



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

CAROLINA MENEZES SUASSUNA DE SOUZA

**EXPRESSÃO DE PD-1 E CTLA-4 EM LINFÓCITOS T E SUA RELAÇÃO COM O
PERÍODO PERIPARTURIENTE E CITOLOGIA ENDOMETRIAL NO PERÍODO
PÓS-PARTO EM VACAS LEITEIRAS**

AREIA

2022

CAROLINA MENEZES SUASSUNA DE SOUZA

**EXPRESSÃO DE PD-1 E CTLA-4 EM LINFÓCITOS T E SUA RELAÇÃO COM O
PERÍODO PERIPARTURIENTE E CITOLOGIA ENDOMETRIAL NO PERÍODO
PÓS-PARTO EM VACAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Artur Cezar de Carvalho Fernandes

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Nogueira de Souza

AREIA

2022

**Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

S729e Souza, Carolina Menezes Suassuna de.

Expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos T e sua relação com o período periparturiente e citologia endometrial no período pós-parto em vacas leiteiras / Carolina Menezes Suassuna de Souza. - Areia:UFPB/CCA, 2022.

44 f. : il.

Orientação: Artur Cezar de Carvalho Fernandes.

Coorientação: Fernando Nogueira de Souza.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/Areia.

1. Ciência Animal. 2. Pontos de controle imunológicos. 3. Citologia endometrial. 4. Vaca leiteira. I. Fernandes, Artur Cezar de Carvalho. II. Souza, Fernando Nogueira de. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09(043.3)



CAROLINA MENEZES SUASSUNA DE SOUZA

EXPRESSÃO DE PD-1 E CTLA-4 EM LINFÓCITOS T E SUA RELAÇÃO COM O PERÍODO PERIPARTURIENTE E A CITOLOGIA ENDOMETRIAL NO PERÍODO PÓS-PARTO EM VACAS LEITEIRAS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal no Brejo Paraibano.

APROVADA EM 30/03/2022

BANCA EXAMINADORA

Artur Cezar de C. Fernandes

Dr. ARTUR CEZAR DE CARVALHO FERNANDES
UFPB
Orientador

Alexandre José Alves
Prof. Dr. Alexandre José Alves
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Dr. ALEXANDRE JOSÉ ALVES
UFPB
Examinador

Maiara G. Blagitz

Dr^a. MAIARA GARCIA BLAGITZ
UFFS
Examinadora

Prof.^a Dra. Maiara Garcia Blagitz Azevedo
SIAPE: 1868534
Universidade Federal da Fronteira Sul
Campus Realeza

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAROLINA MENEZES SUASSUNA DE SOUZA- Nascida em Natal-RN (1994), graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB - Campus II - Areia/PB (2020). Extensionista voluntária do Projeto Educação Em Saúde Única: Uma Visão Integrada Da Saúde Animal, Humana e Ambiental – ANO II (2017). Monitora bolsista da unidade curricular em Microbiologia Geral - Monitoria e Docência: Uma Parceria No Processo Ensino-Aprendizagem No Departamento De Ciências Veterinárias CCA/UFPB (2018); e monitora voluntária da unidade curricular em Clínica Médica de Equídeos (2019). Bolsista do Programa de Iniciação Científica PIBIC – Na pesquisa: Determinação das medidas dopplervelocimétricas da artéria mediana em equinos através do ultrassom doppler (2019-2020). Extensionista voluntária do projeto Construindo junto ao produtor uma melhor percepção da mastite bovina e seus impactos na produção e na saúde pública (2020); Extensionista voluntária do projeto Estabelecimento e implementação de modelo sustentável baseado em pontos críticos de controle da mastite na caprinocultura leiteira da Paraíba (2020);

AGRADECIMENTOS

Iniciei o mestrado um dia antes de parar tudo por causa da pandemia. Em meio ao caos e insegurança assisti todas as disciplinas no modelo online como várias outras pessoas que também estavam tentando se acostumar com essa nova realidade. Após concluir essa etapa, fiquei um tempo impossibilitada de começar a coleta e pesquisa a campo, por causa das buscas por fazendas, além da espera pela chegada do material. Enfim, no total foram 30 idas e vindas a Alagoinha, fora as 25 vezes que também fui a Pilões. No meio do processo não tinha apenas o trabalho a campo, mas também toda a parte de laboratório, logística de preparar material com antecedência e planejar as tabelas com dias e horários de cada visita.

Com muita alegria agradeço a Deus, aos meus pais Maria Aparecida Ferreira Menezes Suassuna e Domingos Sávio Suassuna de Souza e meu namorado André Ferreira Costa, que foram incansáveis vezes para Areia ficar comigo nos finais de semana porque eu tinha que ficar de sobreaviso caso alguma vaca parisse e assim não tinha como ir para casa.

Gostaria de agradecer também a CAPES pelo apoio e financiamento a pesquisa e aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da UFPB que contribuíram ao longo desses semestres, por meio das disciplinas e debates, em especial ao meu orientador Artur Cezar de Carvalho Fernandes e coorientador Fernando Nogueira de Souza, pela dedicação e apoio nos momentos prático e teórico para o desenvolvimento desta pesquisa, aos professores Maiara Garcia Blagitz Azevedo e Alexandre José Alves que participaram da banca da defesa da dissertação e fizeram contribuições de muita importância, a Jozenio que me deu todo o suporte tirando dúvidas sobre os documentos, matrículas e materiais da coordenação da pós graduação, aos técnicos e residentes do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Hospital Veterinário, aos colegas da turma do mestrado pelos momentos de amizade e apoio, aos amigos do grupo NAPROSA que estiveram comigo nas diversas reuniões online, apresentações de artigos, discussões de casos, organização de evento como o SIMPROSA, das coletas nas fazendas, e no momentos até tarde da noite no laboratório (Rebeca, Bianca, Léo, Gabriel, Alice, Raphael, Ewerton e especialmente Vitória que me ajuda desde as coletas do tcc). Além disso, por pessoas tão especiais que estiveram no meu caminho, como os tratadores dos animais que me acolheram e me ajudaram muito na lida com as vacas (Sr. Aguinaldo, Antônio, Adriano, Val e Jordilene), aos responsáveis pela estação experimental da Emepa em Alagoinha (Dr. Rubens e Dr. Ricardo).

Também tiveram aqueles que estavam longe, mas que através de uma oração ou uma palavra de apoio fizeram muito por mim, a minha vó Corina (in memoriam), embora fisicamente ausente, estava ao meu lado me dando força. E por último, mas não menos importante, as 26 vacas que eu acompanhei durante 45 dias do pré ao

pós parto. Tenho certeza que elas entendiam o quanto aquilo era importante para mim e colaboravam com o processo. Obrigada, Itatuba, Garça, França, Janete, Odisseia... e todas as outras que vou lembrar o nome de uma por uma.

Enfim, entreguei nas mãos de Nossa Senhora e tive que entender que nem sempre as coisas são como queremos e planejamos, porém hoje posso dizer que sou mestre!

RESUMO

O presente estudo buscou avaliar a expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos T sanguíneos durante o período periparturiente e sua relação com a saúde uterina, determinada pela citologia endometrial, e as concentrações séricas de β -hidroxibutirato (BHB) e ácidos graxos não esterificados (NEFA), indicadores de balanço energético negativo. Para isso, foi realizada a coleta de sangue periférico de 26 vacas leiteiras 14 dias anterior ao parto (T-14), no parto (T0) e 30 dias pós-parto (T30) para determinação da expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos T sanguíneos por citometria de fluxo e nos dias T0, 10 após o parto (T10), e T30 para obtenção de soro e determinação sérica de NEFA, BHB e da proteína de fase aguda haptoglobina. A citologia endometrial foi realizada em T10, 20 dias após o parto (T20) e T30. Nossos achados sugerem que os *immune check points* apresentam papel fundamental na tolerância imunológica durante a gestação bovina, que por outro lado, caso sejam altamente expressos em linfócitos T podem inibir a resposta imune de tal modo que levam a implicações negativas para saúde uterina. Assim, o presente estudo representa um passo inicial que abre caminho para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas dirigidas pelo hospedeiro com o objetivo de aumentar a resistência dos bovinos leiteiros a infecções neste período crítico da vida destes animais.

Palavras-Chave: pontos de controle imunológicos; citologia endometrial; vaca leiteira.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the expression of PD-1 and CTLA-4 in blood T lymphocytes during the periparturient period and its relationship with uterine health, determined by endometrial cytology, and serum concentrations of β -hydroxybutyrate (BHB) and fatty acids. non-esterified (NEFA), indicators of negative energy balance. For this, peripheral blood was collected from 26 dairy cows 14 days before calving (T-14), at calving (T0) and 30 days postpartum (T30) to determine the expression of PD-1 and CTLA-4 in blood T lymphocytes by flow cytometry and on days T0, 10 postpartum (T10), and T30 for obtaining serum and serum determination of NEFA, BHB and the acute phase protein haptoglobin. Endometrial cytology was performed at T10, 20 days postpartum (T20) and T30. Our findings suggest that *immune checkpoints* play a fundamental role in immunological tolerance during bovine pregnancy, which, on the other hand, if highly expressed in T lymphocytes, can inhibit the immune response in such a way that leads to negative implications for uterine health. Thus, the present study represents an initial step that opens the way for the development of new therapeutic alternatives directed by the host with the objective of increasing the resistance of dairy cattle to infections in this critical period of the life of these animals.

