delta$ T cell receptor-positive lymphocytes during pregnancy. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 5, p. 1112-1117, 1993.

MEGGYES, M.; MIKO, E.; POLGAR, B.; BOGAR, B.; FARKAS, B.; ILLES, Z.; SZEREDAY, L. Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8⁺ T cells throughout pregnancy: TIM-3/galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92371, 2014.

MICHIE, A. M.; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C. Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection. **Seminars in Immunology**, v. 14, n. 5, p. 311-323, 2002.

MIKHAYLOVA, V. A.; ONOKHINA, Y. C.; OVCHINNIKOVA, O. M.; MAKSIMOVA, I. M.; ARZHANOVA, O. N.; SOKOLOV, D. I.; SELKOV, S. A. Phenotypical characteristics of peripheral blood monocytes in normal pregnancy and gestosis. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 154, n. 4, p. 471-475, 2013.

MINCHEVA-NILSSON, L.; HAMMARSTROM, S.; HAMMARSTROM, M. L. Human decidual leukocytes from early pregnancy contain high numbers of gamma delta+ cells and show selective down-regulation of alloreactivity. **Journal of Immunology**, v. 149, n. 6, p. 2203-2211, 1992.

MINCHEVA-NILSSON, L.; BARANOV, V.; YEUNG, M. M.; HAMMARSTROM, S.; HAMMARSTROM, M. L. Immunomorphologic studies of human decidua-associated lymphoid cells in normal early pregnancy. **Journal of Immunology**, v. 152, n. 4, p. 2020-2032, 1994.

MINCHEVA-NILSSON, L.; KLING, M.; HAMMARSTROM, S.; NAGAEVA, O.; SUNDQVIST, K. G.; HAMMARSTROM, M. L.; BARANOV, V. Gamma delta T cells of human early pregnancy decidua: evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation. **Journal of Immunology**, v. 159, n. 7, p. 3266-3277, 1997.

MINCHEVA-NILSSON, L.; NAGAEVA, O.; SUNDQVIST, K. G.; HAMMARSTRÖM, M. L.; HAMMARSTRÖM, S.; BARANOV, V. $\gamma\delta$ T cells of human early pregnancy decidua: evidence for cytotoxic potency. **International Immunology**, v. 12, n. 5, p. 585-596, 2000.

MINCHEVA-NILSSON, L. Pregnancy and gamma/delta T cells: taking on the hard questions. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n., p. 120, 2003.

MIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y.; IWANAGA, T. Reduced phagocytotic activity of macrophages in the bovine retained placenta. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 1, p. 53-56, 2002.

MJÖSBERG, J.; BERG, G.; ERNERUDH, J.; EKERFELT, C. CD4+ CD25+ regulatory T cells in human pregnancy: development of a Treg-MLC-ELISPOT suppression assay and indications of paternal specific Tregs. **Immunology**, v. 120, n. 4, p. 456-466, 2007.

MOLVAREC, A.; CZEGLE, I.; SZIJÁRTÓ, J.; RIGÓ JR, J. Increased circulating interleukin-17 levels in preeclampsia. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 112, n., p. 53-57, 2015.

MOR, G.; STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L.; ABRAHAMS, V. M. Macrophage-trophoblast interactions. **Methods in Molecular Medicine**, v. 122, n., p. 149-163, 2006.

MORELI, J. M.; RUOCCO, A. M. C.; VERNINI, J. M.; RUDGE, M. V. C.; CALDERON, I. M. P. Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Pregnancy: Aspects of Interest in Clinical Obstetrics. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, v. 2012, n., p. 5, 2012.

MORITA, C. T.; VERMA, S.; APARICIO, P.; MARTINEZ, C.; SPITS, H.; BRENNER, M. B. Functionally distinct subsets of human gamma/delta T cells. **European Journal of Immunology**, v. 21, n. 12, p. 2999-3007, 1991.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v. 17, n. 3, p. 138-146, 1996.

