

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

TALITA VIETA JUNQUEIRA

EXPRESSÃO GÊNICA DE FOXP3, INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE,
IL10 E CSF1 EM ÚTERO DE VACAS QUE RECEBERAM INFUSÃO
INTRAUTERINA DE ANTÍGENOS MATERNOS E PATERNOS NO
PERÍODO PERI-OVULATÓRIO.

UBERLÂNDIA

2015

TALITA VIETA JUNQUEIRA

EXPRESSÃO GÊNICA DE FOXP3, INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE,
IL10 E CSF1 EM ÚTERO DE VACAS QUE RECEBERAM INFUSÃO
INTRAUTERINA DE ANTÍGENOS MATERNO E PATERNO NO
PERÍODO PERI-OVULATÓRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

J95e
2015

Junqueira, Talita Vieta, 1988-
Expressão gênica de FOXP3, indoleamina 2,3 dioxigenase, IL10 e CSF1 em útero de vacas que receberam infusão intrauterina de antígenos maternos e paternos no período peri-ovulatório / Talita Vieta Junqueira. - 2015.
77 f. : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Bovino - Gestação - Aspectos imunológicos - Teses. 3. Bovino - Imunologia - Teses. 4. Sêmen - Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 581

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Uberlândia,

instituição que proporcionou minha graduação e pós-graduação e o contato com professores exemplares que me guiaram pelo fascinante caminho da pesquisa científica e da carreira acadêmica e que, através do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) e da Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas (PPGBC), possibilitaram a realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),

que com o apoio financeiro proporcionou as condições materiais necessárias para a realização desse trabalho.

À Marilene Simarro Fagundes,

por disponibilizar o espaço e as fêmeas bovinas e touros de sua propriedade necessários para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti,

por me orientar durante esses 2 anos, por todo o conhecimento compartilhado, pela autonomia cedida, pelas decisões tomadas e pela disponibilização de todas as condições necessárias para o desenvolvimento desse projeto. Agradeço imensamente pela oportunidade oferecida e pela confiança depositada nesse trabalho que certamente contribuíram para o meu conhecimento e desenvolvimento científico.

Ao Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva,

que foi o responsável por orientar toda a parte referente ao PCR em tempo real, que contribuiu desde a definição dos alvos desse estudo até a análise dos resultados. Agradeço e muito, não só pela participação ativa neste trabalho e pela disposição em sempre ajudar, mas também pelos conhecimentos compartilhados, conselhos dados e confiança depositada.

Ao Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut,

e seus alunos: Amanda, Layane, Paula, Melissa e Felipe, que contribuíram e muito para a realização de todo o trabalho árduo realizado em campo durante o manejo das fêmeas bovinas, sincronização do cio, estimulação imunológica e coleta das biópsias. Agradeço pela orientação e conhecimento compartilhado.

À Profa. Dra. Ana Paula de Lima Oliveira,

por contribuir com seu tempo e conhecimento para a realização da separação das células mononucleares do sangue periférico bovinas (PBMCs) necessárias para a realização desse trabalho. Além disso, por demonstrar tamanha disposição em nos ajudar e nos aconselhar.

À Profa. Dra. Belissa de Freitas Barbosa,

que enriqueceu este trabalho com seus conselhos e conhecimentos quanto á coleta e armazenamento das biópsias uterinas, e que sempre se mostrou disposta em ajudar.

À Dra. Aline Costa de Lucio,

e toda sua família, agradeço imensamente por amparar e possibilitar condições para a realização dessa pesquisa.

Ao laboratório de Biologia da Reprodução,

e todos os seus integrantes pela ajuda fornecida ou mesmo pela companhia, amenizando o cansaço dos experimentos diários. Em especial, agradeço a Nádia, companheira de trabalho, e a Sara pela companhia, conhecimentos compartilhados e por toda ajuda ao longo dessa trajetória. Ao Rodrigo e a Gleysi, alunos da graduação da Medicina Veterinária do prof. Beletti, que nos acompanharam e nos ajudaram muito durante todo o trabalho em campo. Aos integrantes do laboratório do Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva: Felipe, Daniele, Bruna, Bruninha, Mari, Isadora e Lívia, pela companhia e pelos ensinamentos compartilhados.

Outros laboratórios,

aos laboratórios de imunologia, genética e histologia que contribuíram com a estrutura e equipamentos necessários para a realização desse trabalho, assim como, agradeço aos técnicos e responsáveis pelos respectivos laboratórios.

Aos grandes amigos,

que, de uma maneira indireta, com palavras de incentivo, admiração e companhia, também ajudaram, fazendo com que esse trabalho fosse desenvolvido de uma forma mais amena e prazerosa, os meus sinceros agradecimentos.

À minha família,

principalmente a meus pais, Fátima e Gilmar, que sempre me apoiaram, deram condições e incentivaram meus estudos. Aos meus irmãos, Leonardo e Guilherme, meus companheiros e espelhos de sucesso. Ao meu marido, Marcelo, por todo apoio dado ao longo desse período, pelo companheirismo, paciência, compreensão, por acreditar no meu potencial e por todo o incentivo, essencial para a finalização dessa etapa.

RESUMO

A maioria das perdas gestacionais em bovinos acontece no início da gestação, particularmente entre os dias 7 e 16, período no qual o embrião é totalmente dependente do ambiente uterino para sobreviver e iniciar seu crescimento pré-implantação. Durante esse período, a mortalidade embrionária após transferência de embriões produzidos *in vitro* (TE-PIV) ou *in vivo* (TE-OM) é em média quase duas vezes mais elevada do que aquela derivada de embriões originados de monta natural ou inseminação artificial (IA). A sensibilização da receptora contra as moléculas MHC paternas e maternas do embrião alogênico pode ser uma das causas das altas taxas de perdas gestacionais observadas após TE. Estudos realizados em humanos e em várias espécies têm demonstrado que a sensibilização com antígenos do conceito pode ser uma maneira útil de afetar o desempenho reprodutivo facilitando o reconhecimento e a aceitação materna do embrião alogênico através da indução de citocinas e células imunorregulatórias no microambiente uterino. Nesse sentido, o presente estudo teve como foco principal determinar se a administração simultânea ou isolada de antígenos paterno e materno no útero de fêmeas bovinas receptoras de embrião PIV, no dia do estro, aumenta a expressão de genes que podem facilitar o reconhecimento e desenvolvimento do embrião alogênico durante o início da gestação. Para isto, foram utilizadas 45 vacas cruzadas divididas em 4 tratamentos: T0: controle; T1: Sêmen; T2: PBMCs e T3: PBMCs+Sêmen. As fêmeas bovinas foram sincronizadas ao estro e receberam os antígenos no corpo uterino no dia do cio (D0). Biópsias uterinas foram coletadas *in vivo* no D0, para controle, e 7 (D7) e 14 (D14) dias após o cio e a administração dos antígenos, para avaliar o efeito do tratamento no ambiente uterino da receptora no momento em que ocorreria o procedimento de anovulação em TE-PIV e durante o período no qual o embrião bovino já teria iniciado seu crescimento pré-implantação, respectivamente. A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real e transcritos de FOXP3, IDO, IL-10 e CSF-1 foram detectados em todas as amostras de RNA extraídas das biópsias uterinas. A análise semiquantitativa da expressão gênica relativa entre os grupos controle e tratado mostrou que nenhum dos tratamentos promoveu aumento significativo na expressão desses genes. Além disso, no D14 todos os tratamentos promoveram uma queda na quantidade de transcritos de CSF-1 e, ainda, o tratamento com ambos os antígenos também promoveu uma queda na abundância de transcritos de IL-10. Em conclusão, a administração isolada ou simultânea de ambos os antígenos no útero de vacas receptoras de embrião PIV parece não propiciar aumento da tolerância materna aos aloantígenos do embrião nem condições favoráveis a seu crescimento e desenvolvimento pré-implantação, pelo menos no que se refere ao efeito mediado por FOXP3, IDO, IL-10 e CSF-1 no D7 e D14 do ciclo estral.

Palavras-chave: Indução Imunológica. PBMCs. Sêmen.

ABSTRACT

In cattles, most of pregnancy losses occurs at the beginning of gestation, notably from the 7th to the 16th day of the cycle, a period in which, the embryo depends entirely on the uterine environment to survive and to start their preimplantation growth. During this period, the embryonic death after embryo transfers performed *in vitro* (TE-IVP) or *in vivo* (TE-OM) is on average nearly twice as high as that produced by natural mating or artificial insemination (AI). The recipient sensitization against the paternal and maternal MHC molecules of allogeneic embryo might be one of the causes of high rates of pregnancy loss observed after TE. Studies in humans and in various species have pointed that the sensitization with conceptus antigens may affect the reproductive performance facilitating the recognition and the maternal acceptance of allogeneic embryo through induction of cytokine and immunoregulatory cells in the the uterine microenvironment. The purpose of this study is to determine whether simultaneous or separate administration of paternal and maternal antigens in the uterus of the cows embryo recipientes, during the estrus, increases the expression of genes which can facilitate recognition and development of allogeneic embryos during early pregnancy. Forty-five crossbred cows were evaluated. The animals were divided in four treatments: T0: control; T1: Semen; T2: PBMCs and T3: PBMCs+Semen. The cows were estrus synchronized and received antigens in the uterine body on the estrus day. Uterine biopsies were collected *in vivo* on D0 for control, and after seven (D7) and fourteen (D14) days after the estrus and administration of antigens in order to evaluate the treatment effect on the uterine environment of the receiving at the moment of the anovulation procedure would occur in TE-IVP, and during the period in which the bovine embryo would have their preimplantation growth, respectively. The gene expression was evaluated in real time PCR, and then transcribed from FOXP3, IDO, IL-10 and CSF-1 were detected in all RNA samples extracted from uterine biopsies. Semiquantitative analyses of relative gene expression among the control and the treat groups demonstrated that none of the treatments significantly increased those gene expressions. Furthermore, at D14 all the treatments led to a decline in amount CSF-1 transcripts and, further, treatment with both antigens also to a drop in the abundance of IL-10 transcripts. In conclusion, the isolated or simultaneous antigens administration in the in the uterus of IVP embryo recipient cows seems not to increase the maternal tolerance to alloantigens embryo nor benefit conditions for their growth and preimplantation development, at least with regard to the effect mediated by FOXP3, IDO, IL-10 and CSF-1 on D7 and D14 in the estrous cycle.

Keywords: Immunologic Induction. PBMCs. Semen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Diagrama esquemático ilustrando as mudanças na expressão do MHC-I no embrião bovino em pré-implantação, elongação e no corioalantóide.	26
FIGURA 2	Coleta do antígeno paterno.	44
FIGURA 3	Coleta do sangue periférico de uma fêmea bovina através da veia mamária com o auxílio de uma bolsa de transfusão sanguínea.	46
FIGURA 4	Separação das PBMCs bovinas do sangue periférico por meio do gradiente Ficoll-Paque TM PLUS para a obtenção do antígeno materno.	46
FIGURA 5	Diagrama esquemático ilustrando o protocolo de sincronização do cio utilizado nas vacas selecionadas para o experimento. Fotografias retiradas durante a realização desse protocolo e durante a identificação do cio no D10 do protocolo através da visualização de muco vaginal com o auxílio da técnica da mão enluvada na fazenda Represa no município de Monte Alegre, MG.	47
FIGURA 6	Administração dos antígenos no corpo uterino das vacas no dia do cio com o auxílio de uma sonda de infusão intrauterina bovina.	48
FIGURA 7	Procedimento de coleta das biópsias uterinas bovinas utilizadas no trabalho.	50
FIGURA 8	Preparação, acondicionamento e estocagem das biópsias uterinas.	50
FIGURA 9	Quantificação relativa de transcritos de FOXP3 em útero de vacas sem tratamento no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro.	56
FIGURA 10	Quantificação relativa de transcritos de FOXP3 em útero de vacas controle e tratadas, 7 e 14 dias após o tratamento com antígeno materno, com antígeno paterno e com ambos os antígenos.	56
FIGURA 11	Quantificação relativa de transcritos deIDO em útero de vacas sem tratamento no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro.	57
FIGURA 12	Quantificação relativa de transcritos deIDO em útero de vacas controle e tratadas, 7 e 14 dias após o tratamento com antígeno materno, com antígeno paterno e com ambos os antígenos.	58

FIGURA 13	Quantificação relativa de transcritos de IL-10 em útero de vacas sem tratamento no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro.	59
FIGURA 14	Quantificação relativa de transcritos de IL-10 em útero de vacas controle e tratadas, 7 e 14 dias após o tratamento com antígeno materno, com antígeno paterno e com ambos os antígenos.	59
FIGURA 15	Quantificação relativa de transcritos de CSF-1 em útero de vacas sem tratamento no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro.	61
FIGURA 16	Quantificação relativa de transcritos de CSF-1 em útero de vacas controle e tratadas, 7 e 14 dias após o tratamento com antígeno materno, com antígeno paterno e com ambos os antígenos.	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Delineamento da coleta das biópsias uterinas por dia, tratamento e quantidade de fêmeas bovinas.	49
TABELA 2	Sequência dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> com suas respectivas referências e eficiências.	51

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

µl	Microlitro
BNC	Células binucleadas
CCL19	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 19</i> ou Quimiocina ligante 19
CCR7	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 7</i> ou Receptor de quimiocina 7
CD25⁺	<i>Cluster of differentiation 25</i> ou grupamento de diferenciação 25
CD4⁺	<i>Cluster of differentiation 4</i> ou grupamento de diferenciação 4
CD8⁺	<i>Cluster of differentiation 8</i> ou grupamento de diferenciação 8
CL	Corpo lúteo
CPDA-1	<i>Citrate phosphate dextrose-adenine 1</i>
CSF-1	Fator estimulador de colônias 1
CSF-1R	Receptor do fator estimulador de colônias 1
CSF-2	Fator estimulador de colônias 2
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DC	Células dendríticas
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FoxP3	Fator de transcrição <i>Forkhead box P3</i>
Há	Hectare
IA	Inseminação artificial
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-1α	Interleucina 1α
IL-1β	Interleucina 1β
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-8	Interleucina 8
INFs	Interferons
INFγ	Interferon gama
INF-τ	Interferon-tau
Kg	Quilograma
LIF	Fator inibidor de leucemia
M-CSF	Fator de crescimento estimulador de macrófagos
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MHC-I	Complexo de histocompatibilidade principal de classe 1
MHC-II	Complexo de histocompatibilidade principal de classe 2

MI	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NK	Células <i>Natural Killers</i> ou Células matadoras naturais
Pb	Pares de bases
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2_α	Prostaglandina F2 _α
PIV	Produzido <i>in vitro</i>
Rpm	Rotações por minuto
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real
sCD8	Forma solúvel da ectoenzima <i>ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 1</i>
SOD2	<i>Superoxide dismutase 2</i> , mitochondrial
SUZ12	Proteína Policomb SUZ 12 ou <i>Supressor of Zeste 12</i>
T0	Tratamento controle (sem tratamento)
T1	Tratamento com antígeno paterno
T2	Tratamento com antígeno materno
T3	Tratamento com antígenos paterno e materno
tDC	Células dendríticas tolerogênicas
TE	Transferência de embriões
TE-OM	Transferência de embriões advindos de ovulações múltiplas
TE-PIV	Transferência de embriões produzidos <i>in vitro</i>
TGFβ	Fator de crescimento tumoral β
Th1	Células T <i>helper</i> tipo 1 ou Células T auxiliaadoras tipo 1
Th17	Células T <i>helper</i> tipo 17 ou Células T auxiliaadoras tipo 17
Th2	Células T <i>helper</i> tipo 2 ou Células T auxiliaadoras tipo 2
Treg	Células T regulatórias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Importância das tecnologias de produção e transferência de embriões bovinos	16
2.2 Perdas embrionárias após TE-PIV	17
2.3 A gestação em bovinos	20
2.4 Imunologia no início da gestação	21
2.4.1 Reconhecimento materno do concepto bovino.....	24
2.4.2 Imunomodulação: mudanças no status imune endometrial durante a gestação	27
2.4.3 O papel das células Treg, da enzima IDO e das citocinas IL-10 e CSF-1	30
2.4.3.1 O papel das células T regulatórias (Treg)	30
2.4.3.2 O papel da enzima indoleamina 2,3 dioxinogenase (IDO).....	32
2.4.3.3 O papel da interleucina 10 (IL-10)	33
2.4.3.4 O papel do fator estimulador de colônias 1 (CSF-1).....	34
2.5 Administração intrauterina de sêmen e PBMCS afetando o desempenho reprodutivo ..	38
3 OBJETIVOS	42
3.1 Geral.....	42
3.2 Específicos	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Animais	43
4.2 Coleta, preparação e armazenamento dos antígenos.....	43
4.2.1 Antígeno paterno	43
4.2.2 Antígeno materno	44
4.3 Estimulação imunológica das receptoras	47
4.3.1 Sincronização do estro	47
4.3.2 Administração intrauterina dos antígenos nas receptoras	47
4.4 Biópsia uterina <i>in vivo</i>	48
4.5 RT-qPCR	51
4.5.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers).....	51
4.5.2 Extração de RNA	52
4.5.3 Transcrição reversa	52

4.5.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR	53
4.6 Estatística	54
5 RESULTADOS	55
5.1 Análise Molecular	55
5.1.1 Quantificação relativa de transcritos de FOXP3	55
5.1.2 Quantificação relativa de transcritos de IDO.....	57
5.1.3 Quantificação relativa de transcritos de IL-10.....	58
5.1.4 Quantificação relativa de transcritos de CSF-1	60
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética.....	75
ANEXO B – Autorização da proprietária para o uso dos animais da fazenda Represa no município de Monte Alegre, MG e da fazenda Bom Jardim no município de Uberlândia, MG	76

1 INTRODUÇÃO

Considerando a importância da utilização e desenvolvimento de biotécnicas na reprodução animal para o aumento da eficiência produtiva, a implementação de tecnologias na produção e transferência de embriões bovinos se destaca e é fortemente impulsionada pela necessidade da indústria de criação em aumentar o melhoramento genético do gado de corte e leite (MERTON et al., 2003). Dentro deste contexto, a transferência de embriões produzidos *in vitro* (TE-PIV) é uma técnica que se sobressai por permitir um melhor aproveitamento da fêmea e do sêmen de alto valor comercial com maior produção de embriões por unidade de tempo quando comparada à transferência de embriões advindos de ovulações múltiplas (TE-OM), inseminação artificial (IA) e monta natural, e consequentemente, com maior obtenção de descendentes em um curto período de tempo, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o melhoramento genético animal (FABER et al., 2003; MERTON et al., 2003; HANSEN; BLOCK, 2004; PENITENTE FILHO; OLIVEIRA; TORRES, 2012).

Apesar das vantagens dos programas de TE-PIV, as perdas gestacionais após transferência de embriões (TE) vêm sendo altas, em torno de 40% a 60%, principalmente no início da gestação (DUNNE; DISKIN; SREENAN, 2000; BERG et al., 2010; FERREIRA, 2010), e muitos dos problemas são relacionados com as receptoras, ou seja, com um ambiente uterino inadequado para o estabelecimento da gestação (IDETA et al., 2010a; ANDRADE et al., 2012). Em bovinos, vem sendo demonstrado que a maioria das perdas embrionárias acontece nas duas primeiras semanas de gestação, em específico entre os dias 7 e 16 (DUNNE et al., 2000; BERG et al., 2010; KIMURA; MATSUYAMA, 2014). Neste período, o embrião eclodido permanece livre e flutuante no lúmen uterino, sendo totalmente dependente do ambiente uterino para sobreviver e iniciar seu crescimento pré-implantação (FERREIRA, 2010; MINTEN et al., 2013; KIMURA; MATSUYAMA, 2014). Visto que a mortalidade do embrião produzido *in vitro* (PIV) durante essa segunda semana de gestação é quase duas vezes mais elevada do que aquela derivada de embriões produzidos *in vivo* após IA (BERG et al., 2010) e sabendo que o embrião PIV é totalmente alogênico à sua receptora e, consequentemente, mais susceptível às teorias de rejeição imunológica, estas observações indicam que a perda gestacional em receptoras pode ser atribuída principalmente a um comprometimento na interação entre o útero materno e o embrião em pré-implantação, levando a uma falha no reconhecimento materno da gestação e/ou a uma intolerância materna

aos antígenos do embrião (KANZAKI et al., 1995; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2004; IDETA et al., 2010a, 2010b; MINTEN et al., 2013).