Key words: immunological checkpoints; endometrial cytology; milky cow.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

- Figura Sup. 1 -** Esquema sucessivo de gates para determinação da expressão de PD-1 em linfócitos T. Inicialmente, a população de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi identificada após exclusão da maioria dos debris celulares (**A**). Posteriormente, os linfócitos foram identificados com base em sua granularidade citoplasmática e intensidade de fluorescência seguindo um protocolo de imunomarcacão fluorescente de duas etapas usando anticorpo monoclonal (Ab) primário anti-bovino específico para identificação de linfócitos T (CD3⁺) e Abs secundários acoplados a comprimento de onda longo sonda fluorescente [PE (Phycoerythrin)-Texas Red] (**B**). Posteriormente, o histograma mostra a expressão de PD-1 por linfócitos T 14 dias anterior ao parto (T-14; **C**) e 30 dias após o parto (T30, **D**) seguindo um protocolo de imunomarcacão fluorescente de duas etapas usando anticorpo monoclonal (Ab) primário com reação cruzada com bovinos para identificação de PD-1 e Abs secundários acoplados a comprimento de onda longo sonda fluorescente (Alexa-Fluor 488) (**D**). 35
- Figura Sup. 2 -** Concentração sérica de Ácido Graxo Não Esterificado (NEFA) aos 10 (T10), 20 (T20) e 30 (T30) dias pós-parto. 37
- Figura 1 -** Expressão de CTLA-4 por linfócitos T no T-14, T0 e T30 (A) e expressão de PD-1 por linfócitos T no T-14 e T30 (B). T-14 = 14 dias antes do parto; T0 = dia do parto; T30 = 30 dias pós parto. 38
- Figura 2 -** Expressão de PD-1 por linfócitos T no T0 (A) e T30 (B) em animais com endometrite detectada por citologia endometrial em T30. T0 = dia do parto; T30 = 30 dias pós parto. 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
ATP	Adenosina Trifosfato
BEN	Balanço Energético Negativo
BHB	β -Hidroxibutirato
CE	Citologia Endometrial
CPI	Inibidor de Checkpoint
CTLA-4	Proteína Citotóxica do Linfócito T-4 Associado
DPP	Dias Pós-Parto
ES	Endometrite Subclínica
Hb	Hemoglobina
Hp	Haptoglobina
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon-Gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IMS	Ingestão de Matéria Seca
mAbs	Anticorpos Monoclonais

NEFA	Ácido Graxo Não Esterificado
PBMC	Células do Sangue Venoso Periférico
PD-1	Proteína Programada para Morte Celular 1
PD-L1	Anticorpos Anti-Ligante de Morte Programada 1
PFA	Proteínas de Fase Aguda
PT	Período de Transição
RFA	Resposta de Fase Aguda
T0	No parto
T10	10 Após o Parto
T-14	14 Dias Anterior ao Parto
T20	20 Dias Após o Parto
T30	30 Dias Após o Parto
TCR	Receptor de Célula T
TG	Triacilglicerol
Tim-3	Mucina-3 de Imunoglobulina de Célula T
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
Tregs	Células T Reguladoras
TRF	Trato Reprodutivo da Fêmea
VLDL	<i>Very Low Density Lipoproteins</i>

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	13
2	CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	PERÍODO DE TRANSIÇÃO.....	14
2.2	RESPOSTA IMUNE.....	16
2.3	INFECÇÃO UTERINA.....	22
2.4	CAPÍTULO II – EXPRESSÃO DE PD-1 E CTLA-4 EM LINFÓCITOS T E SUA RELAÇÃO COM O PERÍODO PERIPARTURIENTE E 3. CITOLOGIA ENDOMETRIAL NO PERÍODO PÓS-PARTO EM VACAS LEITEIRAS.....	30
3.1	RESUMO.....	30
3.2	INTRODUÇÃO.....	30
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.4	RESULTADOS	35
3.5	DISCUSSÃO.....	37
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
	REFERÊNCIAS	41

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O período de transição em vacas de leite, compreendido entre as três semanas que antecedem ao parto até as três semanas após o parto, é caracterizado por drásticas alterações metabólicas e na resposta imune, representando um período de maior desafio para esses animais resultando em maior suscetibilidade às enfermidades nas três primeiras semanas pós-parto (LEBLANC, 2010; MEZZETTI et al., 2021). Nesse período, portanto, destaca-se a endometrite que é a principal causa de infertilidade nos rebanhos leiteiros (PAIANO et al., 2022), no qual a citologia endometrial é amplamente empregada para o seu diagnóstico.

Diversos estudos vem sendo desenvolvidos acerca dos *immune checkpoints* que podem estar envolvidos com o surgimento ou mesmo a manutenção de diferentes doenças, dentre as quais podem ser destacadas a proteína 1 de morte celular programada (PD-1) e proteína 4 associada a linfócitos citotóxicos (CTLA-4) que são expressas nas células T induzindo sua exaustão imune (BARBER et al., 2006; DAY et al., 2006; DONG et al., 2002; SZNOL & CHEN, 2013) promovendo um mecanismo de retroalimentação negativa. No entanto, a relação destes pontos de controle imunológicos com o período de transição em vacas leiteiras e a saúde uterina no período pós-parto em vacas leiteiras ainda não foi estudado.

Desta forma, o presente estudo buscou avaliar a expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos T sanguíneos durante o período periparturiente e sua relação com a saúde uterina, determinada pela citologia endometrial, e as concentrações séricas de β -hidroxibutirato (BHB) e ácidos graxos não esterificados (NEFA), indicadores de balanço energético negativo.

Nesta ótica os dados apontam para a necessidade de maiores estudos acerca dos *immune checkpoints* CTLA-4 e PD-1 em linfócitos T em diferentes situações fisiopatológicas em bovinos de leite para que posteriormente seja possível instituir métodos de prevenção, diminuindo os índices de animais acometidos por endometrite, minimizando os impactos negativos nas criações desses rebanhos.

2 CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Período de Transição

Existem muitos estudos relevantes sobre os desafios enfrentados por vacas leiteiras em sua transição do parto para a lactação, momento bem conhecido como período de transição (PT), que começa três semanas antes do parto e estendendo-se até as três primeiras semanas de lactação (ABUELO et al., 2021). Esta fase fisiológica resulta em severas alterações no metabolismo de vacas leiteiras que são impulsionadas por mudanças repentinas nos níveis hormonais, bem como na demanda energética e mineral (AKBAR et al., 2015; BARRAGAN et al., 2018), devendo-se considerar ainda as condições de balanço energético negativo (BEN) e protéico provocado pelo fim da gestação e início da lactação (BATISTEL et al., 2018; MCCABE et al., 2020).

O BEN durante o periparto tornou-se fenômeno acentuado em bovinos leiteiros de alta produção, devido à intensa seleção genética para a produção de leite (HERDT, 2000). Dessa forma, alterações metabólicas que afetam vacas no início de lactação são uma preocupação relevante nos rebanhos de leite, uma vez que já foram bem caracterizados seus impactos diretos e indiretos na produção, desde uma menor produção leiteira, passando por perdas reprodutivas e levando ao maior custo com medicamentos e serviços veterinários (CAMPLER et al., 2014; CANNING et al., 2017).

2.1.1 Metabolismo energético

Segundo Rabelo e Campos (2009), no periparto há um aumento na demanda de nutrientes, justificado pelo desenvolvimento final do feto, colostrogênese e lactogênese, somados a uma baixa ingestão de matéria seca (IMS), resultando em um aporte nutricional abaixo da demanda necessária. Assim as exigências de energia líquida para a lactação chegam a dobrar neste período (NRC, 2001).

Dessa forma, a diminuição da IMS em cerca de 20 a 30% (PARK et al., 2001) nas semanas que antecedem o parto é associada principalmente à elevados níveis de hormônios esteróides na corrente sanguínea (GRUMMER et al., 2004), devendo ser considerado ainda o aspecto multifatorial deste fenômeno, ressaltando a co-

participação de fatores como metabólitos sanguíneos, corticosteróides, leptina, insulina, peptídeos intestinais e neuropeptídios (INGVARTSEN e ANDERSEN, 2000).

Neste período, os níveis séricos glicêmicos e de insulina sofrem os efeitos negativos da associação de uma elevada demanda energética com a baixa IMS, levando a uma maior mobilização da gordura corpórea (SORDILLO e RAPHAEL, 2013). Uma vez que presente a necessidade de equilibrar os níveis glicêmicos, há inicialmente uma resposta do organismo com vistas a uma maior atividade hepática para produção glicose, associada a uma menor oxidação da glicose a nível de tecidos periféricos, como por exemplo, no tecido muscular. Posteriormente, a mobilização das reservas de gordura corpórea resulta na liberação de ácidos graxos não esterificados (NEFA) na circulação sanguínea (OVERTON, 2004), os quais devem auxiliar a atender a demanda energética do organismo, porém, sem ultrapassar sua capacidade de metabolização do mesmo pelo fígado (HERDT, 2000), sob o risco de resultar em acúmulo de triglicerídeo hepático e comprometimento da gliconeogênese no fígado, mecanismo fundamental na manutenção da homeostase, sobre tudo nesse período de elevada demanda energético (OVERTON, 2004).

Uma vez na circulação sanguínea, os ácidos graxos não esterificados chegam ao fígado onde poderão ser metabolizados no processo de β -oxidação e posteriormente utilizados como fonte de energia na forma de Adenosina Trifosfato (ATP), ou serem convertidos em corpos cetônicos (acetona, acetoacetato ou β -hidroxibutirato – BHB) para posterior utilização como fonte energética pelos hepatócitos ou ainda liberados na corrente sanguínea. Por fim os NEFAs podem ainda sofrer a re-esterificação em triacilglicerol (TG) que será armazenado nos hepatócitos ou, após conversão em lipoproteínas de muito baixa densidade (*very low density lipoproteins* – VLDL) serão liberados para a corrente sanguínea (CHRISTENSEN et al., 1997; INGVARTSEN, 2006; WATHES et al., 2012; INGVARSTEN & MOYES, 2013).

Considerando a importância do metabolismo hepático dos NEFAs para os ruminantes, as vias de β -oxidação produzindo ATP, bem como a produção de VLDL, atendem uma demanda inicial, contudo são vias limitadas. Uma vez que no PT a lipólise é intensificada e a concentração plasmática de NEFA torna-se elevada, o processo de síntese de corpos cetônicos e o acúmulo de TG nos hepatócitos acontece em excesso, predispondo o animal à cetose e à lipidose hepática, respectivamente

(WATHES et al., 2012). Estas são as principais enfermidades que acometem vacas leiteiras no início da lactação (BARBOSA et al., 2009).

Da mesma forma, quando se trata da β -oxidação do NEFA, esta ocorre nas mitocôndrias e produz a acetilcoenzima A (Acetil-CoA), um importante substrato utilizado pelo ciclo de *Krebs* como fonte de energia para a produção do ATP (BELL, 1995), como também diretamente pelo fígado (ADEWUYI et al., 2005). Nesse contexto, se a produção de acetil-CoA superar a capacidade de aproveitamento do mesmo pelo ciclo de *Krebs*, ou não houver oxaloacetato suficiente para facilitar a entrada nesse processo, seu metabolismo também é redirecionado para a produção dos corpos cetônicos (BLOCK, 2010; SORDILLO e RAPHAEL, 2013).

Resumidamente podemos dizer que as concentrações circulantes de NEFA e BHB mede aspectos do sucesso da adaptação ao balanço energético negativo (ADEWUYI et al., 2005), além de serem considerados importantes marcadores do metabolismo e da fisiologia da vaca de leite periparturiente (BELL, 1995; OVERTON, 2004). Assim, a concentração de NEFA reflete a magnitude da mobilização da gordura do armazenamento e espelha a ingestão de matéria seca (ADEWUYI et al., 2005), enquanto o BHB reflete a integridade da oxidação da gordura no fígado.