MUELLER-ECKHARDT, G.; MALLMANN, P.; NEPPERT, J.; LATTERMANN, A.; MELK, A.; HEINE, O.; PFEIFFER, R.; ZINGSEM, J.; DOMKE, N.; MOHR-PENNERT, A. Immunogenetic and serological investigations in nonpregnant and in pregnant women with a history of recurrent spontaneous abortions. German RSA/IVIG Study Group. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 27, n. 2, p. 95-109, 1994.

MUNSON, L.; WILHITE, A.; BOLTZ, V. F.; WILKINSON, J. E. Transforming growth factor beta in bovine placentas. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 4, p. 748-755, 1996.

NAGAEVA, O.; JONSSON, L.; MINCHEVA-NILSSON, L. Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadeltaT cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 48, n. 1, p. 9-17, 2002.

NAIR, R. R.; KHANNA, A.; SINGH, K. Association of Interleukin 1 beta (IL-1B) gene polymorphism with early pregnancy loss risk in the North Indian population. **International Journal of Immunogenetics**, v. 41, n. 1, p. 41-43, 2014.

NAKASHIMA, A.; ITO, M.; YONEDA, S.; SHIOZAKI, A.; HIDAKA, T.; SAITO, S. Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 2, p. 104-109, 2010.

NG, W. F.; DUGGAN, P. J.; PONCHEL, F.; MATARESE, G.; LOMBARDI, G.; EDWARDS, A. D.; ISAACS, J. D.; LECHLER, R. I. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2736-2744, 2001.

OHTA, T.; KOSHI, K.; USHIZAWA, K.; HOSOE, M.; TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, T.; KIZAKI, K.; HASHIZUME, K. Dynamics of CD3(+) T-cell Distribution Throughout the Estrous Cycle and Gestation in the Bovine Endometrium. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 6, p. 507-511, 2013.

OHTA, T.; KOSHI, K.; USHIZAWA, K.; HOSOE, M.; TAKAHASHI, T.; YAMAGUCHI, T.; KIZAKI, K.; HASHIZUME, K. Expression profiles of perforin, granzyme B and granulysin genes during the estrous cycle and gestation in the bovine endometrium. **Animal Science Journal**, v. 85, n. 7, p. 763-769, 2014.

OLIVEIRA, L. J.; HANSEN, P. J. Deviations in populations of peripheral blood mononuclear cells and endometrial macrophages in the cow during pregnancy. **Reproduction**, v. 136, n. 4, p. 481-490, 2008.

OLIVEIRA, L. J.; HANSEN, P. J. Phenotypic characterization of macrophages in the endometrium of the pregnant cow. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 62, n. 6, p. 418-426, 2009.

OLIVEIRA, L. J.; MANSOURI-ATTIA, N.; FAHEY, A. G.; BROWNE, J.; FORDE, N.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Characterization of the Th profile of the bovine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e75571, 2013.

PAIBOMESAI, M.; HUSSEY, B.; NINO-SOTO, M.; MALLARD, B. A. Effects of parturition and dexamethasone on DNA methylation patterns of IFN-gamma and IL-4

promoters in CD4⁺ T-lymphocytes of Holstein dairy cows. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 1, p. 54-62, 2013.

PICCINNI, M. P.; BELONI, L.; LIVI, C.; MAGGI, E.; SCARSELLI, G.; ROMAGNANI, S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. **Nature Medicine**, v. 4, n. 9, p. 1020-1024, 1998.

PICCINNI, M. P. Role of immune cells in pregnancy. **Autoimmunity**, v. 36, n. 1, p. 1-4, 2003.

PICCINNI, M. P.; LOMBARDELLI, L.; LOGIODICE, F.; KULLOLLI, O.; ROMAGNANI, S.; LE BOUTEILLER, P. T helper cell mediated-tolerance towards fetal allograft in successful pregnancy. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2015.

PICKUP, M.; NOVITSKIY, S.; MOSES, H. L. The roles of TGF[β] in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 11, p. 788-799, 2013.

POLGAR, B.; BARAKONYI, A.; XYNOS, I.; SZEKERES-BARTHO, J. The role of gamma/delta T cell receptor positive cells in pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 41, n. 4, p. 239-244, 1999.