Durante o início da gestação, as interações entre as células e moléculas do sistema imune da mãe e do embrião são de extrema importância para a modulação da resposta imune materna, podendo ser tanto benéficas quanto prejudiciais. Para que ocorra a gestação é necessário o alorreconhecimento do embrião e a criação de um ambiente intrauterino no qual o tecido materno e o trofoblasto secretam moléculas inibitórias de linfócitos T alorreativos e que estabeleçam mudanças na atividade funcional de populações específicas de linfócitos maternos que levam à tolerância transitória aos aloantígenos do conceito e liberação de citocinas que estimulam o crescimento e desenvolvimento do embrião, caracterizando um estado de tolerância materno-fetal e permitindo a evolução da gestação (BILLINGHAM; BRENT; MEDAWAR, 1953; HANSEN, 1997; DA SILVEIRA, 2006; HANSEN, 2011). A inativação do sistema imune materno ou qualquer desvio na resposta imunorregulatória favorável ao estabelecimento da gestação pode levar ao reconhecimento materno do embrião como um corpo estranho e causar sua rejeição (DA SILVEIRA, 2006; SANGUANSERMSRI; PONGCHAROEN, 2008; IDETA et al., 2010a; HANSEN, 2011).

Em humanos, o fenótipo e a função das células imunes maternas, bem como o perfil de citocinas induzidas na interface materno-fetal, afetam o processo gestacional e subsequentemente, o resultado da gestação (SANGUANSERMSRI; PONGCHAROEN, 2008). Vários são os fatores envolvidos nessa complexa rede imunorregulatória para a tolerância materno-fetal e regulação do desenvolvimento embrionário e da placenta durante a gestação. Dentre eles se destacam a atividade das células Treg, que desempenham papel fundamental na imunorregulação antígeno-específica e indução da tolerância materno-fetal (SAITO; SASAKI; SAKAI, 2005; DA SILVEIRA, 2006; SAITO et al., 2010), a atividade da enzima IDO, por desempenhar importante papel na inibição da imunoestimulação convencional através da depleção do triptofano (DA SILVEIRA, 2006; DELLÊ; NORONHA, 2009), e a produção das citocinas IL-10 e CSF-1 no ambiente gestacional, que são importantes moduladores da imunotolerância (PESTKA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2013) e crescimento e desenvolvimento do embrião bovino (BEAUCHAMP; CROY, 1991; OSHIMA, K. et al., 2003; OSHIMA, KAZUNAGA et al., 2008), respectivamente.

A sensibilização de fêmeas bovinas com antígenos do conceito pode ser uma maneira útil de afetar o desempenho reprodutivo facilitando a aceitação materna do embrião alogênico (HANSEN, 1997). Existem fortes evidências de que a exposição ao sêmen e a outros componentes do esperma causem grandes mudanças na função imune da fêmea antes da

implantação do embrião que podem promover um estado de tolerância funcional aos aloantígenos paterno com implicações diretas no sucesso gestacional (ROBERTSON et al., 2002; DA SILVEIRA, 2006; ROBERTSON et al., 2009; CLARK, 2011). Estudos realizados em humanos (BELLINGE et al., 1986; CRAWFORD et al., 2014), camundongos (CLARK, 2011; KIM et al., 2015) e suínos (O'LEARY et al., 2004) têm demonstrado esse efeito do sêmen no aumento da receptividade endometrial favorável ao processo de desenvolvimento e implantação do embrião, uma vez que os efeitos do fluído seminal provavelmente são mediados pela expansão do *pool* de células Treg induzidas pelas diversas moléculas imunorregulatórias presentes no plasma seminal (ROBERTSON et al., 2009; CRAWFORD et al., 2014; KIM et al., 2015). Além da estimulação imunológica decorrente do sêmen, existem estudos que promovem essa estimulação através da administração intrauterina de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Pesquisas realizadas em humanos (YOSHIOKA et al., 2006; OKITSU et al., 2011) e bovinos (IDETA et al., 2010a, 2010b) demonstram que a administração intrauterina de PBMCs autólogas antes da TE aumenta a taxa de sucesso gestacional. Os efeitos desse tratamento podem ser relacionados a várias citocinas e quimiocinas produzidas pelas PBMCs que desempenham um papel positivo no útero aumentando a receptividade do endométrio e melhorando o desenvolvimento do embrião (IDETA et al., 2010a, 2010b; HANSEN, 2011).

Portanto, como citado anteriormente, a estimulação imunológica com antígenos maternos e paternos tem mostrado resultados promissores em experimentos com várias espécies e em humanos no aumento da taxa de gestação. Porém, não existe nenhum trabalho publicado analisando os efeitos imunológicos a antígenos paternos e maternos administrados simultaneamente em um mesmo indivíduo. Em vista disso, esse trabalho teve como intuito final melhorar a tolerância da receptora bovina ao embrião alogênico através da indução de citocinas e células imunorregulatórias no microambiente uterino local, as quais podem facilitar o reconhecimento e desenvolvimento do embrião alogênico durante o início da gestação por meio da exposição prévia da receptora a antígenos materno e paterno, ou seja, a PBMCs provenientes da doadora do ovócito e ao sêmen utilizado na fertilização dos ovócitos, e assim, constituir um método potencial para melhorar o índice de gestação e nascimento de bezerros provenientes de PIV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância das tecnologias de produção e transferência de embriões bovinos

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas na reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva (PENITENTE FILHO; OLIVEIRA; TORRES, 2012). Nesse sentido, especialmente no que se refere aos ruminantes domésticos, várias biotecnologias vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva, maximizando a produção de animais geneticamente superiores e visando o aproveitamento deste material genético para obtenção do maior número de descendentes em um curto período de tempo, acelerando o melhoramento genético animal e diminuindo o intervalo entre gerações (HANSEN; BLOCK, 2004; ANDRADE et al., 2012).

Dentro deste contexto, a implementação de tecnologias na produção e transferência de embriões bovinos se destaca e é fortemente impulsionada pela necessidade da indústria de criação em aumentar o melhoramento genético do gado de corte e leite (MERTON et al., 2003), assim como de diminuir o intervalo entre as gerações (HANSEN; BLOCK, 2004; ANDRADE et al., 2012), sendo, portanto, utilizada para reproduzir fêmeas valiosas e produzir machos de alto valor genético (IDETA et al., 2010b).

Normalmente, ao longo de cada ciclo estral bovino, apenas um ovócito se desenvolve até a ovulação. Com o advento das técnicas de produção de embriões, numerosos ovócitos que teriam se degenerado podem se tornar embriões (MERTON et al., 2003). Portanto, essas técnicas possibilitam que uma única fêmea bovina possa produzir um número de descendente muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva com a monta natural, visto que a gestação bovina tem a duração de aproximadamente 9 meses.

Os embriões bovinos podem ser produzidos por meio de biotécnicas realizadas tanto *in vivo* como *in vitro*. A produção *in vivo* de embriões bovinos ou transferência de embriões advindos de ovulações múltiplas (TE-OM) consiste na indução hormonal de superovulações em fêmeas bovinas doadoras com subsequente inseminação e lavagem uterina para a coleta e transferência dos embriões de 6 a 8 dias após o procedimento (PENITENTE FILHO; OLIVEIRA; TORRES, 2012). A produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV) ou transferência de embriões produzidos *in vitro* (TE-PIV) envolve a coleta *in vivo* de ovócitos imaturos de fêmeas bovinas doadoras (FERREIRA, 2010) ou de ovários de abatedouros (HANSEN; BLOCK, 2004), com todo o restante do processo de maturação e fertilização dos

ovócitos e cultivo dos embriões sendo conduzido em laboratório até que o embrião produzido, principalmente no estágio de blastocisto, seja inovulado em uma vaca receptora ou criopreservado para futura transferência (FERREIRA, 2010).

A inovulação ou transferência de embriões (TE) é o procedimento pelo qual o embrião produzido é depositado no terço médio-final do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (CL) da receptora sincronizada ao embrião (ANDRADE et al., 2012; PENITENTE FILHO; OLIVEIRA; TORRES, 2012). A sincronia entre o ambiente uterino da receptora e o embrião é essencial para maximizar a sobrevivência embrionária (ANDRADE et al., 2012). Na maioria das vezes, o embrião é transferido para vacas receptoras no estágio de blastocisto, pois é o estágio no qual se tem maior probabilidade de sobrevivência após TE (HANSEN; BLOCK, 2004) e é o estágio no qual o embrião já se encontraria livre na cavidade uterina em uma gestação advinda de monta natural. A TE é realizada de 7 ± 1 dias após o cio (PENITENTE FILHO; OLIVEIRA; TORRES, 2012; TEIXEIRA et al., 2014), correspondendo à idade do embrião no estágio de blastocisto na cavidade uterina.

A TE-PIV tem sido utilizada como um método alternativo ou complementar à TE-OM (TEIXEIRA et al., 2014), uma vez que essa técnica permite a coleta de ovócitos várias vezes ao ano sem levar em consideração o estágio do ciclo estral da doadora (FERREIRA, 2010), podendo ser realizada também em vacas no primeiro trimestre da gestação e em intervalos tão frequentes quanto 2 vezes por semana, com um campo alto de ovócitos competentes (HANSEN; BLOCK, 2004). Portanto, a TE-PIV se destaca por permitir um melhor aproveitamento da fêmea e do sêmen de alto valor comercial com maior produção de embriões por unidade de tempo quando comparada a TE-OM (FABER et al., 2003; MERTON et al., 2003; HANSEN; BLOCK, 2004; PENITENTE FILHO; OLIVEIRA; TORRES, 2012), visto que o tratamento superovulatório só é eficiente no início da onda folicular e só pode ser realizado repetidamente a cada 30-40 dias em vacas não destinadas à prenhez (HANSEN; BLOCK, 2004; PENITENTE FILHO; OLIVEIRA; TORRES, 2012).

2.2 Perdas embrionárias após transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro* (TE-PIV)

A sobrevivência embrionária e fetal é um fator decisivo que afeta a produção e a eficiência econômica em todos os sistemas de produção de carne e leite de ruminantes (HANSEN; BLOCK, 2004; DISKIN; MORRIS, 2008; BERG et al., 2010). Para a indústria do

gado, a perda gestacional impacta negativamente no nascimento de bezerros, progresso genético e ganho financeiro (DUNNE et al., 2000).

Apesar das vantagens dos programas de TE-PIV para a bovinocultura, as perdas gestacionais limitam a eficiência da produção em cada etapa do processo, incluindo as perdas durante o recrutamento de oócitos de qualidade, falhas na fertilização *in vitro* (FIV), baixo desenvolvimento dos embriões a um estágio adequado para TE, abortos e mortes pós-natal (HANSEN; BLOCK, 2004). Dados mostram que a taxa de sobrevivência média para partos seguidos de TE-PIV varia entre 30% e 40% (MCMILLAN, 1998; HANSEN; BLOCK, 2004), sendo as taxas mais altas relatadas entre 60% e 70% (HASLER, 2001).

Perdas gestacionais após TE-PIV vêm sendo altas tanto no início da gestação, período de embrião e organogênese, como após os 45 dias de gestação, período de feto e desenvolvimento (FERREIRA, 2010). No entanto, a maioria dessas perdas ocorre durante o período embrionário (DUNNE et al., 2000; BERG et al., 2010; FERREIRA, 2010), uma vez que as primeiras semanas de desenvolvimento são críticas para o sucesso gestacional, pois são nelas que ocorrem, entre outros eventos, o rompimento do blastocisto da zona pelúcida, o reconhecimento materno da gestação e os processos de implantação e placentação (BERG et al., 2010; FERREIRA, 2010; MINTEN et al., 2013). A elevada taxa de mortalidade embrionária nas primeiras semanas de gestação continua sendo um dos principais problemas reprodutivos e pode ocorrer, principalmente, devido a um comprometimento na interação entre o útero materno e o conceito (KANZAKI et al., 1995; IDETA et al., 2010b).

Tem sido demonstrado que a maioria das perdas embrionárias em bovinos, de 70% a 80% (MINTEN et al., 2013), acontece entre os dias 7 e 16 de gestação (ROCHE; BOLANDL; MCGEADY, 1981; DUNNE et al., 2000; BERG et al., 2010; MINTEN et al., 2013; KIMURA; MATSUYAMA, 2014), período entre o qual ocorre a eclosão do blastocisto da zona pelúcida e início dos processos de crescimento pré-implantação e reconhecimento materno da gestação (MINTEN et al., 2013). O blastocisto bovino após eclodir da zona pelúcida permanece livre e flutuante no lúmen uterino, sendo totalmente dependente do ambiente uterino para sobreviver e realizar seu crescimento pré-implantação (FERREIRA, 2010; KIMURA; MATSUYAMA, 2014). Dunne e pesquisadores (2000) demonstraram que a incidência de perdas embrionárias avaliadas no dia 14 após inseminação artificial (IA) de novilhas foi de 22%, com nenhuma perda adicional por volta do dia 30 de gestação e com apenas 4,2% de perdas entre o dia 30 e o nascimento. Estas observações reforçam a grande incidência de perdas embrionárias nas 2 primeiras semanas de gestação e indicam que a causa da perda gestacional em receptoras já está presente no momento da transferência (BERG et

al., 2010; KIMURA; MATSUYAMA, 2014). Ademais, a mortalidade do embrião PIV durante a segunda semana de gestação é quase duas vezes mais elevada do que aquela derivada de embriões produzidos *in vivo* após IA (BERG et al., 2010). Sendo assim, a mortalidade embrionária é a principal causa de falhas reprodutivas em bovinos (DUNNE et al., 2000), assim como após TE-PIV, e ela pode ser atribuída a um efeito negativo da receptora ou do próprio embrião (BERG et al., 2010). Alterações causadas pelo processo de PIV podem tornar o embrião inviável e comprometer seu desenvolvimento e sobrevivência após TE (HANSEN; BLOCK, 2004). Da mesma forma, um ambiente uterino inadequado, incapaz de suportar o desenvolvimento de um embrião alogênico viável, resulta em perda embrionária (IDETA et al., 2010a).

Segundo Andrade e colaboradores (2012), a variabilidade do sucesso da TE-PIV ainda é um dos entraves para sua expansão e muitos dos problemas são relacionados com as receptoras. Considerando a viabilidade do embrião PIV, o desempenho reprodutivo das receptoras depende, além de uma adequada condição nutricional e reprodutiva (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010), de um ambiente uterino adequado que permita o reconhecimento materno da gestação e a tolerância materna aos antígenos do embrião, dando suporte e estimulando o desenvolvimento embrionário e endometrial, promovendo o estabelecimento da gestação (IDETA et al., 2010a). Dessa forma, o fracasso no estabelecimento da gestação pode ser resultado de um comprometimento na interação entre o útero materno e o conceito, levando a uma falha no reconhecimento materno da gestação entre o embrião em pré-implantação e o endométrio uterino e/ou a uma intolerância materna aos antígenos do embrião (KANZAKI et al., 1995; KATAGIRI; TAKAHASHI, 2004; IDETA et al., 2010b; MINTEN et al., 2013).

O reconhecimento materno da gestação é um processo fisiológico pelo qual o conceito sinaliza sua presença ao organismo materno para a manutenção do CL e da alta concentração de progesterona necessária para a manutenção da gestação. Nos bovinos, esse processo ocorre por volta do dia 16-18 de gestação (KIMURA; MATSUYAMA, 2014) e o interferon-tau (IFN- τ), secretado pelo embrião, exerce um papel fundamental (THATCHER et al., 2001; ROBERTS, 2007), sendo produzido em grandes quantidades do dia 15 ao 25 da gestação (HANSEN, 1997). O reconhecimento materno da gestação também é caracterizado por mudanças na função imune do organismo materno, incluindo a detecção de antígenos do conceito pelas células do sistema imune da mãe (HANSEN, 1997).

Sabe-se que o embrião PIV é frequentemente diferente daquele derivado *in vivo* em termos morfológicos, de expressão gênica e metabolismo (HANSEN; BLOCK, 2004). Além

disso, o embrião PIV destinado a TE é totalmente alogênico à sua receptora, ou seja, se comporta com um enxerto 100% estranho ao sistema imune da “mãe”, uma vez que tanto a parte paterna como a materna do embrião é antigênica à receptora. Durante uma gestação normal, o sistema imune materno é desafiado com moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) associadas ao conceito (DAVIES et al., 2006). A sensibilização materna contra tais antígenos é orientada pelos linfócitos T *helper* 1 (Th1) que secretam grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas auxiliam na ativação dos linfócitos T CD8⁺ dirigidos contra as células do feto que expressam essas moléculas de MHC, danificando diretamente os anexos fetais e amplificando a resposta pró-inflamatória local que resulta na rejeição do feto (ZENCLUSSEN et al., 2005). Portanto, para que a gestação ocorra, é necessário o desenvolvimento de algum mecanismo que impeça a rejeição do embrião pela mãe e estabeleça a tolerância imunológica transitória ao conceito necessária para o estabelecimento e manutenção da gestação (BILLINGHAM et al., 1953).

2.3 A gestação em bovinos

Após a fecundação, o embrião passa por um processo de divisão mitótica até o estágio de mórula e, subsequentemente, diferenciação em blastocisto. Nos ruminantes, o blastocisto depois de chegar ao útero e eclodir da zona pelúcida permanece livre na cavidade uterina e passa pelo processo de alongação antes de se implantar na parede do endométrio para formar a placenta (FERREIRA, 2010; KIMURA; MATSUYAMA, 2014). Na espécie bovina, o blastocisto eclode da zona pelúcida por volta do dia 9 de gestação e a alongação trofoblástica é iniciada em torno do dia 12. A drástica transição da forma ovóide para a filamentosa é completada após vários dias, com crescimento rápido no dia 15 de gestação (IDETA et al., 2010a). O conceito cresce de 2mm de comprimento no dia 13 de gestação para 6 mm ao dia 14, atingindo 60 mm ao dia 16 (KIMURA; MATSUYAMA, 2014).

O reconhecimento materno da gestação em bovinos ocorre por volta do dia 16-18 de gestação (OSHIMA, K. et al., 2003; KIMURA; MATSUYAMA, 2014) e o IFN- τ exerce um papel fundamental nesse processo. A fim de evitar a regressão do CL materno, evento que ocorre normalmente no final do ciclo estral de animais não gestantes, o conceito produz INF- τ . Essa citocina previne a liberação pulsátil do hormônio luteolítico prostaglandina F_{2 α} .

(PGF_{2α}) agindo localmente no endométrio uterino e promovendo a manutenção da gestação (THATCHER et al., 2001; EZASHI; ROBERTS, 2004; ROBERTS, 2007).

O endométrio dos ruminantes é composto por regiões carunculares e intercarunculares. Os eventos que envolvem a implantação e placentação ocorrem em proeminências altamente celulares e não glandulares do endométrio bovino denominadas carúnculas (BANKS, 1991; HASHIZUME et al., 2006). Essas áreas limitadas do endométrio são os pontos onde os tecidos maternos entram em contato com as membranas extraembrionárias. As células binucleadas (BNC) fetais estão diretamente envolvidas nesse processo de implantação e são responsáveis pela formação do sincício materno-fetal, formado pela migração e fusão das BNC fetais com aquelas do epitélio uterino, crucial para o desenvolvimento da placenta (WOODING, 1992). Em bovinos, o trofoblasto é minimamente invasivo e o tecido fetal não ultrapassa a membrana basal, apenas as BNC do trofotoderma são incorporadas no epitélio uterino (BEAUCHAMP; CROY, 1991). O início do processo de implantação ocorre por volta do dia 20 de gestação, o desenvolvimento dos cotilédones é observado na membrana fetal em torno do dia 30 e a formação dos placentomas é observada próximo ao dia 48 (OSHIMA et al., 2003).

Assim, a placenta bovina é classificada como não-decídua (BANKS, 1991), sinepiteliocorial (BANKS, 1991; WOODING, 1992), policotiledonária e vilosa (BANKS, 1991), apresentando áreas especializadas de aposição e proliferação das membranas materno-fetais, os placentomas, que constituem a união entre as carúnculas e os cotilédones (WOODING, 1992; OSHIMA et al., 2003). Nesta interface ocorrem trocas metabólicas indispensáveis para o desenvolvimento do conceito e as células trofoblásticas bovinas, derivadas da camada externa do blastocisto e integrantes da placenta fetal, definem o limite entre mãe e feto (MOFFETT; LOKE, 2006). A migração das BNC é essencial para o suporte da grande área de desenvolvimento dos placentomas, além de serem importantes para a produção e liberação de proteínas e hormônios esteroides importantes para o estabelecimento e manutenção da gestação (WOODING, 1992).