Por outro lado, a relação entre o metabolismo energético e a inflamação vem sendo bastante estudada, com ênfase sobre os efeitos negativos das alterações metabólicas na resposta imunológica durante o período de transição em vaca de leite (SORDILLO e RAPHAEL, 2013; SORDILLO, 2016) e principalmente pela ocorrência concomitante de enfermidades (DE HEREDIA et al., 2012). Contudo, a relação inversa também deve ser levada em consideração (TREVISI et al., 2009; BRADFORD et al., 2009).

2.2 Resposta Imune

2.2.1 Proteína de fase aguda (Haptoglobina)

A resposta de fase aguda compõe a resposta imune inata diante de processos inflamatórios, infecciosos, traumáticos e neoplásicos (CRAY et al., 2009). Caracteriza-se por reações inespecíficas que variam em intensidade de acordo com a natureza do insulto enfrentado pelo organismo, como leucocitose, febre, mudanças

comportamentais, alterações nas concentrações plasmáticas de minerais e a mudança no padrão de síntese proteica (HEINRICH et. al., 1990; CARROLL & FORSBERG, 2007).

O estímulo para essas reações decorre da produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL) 1, 6 e fator de necrose tumoral alfa (IL-1, IL-6 e TNF- α) por parte dos macrófagos após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos ou padrões moleculares associados a danos teciduais (BRANDÃO, 2016). Desta forma, uma vez que via corrente sanguínea essas citocinas chegam ao fígado, há o estímulo para a produção e liberação das proteínas de fase aguda (PFA) por parte dos hepatócitos (CECILIANI et al., 2012).

Quanto ao perfil proteico da resposta de fase aguda, bem como a produção das PFA, sabe-se que há variação entre diferentes espécies e que a produção das referidas proteínas não ocorre exclusivamente por via hepática (SKOVGAARD et al., 2009). Nos ruminantes, por exemplo, foi descrita a produção de PFA na glândula mamária (HISS et al., 2004; LARSON et al., 2005; THIELE et al., 2007; MOLENAAR et al., 2009) e no sistema reprodutivo (SHELDON et al., 2001; LAVERY et al., 2003; CHAPWANYA et al., 2009).

Em vacas leiteiras, durante o período de transição, há exposição a diversos eventos inflamatórios, e mesmo animais que não enfrentam qualquer episódio de doença ou distúrbio metabólico, apresentam disfuncionalidade no sistema imune durante o parto (ALSEMGEEST et al., 1993; CHAN et al., 2010; PAULINA e STEFANIAK, 2011). Desta forma, a determinação sérica das PFAs pode auxiliar na caracterização dessa resposta inflamatória e ainda, oferecer informação relevante na interpretação de outros dados relacionados com a fisiologia e problemática desse período (BRANDÃO, 2016).

Dentre as PFA produzidas pelo fígado destacamos a Haptoglobina (Hp), uma proteína de fase aguda positiva, e juntamente com o Amilóide A Sérico, são PFA de importante aspecto diagnóstico para ruminantes (ECKERSALL & BELL, 2010). Essas PFA podem apresentar concentrações séricas elevadas, mesmo diante de situações fisiológicas como o parto em vacas leiteiras, a exemplo da Hp (UCHIDA et al., 1993).

A principal função da Hp é ligar-se à hemoglobina (Hb) formando um complexo estável Hp-Hb (CECILIANI et al., 2012), que pode então ser reconhecido, fagocitado e removido da corrente sanguínea por macrófagos especializados do fígado, as células de Kupffer (GRAVERSEN et al., 2002). Nesse sentido, há uma perspectiva de menor disponibilidade de hemoglobina livre para o metabolismo bacteriano, limitando a capacidade de multiplicação desses microrganismos (MURATA et al. 2004), e consequentemente minimiza os efeitos deletérios da hemoglobina livre proveniente da hemólise no organismo (KATO, 2009).

As concentrações séricas de Hp, refletem portanto, a ocorrência de uma série de eventos em cadeia que, em função das circunstâncias, podem ter interpretações diferentes. Elevadas concentrações séricas de Hp indicam, portanto, que houve uma resposta de fase aguda (RFA) mediante a algum estímulo (BRANDÃO, 2016). Nesse sentido, Hirvonen et al. (1996) relacionaram a elevação das concentrações séricas de Hp em casos de mastite induzida, os animais apresentaram quadro clínico mais grave, de maior duração e com pior resolução (perda de função de quartos mamários afetados). Adicionalmente, Fernandes et al., (2019) demonstraram aumento dos níveis de Hp de forma prolongada e consistente após a indução de resposta inflamatória por infusão intravenosa de LPS de *E. coli*.

A literatura é consistente também ao afirmar a ocorrência de alterações metabólicas em decorrência da RFA. Nesse contexto, Campos et al., (2018) demonstra que após indução de RFA por infusão intramamária de LPS de *E. coli*, mesmo com a elevação dos níveis de Hp, não foi observada alteração nos níveis de TNF- α , sugerindo inclusive a participação de outras citocinas na indução da RFA.

2.2.2 Célula T e receptores imunoinibitórios

As interações entre subconjuntos de células imunes por meio de ligantes coestimuladores e seus receptores transmitem sinais bioquímicos que iniciam, amplificam, diferenciam e terminam as respostas imunes. Caso não haja atividade coestimuladora, pela administração de anticorpos monoclonais e receptores solúveis que neutralizam as moléculas coestimuladoras, ou pela interrupção de sua expressão direcionada ao gene, resultará em respostas imunes celulares e humorais

comprometidas. Além de sua função coestimuladora, sabe-se que muitas interações receptor-ligante desencadeiam vias antiapoptóticas que previnem a morte de células T induzida por ativação (BOISE et al., 1995; WATTS & DEBENEDETTE, 1999).

Por exemplo, o desencadeamento dos receptores CD28 co-estimulam o crescimento de células T e previne a morte de células T ativadas (NOEL et al., 1996; ROGERS et al., 2001). Em contraste, o envolvimento da proteína citotóxica dos linfócitos T-4 associado (CTLA-4) pode inibir o crescimento de células T bloqueando a progressão do ciclo celular (KRUMMEL & ALLISON, 1996; WALUNAS et al., 1996). Além disso, a ligação da proteína programada para morte celular 1 (PD-1) com anticorpos anti-ligante de morte programada 1 (PD-L1) inibe a proliferação e a produção de citocinas por células T ativadas (FREEMAN, 2000).

Com isso é possível observar que durante a infecção crônica, os patógenos evitam as respostas imunes do hospedeiro e persistem após a fase efetora (FINLAY & MCFADDEN, 2006; KLENERMAN & HILL, 2005), levando à estimulação persistente do antígeno e à disfunção progressiva das células T, conhecida como exaustão das células T (WHERRY, 2011).

O desenvolvimento de inibidores de checkpoint (CPIs) – anticorpos monoclonais (mAbs) que inibem as moléculas imunorreguladoras CTLA-4 e PD-1 – revolucionou o campo da oncologia médica. De fato, os CPIs prolongam a sobrevida em vários tumores, e a lista de malignidades para as quais os CPIs foram aprovados continua a crescer. Em contraste com a quimioterapia convencional que mata as células tumorais em divisão, os CPIs promovem a eliminação endógena imunomediada de células tumorais, bloqueando as vias que os tumores empregam para evitar o reconhecimento do hospedeiro (ABERS et al., 2019).

A importância da imunidade do hospedeiro no controle de infecções levou muitos a postular que os CPIs podem ter eficácia terapêutica contra infecções. O benefício potencial do aumento da imunidade do hospedeiro mediado por CPIs deve ser equilibrado com o dano teórico de promover respostas exuberantes que podem se manifestar clinicamente como síndrome inflamatória de reconstituição imune. Assim, vários estudos pré-clínicos investigaram os efeitos dos CPIs na sobrevivência do

hospedeiro, eliminação de patógenos e imunopatologia durante a infecção aguda e crônica (ABERS et al., 2019).

A ativação completa das células T requer dois sinais. O sinal 1 ocorre quando os receptores de células T (TCRs) se engajam com complexos MHC-II/antígeno nas células apresentadoras de antígeno (APC), conferindo especificidade para a ativação de células T. O sinal 2 refere-se à interação entre CD28 em células T e CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2) em APCs. Essa interação, denominada co-estimulação, amplifica o sinal 1, promovendo assim a ativação e proliferação de células T virgens. O sinal 2 é autorregulado por um *loop* de *feedback* negativo, de modo que a sinalização de CD28 regula positivamente a expressão de superfície de CTLA-4, que então compete com CD28 pela ligação a CD80 e CD86, embora com maior afinidade. O CTLA-4 é detectado na superfície das células T dentro de 48 h após a estimulação do TCR. Após a ligação ao CD80 ou CD86, o CTLA-4 inibe a atividade das células T através de vários mecanismos, incluindo a regulação negativa da sinalização do TCR (TEFT et al., 2006).

A função contra-reguladora do CTLA-4 previne a ativação e proliferação descontroladas de células T. Além disso, as ações opostas de CD28 e CTLA-4 permitem o ajuste fino da atividade das células T. CTLA-4 também promove a tolerância através de uma via distinta que envolve células T reguladoras (Tregs). Em contraste com a expressão induzível de CTLA-4 por FoxP3⁺ Células T, Tregs expressam constitutivamente CTLA-4 (TEFT et al., 2006).

PD-1 é expresso em células T, células B, células NK e macrófagos. O PD-1 é regulado positivamente nas células T dentro de 24 h após a ativação e a expressão diminui com a depuração do antígeno. Em contraste com os ligantes de CTLA-4 CD80 e CD86 que são expressos exclusivamente em APCs, PD-L1 é amplamente expresso por células hematopoiéticas e não hematopoiéticas. Assim, a ação de PD-1/PD-L1 ocorre em tecidos periféricos enquanto CTLA-4 regula a atividade de células T em órgãos linfoides secundários (KEIR et al., 2008).

A expressão de PD-L1 é regulada positivamente após a inflamação e o Interferon-gama (IFN- γ) é um estímulo potente para a expressão de PD-L1. Da mesma forma que CTLA-4, a sinalização PD-1 atenua a atividade das células T através de

vários mecanismos, incluindo modulação descendente da sinalização de TCR (KEIR et al., 2008). O PD-1 desempenha um papel crucial na redução da atividade das células T autorreativas, promovendo assim a tolerância das células T periféricas. O PD-1 também regula a exaustão das células T, um processo fisiopatológico que ocorre durante a exposição persistente ao antígeno e que é caracterizado pela perda progressiva das funções efectoras, capacidade proliferativa reduzida, regulação positiva dos receptores coinibitórios e aumento da apoptose (ABERS et al., 2019).