PORRITT, H. E.; RUMFELT, L. L.; TABRIZIFARD, S.; SCHMITT, T. M.; ZUNIGA-PFLUCKER, J. C.; PETRIE, H. T. Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. **Immunity**, v. 20, n. 6, p. 735-745, 2004.

RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology Today**, v. 18, n. 10, p. 478-482, 1997.

RAGHUPATHY, R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. **Medical Principles and Practice**, v. 22 Suppl 1, n., p. 8-19, 2013.

RAJALA, P. J.; GROHN, Y. T. Effects of dystocia, retained placenta, and metritis on milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, p. 3172-3181, 1998.

RAULET, D. H. The structure, function, and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 7, n., p. 175-207, 1989.

ROBERTSON, S. A.; SEAMARK, R. F.; GUILBERT, L. J.; WEGMANN, T. G. The role of cytokines in gestation. **Critical Reviews in Immunology**, v. 14, n. 3-4, p. 239-292, 1994.

SAITO, S. Cytokine network at the feto-maternal interface. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 47, n. 2, p. 87-103, 2000.

SALAMONSEN, L. A.; DIMITRIADIS, E.; ROBB, L. Cytokines in implantation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 18, n. 3, p. 299-310, 2000.

SERIN, I. S.; OZCELIK, B.; BASBUG, M.; KILIC, H.; OKUR, D.; EREZ, R. Predictive value of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in preeclampsia. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 100, n. 2, p. 143-145, 2002.

SHIRASUNA, K.; NITTA, A.; SINEENARD, J.; SHIMIZU, T.; BOLLWEIN, H.; MIYAMOTO, A. Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. **Domest Anim Endocrinol**, v. 43, n. 2, p. 198-211, 2012.

SIEGEL, P. M.; MASSAGUE, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 11, p. 807-821, 2003.

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

SPIELMAN, J.; LEE, R. K.; PODACK, E. R. Perforin/Fas-ligand double deficiency is associated with macrophage expansion and severe pancreatitis. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 12, p. 7063-7070, 1998.

SPITS, H.; PALIARD, X.; VANDEKERCKHOVE, Y.; VAN VLASSELAER, P.; DE VRIES, J. E. Functional and phenotypic differences between CD4⁺ and CD4⁻ T cell receptor-gamma delta clones from peripheral blood. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 4, p. 1180-1188, 1991.

SUZUKI, T.; HIROMATSU, K.; ANDO, Y.; OKAMOTO, T.; TOMODA, Y.; YOSHIKAI, Y. Regulatory role of gamma delta T cells in uterine intraepithelial lymphocytes in maternal antifetal immune response. **Journal of Immunology**, v. 154, n. 9, p. 4476-4484, 1995.

SZEKERES-BARTHO, J.; BARAKONYI, A.; POLGAR, B.; PAR, G.; FAUST, Z.; PALKOVICS, T.; SZEREDAY, L. The role of gamma/delta T cells in progesterone-mediated immunomodulation during pregnancy: a review. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 42, n. 1, p. 44-48, 1999.

SZEKERES-BARTHO, J.; BARAKONYI, A.; MIKO, E.; POLGAR, B.; PALKOVICS, T. The role of gamma/delta T cells in the feto-maternal relationship. **Seminars in Immunology**, v. 13, n. 4, p. 229-233, 2001.

SZEREDAY, L.; MIKO, E.; MEGGYES, M.; BARAKONYI, A.; FARKAS, B.; VARNAGY, A.; BODIS, J.; LYNCH, L.; O'FARRELLY, C.; SZEKERES-BARTHO, J. Commitment of decidual haematopoietic progenitor cells in first trimester pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 1, p. 9-16, 2012.

TAGHON, T.; YUI, M. A.; PANT, R.; DIAMOND, R. A.; ROTHENBERG, E. V. Developmental and Molecular Characterization of Emerging β - and $\gamma\delta$ -Selected Pre-T Cells in the Adult Mouse Thymus. **Immunity**, v. 24, n. 1, p. 53-64, 2006.