2.4 Imunologia no início da gestação

Sabe-se que, de acordo com as características da viviparidade, o conceito dos mamíferos sofre seu desenvolvimento frente a um sistema imunológico materno funcional e

que esta característica proporciona oportunidades e perigos para o embrião (HANSEN, 2011). No que se refere ao comportamento do sistema imune, a gestação constitui um fenômeno ímpar, pois diferentemente do que ocorreria em qualquer outra circunstância de exposição ao material genético proveniente de outro indivíduo não idêntico, o embrião é reconhecido pelo sistema imune da mãe sem que seja disparada uma resposta contra a sua permanência e desenvolvimento. Dessa forma, a gestação somente é possível, com o desenvolvimento de um padrão de resposta alo-imune destinado à “proteção” do conceito desde o início de sua formação até o momento do nascimento, caracterizando um estado de tolerância materno-fetal (DA SILVEIRA, 2006). Isto é, o sistema imune materno reconhece a gestação e os antígenos do embrião e dispara uma complexa rede imunorregulatória na interface materno-fetal com o objetivo de limitar a imunorreatividade materna contra os antígenos do conceito e promover o desenvolvimento embrionário-fetal (DA SILVEIRA, 2006; HANSEN, 2011). Qualquer desvio na resposta imunológica favorável ao estabelecimento da gestação pode levar à falha gestacional (DA SILVEIRA, 2006; SANGUANSEMSRI; PONGCHAROEN, 2008; IDETA et al., 2010a).

Visto que existe a possibilidade de ocorrer ativação de resposta imune mediada por células contra os antígenos do conceito ou inflamação e eventos imunológicos em resposta a doenças infecciosas que levam à morte do conceito, o sistema imune materno é regulado tanto pela mãe quanto pelo conceito com o objetivo de reduzir a capacidade de resposta imunológica agressiva contra a sobrevivência e desenvolvimento do embrião durante a prenhez (HANSEN, 2011). As interações entre as células e moléculas do sistema imune materno e do conceito durante o início da gestação são de extrema importância para o estabelecimento da gravidez e elas podem ser tanto benéficas quanto prejudiciais. Enquanto que certa resposta imune facilita a gestação, através do recrutamento de populações adequadas de células imunitárias e da produção de citocinas específicas que limitam a imunorreatividade materna contra os antígenos do conceito e promove o desenvolvimento do embrião, a inativação ou ativação inapropriada do sistema imune materno pode resultar na morte do conceito, como por exemplo, adquirindo imunidade mediada por células contra os antígenos do embrião (SANGUANSEMSRI; PONGCHAROEN, 2008; HANSEN, 2011).

Nesse contexto, as citocinas assumem um papel complexo, atuando diretamente sobre a modulação da resposta imune. Elas atuam como mediadores responsáveis pelo comportamento individual e pela interação dos diferentes tipos celulares na interface materno-fetal. Podem ser produzidas por macrófagos, linfócitos, células *Natural Killers* (NK) e pelas próprias células trofoblásticas do embrião, e agem através de vias complexas de *feedback*

positivo ou negativo, controlando o nível de ativação inflamatória nesse microambiente (DA SILVEIRA, 2006). A expressão de citocinas é extremamente importante durante o início da gestação e implantação, uma vez que elas exercem um papel chave na atração e ativação das células imunes efetoras (NASU et al., 1999). A manutenção do microambiente e alorreconhecimento dos tecidos feto-placentários se devem a uma complexa rede de comunicação com o trofoblasto através de citocinas, moléculas e receptores de diferentes tipos celulares que compõem o sistema imune uterino (SANGUANSERMSRI; PONGCHAROEN, 2008).

O início da gestação em ungulados domésticos é compreendido pelo período entre o qual ocorre a deposição do sêmen no trato reprodutivo feminino e o início da aposição e interdigitação do trofoblásto com o epitélio do endométrio. Durante este período, o sistema imune local passa por mudanças necessárias para tornar o microambiente uterino favorável à gestação e à continuação do desenvolvimento do conceito e da placenta (HANSEN, 2011). A fecundação tem sido considerada como o início da comunicação entre o embrião e o organismo materno, onde reações imunes prematuras induzem à tolerância imunológica aos antígenos paternos, reestruturação do endotélio para implantação e placentação e suporte imunológico para o desenvolvimento do tecido fetal (ROBERTSON, 2005; SCHUBERTH et al., 2008). Acredita-se também, que a deposição do sêmen no trato reprodutivo feminino possa causar uma inflamação favorável à gestação (HANSEN, 2011). No entanto, após a eclosão do blastocisto da zona pelúcida, mudanças em larga escala ocorrem na função endometrial, quando o conceito em elongação trofoblástica e placentação inicial secreta citocinas e/ou expressa seus aloantígenos (HANSEN, 2011).

Além disso, para evitar a produção de citocinas embriotóxicas e a rejeição do embrião no início da gestação, a mãe deve passar por mudanças fisiológicas apropriadas que são necessárias para tornar o ambiente uterino adequado para o estabelecimento da gestação. Ambos conceito e mãe devem secretar moléculas favoráveis ao desenvolvimento desse processo e, neste sentido, a progesterona e o INF- τ se destacam como uma das principais moléculas secretadas pelo organismo materno e pelo embrião, respectivamente. A progesterona, induzida desde a ovulação e secretada em grandes quantidades durante a gestação, é um dos principais hormônios responsável por desencadear mudanças apropriadas na população e função das células imunes uterinas, afetando o desenvolvimento endometrial e embrionário por meio do aumento da concentração de uma rede de citocinas regulatórias e quimiocinas na interface materno-fetal (POLANCZYK et al., 2004; ROBERTSON, 2005; IDETA et al., 2010a). A progesterona por si só é capaz de suprimir a função efetora das

células T, exercendo um efeito direto na modulação de canais de potássio da membrana celular e também sobre os íons-cálcio, com efeito direto sobre a expressão gênica dessas células (DA SILVEIRA, 2006). O INF- τ , entre as várias moléculas produzidas pelo conceito, se destaca por evitar a lise do CL e garantir a alta concentração de progesterona necessária para a manutenção da gestação, entre outras funções (THATCHER et al., 2001; EZASHI; ROBERTS, 2004; ROBERTS, 2007).

Portanto, vários são os mecanismos que evitam o reconhecimento materno do embrião como um corpo estranho e sua rejeição. Assim sendo, podemos destacar a redução da expressão dos antígenos MHC na superfície do conceito em contato com a mãe (HANSEN, 1997; HILL et al., 2002; DAVIES et al., 2006), a criação de um ambiente intrauterino no qual o tecido materno e o trofoblasto secretam moléculas inibitórias de linfócitos T alo-reativos e que estabeleçam mudanças na atividade funcional de populações específicas de linfócitos maternos que levam à tolerância transitória aos aloantígenos do conceito e liberação de citocinas que estimulam o crescimento e desenvolvimento do embrião (HANSEN, 1997).

2.4.1 Reconhecimento materno do conceito bovino

O sistema imune materno reconhece o conceito principalmente por meio da detecção da presença de aloantígenos no embrião ou pela detecção de citocinas ou quimiocinas produzidas pelo próprio conceito que ativam o sistema imune da mãe para o reconhecimento materno da gestação (HANSEN, 2011).

Durante a gestação, o sistema imune materno é desafiado com moléculas do MHC associadas às células embrionárias que são herdadas da mãe e do pai (HANSEN, 2011). O MHC é um locus que codifica genes de proteínas especializadas que têm a função de apresentar antígenos para serem reconhecidos pelas células T, existindo dois tipos principais de produtos gênicos, as moléculas de classe 1 (MHC-I) e as de classe 2 (MHC-II) (DAVIES et al., 2006; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Na superfície do conceito, entre as duas classes do MHC, apenas a classe I é expressa (HANSEN, 2011).

O embrião bovino pode expressar moléculas tanto da via clássica quanto da não clássica do MHC-I e essa expressão varia ao longo do desenvolvimento embrionário (DAVIES et al., 2006; HANSEN, 2011) (FIGURA 1). Os antígenos MHC-I podem ser detectados ao longo do desenvolvimento do embrião bovino até o estágio de blastocisto,

sendo que, após o estágio de zigoto, a abundância da transcrição declina e permanece baixa até o período de eclosão do blastocisto (FIGURA 1). É provável que as interações entre os antígenos MHC-I e as células T CD8⁺ uterinas estejam restritas durante esse período devido à barreira física imposta pela zona pelúcida. Acredita-se, portanto, que esse período é caracterizado pela inércia imunológica do conceito, o qual evita seu reconhecimento pelo sistema imune materno (HANSEN, 2011).

Após a eclosão do blastocisto da zona pelúcida, o período de inércia imunológica do embrião bovino é trocado por um período de imunoativação, no entanto, pouco se sabe a respeito da expressão das moléculas de MHC-I durante esse período. A regulação negativa da transcrição do MHC-1 observada em trofoblastos de embriões suínos contribuiu na sugestão de que, após a eclosão do blastocisto bovino, uma baixa expressão de antígenos MHC-I pode garantir que uma resposta de rejeição contra o embrião não seja evocada (HANSEN, 2011) (FIGURA 1). Em adição, o contato íntimo entre o endométrio e o corioalantóide no primeiro trimestre da gestação em ruminantes, pode causar uma supressão da expressão do MHC-I no trofoblasto (DAVIES; FISHER; SCHLAFFER, 2000; HILL et al., 2002) e consequentemente, proteger a placenta do ataque do sistema imune materno e evitar a rejeição do feto (DAVIES et al., 2006).

Além disso, a abundância da expressão das moléculas não clássicas do MHC-I no embrião bovino pode contribuir para a inibição de uma resposta imune agressiva contra a sobrevivência do conceito (HANSEN, 2011). Segundo experimentos realizados por Davies e colaboradores (2006), as células trofoblásticas bovinas apresentam de 34% a 79% de transcritos de MHC-I codificados pela via não clássica. Um alto nível de expressão dessas moléculas pode estar associado com o aumento da proteção do feto contra a rejeição imunológica materna, uma vez que, em humanos, as isoformas não clássicas do MHC-I interagem com receptores inibitórios de células T e/ou NK inibindo a citotoxicidade dessas células contra o conceito e facilitando a tolerância materno-fetal (THELLIN et al., 2000).

As células trofoblásticas têm um potencial peculiar de resposta às citocinas presentes no meio (DA SILVA, 2006) e dessa forma, fatores presentes na secreção uterina podem ser capazes de regular positivamente ou negativamente a expressão gênica no conceito, favorecendo ou inibindo a continuação da gestação. A expressão das moléculas não clássicas do MHC-1 pode ser aumentada na presença de progesterona, INF- γ , IL-3 ou IL-4 (HANSEN, 2011) (FIGURA 1). Assim, a proporção entre a expressão dos genes clássicos e não clássicos do MHC-I em trofoblastos bovinos parece influenciar o balanço entre sistema imune ativo e imunossupressão, respectivamente (DAVIES et al., 2006).

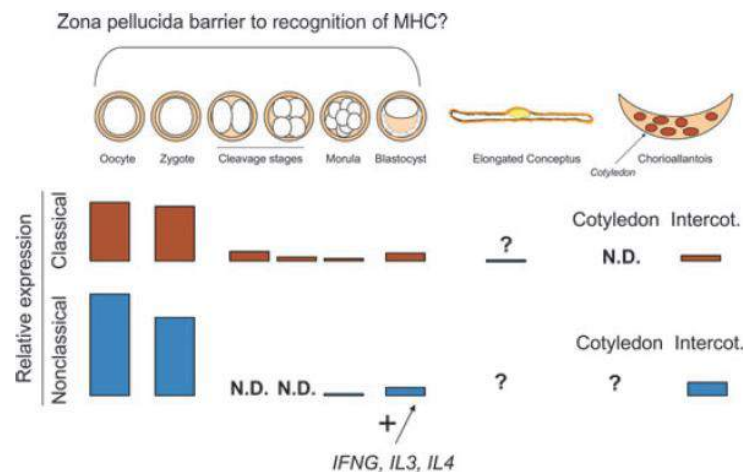


Figura 1. Diagrama esquemático ilustrando as mudanças na expressão do MHC-I no embrião bovino em pré-implantação, elongação e no corioalantóide. Abreviações: intercot. = tecido intercotiledonário; N.D. = não detectado. Fonte: Hansen (2011).

O conceito também pode sinalizar sua presença para o organismo materno através da produção e secreção de moléculas que regulam a função das células imunes uterinas. O embrião precoce secreta uma imensa quantidade de citocinas, quimiocinas, enzimas, prostaglandinas, hormônios e outros fatores desconhecidos que são importantes por promover mudanças fisiológicas na mãe e nas células imunes uterinas favoráveis ao estabelecimento e manutenção da gestação (HANSEN, 1997; ROBERTS, 2007). Dentre as várias moléculas secretadas pelo conceito bovino, o $\text{INF-}\tau$ é uma citocina produzida durante o início da gestação que se destaca por promover o reconhecimento materno da gestação e sua manutenção (EZASHI; ROBERTS, 2004; ROBERTS, 2007; HANSEN, 2011). O $\text{INF-}\tau$ apresenta forte efeito antiluteolítico, atuando por meio da inibição ou alteração dos padrões de síntese e liberação da $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio. Esse efeito é obtido por meio do bloqueio direto da expressão de receptores de oxitocina no endométrio, o qual determina o impedimento da ação da oxitocina no estímulo para a síntese e secreção de $\text{PGF2}\alpha$ (EZASHI; ROBERTS, 2004; FERREIRA, 2010; HANSEN, 2011).

Nos bovinos, o reconhecimento materno da gestação ocorre por volta do dia 16-18 de gestação (KIMURA; MATSUYAMA, 2014) e o $\text{INF-}\tau$, secretado exclusivamente pelo trofoblasto, exerce um papel fundamental nesse processo atingindo sua secreção máxima (THATCHER et al., 2001; ROBERTS, 2007). Esta secreção começa tão cedo quanto o estágio de blastocisto, aumenta significativamente quando o embrião inicia sua elongação

trofoblástica e declina a níveis indetectáveis no final da fase pré-implantatória (HANSEN, 1997, 2011).

Ademais, o INF- τ possui outros papéis biológicos que alteram a função endometrial, como atividade antiviral (EZASHI; ROBERTS, 2004; HANSEN, 2011), inibidora da proliferação linfocitária, estimuladora da produção da molécula luteotrófica prostaglandina E2 (PGE2) e ativadora da expressão de genes específicos no endométrio (HANSEN, 1997, 2011). Desse modo, o INF- τ aumenta a produção e secreção de diversas moléculas no microambiente uterino advindos da mãe que podem estar envolvidas na manutenção da viabilidade do conceito e na tolerância aos aloantígenos do conceito.

Como citado anteriormente, fatores presentes na secreção uterina podem ser capazes de regular positivamente a expressão gênica no conceito (DA SILVEIRA, 2006). Segundo Ezashi e Roberts (2004) esses fatores podem se ligar a receptores na superfície do trofotoderma e ativar a via de sinalização transducional que regula positivamente o INF- τ já constitutivamente ativo, coordenando, assim, o crescimento e a atividade do conceito com o estado hormonal da mãe. Essa característica reforça ainda mais o fato de que, o sucesso gestacional e o desenvolvimento da placenta dependem da função das moléculas secretadas dentro do microambiente uterino, ou seja, da comunicação entre o embrião em pré-implantação e o endométrio uterino (SANGUANSEMSRI; PONGCHAROEN, 2008). Dessa maneira, deduz-se que o INF- τ atue com a progesterona na preparação do endométrio para o estabelecimento e desenvolvimento da placenta (HANSEN, 2011).

2.4.2 Imunomodulação: mudanças no status imune endometrial durante a gestação

As células imunes uterinas são responsáveis por alertar o sistema imune materno quanto a presença de aloantígenos durante toda a gestação e elas podem contribuir direta e indiretamente pela expressão de receptores que medeiam o reconhecimento do embrião, bem como os processos envolvendo a placentação e a produção de citocinas no microambiente uterino que regulam e modulam a resposta imune materna e a função vascular (DA SILVEIRA, 2006). Em gestações bem sucedidas, o conceito é tolerado e a gravidez chega a termo sem problemas imunológicos (ARCECI et al., 1989). De maneira geral, o ambiente uterino celular dos bovinos durante a gestação é caracterizado por um perfil baixo de células NK e uma grande população de macrófagos que são recrutados no endométrio e promovem o

crescimento do trofoblasto através da secreção de citocinas mitogênicas (HANSEN, 1997). A função reprodutiva dos macrófagos varia de um papel imunológico clássico de fagocitose, apresentação de antígenos e atividade bactericida, para um papel na produção de citocinas que promovem o crescimento pré-implantação e facilitam a implantação do embrião (COHEN et al., 1999).

Durante o início da gestação, o reconhecimento imunológico da presença do conceito deve refletir em mudanças imunes funcionais no trato reprodutivo feminino ou sistematicamente que garantam o sucesso gestacional. Em animais domésticos, dados obtidos através de estudos com suínos indicam que a função imune é alterada pelo embrião durante o processo de elongação trofoblástica, produção de interferons e ligação do conceito com o endométrio (HANSEN, 2011). Em vacas, linfócitos são observados no epitélio luminal uterino no início da gestação diminuindo com o tempo, possivelmente por imunossupressão, pois moléculas derivadas do trofoblasto, tais como o INF- τ , podem inibir a proliferação linfocitária (HANSEN, 1997). Também, mudanças em larga escala ocorrem na expressão gênica endometrial coincidentemente com a secreção de INF- τ pelo conceito, sendo que muitas delas são genes induzidos por INFs e na sua maioria imunossupressores (BAUERSACHS et al., 2006; HANSEN, 2011). Mudanças na função imune sistêmica também ocorrem com a sinalização do conceito, podendo fazer parte do processo pelo qual a gestação é facilitada (HANSEN, 2011).

O fenótipo e a função das células imunes maternas podem afetar o processo gestacional e subsequentemente, o resultado da gestação (SANGUANSEMSRI; PONGCHAROEN, 2008). Sabe-se que, em humanos, a decídua funciona como um sítio extra-tímico de maturação e promove a diferenciação de células precursoras em resposta a sinais dados durante a apresentação dos antígenos do conceito (THELLIN et al., 2000; SANGUANSEMSRI; PONGCHAROEN, 2008). Neste sentido, as células T exercem um papel central na imunorregulação e imunoestimulação durante a gestação (SAITO et al., 2010). A evolução ou interrupção da gestação depende do perfil de citocinas induzidas por diferentes subpopulações de linfócitos T na interface materno-fetal (DA SILVEIRA, 2006; SANGUANSEMSRI; PONGCHAROEN, 2008).

Dentro deste contexto, os linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1) produzem citocinas que são caracteristicamente pró-inflamatórias e indutoras da imunidade celular e dos processos de rejeição, como IL-2 e INF γ (DA SILVEIRA, 2006; SAITO et al., 2010). Ao contrário, linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) produzem citocinas potencialmente anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, que suprimem a ativação deletéria à gestação e podem promover um *feedback*

negativo para as citocinas pró-inflamatórias Th1 (DA SILVEIRA, 2006). Linfócitos T *helper* tipo 17 (Th17) produzem a citocina pró-inflamatória IL-17, a qual desempenha importante papel na indução da inflamação, na patogenicidade de doenças autoimunes, rejeição e na defesa do hospedeiro contra micróbios (SAITO et al., 2010). Em contraste, os linfócitos T reguladores (Treg) desempenham um papel central na imunorregulação e indução da tolerância, regulando a função das células T efectoras, tais como Th1, Th2 e Th17 (SAITO et al., 2010).