Como citado, esse tema já é bem descrito na oncologia, onde sua aplicação é fundamentada. Desta forma, apesar de estudos anteriores revelarem que a expressão de PD-1 foi regulada positivamente em células T exaustas em várias infecções crônicas em bovinos, como a infecção pelo vírus da leucemia bovina (leucose enzootica bovina), doença de Johne e anaplasmoze bovina (IKEBUCHI et al., 2013; OKAGAWA et al., 2016, KONNAI et al., 2016), não há estudos que correlacionam alterações na expressão desses receptores imunoinibitórios em infecções de bovinos leiteiros, como por exemplo na mastite e infecções uterinas.

2.2.3 Imunidade de mucosa

O sistema imunológico das mucosas é um conjunto integrado que fornece a primeira barreira de defesa para mais de 90% dos patógenos. O mesmo fortalece essa barreira de defesa com uma resposta inata e adaptativa, e apresenta a maior concentração de anticorpos do que qualquer outro tecido do corpo (CHASE et al., 2019).

O trato reprodutivo da fêmea (TRF) apresenta um sistema imunológico dinâmico devido à ciclicidade da regulação hormonal e da gravidez. São descritos níveis elevados de imunoglobulinas (Ig) IgG e IgA no muco cervicovaginal, bem como IgA, IgE e IgG no útero, o que coloca a IgG como é um importante mecanismo de defesa da mucosa para o TRF (HORTON & VIDARSSON, 2013).

Após o parto, o TRF de vacas apresenta um processo inflamatório ativo com o objetivo de limpar os restos celulares da placenta e responder à possível contaminação bacteriana. Dessa forma, as células da mucosa epitelial do útero se descamam completamente. Já em vacas saudáveis, a inflamação do útero desaparece após a quarta ou quinta semana pós-parto. No entanto, o reparo da TRF

(principalmente do útero) não está completo da sexta a oitava semana pós-parto (DADARWAL et al., 2017). A ativação do sistema imunológico inato também é essencial para a separação da placenta. Durante a primeira semana pós-parto, há aumento do influxo de recrutamento de neutrófilos para o TRF que está intimamente associado ao aumento da secreção de citocinas observado no leite de vacas clinicamente normais até 24 dias (GABLER et al., 2010). Os níveis de neutrófilos diminuem na quarta semana pós-parto, quando a involução uterina está quase completa. Os macrófagos também fornecem um componente crucial na fagocitose, apresentação de antígenos e regulação da inflamação uterina. Uma vez que as bactérias foram eliminadas, estas auxiliam na involução uterina.

A microflora da TRF depende da fertilidade e do estado de parto do animal. Quando saudável, a flora microbiana é uma combinação de microrganismos aeróbicos, anaeróbios facultativos e anaeróbios obrigatórios (WANG et al., 2013). A contaminação bacteriana do útero ocorre por duas a três semanas após o parto devido ao relaxamento das barreiras físicas, incluindo a abertura do colo. Eventos de pressão negativa criados por contrações e relaxamentos uterinos repetidos aumentam a contaminação bacteriana por um efeito de vácuo. Bactérias Gram-negativas predominam no útero bovino durante a primeira semana após o parto e são gradualmente substituídas por bactérias Gram-positivas durante a segunda e terceira semana pós-parto. A contaminação bacteriana é eliminada na maioria das vacas ao final da quarta semana pós-parto (DADARWAL et al., 2017).

2.4 Infecção uterina

Assim como a mastite, a endometrite é considerada uma importante causa de perdas econômicas e infertilidade em vacas leiteiras, resultando em grandes prejuízos na indústria de laticínios (SHELDON et al., 2009; WAGENER et al., 2017).

Um importante parâmetro para avaliar a saúde reprodutiva de um rebanho é o intervalo entre partos, que apresenta estreita relação com o tempo que a vaca retorna à atividade reprodutiva após o parto. Para que isto ocorra, são necessários vários processos como a involução uterina, a regeneração do endométrio, a eliminação do conteúdo bacteriano do útero e a retomada da atividade cíclica ovariana (SHELDON et al. 2008). O risco da ocorrência de doenças uterinas é aumentado quando existem

falhas em um ou mais desses processos, reduzindo assim a fertilidade de vacas leiteiras (DJURICIC et al. 2012). Além disso, outros fatores estão associados, tais quais, endócrinos, imunológicos, genéticos, de manejo e suas interações contribuem para o aumento na incidência de infecções uterinas.

Segundo Sheldon et al. (2006) a endometrite é uma inflamação superficial do endométrio sem sinais sistêmicos. Assim, uma vaca com endometrite clínica apresenta secreção uterina purulenta detectada na vagina a partir dos 21 dias pós-parto (DPP) ou secreção mucopurulenta (50% de muco e 50% de pus) depois dos 26 DPP, sem alterações sistêmicas. No entanto, quando não há evidências dos sinais clínicos da endometrite mas há uma redução no desempenho reprodutivo da fêmea, surge o conceito de endometrite subclínica (ES) (SHELDON et al. 2009).

Infelizmente, não existe um “padrão ouro” para diagnóstico de doença uterina, dificultando a mensuração da sensibilidade e especificidade das definições clínicas (SHELDON et al., 2006).

Segundo a classificação proposta por McDougall et al. (2007) a endometrite clínica pode ser diagnosticada de acordo com a cor e a proporção de pus contido na secreção. O muco pode ser classificado em cinco graus, dos quais grau 0 = ausente, grau 1 = muco cristalino, grau 2 = muco com focos de pus, grau 3 = descarga mucopurulenta, grau 4 = descarga purulenta e grau 5= descarga purulenta com odor fétido.

Já a endometrite subclínica foi determinada por Sheldon et al. (2006) pela presença de >18% de neutrófilos na citologia uterina em amostras coletadas 20 a 33 dias após o parto ou > 10% de neutrófilos em 34 a 47 dias após o parto. A avaliação da inflamação em 40-60 dias pós-parto correspondeu aproximadamente a >5% de neutrófilos (GILBERT et al., 2005). Dessa forma, é possível identificar a enfermidade subclínica, tratar e prevenir recidivas e novos casos.

REFERÊNCIAS

- ABERS, Michael S.; LIONAKIS, Michail S.; KONTOYIANNIS, Dimitrios P. Checkpoint inhibition and infectious diseases: a good thing?. **Trends in molecular medicine**, v. 25, n. 12, p. 1080-1093, 2019.
- ABUELO, Angel et al. Rumination time around dry-off relative to the development of diseases in early-lactation cows. **Journal of dairy science**, v. 104, n. 5, p. 5909-5920, 2021.
- ADEWUYI, A. A.; GRUYS, E.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. **Veterinary quarterly**, v. 27, n. 3, p. 117-126, 2005.
- AKBAR, Haji et al. Alterations in hepatic FGF21, co-regulated genes, and upstream metabolic genes in response to nutrition, ketosis and inflammation in Periparturient Holstein cows. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0139963, 2015.
- ALSEMGEEST, S. P. et al. Periparturient acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 1, p. 164-167, 1993.
- BARBOSA, José Diomedes et al. Cetose nervosa em bovinos, diagnosticada pela Central de Diagnóstico Veterinário (Cedivet) da Universidade Federal do Pará, no período de 2000 a 2009. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 35-40, 2009.
- BARRAGAN, A. A. et al. Assessment of daily activity patterns and biomarkers of pain, inflammation, and stress in lactating dairy cows diagnosed with clinical metritis. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 9, p. 8248-8258, 2018.
- BATISTEL, F. et al. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine alleviates inflammation and oxidative stress and improves neutrophil function during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 1, p. 480-490, 2018.
- BELL, Alan W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of animal science**, v. 73, n. 9, p. 2804-2819, 1995.
- BLOCK, Elliot. Transition cow research—what makes sense today? In: **Proceedings High Plains Dairy Conference**, p. 75-98, 2010.
- BOISE, Lawrence H.; NOEL, Patricia J.; THOMPSON, Craig B. CD28 and apoptosis. **Current opinion in immunology**, v. 7, n. 5, p. 620-625, 1995.
- BRADFORD, Barry J. et al. Daily injection of tumor necrosis factor- α increases hepatic triglycerides and alters transcript abundance of metabolic genes in lactating dairy cattle. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 8, p. 1451-1456, 2009.
- BRANDÃO, Alice Poggi. **Impactos dos principais aspectos do período de transição sobre a produção de leite e resposta inflamatória de vacas leiteiras**. 2016.
- CAMPLER, M. et al. Flooring preferences of dairy cows at calving. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 2, p. 892-896, 2014.

CAMPOS, C. C. et al. Intramammary infusion of lipopolysaccharide promotes inflammation and alters endometrial gene expression in lactating Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 11, p. 10440-10455, 2018.

CANNING, Peter et al. Efficacy and clinical safety of pegbovigrastim for preventing naturally occurring clinical mastitis in periparturient primiparous and multiparous cows on US commercial dairies. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 8, p. 6504-6515, 2017.

CARROLL, Jeffery A.; FORSBERG, Neil E. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, n. 1, p. 105-149, 2007.

CECILIANI, F. et al. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4207-4231, 2012.

CHAN, Jacky Peng-Wen et al. Association of increased serum acute-phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 1, p. 72-78, 2010.

CHAPWANYA, Aspinas et al. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1396-1407, 2009.

CHASE, Christopher; KAUSHIK, Radhey S. Mucosal immune system of cattle: all immune responses begin here. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 431-451, 2019.

CHRISTENSEN, Jens O. et al. Effect of method of delivery of propylene glycol on plasma metabolites of feed-restricted cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 3, p. 563-568, 1997.

CRAY, Carolyn; ZAIAS, Julia; ALTMAN, Norman H. Acute phase response in animals: a review. **Comparative medicine**, v. 59, n. 6, p. 517-526, 2009.

DADARWAL, Dinesh; PALMER, Colin; GRIEBEL, Philip. Mucosal immunity of the postpartum bovine genital tract. **Theriogenology**, v. 104, p. 62-71, 2017.

DE HEREDIA, Fátima Pérez; GÓMEZ-MARTÍNEZ, Sonia; MARCOS, Ascensión. Obesity, inflammation and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 2, p. 332-338, 2012.

DJURICIC, D. et al. Intrauterine ozone treatment of retained fetal membrane in Simmental cows. **Animal reproduction science**, v. 134, n. 3-4, p. 119-124, 2012.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The veterinary journal**, v. 185, n. 1, p. 23-27, 2010.

FERNANDES, A. C. C. et al. Effect of repeated intravenous lipopolysaccharide infusions on systemic inflammatory response and endometrium gene expression in Holstein heifers. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 4, p. 3531-3543, 2019.

FINLAY, B. Brett; MCFADDEN, Grant. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 767-782, 2006.

FREEMAN, Gordon J. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 7, p. 1027-1034, 2000.

GABLER, Christoph et al. Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2010.

GILBERT, Robert O. et al. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p. 1879-1888, 2005.

GRAVERSEN, Jonas Heilskov; MADSEN, Mette; MOESTRUP, Søren K. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 34, n. 4, p. 309-314, 2002.