TANAKA, S.; NAGAI, Y.; NOGUCHI, Y.; MIYAKE, M.; WATANABE, K.; OHWADA, S.; ASO, H.; YAMAGUCHI, T. Differential cytokine expression in T cell subsets from bovine peripheral blood. **Animal Science Journal**, v. 79, n. 5, p. 597-604, 2008.

TANG, M. X.; HU, X. H.; LIU, Z. Z.; KWAK-KIM, J.; LIAO, A. H. What are the roles of macrophages and monocytes in human pregnancy? **Journal of Reproductive Immunology**, v. 112, n., p. 73-80, 2015.

TAYLOR, P. A.; NOELLE, R. J.; BLAZAR, B. R. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. **Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 11, p. 1311-1318, 2001.

TEKIN, S.; HANSEN, P. J. Regulation of numbers of macrophages in the endometrium of the sheep by systemic effects of pregnancy, local presence of the conceptus, and progesterone. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 51, n. 1, p. 56-62, 2004.

THATCHER, W. W.; MEYER, M. D.; DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 49, n., p. 15-28, 1995.

TOTH, B.; HAUFE, T.; SCHOLZ, C.; KUHN, C.; FRIESE, K.; KARAMOUTI, M.; MAKRIGIANNAKIS, A.; JESCHKE, U. Placental Interleukin-15 Expression in Recurrent Miscarriage. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 6, p. 402-410, 2010.

TREVISI, E.; AMADORI, M.; COGROSSI, S.; RAZZUOLI, E.; BERTONI, G. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 695-704, 2012.

USDA. **USDA Foreign Agricultural Service**: secondary title.

<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>, 2015. 2015.

VAN KAMPEN, C.; MALLARD, B. A. Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 59, n. 1-2, p. 79-91, 1997.

VANTOUROUT, P.; HAYDAY, A. Six-of-the-best: unique contributions of [gamma][delta] T cells to immunology. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 2, p. 88-100, 2013.

- VON WOLFF, M.; THALER, C. J.; STROWITZKI, T.; BROOME, J.; STOLZ, W.; TABIBZADEH, S. Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 7, p. 627-634, 2000.
- WALIA, G. K.; MUKHOPADHYAY, R.; SARASWATHY, K. N.; PURI, M.; CHAHAL, S. M. S. Immuno-molecular etiology of recurrent pregnancy loss and the anthropological perspective. **International Journal of Human Genetics**, v. 8, n. 1/2, p. 227, 2008.
- WATHES, D. C.; LAMMING, G. E. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 49, n., p. 53-67, 1995.
- WEGMANN, T. G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T. R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? **Immunology Today**, v. 14, n. 7, p. 353-356, 1993.
- WILLIAMS, P. J.; SEARLE, R. F.; ROBSON, S. C.; INNES, B. A.; BULMER, J. N. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 82, n. 1, p. 24-31, 2009.
- XIONG, N.; RAULET, D. H. Development and selection of gammadelta T cells. **Immunological Reviews**, v. 215, n., p. 15-31, 2007.
- YANG, H.; QIU, L.; CHEN, G.; YE, Z.; LU, C.; LIN, Q. Proportional change of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in decidua and peripheral blood in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 3, p. 656-661, 2008.
- ZHANG, G. Transition dairy cows show blood alterations in innate immunity ahead of occurrence of retained placenta. In: 2014 ADSA-ASAS-CSAS Joint Annual Meeting, 2014aAsas, p.
- ZHANG, G. Identification of serum innate immunity reactants in transition dairy cows before clinical signs of laminitis. In: 2014 ADSA-ASAS-CSAS Joint Annual Meeting, 2014bAsas, p.

ZHANG, G.; HAILEMARIAM, D.; DERVISHI, E.; DENG, Q.; GOLDANSAZ, S. A.;
DUNN, S. M.; AMETAJ, B. N. Alterations of Innate Immunity Reactants in Transition Dairy
Cows before Clinical Signs of Lameness. **Animals**, v. 5, n. 3, p. 717-747, 2015.