Em uma gestação normal, a predominância da imunidade Th2 pode não ser essencial para o sucesso gestacional, visto que sua ausência não leva à falha de gravidez e sua superestimulação esta relacionada a perdas gestacionais. Do mesmo modo, o perfil Th1 não pode ser totalmente suprimido, uma vez que, por exemplo, em murinos, o INF γ desempenha um importante papel na remodelação vascular durante o início da gestação. Assim, a imunidade Th1 deve ser bem controlada para evitar sua superestimulação (SAITO et al., 2010) e desencadear perdas embrionárias e fetais (HANSEN, 1997; IDETA et al., 2010a). O aumento das células Th17 também parece ser desvantajoso para a manutenção da gravidez, dado que altos níveis de IL-17 foram observados em rejeições a transplantes. Ainda assim, certo nível de IL-17 parece ser benéfico para a gestação, como por exemplo, na indução de resposta imune contra microorganismos no ambiente uterino (SAITO et al., 2010). Logo, sabe-se que a inflamação é necessária para o sucesso da implantação e ao mesmo tempo sua produção excessiva pode causar reabsorção do embrião. Nesse sentido, as células Treg podem exercer seu papel regulatório no balanço entre os perfis pró e anti-inflamatório e desempenhar um importante papel na regulação da rejeição do embrião alogênico pelas células imunes maternas, inibindo o ataque das células T ativas contra os antígenos MHC do conceito. Portanto, o mecanismo pelo qual o feto não é rejeitado pelas células imunes maternas pode ser explicado pelo paradigma Th1/Th2/Th17 e Treg (SAITO et al., 2010).

2.4.3 O papel das células Treg, da enzima IDO e das citocinas IL-10 e CSF-1 durante a gestação

2.4.3.1 O papel das células T regulatórias (Treg)

Vários são os fatores envolvidos na complexa rede imunorregulatória para a tolerância materno-fetal e regulação do desenvolvimento embrionário e da placenta durante a gestação, e entre eles, a atividade das células Treg se destaca por desempenhar um papel fundamental nesse processo (DA SILVEIRA, 2006). Em camundongos e humanos, vários trabalhos têm proposto que a atividade das células Treg é essencial para o desenvolvimento da tolerância materno-fetal (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004; SAITO et al., 2005; KIM et al., 2015).

As Treg são uma população de células T $CD4^+CD25^{high}$ com atividade imunorregulatória antígeno-específica que exercem atividade fundamental durante os processos de tolerância materno-fetal, periférica e aos transplantes (DA SILVEIRA, 2006). As células T $CD4^+CD25^{high}$ expressam um gene chamado fator de transcrição *forkhead box P3* (FOXP3) (DA SILVEIRA, 2006; SAITO et al., 2010) e a transdução desse gene indica a expressão de $CD25^+$, ou seja, a diferenciação das células T $CD4^+CD25^-$ em linfócitos T $CD4^+CD25^+$ com capacidade imunorregulatória (DA SILVEIRA, 2006). Assim, em tecidos ativados, como, por exemplo, a decídua, o melhor indicador de função imunomodulatória, ou seja, células Treg, é a detecção de FOXP3 em linfócito T (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; DA SILVEIRA, 2006).

Na gestação, a atividade das células Treg é especificamente dirigida aos aloantígenos do embrião e se destaca por desempenhar um papel central no controle da proliferação e produção de citocinas em ambas as células T $CD4^+$ e $CD8^+$, na produção de imunoglobulinas pelas células B, na atividade citotóxica das células NK e na maturação das células dendríticas (DC) (SAITO et al., 2010). Elas atuam regulando toda a intrincada rede de atividade imune relacionada ao alorreconhecimento, implantação, placentação e desenvolvimento fetal, promovendo os mecanismos e a manutenção da tolerância materno-fetal (SAITO et al., 2005; DA SILVEIRA, 2006; SAITO et al., 2010). Em camundongos, as células Treg já estão aumentadas nos linfonodos drenantes do útero 2 ou 3 dias após o acasalamento, sugerindo que elas se acumulam antes da implantação e que movem rapidamente para o útero grávido e proliferam, resultando na indução da tolerância específica aos aloantígenos do embrião no início da gestação (SAITO et al., 2010; CLARK, 2011).

A expansão de linfócitos Treg durante o início da gestação, no útero e no sangue periférico, parece ser importante na supressão de uma resposta agressiva dirigida aos aloantígenos do conceito, visto que a ausência desse controle leva à falha de gravidez relacionada ao ataque imunológico, com rejeição do feto (ALUVIHARE; KALLIKOURDIS; BETZ, 2004; DA SILVEIRA, 2006). Estudos realizados em camundongos demonstraram esse importante papel das células Treg na indução da tolerância imunológica específica aos aloantígenos do conceito durante a gestação. De fato, em gravidez alogênica, o número de células Treg endometriais é superior ao de gestações singênicas e, mais, a depleção dessas células no dia do coito ou 2,5 dias após resulta no comprometimento da implantação em camundongos alogênicos, mas não em singênicos, sugerindo que as células Treg são essenciais para a indução da tolerância imunológica aos aloantígenos do embrião (SAITO et al., 2010). Além disso, elas podem ser induzidas sob condições tolerogênicas e produzir altos níveis de IL-10 (SANGUANSERMSRI; PONGCHAROEN, 2008), contribuindo para o perfil anti-inflamatório necessário durante a imunomodulação. Essas observações reforçam o papel fundamental dessas células no mecanismo de tolerância materno-fetal, especialmente após a demonstração de que sofrem um aumento no sangue periférico no início da gestação, com pico no segundo trimestre, declinando no período pós-parto (DA SILVEIRA, 2006).

Em bovinos, pouco se sabe a respeito da presença e regulação das células Treg durante a gestação, no entanto, pressupõe-se que populações endometriais sejam estreitamente reguladas em termos de tempo e localização no início da gestação (OLIVEIRA et al., 2013). Em contraste às observações em humanos e camundongos, no qual as células Treg acumulam no útero antes da implantação, pode ser que a expansão dessas células não seja requerida para a implantação em bovinos (OLIVEIRA; HANSEN, 2008), o qual possui trofoblasto minimamente invasivo (BEAUCHAMP; CROY, 1991), mas possivelmente desempenhe importante papel durante a placentação, uma vez que a proporção de células Treg no sangue periférico foi aumentada em vacas prenhas com 33-34 dias de gestação (OLIVEIRA; HANSEN, 2008).

A imunoestimulação convencional das células T é inibida pelas células Treg através do contato célula-a-célula ou através da produção de citocinas imunossupressoras, como a IL10 e o TGF β . Outros mecanismos ainda têm sido propostos, como, por exemplo, a estimulação da indoleamina 2,3 dioxinogenase (IDO) nesses linfócitos, enzima importante no metabolismo do triptofano (DA SILVEIRA, 2006).

2.4.3.2 O papel da enzima Indoleamina 2,3-dioxinagenase (IDO)

Vários relatos indicam fortes evidências de que a proteína enzimática IDO exerça um importante papel na inibição da imunoestimulação convencional durante a gestação (DA SILVEIRA, 2006; DELLÊ; NORONHA, 2009). De fato, estudos realizados por Munn e colaboradores (1998) demonstraram que a inibição química da IDO durante a gravidez induziu o aborto em camundongos, caracterizado pela rejeição do tecido embrionário por meio de linfócitos T alorreativos.

Sabe-se que as células Treg recrutadas ou estimuladas durante a gestação expressam CTLA-4 e essa expressão pode regular positivamente a expressão da molécula IDO pelas células dendríticas e monócitos do útero e do sangue periférico (SANGUANSERMSRI; PONGCHAROEN, 2008). Em camundongos, essa enzima também é sintetizada e secretada pelo sinciciotrofoblasto e tem sido mostrada ser essencial para o sucesso da gestação (THELLIN et al., 2000). O efeito da IDO na imunomodulação está relacionada com a depleção do triptofano, aminoácido essencial para a síntese de proteínas e, consequentemente, importante para a proliferação das células do sistema imune, que em sua ausência ou em baixos níveis reduzem a possibilidade de rejeição do feto alogênico. Assim, a IDO impede a proliferação de linfócitos T alorreativos no microambiente uterino local e promove a tolerância ao feto alogênico (THELLIN et al., 2000; SANGUANSERMSRI; PONGCHAROEN, 2008; DELLÊ; NORONHA, 2009).

Ademais, o efeito imunomodulador da IDO não se limita apenas à depleção de triptofano, mas também aos metabólitos que são gerados a partir desse aminoácido, mais especificamente os derivados da quinurenina. Terness e colaboradores (2002) demonstraram que células dendríticas expressando IDO inibem a proliferação de linfócitos T “*in vitro*” e que a adição de derivados da quinurenina potencializa esse efeito inibitório, além disso, também induzem a apoptose em linfócitos T “*in vitro*” e suprime timócitos alorreativos “*in vivo*” (FALLARINO et al., 2002).

Em bovinos, de maneira semelhante ao que ocorre em camundongos, a estimulação e a elevada atividade da enzima IDO durante a gestação pode reduzir a presença de leucócitos no endométrio grávido, promovendo um possível mecanismo de proteção ao feto alogênico. Groebner e pesquisadores (2011) demonstraram, através de espectrometria de massa, que novilhas da raça simental entre 12-18 dias de gestação apresentam uma diminuição na concentração endometrial de triptofano e um aumento na concentração de quinurenina, sugerindo um aumento da atividade da IDO. Além disso, a IDO teve sua expressão 18 vezes

mais abundante no endométrio intercaruncular ipsilateral do dia 18 de gestação do que nos animais não gestantes. Esse estudo também demonstrou, através de uma cocultura *in vitro* de células endometriais, que o INF- τ secretado pelo embrião é capaz de estimular a expressão de IDO pelas células do estroma endometrial e consequentemente, facilitar a tolerância ao feto alogênico.

Portanto, sabe-se que durante a gestação o sistema imune é bem controlado pelo balanço entre imunoestimulação e imunoregulação e, nesse sentido, as células Treg e a IDO medeiam a tolerância materna ao feto alogênico (IDETA et al., 2010a), diminuindo a resposta imune particularmente sobre a atividade dos linfócitos T e células NK, que são relacionados como mediadores primários da rejeição alogênica no tecido.

2.4.3.3 O papel da Interleucina 10 (IL-10)

A citocina anti-inflamatória IL-10 tem sido relatada em diversos estudos pelo seu importante papel durante a gestação, contribuindo para o estabelecimento de um perfil imunossupressor necessário para evitar o desencadeamento de respostas imunes contra o desenvolvimento do embrião alogênico no microambiente uterino. A IL-10 é expressa por várias células imunes, incluindo linfócitos T e B e macrófagos. Os efeitos imunossupressores dessa citocina incluem a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos T e inibição da apresentação de antígenos (PESTKA et al., 2004).

Estudos experimentais têm detectado altas concentrações de IL-10 no soro de animais que apresentam tolerância a transplantes, sugerindo um papel regulatório dessa citocina e propondo que a presença de IL-10 no microambiente gestacional poderia contribuir para a geração e expansão de células Tregs (HARA et al., 2001). Além disso, pressupõe-se que a IL-10 estimule o aumento da expressão de moléculas não clássicas do MHC-I no trofoblasto (THELLIN et al., 2000), importante para a proteção do conceito contra a rejeição imunológica materna (DAVIES et al., 2006), e module o desenvolvimento da resposta imune Th2, e desta forma, o conceito tenta passar de forma despercebida pelo sistema imune da mãe (DA SILVEIRA, 2006).

Abortos recorrentes em humanos são relacionados com mudanças no perfil de citocinas Th1/Th2, com baixa produção de IL-10 pelas células T CD4⁺ (SAITO et al., 2010). Em bovinos, a expressão de IL-10 no endométrio no início da gestação sugere que existe uma

tendência na expressão do perfil de citocinas Th2 para o estabelecimento da gestação (OLIVEIRA et al., 2013).

2.4.3.4 O papel do fator estimulador de colônias 1 (CSF-1)

Os fatores estimuladores de colônias têm a habilidade de estimular a formação de células mielóides maduras a partir de células hematopoiéticas precursoras. O fator estimulador de colônias 1 (CSF-1) ou também conhecido como fator de crescimento estimulador de macrófagos (M-CSF) atua localmente e humoralmente, sendo identificado originalmente como um importante fator primário regulador da sobrevivência, proliferação e diferenciação da linhagem fagocítica mononuclear (STANLEY et al., 1983; KANZAKI et al., 1995). A ação do CSF-1 é mediada por um receptor de membrana específico codificado pelo protooncogene *c-fms*, que é um membro do tipo III da família dos receptores de membrana tirosina-quinase (STANLEY et al., 1983; BEAUCHAMP; CROY, 1991; KANZAKI et al., 1995). O CSF-1 é o principal fator de crescimento que regula as populações de macrófagos uterinos durante ambos ciclo estral e gestação, e consequentemente, a abundância de macrófagos no estroma uterino é variável de acordo com o meio hormonal e seu recrutamento durante a gestação é importante para o processo reprodutivo (COHEN et al., 1999; IDETA et al., 2010a). Fenótipos de camundongos noucaute para CSF-1 mostram que os macrófagos que requerem a produção local ou circulante de CSF-1 para seu estabelecimento e manutenção parecem ter um papel importante na organogênese e remodelação tecidual, sendo distinguidos dos “macrófagos independentes do CSF-1” que estão envolvidos primariamente nas respostas imunes e inflamatórias (STANLEY et al., 1983; ARCECI et al., 1989). Tem sido sugerido que o CSF-1 desempenha um papel não apenas na proliferação e diferenciação local de células imunes, mas também no desenvolvimento embrionário e placentário (KANZAKI et al., 1995). Realmente, a rápida proliferação de ambas as células uterinas e embrionárias durante a implantação e formação da placenta sugere que fatores de crescimento desempenhem um papel nesse processo. Dentro desse contexto, tanto o útero como a placenta produzem uma variedade de fatores de crescimento, e ambos trofoblasto e células endometriais expressam receptores para alguns desses fatores, possibilitando a estimulação autócrina, parácrina ou local (ARCECI et al., 1989).

Diferentes tipos celulares sintetizam CSF-1, incluindo macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e células do trato reprodutivo feminino (STANLEY et al., 1983; KANZAKI et al., 1995; NASU et al., 1999). O CSF-1 é expresso pelas células do aparelho reprodutor feminino ao longo de ambos ciclo estral e gestação, e as mudanças cíclicas na produção endometrial de CSF-1 implicam a existência de um mecanismo de regulação pelos hormônios esteroides sexuais (ARCECI et al., 1989). Culturas de células estromais do endométrio humano mostraram responder positivamente ao tratamento com progesterona e testosterona de uma maneira dose dependente na expressão de CSF-1, sendo observada uma alta expressão na decídua no início da gestação (KANZAKI et al., 1995). Em camundongos, a expressão de CSF-1 pelo epitélio uterino também é regulada sinergicamente pelos hormônios estrógeno e progesterona, e é logaritmicamente elevada durante a gestação (NASU et al., 1999; LEE et al., 2003). Da mesma forma, é possível que a expressão do CSF-1 no endométrio e na placenta seja responsiva aos hormônios esteroides sexuais em bovinos, visto que os níveis de mRNA mostram variação dinâmica durante todo o ciclo estral e gestação, de uma maneira que é refletida nos níveis relativos de progesterona e estrógeno, sendo regulada positivamente em torno do cio no útero cíclico (STANLEY et al., 1983; LEE et al., 2003; OSHIMA et al., 2008). Os níveis de progesterona têm sido referidos como sendo maiores no corno ipsilateral do que no corno oposto mais afastado do CL, assim, o gradiente de progesterona pode ser responsável pela diferença na expressão de CSF-1 entre os dois cornos bovinos (LEE et al., 2003). Portanto, essa citocina tem sido sugerida por desempenhar um importante papel no estabelecimento da gestação, sendo sintetizada localmente pelas células epiteliais e estromais uterinas, aumentando ao longo da gestação (STANLEY et al., 1983; ARCECI et al., 1989; BEAUCHAMP; CROY, 1991; KANZAKI et al., 1995).

A importância do CSF-1 na reprodução tem sido evidenciada por camundongos mutantes com total carência de CSF-1, o qual apresenta diversos defeitos reprodutivos e baixas taxas no estabelecimento da gestação, sugerindo que a secreção de CSF-1 no endométrio é indispensável para desenvolvimento pré-implantação do embrião e/ou funções endometriais (KANZAKI et al., 1995; COHEN et al., 1999; OSHIMA et al., 2003; OSHIMA et al., 2008).

O CSF-1 e seu receptor são expressos no trato reprodutivo feminino de várias espécies, entre elas, camundongos, humanos, suínos e bovinos. Em camundongos e humanos, há a suposição de que o CSF-1 contribua na regulação do desenvolvimento da placenta, visto que a expressão do receptor de CSF-1 (CSF-1R) tem sido encontrada nos trofoblastos altamente invasivos de murinos e humanos, e desse modo, o CSF-1 estaria envolvido na

diferenciação de uma placenta hemocorial altamente invasiva (BEAUCHAMP; CROY, 1991). Apesar de todas as observações sugerirem um papel para o CSF-1 no desenvolvimento e função da placenta, não há diferenças aparentes na diferenciação e crescimento placentário entre camundongos noucate, mas sim, nas taxas de sobrevivência e implantação que são significativamente mais baixas (LEE et al., 2003). Ademais, em cultura, o CSF-1 aumenta o desenvolvimento pré-implantação de embriões murinos, pois CSF-1R estão presentes no embrião de camundongo desde o final do estágio de duas células até a implantação, evidenciando que o papel do CSF-1 durante a gravidez vai além da regulação dos abundantes fagócitos mononucleares presentes no útero (LEE et al., 2003). Em humanos e suínos, um padrão similar de expressão do CSF-1 é encontrado, mas o CSF-1 e o CSF-1R são concomitantemente expressos tanto nas células do útero quanto nas células trofoblásticas, tornando o padrão de expressão mais complexo do que em camundongos, o qual não apresenta expressão de CSF-1 nas células da placenta. A coexpressão do ligante e de seu receptor nas células trofoblásticas sugere um modo de ação do CSF-1 tanto parácrino quanto autócrino (LEE et al., 2003).

Um trabalho realizado por Oshima e pesquisadores (2003), no qual 21 vacas foram utilizadas para o estudo dos níveis transcricionais de CSF-1 no endométrio durante os estágios gestacionais de pré-implantação (D16-17), implantação (D20-21), formação dos cotilédones (D30-36) e dos placentomas (D48-49) e estabelecimento da gestação (D74-140), mostrou que o CSF-1 é expresso no endométrio ao longo de todos esses estágios gestacionais e que sua expressão parece aumentar na região intercaruncular entre os dias 74 e 140 de gestação, sugerindo que a produção de CSF-1 pelo endométrio bovino pode estar relacionada à manutenção da gestação. No trofoblasto bovino, o CSF-1R também é expresso (BEAUCHAMP; CROY, 1991; HANSEN, 1997) e é detectado em todos os estágios da gestação, da mórula ao termo, uma vez que, Beauchamp e Croy (1991) identificaram sua presença no embrião antes de se implantar, no dia 7 e 14 de gestação, e no trofoblasto pós-implantação, entre os dias 29 e o termo, com aumento aparente de células CSF-1R positivas na região intercotilodonária no dia 29 e entre os dias 96-190. Já que a expressão do CSF-1 no endométrio intercaruncular e a frequência de células CSF-1R positivas na região intercotilodonária do trofoblasto aumenta durante a gravidez, sugere-se que o CSF-1 produzido e secretado no endométrio se ligue ao respectivo receptor no trofoblasto e promova o crescimento e desenvolvimento do trofoblasto bovino (OSHIMA et al., 2003). Acredita-se que a gestação se torne mais estável por volta do 2-3 mês de gestação, quando a incidência de abortos após TE parece diminuir e, justamente, quando a expressão de CSF-1 nos tecidos

uteroplacentários e a expressão de CSF-1R no trofoblasto atingem altos níveis (OSHIMA et al., 2003).

A expressão de CSF-1R em conceitos bovinos a partir de 7 dias e CSF-1 em todas as membranas extraembrionárias do embrião em pré-implantação sugere que os conceitos podem responder ao CSF-1 secretado tanto pelo endométrio quanto ao próprio CSF-1 (LEE et al., 2003), assemelhando assim, ao padrão de expressão do CSF-1 de humanos e suínos. Segundo Beauchamp e Croy (1991), a expressão de CSF-1R no trofoblasto bovino não está correlacionada com a capacidade invasiva, sendo que o trofoblasto bovino é considerado não invasivo. Membranas vascularizadas, tais como o alantoide e o saco vitelino, que são sítios de hematopoese embrionária, expressam CSF-1, consistentemente com o seu papel promotor de crescimento e diferenciação de células hematopoiéticas. A expressão de CSF-1 pelo alantóide e pelas células mesodérmicas do trofoblasto bovino pode modular a expressão de moléculas de adesão celular que são essenciais para a fusão corioalantóica e subsequente, formação dos placentomas (LEE et al., 2003). Logo, o padrão temporal e espacial de expressão do CSF-1 no tecido uteroplacentário e a expressão de CSF-1R nas células trofoblásticas sugerem um papel importante para o CSF-1 durante a gestação bovina. Estudos suportam a hipótese de que o CSF-1 desempenhe um papel funcional no crescimento e desenvolvimento do trofoblasto bovino, sendo importante para o estabelecimento e manutenção da gestação (BEAUCHAMP; CROY, 1991; OSHIMA et al., 2003, 2008).