GRUMMER, Ric R.; MASHEK, Doug G.; HAYIRLI, Armagan. Dry matter intake and energy balance in the transition period. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 20, n. 3, p. 447-470, 2004.

HEINRICH, Peter C.; CASTELL, Jose V.; ANDUS, Tilo. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical journal**, v. 265, n. 3, p. 621, 1990.

HERDT, Thomas H. Ruminant adaptation to negative energy balance: Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 16, n. 2, p. 215-230, 2000.

HIRVONEN, Juhani; PYÖRÄLÄ, Satu; JOUSIMIES-SOMER, Hannele. Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. **Journal of Dairy Research**, v. 63, n. 3, p. 351-360, 1996.

HISS, S. et al. Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3778-3784, 2004.

HORADAGODA, N. U. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, v. 144, n. 16, p. 437-441, 1999.

HORTON, Rachel; VIDARSSON, Gestur. Antibodies and their receptors: different potential roles in mucosal defense. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 200, 2013.

IKEBUCHI, Ryoyo et al. Blockade of bovine PD-1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 1-15, 2013.

INGVARTSEN, K. L.; ANDERSEN, J. B. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 7, p. 1573-1597, 2000.

INGVARTSEN, K. L. Feeding-and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. **Animal feed science and technology**, v. 126, n. 3-4, p. 175-213, 2006.

INGVARTSEN, K. L.; MOYES, K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. **Animal**, v. 7, n. s1, p. 112-122, 2013.

KATO, Gregory J. et al. Haptoglobin halts hemoglobin's havoc. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 8, p. 2140-2142, 2009.

KEIR, Mary E. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 677-704, 2008.

KLENERMAN, Paul; HILL, Ann. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. **Nature immunology**, v. 6, n. 9, p. 873-879, 2005.

KONNAI, S.; MURATA, S.; OHASHI, K. Immune exhaustion during chronic infections in cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 1, p. 1-5, 2016.

KRUMMEL, Matthew F.; ALLISON, James P. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 6, p. 2533-2540, 1996.

LARSON, Marilyn A. et al. Differential expression and secretion of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells stimulated with prolactin or lipopolysaccharide. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, n. 3-4, p. 255-264, 2005.

LAVERY, K.; WAY, A.; KILLIAN, G. Identification and immunohistochemical localization of a haptoglobin-like protein in the tissues and fluids of the bovine (*Bos taurus*) ovary and oviduct. **Reproduction**, v. 125, n. 6, p. 837-846, 2003.

MCCABE, Conor J.; BOERMAN, Jacquelyn P. Invited Review: Quantifying protein mobilization in dairy cows during the transition period. **Applied Animal Science**, v. 36, n. 3, p. 389-396, 2020.

MCDUGALL, S.; MACAULAY, R.; COMPTON, C. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. **Animal reproduction science**, v. 99, n. 1-2, p. 9-23, 2007.

MOLENAAR, Adrian J. et al. The acute-phase protein serum amyloid A3 is expressed in the bovine mammary gland and plays a role in host defence. **Biomarkers**, v. 14, n. 1, p. 26-37, 2009.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.

NOEL, Patricia J. et al. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 2, p. 636-642, 1996.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL et al. **Nutrient requirements of dairy cattle: 2001**. National Academies Press, 2001.

OKAGAWA, Tomohiro et al. Bovine immunoinhibitory receptors contribute to suppression of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-specific T-cell responses. **Infection and immunity**, v. 84, n. 1, p. 77-89, 2016.

OVERTON, Thomas R. Managing the metabolism of transition cows. In: **CONFERENCE SPONSORS**. 2004. p. 164.

PARK, A. F. et al. Changes in rumen capacity during the periparturient period in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 84, n. Suppl 1, p. 82, 2001.

PAULINA, J.; TADEUSZ, S. Acute Phase Proteins in Cattle, **Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases**, Prof. Francisco Veas (Ed.), ISBN: 978-953-307-873-1, InTech. 2011.

RABELO, Euler; CAMPOS, Betânia G. Fisiologia do período de transição. **Ciência Animal Brasileira**, 2009.

ROGERS, Paul R. et al. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. **Immunity**, v. 15, n. 3, p. 445-455, 2001.

SHELDON, I. M. et al. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. **Veterinary Record**, v. 148, n. 6, p. 172-175, 2001.

SHELDON, I. Martin et al. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516-1530, 2006.

SHELDON, I. Martin et al. Uterine diseases in cattle after parturition. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 115-121, 2008.

SHELDON, I. Martin et al. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 6, p. 1025-1032, 2009.

SILVA, D.M. **Isolamento, caracterização e genômica comparativa de patógenos de mastite bovina**. 2016. 89p. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

SKOVGAARD, KERSTIN et al. Rapid and widely disseminated acute phase protein response after experimental bacterial infection of pigs. **Veterinary Research**, v. 40, n. 3, p. 1-12, 2009.

SORDILLO, Lorraine M.; RAPHAEL, William. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 29, n. 2, p. 267-278, 2013.

SORDILLO, L. M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 6, p. 4967-4982, 2016.

TEFT, Wendy A.; KIRCHHOF, Mark G.; MADRENAS, Joaquín. A molecular perspective of CTLA-4 function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 24, p. 65-97, 2006.

THIELEN, M. A. et al. Cellular localization of haptoglobin mRNA in the experimentally infected bovine mammary gland. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 3, p. 1215-1219, 2007.

TREVISI, Erminio et al. Metabolic changes in dairy cows induced by oral, low-dose interferon-alpha treatment. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 9, p. 3020-3029, 2009.

UCHIDA, Eiji; KATOH, Norio; TAKAHASHI, Kiyoshi. Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 5, p. 893-894, 1993.

WAGENER, Karen; GABLER, Christoph; DRILLICH, Marc. A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. **Theriogenology**, v. 94, p. 21-30, 2017.

WALUNAS, Theresa L.; BAKKER, Christina Y.; BLUESTONE, Jeffrey A. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 6, p. 2541-2550, 1996.

WANG, Yvonne et al. Characterisation of the bacterial microbiota of the vagina of dairy cows and isolation of pediocin-producing *Pediococcus acidilactici*. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2013.

WATHES, D. Claire; CLEMPSON, Andrew M.; POLLOTT, Geoff E. Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 1, p. 48-61, 2012.

WATTS, Tania H.; DEBENEDETTE, Mark A. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. **Current opinion in immunology**, v. 11, n. 3, p. 286-293, 1999.

WHERRY, E. John. T cell exhaustion. **Nature immunology**, v. 12, n. 6, p. 492-499, 2011.

3 CAPÍTULO II – Nota científica: EXPRESSÃO DE PD-1 E CTLA-4 EM LINFÓCITOS T E SUA RELAÇÃO COM O PERÍODO PERIPARTURIENTE E CITOLOGIA ENDOMETRIAL NO PERÍODO PÓS-PARTO EM VACAS LEITEIRAS ¹

3.1 RESUMO

O presente estudo buscou avaliar a expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos T sanguíneos durante o período periparturiente e sua relação com a saúde uterina, determinada pela citologia endometrial, e as concentrações séricas de β -hidroxibutirato (BHB) e ácidos graxos não esterificados (NEFA), indicadores de balanço energético negativo. Para isso, foi realizada a coleta de sangue periférico de 26 vacas leiteiras 14 dias anterior ao parto (T-14), no parto (T0) e 30 dias pós-parto (T30) para determinação da expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos T sanguíneos por citometria de fluxo e nos dias T0, 10 após o parto (T10), e T30 para obtenção de soro e determinação sérica de NEFA, BHB e da proteína de fase aguda haptoglobina. A citologia endometrial foi realizada em T10, 20 dias após o parto (T20) e T30. Nossos achados sugerem que os *immune checkpoints* apresentam papel fundamental na tolerância imunológica durante a gestação bovina, que por outro lado, caso sejam altamente expressos em linfócitos T podem inibir a resposta imune de tal modo que levam a implicações negativas para saúde uterina. Assim, o presente estudo representa um passo inicial que abre caminho para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas dirigidas pelo hospedeiro com o objetivo de aumentar a resistência dos bovinos leiteiros a infecções neste período crítico da vida destes animais.

Palavras-Chave: pontos de controle imunológicos; citologia endometrial; vaca leiteira.

3.2 INTRODUÇÃO

O período de transição em vacas de leite, compreendido entre as três semanas que antecedem ao parto até as três semanas após o parto, é caracterizado por drásticas alterações metabólicas e na resposta imune. Este período possui desafio para esses animais que resultam em maior suscetibilidade às enfermidades (LEBLANC, 2010; MEZZETTI et al., 2021). Com isto, destaca-se a endometrite que é a principal causa de infertilidade nos rebanhos leiteiros (PAIANO et al., 2022), no qual a citologia endometrial é amplamente empregada para o seu diagnóstico.

¹ Artigo submetido à revista Frontiers

Apesar da maioria das vacas leiteiras estarem sujeitas à contaminação bacteriana do útero no período pós-parto, apenas uma fração destes animais desenvolvem a doença. No entanto, os mecanismos que determinam o processo pelo qual alguns animais resolvem a infecção uterina, enquanto outras resistem à infecção ainda não é totalmente compreendido. Diversos estudos vem sendo desenvolvidos acerca dos pontos de controle imunológicos que podem estar envolvidos com o surgimento ou mesmo a manutenção de diferentes doenças, dentre os quais podem ser destacados a proteína 1 de morte celular programada (PD-1) e proteína 4 associada a linfócitos citotóxicos (CTLA-4) que são expressas nas células T induzindo sua exaustão imune (BARBER et al., 2006; DAY et al., 2006; DONG et al., 2002; SZNOL & CHEN, 2013) promovendo um mecanismo de retroalimentação negativa. Esse processo resulta na inibição da produção de importantes mediadores inflamatórios como as citocinas interferon (IFN)- γ e interleucina (IL)-2, redução na proliferação celular e atividade citotóxica, sendo, portanto, associado à imunossupressão, progressão de doenças e prognóstico desfavorável (GOTO et al., 2017). No entanto, a relação destes pontos de controle imunológicos com o período de transição em vacas leiteiras e a saúde uterina no período pós-parto em vacas leiteiras ainda não foi estudado.