Ademais, a presença do conceito no início da gestação modula a expressão de CSF-1 através da secreção local de fatores, tais como o INT- τ . No entanto, o trofotoderma nesta fase secreta muitas outras proteínas e metabolitos, incluindo prostaglandinas, que também podem mediar a expressão endometrial de CSF-1 (LEE et al., 2003). De forma “recíproca”, o CSF-1 endometrial causa o aumento da expressão de INT- τ durante o crescimento pré-implantação do embrião bovino (EZASHI; ROBERTS, 2004), de fato, a expressão de CSF-1 endometrial é aumentada marcadamente entre os dias 14 e 17 de gestação (LEE et al., 2003), no momento exato em que a produção de INF- τ pelo conceito atinge sua máxima produção e promove o reconhecimento materno da gestação (HANSEN, 1997). Essa característica responsiva da expressão gênica do INF- τ às secreções uterinas da mãe permite que a produção de INF- τ pelo conceito se mantenha coordenada com o status fisiológico materno, o qual esta sob o controle dos hormônios sexuais (EZASHI; ROBERTS, 2004).

2.5 Administração intrauterina de sêmen e PBMCS afetando o desempenho reprodutivo

Durante a monta natural, a exposição da fêmea ao sêmen constitui o primeiro momento no qual o sistema imune materno é apresentado aos antígenos paterno, os quais serão novamente evidenciados durante a implantação do embrião (KIM et al., 2015). Por isso, a deposição do sêmen no trato reprodutivo feminino tem sido considerada como o início da comunicação com o organismo materno para facilitar o estabelecimento da gestação (SCHUBERTH et al., 2008).

Existem fortes evidências de que a exposição ao sêmen e a outros componentes do esperma contribuam para um efeito imunossupressor sobre a superfície mucosa do trato reprodutivo feminino com implicações diretas no sucesso gestacional (DA SILVEIRA, 2006). O plasma seminal contém potentes sinalizadores, como o TGF β e outras citocinas e prostaglandinas secretadas principalmente pelas vesículas seminais e pela próstata (ROBERTSON, 2005), que causam grandes mudanças na função imune da fêmea e que podem promover um estado de tolerância funcional aos aloantígenos paterno facilitando a aceitação materna durante a implantação do embrião (ROBERTSON et al., 2002, 2009; CLARK, 2011), o que é crítico para o sucesso reprodutivo nos mamíferos (KIM et al., 2015). Resumidamente, a inseminação resulta na transmissão de fatores seminais que agem para promover a sobrevivência dos espermatozoides e condicionar uma resposta imune materna para tolerar o conceito semi-alogênico, promovendo mudanças celulares e moleculares no endométrio para facilitar o desenvolvimento do embrião e sua implantação (ROBERTSON, 2005).

Sabendo que as células espermáticas são antigênicas nas fêmeas e que a deposição do sêmen no trato reprodutivo feminino conduz a uma resposta inflamatória caracterizada pelo influxo de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, células dendríticas e células T (O'LEARY et al., 2004; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2010; HANSEN, 2011), os efeitos do fluido seminal são provavelmente mediados pela expansão do pool de células Treg provenientes dos linfonodos drenantes do útero, estabelecendo a tolerância materna aos antígenos paterno (ROBERTSON et al., 2009; CRAWFORD et al., 2014; KIM et al., 2015). Esses eventos são iniciados quando os agentes sinalizadores do plasma seminal interagem com as células epiteliais da cérvix e do útero ativando a síntese de citocinas e induzindo mudanças celulares e moleculares que assemelham a uma cascata inflamatória clássica. A consequência desses eventos são o recrutamento e a ativação de macrófagos, granulócitos e DC que têm atividade imunorregulatória e de remodelação tecidual, culminando na melhoria

da receptividade endometrial para a implantação e desenvolvimento inicial do conceito (ROBERTSON, 2005). O plasma seminal ou componente não espermático do fluido seminal foi identificado como essencial para a indução da tolerância materna aos antígenos paternos, visto que a excisão das vesículas seminais do macho diminui o efeito da tolerância (ROBERTSON et al., 2009). O plasma seminal contém potentes moléculas imunorregulatórias que contribuem para a indução de células dendríticas tolerogênicas (tDC) e células Treg que são cruciais para o desenvolvimento da tolerância materno-fetal (KIM et al., 2015). Desta forma, tanto o plasma seminal como os espermatozoides do fluido seminal são necessários para conferir tolerância completa e extrair a máxima resposta de células Treg (CLARK, 2011).

Em camundongos, no momento do coito, o plasma seminal e os espermatozoides depositados no lúmen uterino agem sobre o epitélio uterino, macrófagos subendoteliais e DC promovendo o tráfico dessas células e talvez da quimiocina predominante CCL19 através dos vasos linfáticos aferentes até os linfonodos drenantes do útero. Assim, o CCL19 recruta células Treg circulantes que, após ativação, migram para o revestimento uterino por volta do dia 3 de gestação, principalmente por meio da ligação do CCL19 ao receptor CCR7, agindo antes da implantação do embrião semi-alogênico e protegendo o conceito contra a rejeição imunológica (CLARK, 2011).

Evidências clínicas das alterações induzidas pelo fluido seminal favoráveis ao processo de implantação foram demonstradas em 1986, quando pesquisadores depositaram sêmen na vagina de pacientes submetidas à FIV no dia da fertilização do ovócito. Observaram, então, taxa de implantação de 53% em comparação com a taxa de implantação de 23% no grupo controle (BELLINGE et al., 1986). Recentemente, Kim e colaboradores (2015) demonstraram que uma forma solúvel de CD38 (sCD38) é liberada no plasma seminal pelas vesículas seminais, em camundongos e humanos, desempenhando um importante papel na indução de tDC e células Tregs que são necessárias para o desenvolvimento da tolerância materna ao embrião semi-alogênico. Também, em humanos, Crawford e pesquisadores (2014) concluíram que a utilização do plasma seminal pode ser benéfica para melhorar os resultados clínicos em pacientes submetidas ao tratamento de fertilização *in vitro*. Outras evidências foram demonstradas por O'leary e colaboradores (2004) quando a infusão intrauterina de plasma seminal 2 horas antes da IA de leitoas aumentou o número de embriões viáveis nos dias 5 e 9 após IA. Ainda assim, visto que os diferentes tipos de placentação podem afetar grandemente o tipo de resposta imune materna, pouco se sabe a respeito do efeito do fluido seminal na ativação da tolerância materno-fetal em bovinos.

Além da estimulação imunológica decorrente do sêmen, existem estudos que promovem essa estimulação através da administração intrauterina de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Em humanos, estudos têm demonstrado que a administração intrauterina de PBMCs aumenta a taxa de gestação. Um estudo realizado em pacientes que apresentavam abortos de repetição após TE-PIV, onde as PBMCs autólogas foram cultivadas por 48 horas com adição de HCG e administradas intrauterinamente juntamente com PBMCs frescas, obtiveram resultados significativamente superiores para taxa de gestação, implantação e nascimento (41,2; 23,4 e 35,3% respectivamente) quando comparado com pacientes não tratados (11,1; 4,1 e 5,5%, respectivamente) (YOSHIOKA et al., 2006). Outros resultados positivos também foram encontrados por Okitsu e colaboradores (2011) em pacientes que tiveram 3 ou mais falhas de implantação. O grupo tratado com PBMCs autólogas a fresco na cavidade uterina apresentou taxas de gestação e de implantação (42,1% e 25%, respectivamente) maiores que no grupo não tratado (16,7% e 9,4%, respectivamente).

Resultados similares foram encontrados em bovinos (IDETA et al., 2010b), onde PBMCs autólogas cultivadas *in vitro* durante 24 horas foram administradas no corno uterino ipsilateral para o lado do corpo lúteo no dia 4 do ciclo estral (D0 = cio) de vacas receptoras de embrião. A taxa de gestação no dia 60 no grupo tratado com PBMCs foi significativamente mais elevada do que a do grupo não tratado (76,7%, 56/73 vs. 59,7%, 43/72, $p < 0,05$). De forma complementar, resultados encontrados por Ideta e pesquisadores (2010) mostram que o tratamento com PBMCs durante os procedimentos de TE bovina pode induzir a expressão de genes específicos e possivelmente reações imunes no endométrio que aumentam o reconhecimento materno do embrião e seu desenvolvimento precoce durante o período de pré-implantação através de um ambiente uterino condicionado para suportar o desenvolvimento do conceito e a evolução da gestação.

Esses resultados levantam a possibilidade de que várias citocinas produzidas pelas PBMCs desempenham um papel positivo no útero aumentando a receptividade do endométrio uterino e melhorando o desenvolvimento do embrião (IDETA, et al., 2010b; HANSEN, 2011). Em bovinos, entre as citocinas que podem aumentar a percentagem de embriões que se desenvolvem para o estágio de blastocisto *in vitro* são IL-1 β , fator inibidor de leucemia (LIF) e fator estimulador de colônias 2 (CSF2) (HANSEN, 2011). Sabe-se que as citocinas IL-1 α , IL-1 β e IL-8 são expressas pelas PBMCs bovinas desempenhando importantes papéis no desenvolvimento endometrial e embrionário que são necessários para o estabelecimento de uma gestação bem sucedida (IDETA et al., 2010b). Em uma análise de microarranjo realizada por Ideta e colaboradores (2010), em culturas *in vitro* de PBMCs,

revelou que as PBMCs produzem várias citocinas e quimiocinas que podem melhorar o ambiente uterino e que os genes mais fortemente regulados positivamente nessas células são IL1 β , SOD2, e THBS.

Assim, apesar do período de implantação diferir, a administração intrauterina de PBMCs humanas e bovinas antes da TE têm mostrado melhorar a taxa de gestação em ambas as espécies (YOSHIOKA et al., 2006; IDETA et al., 2010b). Segundo Ideta e pesquisadores (2010a), condicionar o ambiente uterino com PBMCs promove o desenvolvimento precoce do concepto bovino durante o período de pré-implantação. Já em humanos, as PBMCs induzem uma diferenciação endometrial que é favorável à implantação do embrião. Portanto, estes trabalhos indicam que a administração de células imunes dentro do útero provoca uma resposta endometrial que é necessária para o estabelecimento de uma gravidez bem sucedida. Assim, condicionar o ambiente uterino com células imunitárias pode aumentar o sucesso gestacional.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente estudo teve como objetivo principal determinar se a administração simultânea ou individual de antígenos paterno (sêmen) e materno (PBMCs) no útero de fêmeas bovinas receptoras de embrião PIV, no dia do estro, aumenta a expressão de genes que podem facilitar o reconhecimento e desenvolvimento do embrião alogênico durante o início da gestação.

3.2 Específicos

- 3.2.1 Determinar os níveis transcricionais que são normalmente expressos de FOXP3, IDO, IL-10 E CSF-1 no útero bovino no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro.
- 3.2.2 Avaliar e comparar o efeito da administração intrauterina de antígenos paterno, materno e de ambos os antígenos na expressão gênica de FOXP3, IDO, IL-10 e CSF-1 no útero bovino sete e quatorze dias após o estro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA), segundo o protocolo número 023/15 (ANEXO A).

4.1 Animais

Foram utilizadas para o experimento 45 fêmeas bovinas cruzadas (mestiças) não gestantes, de idades semelhantes, vacinadas e com a mesma dieta alimentar e hídrica da fazenda Represa no município de Monte Alegre, MG, com o consentimento da proprietária (ANEXO B). Os animais foram mantidos em pasto de *Brachiaria brizantha* (2 UA/ha) sendo oferecido sal mineral (macro e micro) e água *ad libitum*. A água foi ofertada em bebedouro de alvenaria tratado com pastilhas de cloro proveniente de nascente localizada na propriedade. Após o experimento, os animais foram destinados ao confinamento e posterior abate.

As 45 fêmeas selecionadas para a indução imunológica foram divididas em 4 tratamentos:

T0: Grupo com 15 animais controle (Sem tratamento).

T1: Grupo com 10 animais tratados com antígeno paterno (Sêmen).

T2: Grupo com 10 animais tratados com antígeno materno (PBMCs).

T3: Grupo com 10 animais tratados com antígenos paterno e materno.

4.2 Coleta, preparação e armazenamento dos antígenos

4.2.1 Antígeno paterno

O antígeno paterno utilizado no experimento foi o sêmen, constituído pelo plasma seminal e por espermatozoides mortos, pois a intenção da inoculação uterina desses antígenos era promover uma resposta imunológica e não a prenhez.

O sêmen foi coletado de quatro touros doadores com o auxílio de um eletroejaculador e/ou da massagem da vesícula seminal, constituindo um *pool* de células seminais (FIGURA 2). Foram coletados 50 ml de sêmen e como não houve a transferência do embrião para as vacas receptoras, não existiu a necessidade desta coleta ser de apenas um touro doador. Esse *pool* de células seminais foi acondicionado em microtubos contendo 2,0 ml cada e em seguida, congelados a -20°C , onde permaneceram até a data da inoculação uterina, promovendo a preservação dos antígenos e a morte dos espermatozoides.



Figura 2 – Coleta do antígeno paterno. Fonte: Fotografias retiradas durante a coleta de sêmen para o experimento na fazenda Represa no município de Monte Alegre, MG. Acervo pessoal.

4.2.2 Antígeno materno

O antígeno materno utilizado no experimento foram as PBMCs bovinas. O sangue periférico de uma única fêmea bovina doadora de aproximadamente 400 kg, vacinada e saudável foi coletado através da veia mamária com o auxílio de bolsas estéreis de transfusão sanguínea e com anticoagulante CPDA-1 (*Citrate phosphate dextrose-adenine 1*). Foram

coletados 500 ml de sangue a cada 15-20 dias, totalizando 2,5 litros de sangue coletado (FIGURA 3).

As PBMCs foram separadas do sangue periférico da doadora imediatamente após sua coleta por meio do gradiente Ficoll-PaqueTM PLUS, o qual, sob centrifugação, as células com maior densidade depositam-se abaixo do Ficoll e as com baixa densidade formam uma camada logo acima desta solução, resultando na formação de uma nuvem de leucócitos. Para a separação das PBMCs, 15 ml de sangue total foi diluído em um mesmo volume de PBS (Tampão Fosfato-Salino), homogeneizado e depositado cuidadosamente, com o auxílio de uma pipeta pasteur, sobre 15 ml de Ficoll em um tubo Falcon de 50 ml, evitando que o sangue diluído se misture com a solução de Ficoll. Em seguida, os tubos contendo as duas fases foram submetidos a centrifugação a 2.000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, apenas a nuvem de leucócitos formada na interfase entre o plasma e o Ficoll foi coletada e transferida para um tubo Falcon de 15 ml contendo 6,0 ml de PBS de modo a proceder a lavagem dessas células por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. A lavagem foi repetida 2 vezes, sendo de extrema importância para a eliminação do Ficoll que é tóxico para as células. Com a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi resuspendido em 1 ml de PBS. Assim, foi feita a diluição de 1:10 dessas células para a contagem na câmara de Neubauer e as PBMCs foram acondicionadas e alíquotadas em microtubos de 1,0 ml na concentração $(2-4) \times 10^7$ células/ml. Essa concentração foi padronizada com PBS, visto que em um estudo realizado por Ideta e colaboradores (2010b), a administração dessa quantidade de PBMCs no útero de vacas receptoras foi suficiente para a promoção de uma resposta uterina favorável ao estabelecimento da gestação. Ao final do processo, essas células foram congeladas a -20°C , onde permaneceram até a data da inoculação uterina promovendo a preservação dos antígenos (FIGURA 4).



Figura 3 – Coleta do sangue periférico de uma fêmea bovina através da veia mamária com o auxílio de uma bolsa de transfusão sanguínea. Fonte: Fotografias retiradas durante a coleta de sangue para o experimento na fazenda Bom Jardim no município de Uberlândia, MG. Acervo pessoal.

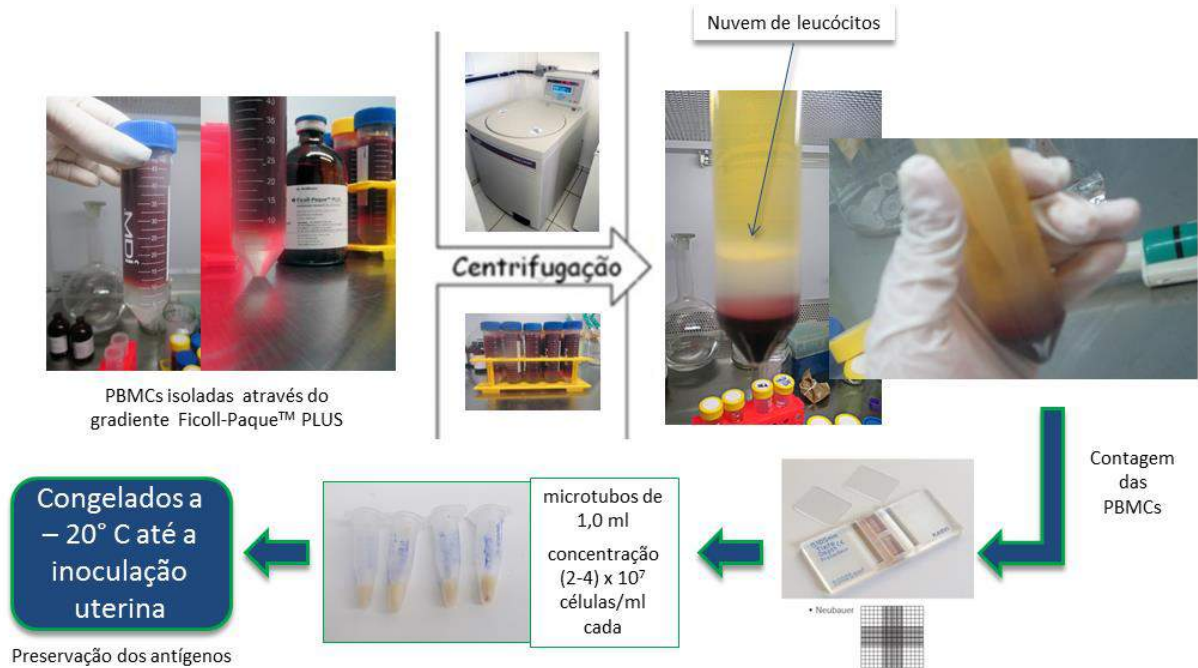


Figura 4 – Separação das PBMCs bovinas do sangue periférico por meio do gradiente Ficoll-Paque™ PLUS para a obtenção do antígeno materno. Fonte: Acervo pessoal.

4.3 Estimulação imunológica das receptoras

4.3.1 Sincronização do estro

As fêmeas foram sincronizadas ao estro, ou seja, ao cio, seguindo um protocolo de duração de 10 dias proposto pelo técnico da empresa fabricante dos hormônios, detalhado na Figura 5. A identificação do cio foi realizada através da visualização macroscópica de muco vaginal característico de estro com o auxílio da técnica da mão enluvada.



Figura 5 – Diagrama esquemático ilustrando o protocolo de sincronização do cio utilizado nas vacas selecionadas para o experimento. No primeiro dia, denominado D0, foi aplicado 2 ml de Benzoato de Estradiol e foi colocado o implante de Progesterona, o qual ficou na vaca durante 8 dias proporcionando o desenvolvimento do CL que em 7 dias se torna responsável à PG. Assim, no dia 8 (D8) foi feita a remoção desse implante e foi aplicado 1,0 ml de Prostaglandina Sintética para promover a lise do CL e também, foi aplicado 1,5 ml de Gonadotrofina Sérica Equina para estimular a síntese de FSH e LH. No dia 9 (D9) foi aplicado 1 ml de Benzoato de Estradiol para induzir a ovulação e, dessa forma, no dia 10 (D10) foi identificado o cio. Fotografias retiradas durante a realização desse protocolo e durante a identificação do cio no D10 do protocolo através da visualização de muco vaginal característico de cio com o auxílio da técnica da mão enluvada na fazenda Represa no município de Monte Alegre, MG. Acervo pessoal.

4.3.2 Administração intrauterina dos antígenos nas receptoras

Os animais que manifestaram cio no dia 10 do protocolo de sincronização receberam a estimulação imunológica. Os antígenos foram inoculados no corpo uterino das vacas com o auxílio de uma sonda de infusão intrauterina bovina (FIGURA 6).

As receptoras selecionadas para a estimulação imunológica receberam o mesmo volume de antígenos de acordo com o tratamento eleito para cada animal da seguinte forma:

T0: 4,0 ml de PBS.

T1: 2,0 ml de sêmen + 2,0 ml de PBS.

T2: 1,0 ml de PBMCs na concentração de $(2-4) \times 10^7$ células/ml + 3,0 ml de PBS.

T3: 2,0 ml de sêmen + 1,0 ml de PBMCs na concentração de $(2-4) \times 10^7$ células/ml + 1,0 ml de PBS.



Figura 6 – Administração dos antígenos no corpo uterino das vacas no dia do cio com o auxílio de uma sonda de infusão intrauterina bovina. Fotografias retiradas durante a realização dessa etapa do experimento na fazenda Represa no município de Monte Alegre, MG. Acervo pessoal.

4.4 Biópsia uterina *in vivo*

Biópsias uterinas *in vivo* foram coletadas das fêmeas bovinas no dia do cio (D0), em vacas sem tratamento, e sete (D7) e quatorze (D14) dias após o cio e a infusão dos antígenos. O número de animais coletados de cada tratamento e o dia são detalhados na Tabela 1. Toda fêmea bovina, após a coleta da biópsia, foi descartada do experimento para evitar a interferência de processos inflamatórios, ou seja, a biópsia foi coletada uma única vez de cada animal.

Tabela 1 – Delineamento da coleta das biópsias uterinas por dia, tratamento e quantidade de fêmeas bovinas.

Tratamento	Quantidade de Fêmeas Bovinas		
	Biópsia D0 Dia do estro	Biópsia D7 Pós-estro e tratamento	Biópsia D14 Pós-estro e tratamento
T0	5	5	5
T1		5	5
T2		5	5
T3		5	5

Para a coleta das biópsias uterinas, as fêmeas foram imobilizadas em tronco de contenção e anestesiadas com cloridrato de xilazina 2% via epidural. A coleta das biópsias foi realizada no corpo uterino com o auxílio de uma pinça para biópsia uterina bovina, utilizada em procedimentos rotineiros por médicos veterinários para análises patológicas. Um pequeno fragmento de aproximadamente 3 mm³ de tecido uterino foi coletado de cada animal e destinado a análise molecular de expressão gênica (FIGURA 7).

Essas biópsias foram acondicionadas, logo após a coleta, em microtubos RNase/DNase-free contendo 1:5 wt/vol de solução estabilizadora de RNA, RNAlater da Ambion®. Durante o transporte, as amostras foram mantidas em caixa de isopor contendo gelo e, posteriormente foram mantidas *overnight* a - 4°C em geladeira para a penetração total do RNAlater no tecido, como manda o protocolo do fabricante. Após esse período de penetração, as biópsias foram estocadas no ultrafreezer a -80°C até a data do processamento das amostras (FIGURA 8).

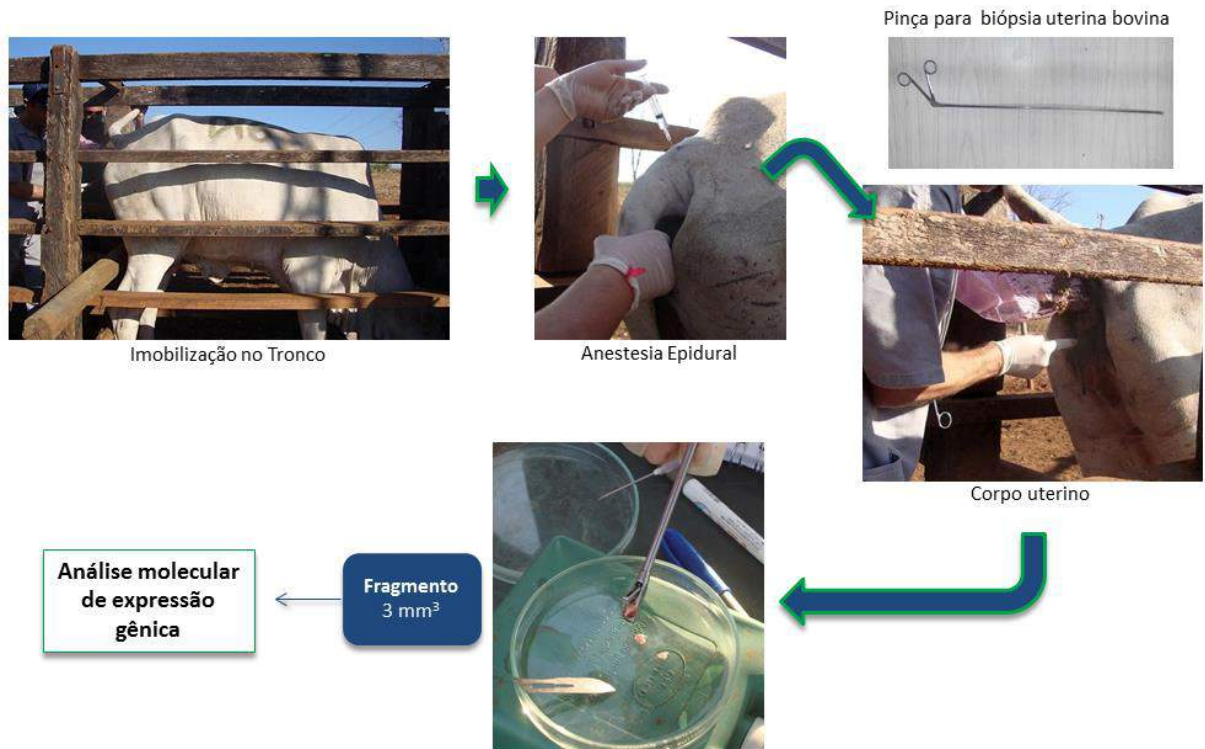


Figura 7 – Procedimento de coleta das biópsias uterinas bovinas utilizadas no trabalho. Fotografias retiradas durante o processo de coleta dos fragmentos uterinos na fazenda Represa no município de Monte Alegre, MG. Acervo pessoal.



Figura 8 – Preparação, acondicionamento e estocagem das biópsias uterinas. Fotografias retiradas durante o acondicionamento em campo e estocagem no laboratório. Acervo pessoal.

4.5 RT-qPCR

4.5.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)

As sequências dos genes alvos foram obtidas pelo site da *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Os iniciadores ou *primers* foram desenhados com o auxílio da ferramenta de *design de primers*, *PrimerQuest® Tool*, da empresa Integrated DNA Technologies (IDT®). Os parâmetros escolhidos foram definidos para *qPCR Intercalating Dyes*, levando em consideração os seguintes fatores: temperatura de *melting* de 60°C, porcentagem de bases GC de 50%, tamanho do primer de 18-22pb e tamanho do *amplicon* de 80 a 100pb. Em seguida, para seleção do melhor *primer*, utilizou-se o programa *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, tal que *primers* de menor *expect-value* (e-value) foram finalmente selecionados, levando em consideração, também, parâmetros como a quantidade de estruturas secundárias formadas (THORNTON; BASU, 2011). A curva de eficiência dos *primers* foi realizada com 5 pontos e fator de diluição 1:4, tendo como ponto inicial a concentração de 2000 ng de cDNA. A Tabela 2 detalha os *primers forward* e *reverse* empregados no estudo de acordo com os parâmetros acima mencionados.

Tabela 2 – Sequência dos *primers forward* e *reverse* com suas respectivas referências e eficiências.

Gene (<i>Bos taurus</i>)	Sequência	Referência IDT	Referência NCBI	Eficiência
FOXP3 F	TAGGAAAGACAGCACCTT	128613172	NM_001045933.1	1,96
FOXP3 R	CCTTGAAGACCTTCTCACATC	128613173	NM_001045933.1	
IDO F	CTACGTGTGGAAGTTGAGAAG	128613174	NM_001101866.2	1,98
IDO R	GTGATGTATCCCAGAACCAAG	128613175	NM_001101866.2	
IL-10 F	AGCCATGAGTGAGTTTGAC	128613176	NM_174088.1	2,08
IL-10 R	GGAGGTCTTCTTCCCTAGAA	128613177	NM_174088.1	
CSF-1 F	CTAACATAGCCCTGGAAGAG	128613180	NM_174026.1	2,06
CSF-1 R	CCCAGACTGTAGAAGGAAAG	128613181	NM_174026.1	
SUZ 12 F	GAAGATGGAGAAGTGAACA	121266340	NM_001205587.1	2,12
SUZ 12 R	GACGGAGAGGTAAACAAGTATC	121266341	NM_001205587.1	

F – Primer Forward

R – Primer Reverse

4.5.2 Extração de RNA

As extrações de RNAs das amostras de tecido uterino foram realizadas no aparelho Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA) juntamente com o kit de extração de RNA de tecido Maxwell® 16 LEV simply RNA Tissue Kit (Referência: AS1280, Promega, Madison, WI, USA). Todas as etapas seguiram as recomendações do fabricante, bem como foram utilizadas todas as soluções disponíveis no kit. Em resumo, a solução estabilizadora de RNA foi retirada das biópsias uterinas por meio de 3 lavagens em PBS antes da pesagem. Após a pesagem, utilizando no máximo 50 mg de tecido por reação, cada amostra foi macerada em ambiente refrigerado em meio contendo 200 µl de solução de homogeneização (1mL de solução de homogeneização para cada 20µl de 1-tioglicerol) com auxílio do Pellet Pestles® (Sigma Aldrich). Seguida a adição de 200µl de tampão de lise, as amostras foram agitadas em vortex por 15s, centrifugadas a 1000xg por 2 minutos a 4°C e os sobrenadantes coletados (400µl) e colocados nas *cartridges* (suporte disponível no kit). Posteriormente, as *cartridges* com todos os reagentes preparados foram colocadas dentro do aparelho Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA) para extração dos RNAs. Ao final, o RNA total eluído de cada amostra foi alíquotado e posteriormente quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® ND1000, utilizando a relação 260/280 (índice de absorbância variando de 1,6 a 2,1) e 260/230 (índice de absorbância variando de 1,9 a 2,4) como controle de qualidade. Todos os RNAs foram armazenados em ultrafreezer a -80°C até a transcrição reversa.

4.5.3 Transcrição reversa

Utilizou-se o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Referência: A5001, Promega, Madison, WI, USA) para a síntese de DNA complementar (cDNA). Todas as etapas foram seguidas de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, para cada amostra, 7µl de Primer Mix (1µl de Oligo DT, 1µl de Random Primer e 5µl de RNA total, utilizando no máximo 500 ng de RNA por reação, foi incubado a 70°C por 5 minutos) e 13µl de RT Mix (5µl de água livre de RNase, 4µl de 5X Reaction Buffer, 1µl de dNTP Mix, 1,5µl de MgCl₂ (1,5mM), 0,5µl de RNasin e 1µl de Enzima RT) foram misturados e incubados em termociclador por 1 hora a 42°C e então por 10 minutos a 70°C para a desnaturação da enzima transcriptase reversa. Ao final, o cDNA de cada amostra foi alíquotado, quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® ND1000 (índices de absorbância variando de 1,6 a 2,1 para

os índices 260/280 e de 1,9 a 2,1 para os índices 260/230) e armazenado em freezer a -20°C até a utilização em PCR em tempo real.

4.5.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR

A quantificação da expressão relativa dos genes FOXP3, IDO, IL-10 e CSF-1 foram realizados no aparelho StepOnePlus™ *Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) através do método comparativo de *threshold cycles* (Ct). Todos os experimentos realizados foram montados em placas de 96 poços MicroAmp® Fast Optical, 0,1ml (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Para a montagem dessas placas, empregou-se o Software StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata com apenas 1 controle negativo para cada gene. As condições da reação foram determinadas em ciclos previamente padronizados de 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para determinação da curva de *melting*, empregaram-se ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. A reação teve um tempo total de corrida de aproximadamente 2 horas.

Para a reação, utilizou-se o GoTaq® qPCR Master Mix (Referência: A6001, Promega, Madison, WI, USA), que contém sondas com propriedades espectrais semelhante ao SYBR® Green I com excitação a 493nm e emissão a 530nm. As proporções dos reagentes utilizados no mix para cada amostra foram as seguintes: 6µl de GoTaq® qPCR Master Mix, 0,5µl de *primer forward*, 0,5µl de *primer reverse* e 2,0µl de água livre de RNase, totalizando 9 µl de mix em cada poço. A quantidade de cDNA padronizada para as reações foi de 300ng, portanto, 3 µl de cDNA na concentração de 100ng/µl foi adicionado em cada poço, totalizando 12µl de reação.

O resultado da qPCR foi analisado tendo por base o princípio de que o Ct (*Cycle Threshold*) é proporcional ao logarítmo da quantidade inicial de expressão do gene alvo (FOXP3, IDO, IL-10 e CSF-1) em uma determinada amostra e normalizado com o valor do Ct do gene controle de referência nesta mesma amostra. A escolha do gene endógeno SUZ12 (TABELA 2) como gene de referência para a normalização dessa reação foi devido a obtenção dos menores índices de variações entre as amostras. De acordo com os resultados obtidos por Walker e colaboradores (2009), o SUZ12 é proposto como o gene controle mais adequado para uso no endométrio bovino durante o início da gestação ou ciclo estral. Além disso, a média da quantidade de cada transcrito encontrada nos úteros sem tratamento foi

utilizada como calibrador ou controle da qPCR, aumentando ainda mais a complexidade do processo de quantificação relativa do gene alvo com um controle não tratado. Também, os valores da eficiência dos primers foram levados em consideração e, deste modo, a expressão relativa de cada alvo em cada amostra foi determinada com base no seguinte modelo matemático de Pfaffl (2007): $Ratio = (E_{target})^{\Delta CT_{target} (control - sample)} / (E_{ref})^{\Delta CT_{ref} (control - sample)}$, considerando as médias das duplicatas.

4.6 Estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para a definição do teste estatístico empregado na análise, utilizou-se previamente o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para as análises de múltiplas comparações, empregou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn ou *One Way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. Alguns dados foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão e outros na forma de mediana \pm *range*. Em todas as análises, valores de $0,1 > p > 0,05$ e $p < 0,05$ foram definidos como sendo tendência e estatisticamente significativa, respectivamente (QUINN; KEOUGH, 2002; IQBAL et al., 2014).

5 RESULTADOS

5.1 Análise Molecular

5.1.1 *Quantificação relativa de transcritos de Forkhead Box P3 (FOXP3)*

A análise da expressão gênica relativa de FOXP3 no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro é mostrada na Figura 9. Presume-se que, normalmente, a expressão de FOXP3 se mantenha constante ao longo dos dias trabalhados, visto que no útero de vacas sem tratamento não foi observada diferença significativa entre a quantidade de transcritos de FOXP3 nos dias analisados.

Os dados referentes a análise semiquantitativa da expressão gênica relativa de FOXP3 entre os grupos controle e tratado, assim como entre os tratamentos, tanto sete quanto quatorze dias após a infusão dos antígenos, podem ser observados na Figura 10. Os tratamentos com antígeno materno, antígeno paterno e com ambos os antígenos não promoveram diferença estatística na quantidade de transcritos de FOXP3 entre as vacas controle e as tratadas, tanto sete (FIGURA 10A) quanto quatorze (FIGURA 10B) dias após a inoculação dos antígenos. Também, a análise comparativa entre os tratamentos mostrou que a quantidade de transcritos de FOXP3 não foi estatisticamente diferente entre os tratamentos, tanto sete (FIGURA 10A) quanto quatorze (FIGURA 10B) dias após a infusão antigênica.

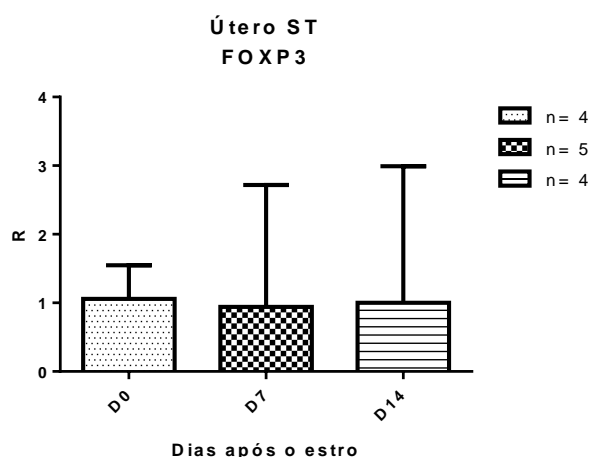


Figura 9: Quantificação relativa de transcritos de FOXP3 em útero de vacas sem tratamento no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro. Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, $p < 0,05$. As barras representam as medianas \pm range. FOXP3 = *Forkhead Box P3*. ST = Sem tratamento. R = Ratio. D0 = Dia do estro. D7 = Sete dias após o estro. D14 = Quatorze dias após o estro. n = n amostral.

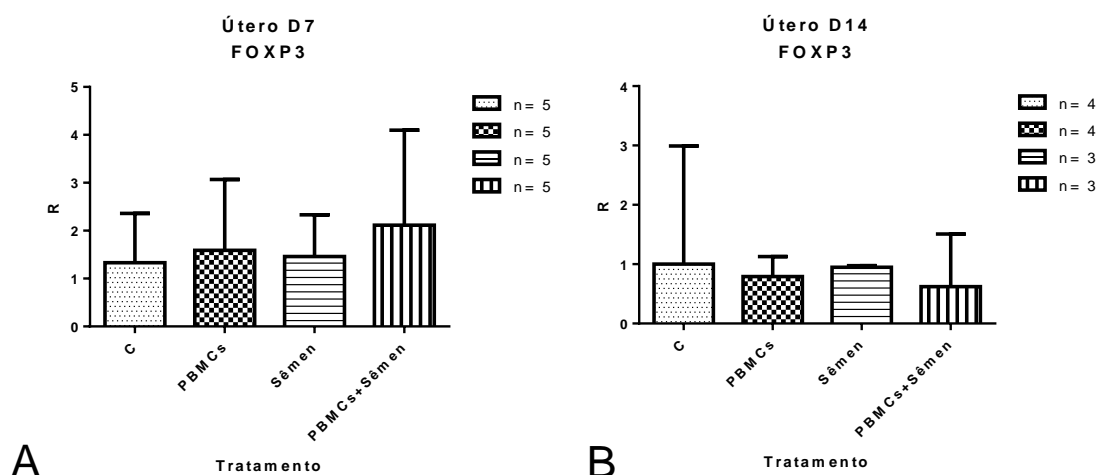


Figura 10: Quantificação relativa de transcritos de FOXP3 em útero de vacas controle e tratadas, 7 (A) e 14 (B) dias após o tratamento com antígeno materno (PBMCs), paterno (Sêmen) e com ambos os antígenos (PBMCs+Sêmen). ANOVA e pós-teste de Tukey's ou Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, $p < 0,05$. As barras representam médias \pm SD (A) ou medianas \pm range (B). FOXP3 = *Forkhead Box P3*. R = Ratio. C = Controle (sem tratamento). PBMCs = Células mononucleares do sangue periférico bovino. D7 = Sete dias após o estro e o respectivo tratamento. D14 = Quatorze dias após o estro e o respectivo tratamento. n = n amostral.

5.1.2 Quantificação relativa de transcritos da Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO)

A análise da expressão gênica relativa da IDO no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro é mostrada na Figura 11. Presume-se que, normalmente, a expressão da IDO se mantenha constante ao longo dos dias trabalhados, visto que no útero de vacas sem tratamento não foi observada diferença significativa entre a quantidade de transcritos da IDO nos dias analisados.

Os dados referentes a análise semiquantitativa da expressão gênica relativa da IDO entre os grupos controle e tratado, assim como entre os tratamentos, tanto sete quanto quatorze dias após a infusão dos antígenos, podem ser observados na Figura 12. Os tratamentos com antígeno materno, antígeno paterno e com ambos os antígenos não promoveram diferença estatística na quantidade de transcritos da IDO entre as vacas controle e as tratadas, tanto sete (FIGURA 12A) quanto quatorze (FIGURA 12B) dias após a inoculação dos antígenos. Também, a análise comparativa entre os tratamentos mostrou que a quantidade de transcritos de IDO não foi estatisticamente diferente entre os tratamentos, tanto sete (FIGURA 12A) quanto quatorze (FIGURA 12B) dias após a infusão antigênica.