Desta forma, o presente estudo buscou avaliar a expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos T sanguíneos durante o período periparturiente e sua relação com a saúde uterina, determinada pela citologia endometrial, e as concentrações séricas de β -hidroxibutirato (BHB) e ácidos graxos não esterificados (NEFA), indicadores de balanço energético negativo.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

Animais e delineamento experimental

Para o presente estudo foi utilizada 26 vacas leiteiras, destas 19 vacas multíparas e 7 primíparas, proveniente de duas propriedades leiteiras. Neste contexto, foram utilizados 16 animais da raça zebuína guzerá (Fazenda A) e 10 animais da raça girolando, composta pelo cruzamento de bovinos da raça holandesa e Gir (Fazenda B). A coleta de sangue periférico foi realizada 14 dias anterior ao parto (T-14), no parto (T0) e 30 dias pós-parto (T30) para determinação da expressão de PD-1 e CTLA-4

em linfócitos T sanguíneos. Além disso, realizamos coleta de sangue nos dias T0, 10 após o parto (T10), e T30 para obtenção de soro e determinação da concentração sérica de NEFA, BHB e da proteína de fase aguda haptoglobina. A citologia endometrial foi realizada em T10, 20 dias após o parto (T20) e T30.

Coleta de amostras de sangue periférico

As amostras de sangue periférico foram coletadas assepticamente por venopunção da veia jugular em tubos do tipo vacutainer® 12 ml contendo heparina sódica (T-14, T0 e T30; cat. n. 367871, BD Biosciences, Nova Jersey, EUA) e 4ml sem anticoagulante (T0, T10, e T30; cat. n.367812, BD Biosciences, Nova Jersey, EUA). O soro sanguíneo foi obtido através de centrifugação por 10 minutos e 2.500 x g a temperatura ambiente.

Concentrações séricas de NEFA, BHB e Haptoglobina

Considerando a importância do metabolismo hepático dos NEFAs para os ruminantes, podemos dizer que as concentrações circulantes de NEFA e BHB mede aspectos do sucesso da adaptação ao balanço energético negativo (ADEWUYI et al., 2005), além de serem considerados importantes marcadores do metabolismo e da fisiologia da vaca periparturiente (BELL, 1995; OVERTON, 2004). Dessa forma, as análises das concentrações séricas de BHB e NEFA foram realizadas com um analisador automático (Randox Rx Daytona Chemistry Analyzer™, Crumlin, UK) usando kits comerciais Randox® (Randox Laboratories, Crumlin, UK) para BHB (Randox, RB 1007) e NEFA (Randox, FA115). O valor de corte estabelecido para determinar cetose foi 1,2 mmol/L para BHB e 0,8 mmol/L para NEFA, conforme previamente descrito por Roberts et al. (2012).

A mensuração das proteínas de fase aguda é amplamente utilizada no diagnóstico de enfermidades em ruminantes, sendo importante indicadores de processos inflamatórios em bovinos (ECKERSALL & BELL, 2010), no qual Haptoglobina (Hp) se destaca por sua alta sensibilidade e especificada, e sua capacidade de discriminar infecções agudas e crônicas (HORADAGODA et al., 1999), sendo portanto, a proteína de fase aguda mais estudada e utilizada para detectar

vacas com alto risco de doença sistêmica e inflamação pós-parto grave em bovinos (SCHMITT et al., 2021). As análises das concentrações séricas de haptoglobina foram determinadas por procedimento colorimétrico que mede a complexação da haptoglobina-hemoglobina estimando as diferenças na atividade da peroxidase, conforme previamente descrito por MAKIMURA e SUZUKI (1982).

Citologia endometrial

Para avaliação da saúde uterina foi realizada a citologia endometrial (CE) com o auxílio da escova cervical Cytobrush® (Kolplast, Itupeva, Brasil). A coleta de conteúdo uterino foi realizada conforme descrito por Martins et al. (2014), na qual consistiu na coleta de amostras utilizando uma escova ginecológica humana acoplada a um aplicador universal de sêmen com haste inoxidável e protegido por uma bacia francesa e camisa sanitária. Primeiramente, foi feita a higienização prévia da vulva com papel toalha, em seguida após a passagem pela cérvix, e chegada até a base do corpo uterino, a camisa sanitária era rompida e o embolo do aplicador empurrado para frente expondo a escova, que em contato com o endométrio, foi rotacionada em sentido horário e então removida como descrito por Moura et al. (2012). Posteriormente, foram realizados esfregaços com movimentos circulares leves em lâminas com o conteúdo uterino obtido na escova cervical Cytobrush® (Kolplast, Itupeva, Brasil), e posteriormente as lâminas confeccionadas foram coradas com panótico rápido para avaliação da celularidade, através da microscopia ótica. A CE foi determinada pela avaliação do percentual de neutrófilos, a partir da contagem de 100 células, no aumento de 100 X. Para o presente estudo, animais que apresentaram >18% de neutrófilos na citologia uterina das amostras coletadas em T20 e T30 foram considerados com diagnóstico de endometrite, conforme previamente descrito (SHELDON et al. 2006).

Expressão de PD-1 e CTLA-4 na população de linfócitos T

Inicialmente, as células mononucleares do sangue venoso periférico (PBMCs) foram isoladas por gradiente de densidade Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, Darmstadt, Alemanha) conforme recomendações do fabricante e posteriormente

foram congeladas no freezer a -80°C por 120 dias. As PBMCs de cada amostra foram transferidas para dois tubos de polipropileno (A e B) de 5 mL, fundo redondo, 12 x 75mm, próprios para citometria de fluxo, no qual foram incubados por 30 min em temperatura ambiente com os anticorpos primários. Previamente foi feita a quantificação dos anticorpos e com isso no tubo A continha 1 μL do anticorpo primário *mouse anti-bovine IgG1 CD3* (clone MM1A, cat. n. BOV 2009, Washington State University Monoclonal Antibody Center, EUA) e *goat anti-human PD-1* com reação cruzada com bovinos (diluído 1/10 em PBS com 1% soro fetal bovino inativado estéril pelo calor e 0,09% de azida sódica; cat. n. LS-C55247-100, LSBIO, EUA) e o tubo B continha 1 μL do anticorpo primário *mouse anti-bovine IgG1 CD3* (clone MM1A, cat. n. BOV 2009, Washington State University Monoclonal Antibody Center, EUA) e *goat anti-human CTLA-4* com reação cruzada com bovinos (diluído 1/10 em PBS com 1% soro fetal bovino inativado estéril pelo calor e 0,09% de azida sódica; cat. n. AF-386-PB, R&D Systems, EUA). Depois do período de incubação as células foram lavadas com PBS, centrifugadas a $250 \times g$ a 4°C por 8 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 100 μL de PBS, e os anticorpos secundários cabra anti-IgG1 de camundongo conjugado com PE-Texas-Red (cat. n. M32017, ThermoFisher, EUA) e burro anti-cabra IgG *cross-adsorbed* conjugado com Alexa Fluor 488 (cat. n. A11055, ThermoFisher, Carlsbad, EUA) foram adicionados. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Posterior ao período de incubação, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas a $250 \times g$ a 4°C por 8 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 300 μL de PBS com 1% soro fetal bovino inativado pelo calor. As leituras da amostra foram realizadas usando um citometro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA). Para este ensaio foram examinadas 10.000 células de cada amostra. Um controle não corado, controle de anticorpo secundário e amostras de PBMCs coradas simples também foram preparadas como controles de compensação. O software Flow Jo Tree Star (FlowJo - Treestar 10.5.3 para Windows, Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA) foi utilizado para analisar os dados (Figura Suplementar 1).

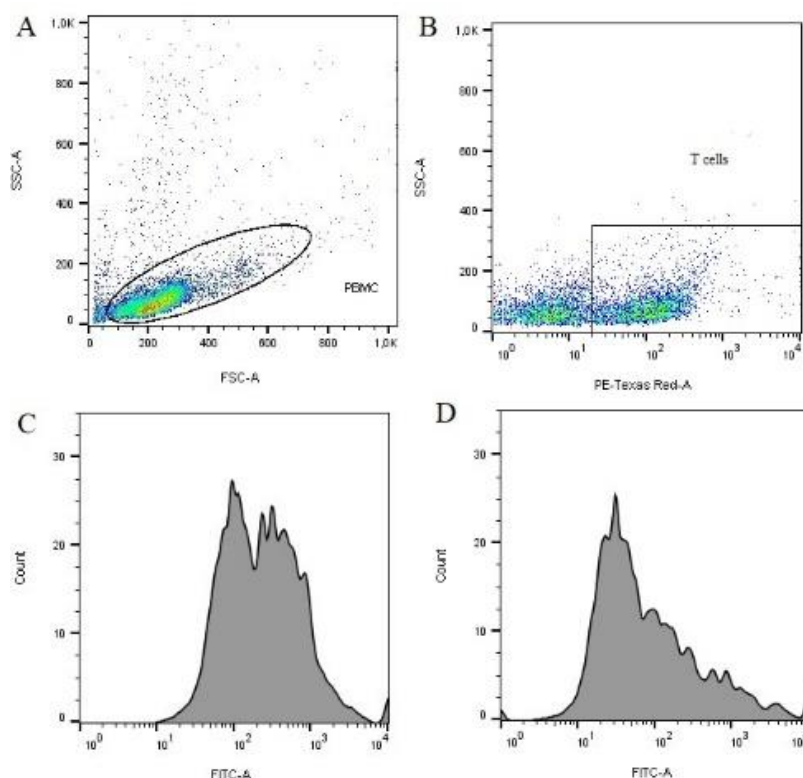


Figura Suplementar 1. Esquema sucessivo de gates para determinação da expressão de PD-1 em linfócitos T. Inicialmente, a população de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi identificada após exclusão da maioria dos debris celulares (A). Posteriormente, os linfócitos foram identificados com base em sua granularidade citoplasmática e intensidade de fluorescência seguindo um protocolo de imunomarcção fluorescente de duas etapas usando anticorpo monoclonal (Ab) primário anti-bovino específico para identificação de linfócitos T (CD3⁺) e Abs secundários acoplados a comprimento de onda longo sonda fluorescente [PE (Phycoerythrin)-Texas Red] (B). Posteriormente, o histograma mostra a expressão de PD-1 por linfócitos T 14 dias anterior ao parto (T-14; C) e 30 dias após o parto (T30, D) seguindo um protocolo de imunomarcção fluorescente de duas etapas usando anticorpo monoclonal (Ab) primário com reação cruzada com bovinos para identificação de PD-1 e Abs secundários acoplados a comprimento de onda longo sonda fluorescente (Alexa-Fluor 488) (D).

Análise estatística

A distribuição dos dados foi avaliada inicialmente pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados de distribuição paramétrica foram submetidos à análise de variância, pelo teste de *Student-Newman-Keuls* para comparação de cada variável analisada nos distintos

momentos. As variáveis com distribuição não-paramétrica foram comparadas pelo teste de *Kruskal Wallis*, seguido pelo teste de *Dunn's*, para verificação de significância ($P \leq 0,05$), exceto quando indicado. As correlações entre as variáveis analisadas deram-se pela correlação de Pearson e de Spearman para dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente. O programa estatístico GraphPad Prism 9.0 foi utilizado (GraphPad software, Inc., San Diego, EUA).