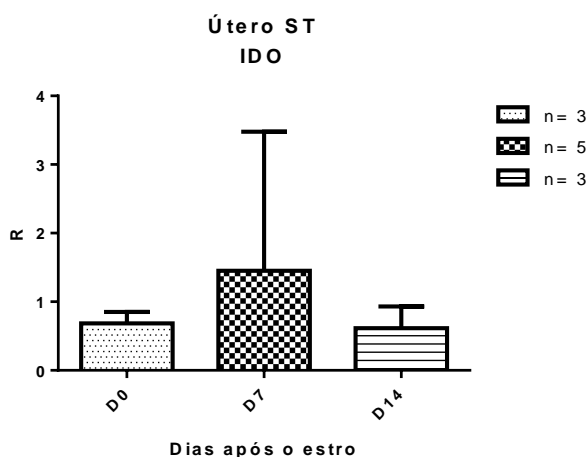


Figura 11: Quantificação relativa de transcritos de IDO em útero de vacas sem tratamento no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro. Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, $p < 0,05$. As barras representam medianas \pm range. IDO = Indoleamina 2,3 dioxigenase. ST = Sem tratamento. R = Ratio. D0 = Dia do estro. D7 = Sete dias após o estro. D14 = Quatorze dias após o estro. n = n amostral.

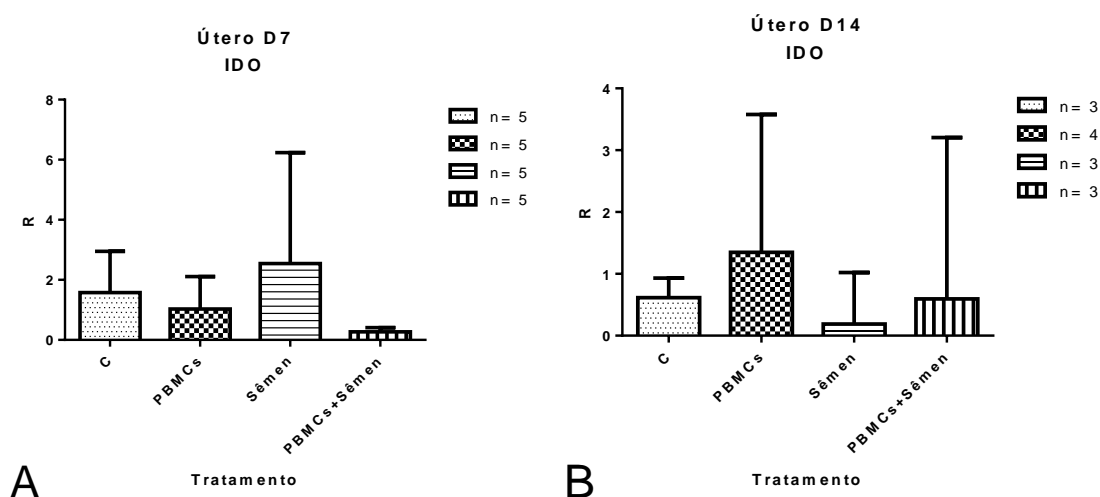


Figura 12: Quantificação relativa de transcritos de IDO em útero de vacas controle e tratadas, 7 (A) e 14 (B) dias após o tratamento com antígeno materno (PBMCs), paterno (Sêmen) e com ambos os antígenos (PBMCs+Sêmen). ANOVA e pós-teste de Tukey's ou Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, $p < 0,05$. As barras representam médias \pm SD (A) ou medianas \pm range (B). IDO = Indoleamina 2,3 dioxigenase. R = Ratio. C = Controle (sem tratamento). PBMCs = Células mononucleares do sangue periférico bovino. D7 = Sete dias após o estro e o respectivo tratamento. D14 = Quatorze dias após o estro e o respectivo tratamento. n = n amostral.

5.1.3 Quantificação relativa de transcritos de Interleucina 10 (IL-10)

A análise da expressão gênica relativa de IL-10 no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro é mostrada na Figura 13. Presume-se que, normalmente, a expressão de IL-10 se mantenha constante ao longo dos dias trabalhados, visto que no útero de vacas sem tratamento não foi observada diferença significativa entre a quantidade de transcritos de IL-10 nos dias analisados.

Os dados referentes a análise semiquantitativa da expressão gênica relativa de IL-10 entre os grupos controle e tratado, assim como entre os tratamentos, tanto sete quanto quatorze dias após a infusão dos antígenos, podem ser observados na Figura 14. Os tratamentos com antígeno materno, antígeno paterno e com ambos os antígenos não promoveram diferença estatística na quantidade de transcritos de IL-10 entre as vacas controle e as tratadas, tanto sete (FIGURA 14A) quanto quatorze (FIGURA 14B) dias após a inoculação dos antígenos. No entanto, quatorze dias após o tratamento com ambos os antígenos (FIGURA 14B), nota-se que existe uma tendência desse tratamento em promover uma diminuição na quantidade de transcritos de IL-10 em relação aos úteros de vacas controle ($p \text{ value} = 0.0795$). Também, a análise comparativa entre os tratamentos mostrou que a

quantidade de transcritos de IL-10 não foi estatisticamente diferente entre os tratamentos, tanto sete (FIGURA 14A) quanto quatorze (FIGURA 14B) dias após a infusão antigênica.

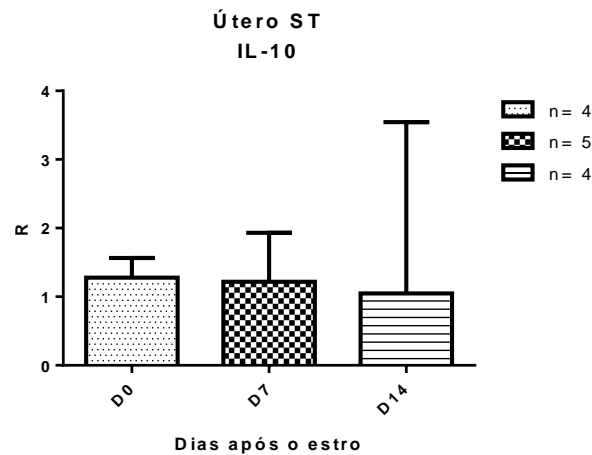


Figura 13: Quantificação relativa de transcritos de IL-10 em útero de vacas sem tratamento no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro. Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, $p < 0,05$. As barras representam medianas \pm range. IL-10 = Interleucina 10. ST = Sem tratamento. R = Ratio. D0 = Dia do estro. D7 = Sete dias após o estro. D14 = Quatorze dias após o estro. n = n amostral.

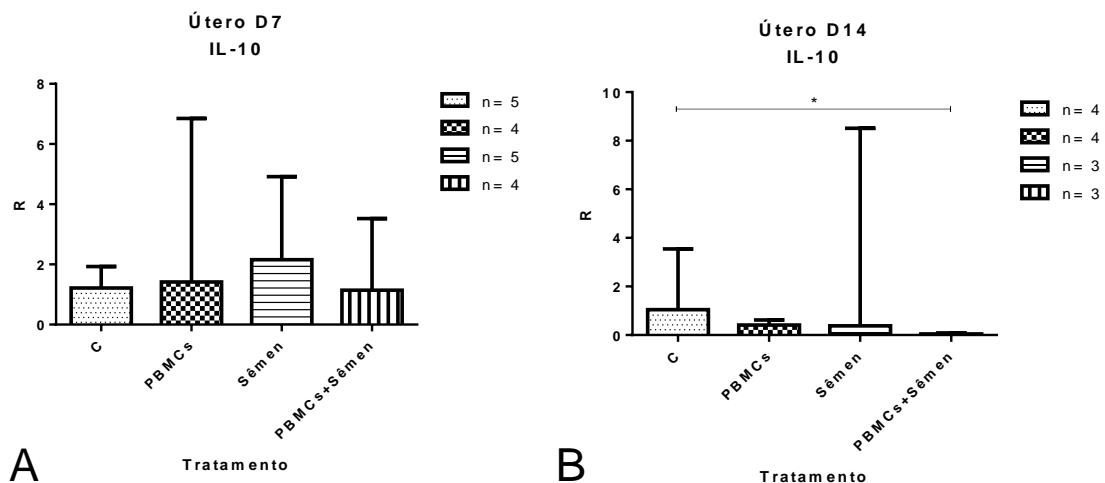


Figura 14: Quantificação relativa de transcritos de IL-10 em útero de vacas controle e tratadas, 7 (A) e 14 (B) dias após o tratamento com antígeno materno (PBMCs), paterno (Sêmen) e com ambos os antígenos (PBMCs+Sêmen). Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, $p < 0,05$. As barras representam medianas \pm range. IL-10 = Interleucina 10. R = Ratio. C = Controle (sem tratamento). PBMCs = Células mononucleares do sangue periférico bovino. D7 = Sete dias após o estro e o respectivo tratamento. D14 = Quatorze dias após o estro e o respectivo tratamento. n = n amostral. * = $p < 0,1$.

5.1.4 Quantificação relativa de transcritos do Fator Estimulador de Colônias 1 (CSF-1)

A análise da expressão gênica relativa de CSF-1 no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro é mostrada na Figura 15. Presume-se que, normalmente, a expressão de CSF-1 se mantenha constante ao longo dos dias trabalhados, visto que no útero de vacas sem tratamento não foi observada diferença significativa entre a quantidade de transcritos de CSF-1 nos dias analisados.

Os dados referentes a análise semiquantitativa da expressão gênica relativa de CSF-1 entre os grupos controle e tratado, assim como entre os tratamentos, tanto sete quanto quatorze dias após a infusão dos antígenos, podem ser observados na Figura 16. Os tratamentos com antígeno materno, antígeno paterno e com ambos os antígenos não promoveram diferença estatística na quantidade de transcritos de CSF-1 entre as vacas controle e as tratadas sete dias após a inoculação dos antígenos (FIGURA 16A). No entanto, quatorze dias após os tratamentos com antígeno materno e com ambos os antígenos (FIGURA 16B), a quantidade de transcritos de CSF-1 foi significativamente menor do que no útero de vacas controle, ambos com $p \text{ value} = 0.0286$. Nota-se, também, que quatorze dias após o tratamento com antígeno paterno (FIGURA 16B), existe uma tendência dele em promover uma diminuição na quantidade de transcritos de CSF-1 em relação ao controle ($p \text{ value} = 0.0571$). Além disso, a análise comparativa entre os tratamentos mostrou que a quantidade de transcritos de CSF-1 não foi estatisticamente diferente entre os tratamentos, tanto sete (FIGURA 14A) quanto quatorze (FIGURA 14B) dias após a infusão antigênica.

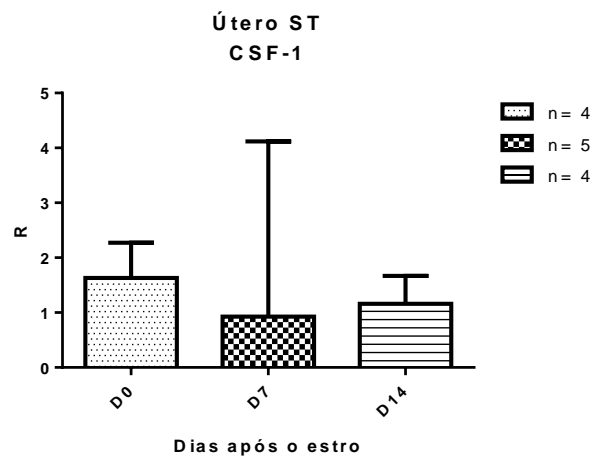


Figura 15: Quantificação relativa de transcritos de CSF-1 em útero de vacas sem tratamento no dia do estro, sete e quatorze dias após o estro. Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, $p < 0,05$. As barras representam medianas \pm range. CSF-1 = Fator de crescimento estimulador de colônias 1. ST = Sem tratamento. R = *Ratio*. D0 = Dia do estro. D7 = Sete dias após o estro. D14 = Quatorze dias após o estro. n = n amostral.

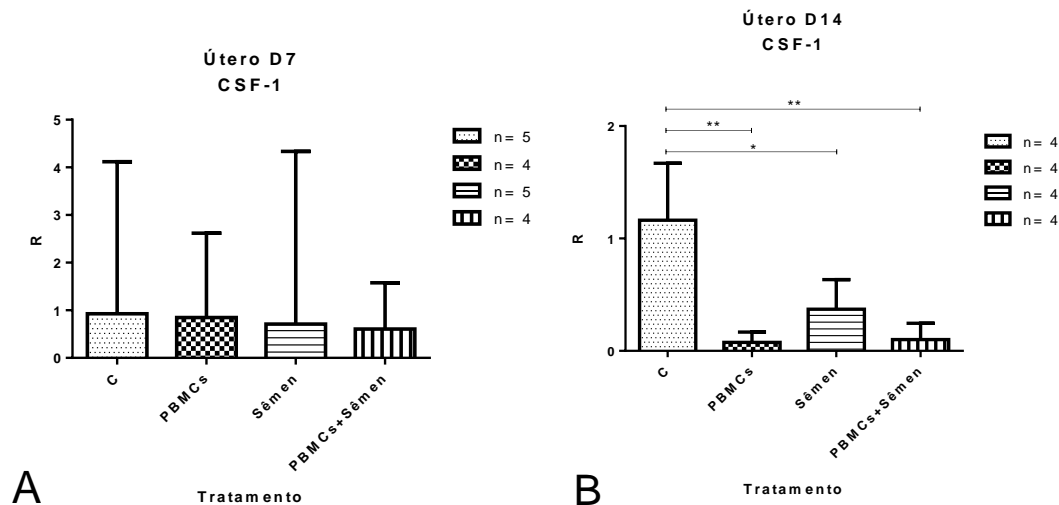


Figura 16: Quantificação relativa de transcritos de CSF-1 em útero de vacas controle e tratadas, 7 (A) e 14 (B) dias após o tratamento com antígeno materno (PBMCs), paterno (Sêmen) e com ambos os antígenos (PBMCs+Sêmen). Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, $p < 0,05$. As barras representam medianas \pm range. CSF-1 = Fator estimulador de colônias 1. R = *Ratio*. C = Controle (sem tratamento). PBMCs = Células mononucleares do sangue periférico bovino. D7 = Sete dias após o estro e o respectivo tratamento. D14 = Quatorze dias após o estro e o respectivo tratamento. n = n amostral. * = $p < 0,1$. ** = $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Considerando a importância mundial da bovinocultura e da utilização da TE-PIV para a produção de animais geneticamente superiores, as altas taxas de perda gestacional constituem um fator limitante para o sucesso da produção, progresso genético e eficiência econômica na indústria de criação (DUNNE et al., 2000; HANSEN; BLOCK, 2004; BERG et al., 2010). A investigação das possíveis causas e mecanismos que medeiam a perda gestacional após TE, assim como o aprimoramento da técnica e a manipulação da receptora são de extrema importância para o aumento da taxa de nascimento de bezerros provenientes de TE-PIV. Visto que as perdas gestacionais ocorrem principalmente devido a um ambiente intrauterino inadequado (HANSEN; BLOCK, 2004; BERG et al., 2010; IDETA et al., 2010b; MINTEN et al., 2013) e que a manipulação da receptora pode melhorar a sobrevivência embrionária após TE (IDETA et al., 2010b), esse estudo teve como foco principal determinar se a administração simultânea de antígenos paterno (sêmen) e materno (PBMCS) no útero de fêmeas bovinas receptoras de embrião PIV, no dia do estro, aumenta a expressão de genes que podem facilitar o reconhecimento e desenvolvimento do embrião alogênico durante o início da gestação.

Normalmente, o embrião se comporta no organismo materno como um enxerto semi-alogênico, estando, portanto, vulnerável às teorias de rejeição e tolerância imunológica (BILLINGHAM et al., 1953). Pode-se dizer que ao usarmos uma fêmea bovina como receptora de um embrião provindo de uma doadora de ovócitos, a resposta imunológica materna frente a esse embrião totalmente alogênico será mais intensa do que aquela decorrente da monta natural ou IA, uma vez que o sistema imune da receptora é desafiado com moléculas MHC tanto paternas quanto maternas do embrião, e assim, presume-se que a sensibilização da receptora contra tais antígenos pode ser uma das causas das altas taxas de perdas gestacionais observadas após TE. Logo, acredita-se que o embrião PIV seja mais vulnerável às teorias de rejeição imunológica do que o embrião semi-alogênico advindo da monta natural ou IA, sendo necessário algum mecanismo que impeça a rejeição do embrião pela “mãe” e estabeleça a tolerância imunológica transitória ao conceito necessária para o estabelecimento e manutenção da gestação.

Estudos realizados em humanos (BELLINGE et al., 1986; YOSHIOKA et al., 2006; OKITSU et al., 2011; CRAWFORD et al., 2014), camundongos (CLARK, 2011; KIM et al., 2015), suínos (O'LEARY et al., 2004) e bovinos (IDETA et al., 2010a, 2010b) têm

demonstrado que a sensibilização com antígenos do conceito pode ser uma maneira útil de afetar o desempenho reprodutivo facilitando a aceitação materna do embrião alogênico e seu desenvolvimento através da indução de citocinas e células imunorregulatórias no microambiente uterino. Nesse sentido, a sensibilização da receptora bovina com antígenos do embrião PIV, provenientes das PBMCs da doadora do ovócito e do sêmen contendo espermatozóides mortos do touro usado na fecundação, pode favorecer o reconhecimento e o desenvolvimento da tolerância materna aos aloantígenos do embrião com implicações diretas no sucesso gestacional.

O conhecimento do momento no qual as perdas gestacionais ocorrem é de suma importância para a investigação e desenvolvimento de estratégias que evitem a morte embrionária e fetal. Estudos realizados em bovinos têm demonstrado que a maioria das perdas gestacionais ocorre ao longo das duas primeiras semanas de desenvolvimento embrionário, particularmente entre os dias 7 e 16 de gestação (ROCHE et al., 1981; DUNNE et al., 2000; BERG et al., 2010; MINTEN et al., 2013; KIMURA; MATSUYAMA, 2014). Assim sendo, as biópsias uterinas coletadas 7 dias após a estimulação imunológica foram utilizadas para avaliar os efeitos do tratamento no ambiente uterino da receptora no momento em que ocorreria o procedimento de TE-PIV e as realizadas no dia 14 foram utilizadas para avaliar os efeitos do tratamento no ambiente uterino durante o período no qual o embrião já teria iniciado seu crescimento pré-implantação e estaria próximo ao início do processo de reconhecimento materno da gestação. A total dependência do embrião bovino, após eclodir da zona pelúcida, do ambiente uterino para sobreviver e realizar seu crescimento pré-implantação o torna susceptível a morte por qualquer comprometimento na adequabilidade do ambiente intrauterino presente no momento da TE (FERREIRA, 2010; KIMURA; MATSUYAMA, 2014).

A expressão gênica uterina de FOXP3, IDO, IL-10 e CSF-1 durante o início da gestação parece ser consequência de um mecanismo imunomodulatório ajustado durante a gravidez favorável ao estabelecimento de um ambiente intrauterino adequado para tolerar e permitir o desenvolvimento do embrião alogênico. No presente estudo, transcritos de FOXP3, IDO, IL-10 e CSF-1 foram detectados em todas as amostras de RNA extraídas das biópsias uterinas. A análise semiquantitativa da expressão gênica relativa entre os grupos controle e tratados, tanto sete quanto quatorze dias após a infusão dos antígenos, mostrou que nenhum dos tratamentos promoveu aumento significativo na expressão desses genes. No geral, a expressão gênica dos alvos foi variável entre os tratamentos e os dias, no entanto, não houve diferença estatística entre as quantidades de transcritos entre os grupos controle e tratados,

com exceção dos tratamentos com antígeno materno e com ambos os antígenos que promoveram uma diminuição significativa na quantidade de transcritos de CSF-1 quatorze dias após a inoculação dos antígenos. Nota-se, também, que 14 dias após a infusão antigênica existe uma tendência dos tratamentos com antígeno paterno e com ambos os antígenos em promover uma diminuição na quantidade de transcritos de CSF-1 e IL-10, respectivamente.

Pelo menos no que se refere ao tratamento com antígeno materno, alguns resultados podem estar de acordo com a constatação de Ideta e colaboradores (2010a) de que a administração intrauterina de PBMCs autólogas cultivadas por 24h no dia 3 do ciclo estral em novilhas receptoras não promove diferença na abundância de transcritos de FOXP3 e IL-10 entre os grupos controle e tratado nas células linfóides do lúmen endometrial no dia 9 do ciclo estral. Por outro lado, nesse mesmo estudo, a expressão de CSF-1 foi significativamente maior no grupo tratado com PBMCs do que no grupo controle, podendo, assim, nossos resultados observados tanto no dia 7, que não apresentou diferença estatística, como no dia 14, que apresentou uma queda na quantidade de transcritos de CSF-1, estarem em desacordo com os obtidos nesse experimento. É importante notar que no presente trabalho não foram utilizadas PBMCs autólogas, mas sim PBMCs de uma fêmea bovina doadora, o que de fato, impede uma comparação precisa com os resultados obtidos por Ideta e colaboradores (2010a), entre outras diferenças existentes nas condições de realização desse experimento. Não existe nenhum trabalho publicado analisando os efeitos da administração intrauterina de PBMCs provenientes de outro indivíduo não idêntico, mas sabe-se que essa administração aumenta a exposição da receptora a aloantígenos (MAGALHÃES; BOHLKE; NEUBARTH, 2004) e consequentemente, a resposta imune pode ser diferente daquela decorrente da administração de PBMCs autólogas.

A ausência de diferença estatística entre a maioria dos grupos analisados pode ser atribuída à variação na expressão individual de cada um dos genes nas amostras investigadas, o que de fato se mostrou alta para todos os genes avaliados. Além disso, essa variação pode ser relacionada às diferenças existentes de compatibilidade entre os doadores de sêmen e PBMCs e as respectivas receptoras (MAGALHÃES; BOHLKE; NEUBARTH, 2004), o que realmente pode ter gerado os grandes desvios padrão observados nas análises estatísticas. As amostras que apresentaram altos coeficientes de variação entre as amostras de um mesmo tratamento foram consideradas como *outliers* e, portanto, foram excluídas da análise, reduzindo muito a quantidade de dados analisados e, por consequência, ocasionando um viés de amostra. Uma possível explicação para esse alto coeficiente de variação observado na expressão de cada gene entre as amostras do mesmo grupo de tratamento pode ser atribuído a

diferenças existentes de expressão gênica entre as regiões intercarunculares e carunculares do endométrio bovino. Sabe-se que o impacto da gestação sobre a função da resposta imune é mais proeminente nas áreas carunculares, onde ocorrem os eventos que envolvem a implantação e placentação, por outro lado, a regulação da função metabólica é mais afetada nas zonas intercarunculares, provavelmente em consonância com a atividade secretora das glândulas endometriais que estão localizadas exclusivamente nesta região (MANSOURI-ATTIA et al., 2009). Com certeza, a impossibilidade do controle da região uterina, caruncular ou intercaruncular, a ser coletada no momento da biópsia *in vivo* contribuiu para o desenvolvimento desse viés amostral.

Interessante notar que, quatorze dias após a infusão dos antígenos, todos os tratamentos promoveram uma queda na quantidade de transcritos de CSF-1. Durante a gestação em bovinos, a atividade do CSF-1 vai além do recrutamento dos importantes macrófagos uterinos (ARCECI et al., 1989; COHEN et al., 1999; IDETA et al., 2010a), desempenhando um papel essencial no crescimento e desenvolvimento do trofoblasto, sendo notável para o estabelecimento e manutenção da gestação, visto que ele é sintetizado no endométrio concomitantemente com a expressão de CSF-1R no trofoblasto, tanto no período pré-implantação quanto no pós-implantação, aumentando ao longo da gestação (BEAUCHAMP; CROY, 1991; OSHIMA et al., 2003). Acredita-se que a gestação se torne mais estável por volta do 2-3º mês, quando a incidência de abortos após TE parece diminuir e, justamente, quando a expressão de CSF-1 nos tecidos uteroplacentários e a expressão de CSF-1R no trofoblasto atingem níveis altos (OSHIMA et al., 2003). Dessa forma, no que se refere a expressão gênica de CSF-1 no endométrio bovino durante a gestação, os resultados obtidos no presente estudo nos permite sugerir que pode existir um efeito negativo da administração intrauterina simultânea ou isolada de sêmen e PBMCs para o crescimento e desenvolvimento pré-implantação do embrião bovino e consequentemente, para o estabelecimento e manutenção da gestação, dado que a expressão endometrial de CSF-1 é aumentada marcadamente entre os dias 14 e 17 de gestação (LEE et al., 2003), no momento exato em que o concepto atinge seu crescimento rápido (IDETA et al., 2010a) e máxima produção de INF- τ , promovendo o reconhecimento materno da gestação e condições ideais para se implantar (HANSEN, 1997). O CSF-1 endometrial induz o aumento da expressão de INT- τ pelo embrião bovino durante seu crescimento pré-implantação, permitindo que sua produção se mantenha coordenada com o status fisiológico materno, o qual está sob o controle dos hormônios sexuais (EZASHI; ROBERTS, 2004) e sugerindo que a secreção de CSF-1 no

endométrio é indispensável para o desenvolvimento pré-implantação do embrião e/ou funções endometriais (KANZAKI et al., 1995; COHEN et al., 1999; OSHIMA et al., 2003, 2008).

No presente estudo não houve a presença do embrião no útero das receptoras, o que de fato pode ter influenciado os resultados, visto que o embrião precoce secreta uma imensa variedade de moléculas que modulam o sistema imune materno para o reconhecimento, estabelecimento e manutenção da gestação (HANSEN, 1997; ROBERTS, 2007). Por exemplo, o embrião bovino libera fatores que aumentam a expressão endometrial de CSF-1 (LEE et al., 2003) e IDO (GROEBNER et al., 2011) durante o início da gestação. Essa característica reforça ainda mais o fato de que, o sucesso gestacional e o desenvolvimento embrionário e da placenta dependem da função das moléculas secretadas dentro do microambiente uterino, ou seja, da comunicação entre o embrião em pré-implantação e o endométrio uterino (SANGUANSEMSRI; PONGCHAROEN, 2008).

Em resumo, o presente trabalho mostrou que é possível que os tratamentos, isolado ou simultâneo de ambos os antígenos, não aumentem a expressão gênica de FOXP3, IDO, IL-10 e CSF-1 no útero bovino e, conseqüentemente, não propiciem aumento da tolerância materno-fetal e desenvolvimento pré-implantação do embrião mediado por esses genes. No entanto, outras alterações uterinas relacionadas às estas citocinas podem favorecer a tolerância materno-fetal. Além disso, evidenciou-se que pode existir uma predisposição maior da administração simultânea de sêmen e PBMCs na promoção de um efeito negativo no microambiente uterino para o estabelecimento da gestação, visto que o respectivo tratamento promoveu uma diminuição na expressão gênica relativa de CSF-1 e IL-10 quatorze dias após a imunoestimulação, justamente no momento em que esses genes deveriam estar altamente expressos, promovendo condições para o crescimento e desenvolvimento pré-implantação do embrião bovino (LEE et al., 2003; OSHIMA et al., 2003, 2008) e inibindo uma resposta imune agressiva contra os antígenos do conceito (PESTKA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2013). Todavia, a expressão desses genes não são os únicos fatores atuando para o estabelecimento da receptividade endometrial, e deste modo, outros fatores podem mediar o aumento das taxas de gestação e nascimento de bezerros provenientes de FIV com a administração intrauterina de antígenos paternos e maternos no dia do estro, podendo constituir um método potencial para melhorar os resultados da TE-PIV. Assim, outros trabalhos devem ser realizados e em outras condições para a obtenção de resultados mais conclusivos a respeito do efeito da imunoestimulação intrauterina por antígenos maternos e paternos no sucesso gestacional após TE bovina.

7 CONCLUSÃO

A administração simultânea ou isolada de antígenos paterno e materno (PBMCs e Sêmen) no útero de fêmeas bovinas receptoras de embrião PIV, no dia do estro, parece não propiciar aumento da tolerância materna aos aloantígenos do embrião, nem condições favoráveis ao crescimento e desenvolvimento do embrião em pré-implantação, pelo menos no que se refere ao efeito mediado por FOXP3, IDO, IL-10 e CSF-1 nos dias sete (D7) e quatorze (D14) do ciclo estral. Além disso, os efeitos da imunoestimulação após 14 dias podem depender da presença do embrião para que surja as condições ideais para o crescimento do embrião bovino em pré-implantação e estabelecimento e manutenção da gestação.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6 ed. Elsevier Brasil, 2008.
- ALUVIHARE, V. R.; KALLIKOURDIS, M.; BETZ, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. **Nature Immunology**, v. 5, n. 3, p. 266-71, 2004.
- ANDRADE, G. et al. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p. 66-69, 2012.
- ARCECI, R. J. et al. Temporal expression and location of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) and its receptor in the female reproductive tract are consistent with CSF-1-regulated placental development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 22, p. 8818-8822, 1989.
- BANKS, W. J. **Histología Veterinaria Aplicada**. 2a ed. 1991.
- BAUERSACHS, S. et al. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 319-31, 2006.
- BEAUCHAMP, J. L.; CROY, B. A. Assessment of expression of the receptor for colony-stimulating factor-1 (fms) in bovine trophoblast. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 6, p. 811-817, 1991.
- BELLINGE, B. S. et al. The influence of patient insemination on the implantation rate in an in vitro fertilization and embryo transfer program. **Fertility and Sterility**, v. 46, n. 2, p. 252-6, 1986.
- BERG, D. K. et al. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. **Theriogenology**, v. 73, n. 2, p. 250-60, 2010.
- BILLINGHAM, R. E.; BRENT, L.; MEDAWAR, P. B. Actively acquired tolerance of foreign cells. **Nature**, v. 172, n. 4379, p. 603-6, 1953.
- CLARK, D. A. Seminal advances in immunology of reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 2, p. 224-7, 2011.
- COHEN, P. E. et al. Macrophages: important accessory cells for reproductive function. **Journal of leukocyte biology**, v. 66, n. 5, p. 765-772, 1999.

CRAWFORD, G. et al. The role of seminal plasma for improved outcomes during in vitro fertilization treatment: review of the literature and meta-analysis. **Human Reproduction Update**, 2014.

DA SILVEIRA, J. G. Pregnancy immunology. **Revista da AMRIGS**, v. 50, n. 2, p. 145-151, 2006.

DAVIES, C.; FISHER, P.; SCHLAFER, D. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. **Placenta**, v. 21, n. 2-3, p. 194, 2000.

DAVIES, C. J. et al. Evidence for Expression of Both Classical and Non-Classical Major Histocompatibility Complex Class I Genes in Bovine Trophoblast Cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 55, n. 3, p. 188-200, 2006.

DELLÊ, H.; NORONHA, I. L. Indução da expressão da molécula Indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO) como terapia gênica em transplantes de ilhotas pancreáticas. **Jornal Brasileiro de Transplantes**, v. 12, p. 1176, 2009.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 260-7, 2008.

DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1, p. 39-44, 2000.

EZASHI, T.; ROBERTS, R. Regulation of interferon-tau (IFN-tau) gene promoters by growth factors that target the Ets-2 composite enhancer: a possible model for maternal control of IFN-tau production by the conceptus during early pregnancy. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4452-4460, 2004.

FABER, D. C. et al. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 125-38, 2003.

FALLARINO, F. et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. **Cell death and differentiation**, v. 9, n. 10, p. 1069-1077, 2002.

FERREIRA, A. D. M. **Reprodução da fêmea bovina: fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. 1. ed. Juiz de Fora: edição do autor, 2010. 420 p.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 4, p. 330-6, 2003.

GROEBNER, A. et al. Immunological mechanisms to establish embryo tolerance in early bovine pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 5, p. 619-632, 2011.

HANSEN, P. J. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. **Theriogenology**, v. 47, 1997.

HANSEN, P. J. The immunology of early pregnancy in farm animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 18-30, 2011.

HANSEN, P. J.; BLOCK, J. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n. 1-2, p. 1-14, 2004.

HARA, M. et al. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 3789-3796, 2001.

HASHIZUME, K. et al. Gene expression and maintenance of pregnancy in bovine: roles of trophoblastic binucleate cell-specific molecules. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 79-90, 2006.

HASLER, J. F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1401-1415, 2001.

HILL, J. et al. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 55, 2002.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-61, 2003.

IDETA, A. et al. Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells enhances early development of the pre-implantation bovine embryo. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 11, p. 954-962, 2010a.

IDETA, A. et al. Administration of peripheral blood mononuclear cells into the uterine horn to improve pregnancy rate following bovine embryo transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1-2, p. 18-23, 2010b.

IQBAL, S. et al. Oral administration of LPS and lipoteichoic acid prepartum modulated reactants of innate and humoral immunity in periparturient dairy cow. **Innate Immunity**, v. 20, n. 4, p. 390-400, 2014.

KANZAKI, H. et al. Hormonal regulation in the production of macrophage colony-stimulating factor and transforming growth factor-beta by human endometrial stromal cells in culture. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 44, n. 2, p. 30-35, 1995.

KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Changes in EGF concentrations during estrous cycle in bovine endometrium and their alterations in repeat breeder cows. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 103-12, 2004.

KIM, B. et al. Seminal CD38 is a pivotal regulator for fetomaternal tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 5, p. 1559-1564, 2015.

KIMURA, K.; MATSUYAMA, S. Successful nonsurgical transfer of bovine elongating conceptuses and its application to sexing. **Journal of Reproduction and Development**, v. 60, n. 3, p. 210-215, 2014.

LEE, R. et al. Dynamic regulation of expression of colony-stimulating factor 1 in the reproductive tract of cattle during the estrous cycle and in pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 2, p. 518-528, 2003.

MAGALHÃES, P. S. C.; BOHLKE, M.; NEUBARTH, F. The Major Histocompatibility Complex (MHC): genetic codification, structural bases and clinical implications. **Rev. Med., Pelotas**, v. 2, n. 1, p. 54-59, 2004.

MANSOURI-ATTIA, N. et al. Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation. **Physiological Genomics**, v. 39, 2009.

MCMILLAN, W. H. Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. **Theriogenology**, v. 50, n. 7, p. 1053-70, 1998.

MERTON, J. S. et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 651-74, 2003.

MINTEN, M. A. et al. Effects of fertility on gene expression and function of the bovine endometrium. **PLoS One**, v. 8, n. 8, 2013.

MOFFETT, A.; LOKE, C. Immunology of placentation in eutherian mammals. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 8, p. 584-594, 2006.

MUNN, D. et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, v. 281, n. 5380, p. 1191, 1998.

NASU, K. et al. Platelet-activating factor stimulates cytokine production by human endometrial stromal cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 6, p. 548-553, 1999.

O'LEARY, S. et al. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. **Reproduction**, v. 128, n. 2, p. 237-47, 2004.

OKITSU, O. et al. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells increases clinical pregnancy rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 92, n. 1-2, p. 82-7, 2011.

OLIVEIRA, L. J.; HANSEN, P. 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. et al. Characterization of the Th profile of the bovine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. **PLOS one**, v. 8, 2013.

OSHIMA, K. et al. Gene expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) in bovine endometrium during early pregnancy. **Theriogenology**, v. 60, n. 7, p. 1217-1226, 2003.

OSHIMA, K. et al. Concentration of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in bovine peripheral blood during pregnancy. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 8, p. 799-805, 2008.

PENITENTE FILHO, J. M.; OLIVEIRA, A. A.; TORRES, C. A. A. Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro. In: 83ª semana do fazendeiro, 2012, Viçosa. **Conference Paper**, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p. 19.

PESTKA, S. et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review Immunology**, v. 22, p. 929-979, 2004.

PFAFFL, M. W. Relative quantification. In: DORAK, M. T. (Ed.). **Real-time PCR**. New York, N Y and Abingdon, OX: Taylor & Francis Group, 2007. cap. 3, p.63-80.

POLANCZYK, M. J. et al. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+ CD25+ regulatory T cell compartment. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 4, p. 2227-2230, 2004.

QUINN, G.P.; KEOUGH, M.J. **Experimental Design and Data Analysis for Biologists**. 1a ed. Cambridge University Press, Cambridge. 537p., 2002.

ROBERTS, R. M. Interferon-tau, a Type 1 interferon involved in maternal recognition of pregnancy. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 18, n. 5, p. 403-408, 2007.

ROBERTSON, S. A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. **Cell and Tissue Research**, v. 322, n. 1, p. 43-52, 2005.

ROBERTSON, S. A. et al. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy - the contribution of seminal fluid. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 83, n. 1-2, p. 109-116, 2009.

ROBERTSON, S. A. et al. Transforming growth factor β —a mediator of immune deviation in seminal plasma. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 1, p. 109-128, 2002.

ROCHE, J. F.; BOLANDL, M. P.; MCGEADY, T. A. Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. **The Veterinary Record**, v. 109, n. 18, p. 401-4, 1981.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. et al. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 84, n. 1, p. 57-65, 2010.

SAITO, S. et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 601-10, 2010.

SAITO, S.; SASAKI, Y.; SAKAI, M. CD4(+)CD25^{high} regulatory T cells in human pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, n. 2, p. 111-20, 2005.

SANGUANSEMSRI, D.; PONGCHAROEN, S. Pregnancy immunology: decidual immune cells. **Asian Pacific Journal of Allergy Immunology**, v. 26, n. 2-3, p. 171-81, 2008.

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M. M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 422-432, 2010.

SCHUBERTH, H. J. et al. Immunological responses to semen in the female genital tract. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1174-81, 2008.

STANLEY, E. R. et al. CSF-1—A mononuclear phagocyte lineage-specific hemopoietic growth factor. **Journal of cellular biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 151-159, 1983.

TEIXEIRA, L. S. et al. Técnicas de melhoramento genético em bovinos para o aumento na produção de leite. **Interfaces Científicas-Saúde e Ambiente**, v. 2, n. 2, p. 81-87, 2014.

TERNESS, P. et al. Inhibition of Allogeneic T Cell Proliferation by Indoleamine 2, 3-Dioxygenase—expressing Dendritic Cells: Mediation of Suppression by Tryptophan Metabolites. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 4, p. 447, 2002.

THATCHER, W. W. et al. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1435-50, 2001.

THELLIN, O. et al. Tolerance to the foeto-placental 'graft': ten ways to support a child for nine months. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 6, p. 731-7, 2000.

THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 39, n. 2, p. 145-154, 2011.

WALKER, C. G. et al. Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. **BMC molecular biology**, v. 10, n. 1, p. 100, 2009.

WOODING, F. The synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**, v. 13, n. 2, p. 101-113, 1992.

YOSHIOKA, S. et al. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. **Human Reproduction**, v. 21, n. 12, p. 3290-4, 2006.

ZENCLUSSEN, A. C. et al. Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. **The American journal of pathology**, v. 166, n. 3, p. 811-822, 2005.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –

CERTIFICADO



Certificamos que o projeto intitulado "Indução imunológica por antígenos maternos e paternos em fêmeas bovinas receptoras de embriões produzidos *in vitro*", protocolo nº 023/15, sob a responsabilidade de Marcelo Emílio Beletti – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de 22/05/2015.

(We certify that the project entitled " Indução imunológica por antígenos maternos e paternos em fêmeas bovinas receptoras de embriões produzidos *in vitro* ", protocol 023/15, under the responsibility of Marcelo Emílio Beletti - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of 22/05/2015).

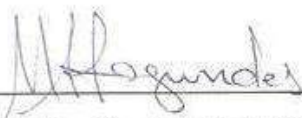
Vigência do Projeto	Início: 01/06/15 / Término: 30/04/16
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	<i>Bos taurus</i> (bovino).
Número de animais	50
Peso / Idade	Fêmeas: 400 / Machos: 600 Kg – 3 a 6 anos
Sexo	4 macho + 46 Fêmeas
Origem / Local	Fazenda Represa (Monte Alegre de Minas/MG) e Fazenda Bom Jardim (Uberlândia/MG)
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 10 de junho de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

ANEXO B – Autorização da proprietária para o uso dos animais da fazenda Represa no município de Monte Alegre, MG e da fazenda Bom Jardim no município de Uberlândia, MG

Eu Márcia Linaro Fagundes, proprietária das fazendas Bom Jardim município de Uberlândia e Represa município de Monte Alegre de Minas, estou ciente e de acordo com a utilização de 110 fêmeas de minhas propriedades para a realização do experimento **INDUÇÃO IMUNOLÓGICA POR ANTÍGENOS MATERNO E PATERNO EM FÊMEAS BOVINAS RECEPTORAS DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO***.
E também declaro estar ciente e de acordo com os procedimentos aos quais os animais serão submetidos.



Uberlândia, 10, fevereiro de 2015