Para investigar a associação entre a expressão de CTLA-4 e PD-1 em linfócitos T, com a endometrite dada pela porcentagem de neutrófilos $> 18\%$ na CE em T20 e T30, utilizou-se da regressão linear generalizada, tendo como variável dependente a afecção e variáveis explicativas como o momento de coleta, o número de partos e a fazenda. Todas estas análises foram realizadas no programa R (R Core Team, 2021) e os pacotes tidyverse (Wickham, 2019) e broom (Robinson, Hayes & Couch, 2021). Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro-padrão, e para todas as análises utilizou-se $\alpha = 5\%$, exceto quando indicado.

2.4 RESULTADOS

No presente estudo não foram observadas diferenças estatísticas no modelo de regressão linear generalizada entre vacas multíparas e primíparas e efeito das fazendas leiteiras nas variáveis analisadas. A porcentagem de neutrófilos na CE no T10 ($27,50 \pm 5,90$), T20 ($30,31 \pm 5,26$) e T30 ($14,65 \pm 4,00$) também não diferiu entre os momentos analisados ($P = 0,12$).

A cetose determinada pelas concentrações séricas de BHB e NEFA foram detectados em pelo menos um dos momentos avaliados em 23,08% ($n = 6$) e 15,38% ($n = 5$), respectivamente. Além disso, a cetose não apresentou associação com a expressão de CTLA-4 e PD-1 em linfócitos T sanguíneos no modelo de regressão linear generalizada. Os tempos analisados não impactaram na concentração sérica de BHB ($P = 0,45$) e haptoglobina ($P = 0,38$), no entanto a concentração sérica de NEFA foi maior em T0 que T10 ($P = 0,02$; Figura Suplementar 2).

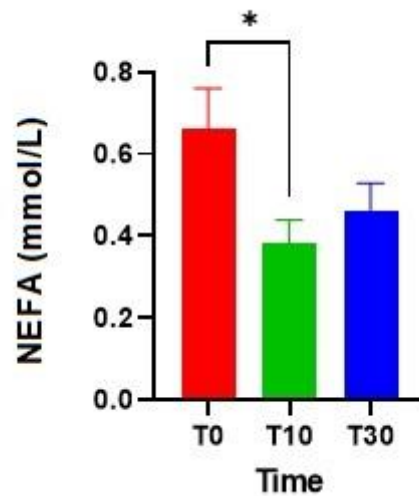


Figura Suplementar 2. Concentração sérica de Ácido Graxo Não Esterificado (NEFA) (mmol/L) aos 10 (T10), 20 (T20) e 30 (T30) dias pós-parto. * ($P = 0,02$).

Um dos resultados que merece destaque foi a maior expressão de CTLA-4 em linfócitos T no T-14 ($P = 0,0007$) e T0 ($P = 0,0004$) quando comparado com T30 (Figura 1A). A expressão de PD-1 em linfócitos T no T-14 também foi maior que T30 ($P = 0,003$; Figura 1B). No modelo de regressão linear generalizada, a porcentagem de neutrófilos determinada pela CE no T20 apresentou uma associação com a expressão de PD-1 em linfócitos T ($P = 0,02$) e uma tendência com a expressão de CTLA-4 em linfócitos T ($P = 0,086$). Além disto, animais com porcentagem de neutrófilos > 18 determinada pela CE (indicador de endometrite) em T30 apresentaram em T0 maior expressão de PD-1 por linfócitos T ($P = 0,009$), assim como tendência a maior expressão de PD-1 em T30 ($P = 0,09$; Figura 2).

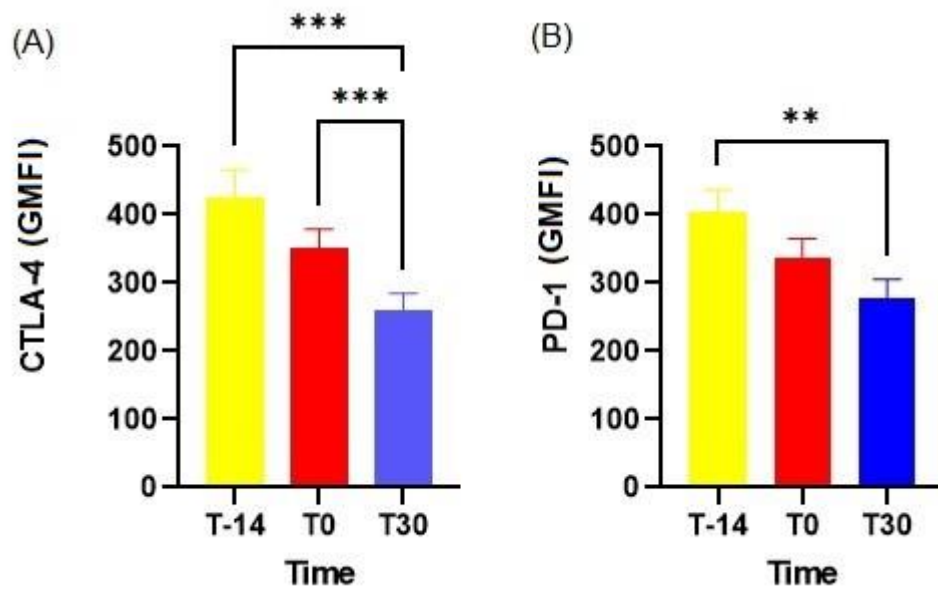


Figura 1. Expressão de CTLA-4 média geométrica de intensidade de fluorescência (GMFI) (A) e PD-1 média geométrica de intensidade de fluorescência (GMFI) por linfócitos T sanguíneos em vacas leiteiras no T-14, T0 e T30 (B). T-14 = 14 dias antes do parto; T0 = dia do parto; T30 = 30 dias pós-parto; *** ($P = 0,0007$); *** ($P = 0,0004$); ** ($P = 0,003$).

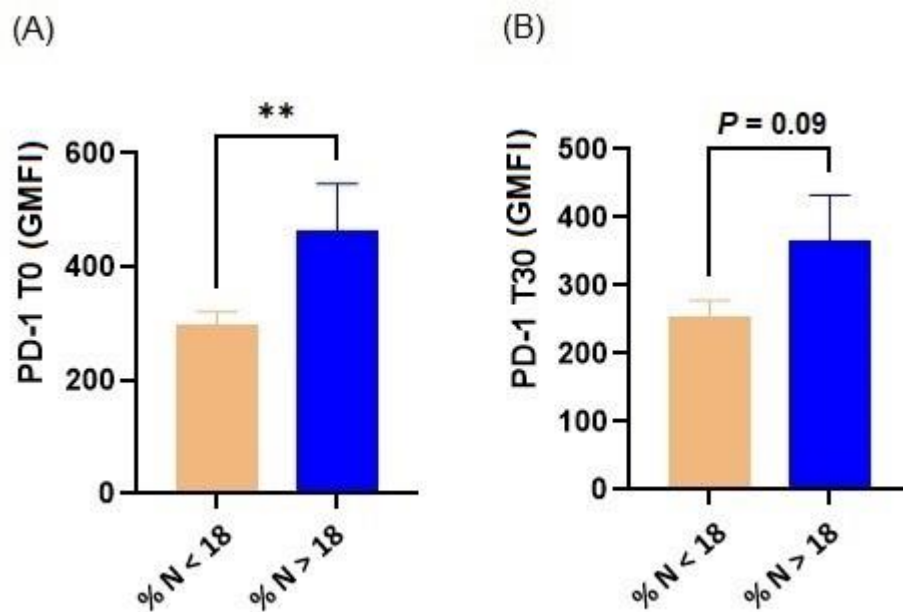


Figura 2. Expressão de PD-1 média geométrica de intensidade de fluorescência (GMFI) por linfócitos T sanguíneos no T0 (A) e T30 (B) em vacas leiteiras com porcentagem de neutrófilos menor (% N < 18) e maior que 18 (% N > 18) detectada por citologia endometrial em T30. T0 = dia do parto; T30 = 30 dias pós-parto; ** ($P = 0,009$).

A expressão de CTLA-4 em linfócitos T sanguíneos no T-14 apresentou correlação com a porcentagem de neutrófilos no T30 ($r = 0,56$; $P = 0,01$) e a concentração sérica de haptoglobina T30 ($r = 0,68$; $P = 0,002$). Também no T-14 a

expressão de PD-1 em linfócitos T apresentou correlação com a concentração sérica de haptoglobina T30 ($r = 0,62$; $P = 0,006$). Já no T0, a expressão de CTLA-4 em linfócitos T teve novamente correlação com porcentagem de neutrófilos T30 ($r = 0,50$; $P = 0,03$) e a concentração sérica de haptoglobina T30 ($r = 0,66$; $P = 0,003$), da mesma forma no T0 a expressão de PD-1 em linfócitos T houve correlação significativa com porcentagem de neutrófilos T30 ($r = 0,62$; $P = 0,006$) e a concentração sérica de haptoglobina T30 ($r = 0,72$; $P = 0,0007$).

Ademais, a concentração sérica de haptoglobina no T10 apresentou correlação com a expressão de CTLA-4 em linfócitos T no T30 ($r = 0,74$; $P = 0,0005$), e expressão de PD-1 em linfócitos T no T30 ($r = 0,63$; $P = 0,005$). A concentração sérica de haptoglobina no T30 apresentou correlação com expressão de CTLA-4 em linfócitos T no T30 ($r = 0,65$; $P = 0,41$), e expressão de PD-1 em linfócitos T no T30 ($r = 0,65$; $P = 0,004$).

2.5 DISCUSSÃO

O período pós-parto em vacas leiteiras representa a finalização com sucesso de um longo período de gestação no qual existe um desafio para a imunidade uterina que por um lado precisa estar suprimida para limitar a resposta imune contra o concepto halogênico. Nesta fase, a diferenciação das células T regulatórias é crucial para inibir as repostas de células T e o processo inflamatório, no entanto por outro lado, a resposta imune precisa atuar contra infecções (MEGGYES et al. 2019). Neste cenário, sabe-se que os *immune checkpoints* CTLA-4 e PD-1 são amplamente reconhecidos como reguladores negativos da imunidade das células T (BUCHBINDER & DESAI, 2016). Assim, a maior expressão de CTLA-4 e PD-1 em linfócitos T no período pré-parto nas vacas leiteiras no presente estudo indica seu importante papel na manutenção da tolerância imunológica materna que ocorre durante a gestação, como previamente reportado em humanos (ANDRIKOPOULOU et al., 2021; ENNINGA et al., 2018; MIKO et al., 2019; WANG et al., 2019) e em ratos (TIAN et al., 2016). De fato, as células T desempenham papel fundamental na indução e manutenção da tolerância materno-fetal, pois são capazes de se diferenciar em subconjuntos distintos, incluindo células Th1, Th2, Th17 e Treg e há dominância de citocinas do tipo Th2 e do tipo Treg durante a gestação normal os quais são considerados os principais

mecanismos de indução de tolerância ao feto, já em aborto espontâneo existe uma dominância por citocinas do tipo Th1 (ARCK & HECHER, 2013; PICCINNI 1998). Neste ponto, a progesterona, apesar de não sido mensurada no experimento, parece ter papel importante no processo de tolerância imunológica materna e na indução da expressão dos *immune checkpoints* CTLA-4 e PD-1 em linfócitos T (D'ALOTTO-MORENO et al., 2015).

Ademais, é notório que a intensidade da imunossupressão uterina que ocorre durante o período pré-parto e a rápida restauração dos mecanismos de defesa determinam se o animal irá desenvolver ou não metrite ou endometrite no período pós-parto (HANSEN et al., 2013). Este fato pode explicar, pelo menos em parte, a relação entre a expressão dos *immune checkpoints* CTLA-4 e PD-1 em linfócitos T no pré-parto e ao parto com a citologia endometrial no período entre T20 e T30, importante ferramenta empregada no diagnóstico da endometrite bovina. Além disto, a maior expressão dos *immune checkpoints* CTLA-4 e PD-1 em linfócitos T pode explicar a susceptibilidade dos bovinos leiteiros à infecção no período pré-parto e ao parto, especialmente ao considerarmos a importância das células T para a imunidade de mucosas (CHASE & KAUSHIK, 2019). Não por acaso, a prevalência de nova infecções intramamárias no período pré-parto e ao parto também é muito alta (DE VLIEGHER et al., 2012), e pode ser explicada pelo menos em parte pelos achados do presente estudo, no entanto merece mais pesquisas. Também, o supracitado é reforçado pela correlação entre a expressão dos *immune checkpoints* CTLA-4 e PD-1 em linfócitos T no pré-parto e com o aumento na concentração sérica de haptoglobina, que é a proteína de fase aguda mais importante em bovinos (ECKERSALL & BELL, 2010; BRANDÃO, 2016), geralmente associada a processos inflamatórios decorrentes de infecções.

Embora o balanço energético negativo ganhe destaque no período pós-parto, com evidente elevação das concentrações séricas de BHB e NEFA, este tem implicações negativas para a resposta imune (WATHES et al, 2009; ESPOSITO et al., 2014) levando a ocorrência de distúrbios metabólicos e doenças infecciosas como a hipocalcemia, deslocamento de abomaso, mastite e metrite (OSPINA et al., 2010; CHAPINAL et al., 2011). Contudo, o presente estudo não apontou relação entre as concentrações séricas de BHB e NEFA, ou a ocorrência de cetose, com a expressão de CTLA-4 e PD-1 em linfócitos T sanguíneos, sugerindo que a reconhecida

imunossupressão relacionada ao balanço energético negativo não está relacionada com a expressão dos *immune checkpoints* estudados aqui em linfócitos T.

No entanto, como a inibição de linfócitos T por este *immune checkpoints* é reversível, por exemplo pelo uso de anticorpos monoclonais anti-ligante de morte programada 1 (PD-L1), anti-PD-1 ou anti-CTLA-4, abrindo novas fronteiras para o tratamento e prevenção de enfermidades. Assim, a inibição funcional de fatores imunossupressores representa ferramentas viáveis para reativar células imunes em um estado de tolerância, sendo uma nova estratégia terapêutica para infecções crônicas, doenças tumorais ou como uma abordagem para aumentar a eficácia das vacinas (KONNAI et al., 2016).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apontou para o importante papel da expressão de PD-1 e CTLA-4 em linfócitos T durante o período periparturiente e seu reflexo na saúde uterina. Desta forma, nossos achados sugerem que os *immune checkpoints* apresentam papel fundamental na tolerância imunológica durante a gestação bovina, que por outro lado, caso sejam altamente expressos em linfócitos T podem inibir a resposta imune de tal modo que levam a implicações negativas para saúde uterina. Assim, o presente estudo representa um passo inicial que abre caminho para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas dirigidas pelo hospedeiro com o objetivo de aumentar a resistência dos bovinos leiteiros a infecções neste período crítico da vida destes animais.

REFERÊNCIAS

ADEWUYI, A. A.; GRUYS, E.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. **Veterinary quarterly**, v. 27, n. 3, p. 117-126, 2005.

ANDRIKOPOULOU, A. et al. Immune checkpoint inhibitor administration during pregnancy: a case series. **ESMO open**, v. 6, n. 5, p. 100262, 2021.

ARCK, Petra C.; HECHER, Kurt. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. **Nature medicine**, v. 19, n. 5, p. 548-556, 2013.

BARBER, Daniel L. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature**, v. 439, n. 7077, p. 682-687, 2006.

BELL, Alan W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of animal science**, v. 73, n. 9, p. 2804-2819, 1995.

BRANDÃO, A. P. et al. Physiologic, health, and production responses of dairy cows supplemented with an immunomodulatory feed ingredient during the transition period. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 7, p. 5562-5572, 2016.

BUCHBINDER, Elizabeth I.; DESAI, Anupam. CTLA-4 and PD-1 pathways: similarities, differences, and implications of their inhibition. **American journal of clinical oncology**, v. 39, n. 1, p. 98, 2016.

CHAPINAL, N. et al. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. **Journal of dairy science**. v. 94 p. 4897-4903, 2011.

CHASE, Christopher; KAUSHIK, Radhey S. Mucosal immune system of cattle: all immune responses begin here. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 431-451, 2019.

D'ALOTTO-MORENO, T. et al. Progesterone links tumor-associated immunosuppression and metastasis in triple-negative breast cancer. In: **Front. Immunol. Conference Abstract: IMMUNOCOLOMBIA2015-11th Congress of the Latin American Association of Immunology-10o. Congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología**. 2015.

DAY, Cheryl L. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature**, v. 443, n. 7:109, p. 350-354, 2006.

DE VliegHER, Sarne et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 3, p. 1025-1040, 2012.

DONG, Haidong et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. **Nature medicine**, v. 8, n. 8, p. 793-800, 2002.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The veterinary journal**, v. 185, n. 1, p. 23-27, 2010.

ENNINGA, Elizabeth Ann L. et al. Immune checkpoint molecules soluble program death ligand 1 and galectin-9 are increased in pregnancy. **American journal of reproductive immunology**, v. 79, n. 2, p. e12795, 2018.

ESPOSITO, Giulia et al. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal reproduction science**, v. 144, n. 3-4, p. 60-71, 2014.

GOTO, Shinya et al. Increase of cells expressing PD-1 and PD-L1 and enhancement of IFN- γ production via PD-1/PD-L1 blockade in Bovine mycoplasmosis. **Immunity, inflammation and disease**, v. 5, n. 3, p. 355-363, 2017.

HANSEN, P. J. PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Maternal immunological adjustments to pregnancy and parturition in ruminants and possible implications for postpartum uterine health: Is there a prepartum–postpartum nexus?. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 4, p. 1639-1649, 2013.

KONNAI, Satoru; MURATA, Shiro; OHASHI, Kazuhiko. Immune exhaustion during chronic infections in cattle. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 1, p. 1-5, 2017.

- LEBLANC, Stephen. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **Journal of reproduction and Development**, v. 56, n. S, p. 29-35, 2010.
- MAKIMURA, S.; SUZUKI, N. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. **Japanese Journal of Veterinary Science** v. 44, n. 1, p. 15-21, 1982.
- MARTINS, T. M.; SANTOS, R. L.; MUNIZ, C. S. Imunidade inata uterina em vacas após o parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**-Belo Horizonte, v. 38, n. 2014, p. 214-219, 2014.
- MEGGYES, Matyas et al. The importance of the PD-1/PD-L1 pathway at the maternal-fetal interface. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2019.
- MEZZETTI, Matteo et al. The Transition Period Updated: A Review of the New Insights into the Adaptation of Dairy Cows to the New Lactation. **Dairy**, v. 2, n. 4, p. 617-636, 2021.
- MIKO, Eva et al. Immune checkpoint molecules in reproductive immunology. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 846, 2019.
- MOURA, Ana Rita Ferreira et al. Endometrite subclínica após o tratamento de vacas com endometrite clínica. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, n. 3, p. 32-41, 2012.
- OSPINA, P. A. et al. Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 8, p. 3595-3601, 2010.
- OVERTON, Thomas R. Managing the metabolism of transition cows. In: **CONFERENCE SPONSORS**, p. 164, 2004.
- PAIANO, R. B. et al. Assessment of the main pathogens associated with clinical and subclinical endometritis in cows by culture and MALDI-TOF mass spectrometry identification. **Journal of Dairy Science**, 2022.
- PICCINNI, Marie-Pierre et al. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. **Nature medicine**, v. 4, n. 9, p. 1020-1024, 1998.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- ROBERTS, T. et al. Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 6, p. 3057-3063, 2012.
- ROBINSON, D.; HAYES, A.; COUCH, S. Convert Statistical Objects into Tidy Tibbles. **R Package Version 0.7**, v. 6, 2021.
- SCHMITT, Ruth et al. Evaluation of different acute-phase proteins for herd health diagnostics in early postpartum Holstein Friesian dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v. 88, n. 1, p. 33-37, 2021.
- SHELDON, I. M. Endometritis in cattle: pathogenesis, consequences for fertility, diagnosis and therapeutic recommendations. **Partners in Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 1-5, 2006.

- SHELDON, I. Martin et al. Preventing postpartum uterine disease in dairy cattle depends on avoiding, tolerating and resisting pathogenic bacteria. **Theriogenology**, v. 150, p. 158-165, 2020.
- SZNOL, Mario; CHEN, Lieping. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. **Clinical cancer research**, v. 19, n. 5, p. 1021-1034, 2013.
- TIAN, Mei et al. The PD-1/PD-L1 inhibitory pathway is altered in pre-eclampsia and regulates T cell responses in pre-eclamptic rats. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.
- TRIPATHI, Sudipta; GULERIA, Indira. Role of PD-1/PDL1 pathway, and TH17 and treg cells in maternal tolerance to the fetus. **Biomedical journal**, v. 38, n. 1, 2015.
- WANG, Songcun et al. Blockade of CTLA-4 and Tim-3 pathways induces fetal loss with altered cytokine profiles by decidual CD4+ T cells. **Cell death & disease**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2019.
- WATHES, D. Claire; CLEMPSON, Andrew M.; POLLOTT, Geoff E. Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 1, p. 48-61, 2012.
- WICKHAM, H. et al. Welcome to the tidyverse. **Journal of Open Source Software** 4: 1686. 2019.
- ZHANG, Yong-Hong et al. Recent insight into the role of the PD-1/PD-L1 pathway in feto-maternal tolerance and pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 74, n. 3, p. 201-208, 2015.