

Telma da Mata Martins

**AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE INATA UTERINA EM VACAS:
TRANSCRIÇÃO ENDOMETRIAL DE RECEPTORES DE
PADRÕES MOLECULARES MICROBIANOS NO PÓS-PARTO
E HISTOPATOLOGIA APÓS INFUSÃO DE
ESCHERICHIA COLI INATIVADA NA FASE DE ESTRO**

Tese apresentada na Escola de Veterinária da
UFMG como requisito parcial para conclusão
do curso de Doutorado em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Álan Maia Borges

Coorientadores: Prof. Renato de Lima Santos
Prof^ª. Tatiane Alves da Paixão

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2014**

Martins, Telma da Mata, 1982-
M386a Avaliação da imunidade inata uterina em vacas: transcrição endometrial de receptores de padrões moleculares microbianos no pós-parto e histopatologia após infusão de *Escherichia coli* inativada na fase de estro / Telma da Mata Martins. – 2014.
172 p. : il.

Orientador: Alan Maia Borges

Coorientadores: Renato de Lima Santos, Tatiane Alves da Paixão

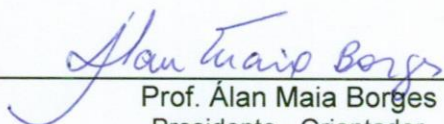
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

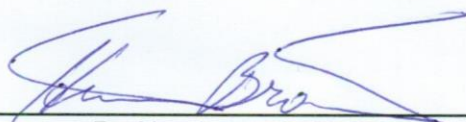
1. Vaca – Reprodução – Teses. 2. Útero – Infecções – Teses. 3. Endométrio – Infecções – Teses. 4. *Escherichia coli* – Teses. 5. Estro – Teses. I. Borges, Alan Maia. II. Santos, Renato de Lima. III. Paixão, Tatiane Alves da. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.208 926

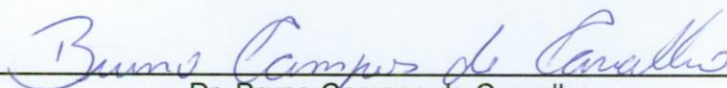
Tese defendida e aprovada em 25 de abril de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



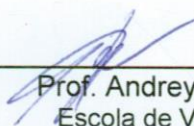
Prof. Alan Maia Borges
Presidente - Orientador



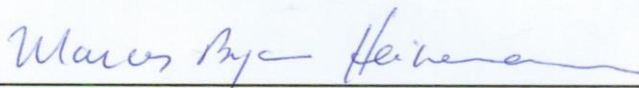
Dr. Humberto de Mello Brandão
EMBRAPA - Gado de leite



Dr. Bruno Campos de Carvalho
EMBRAPA - Gado de leite



Prof. Andrey Pereira Lage
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Marcos Bryan Heinemann
Universidade de São Paulo

*Dedico essa tese à minha irmã, Thaís Maria da Mata Martins,
e ao meu namorado, Nilson Dornellas de Oliveira,
pelo companheirismo e cumplicidade durante os quatro anos de trabalho.
Em especial, dedico aos meus pais,
José Maria Martins e Maria Aparecida da Mata Martins,
sempre presentes na caminhada rumo à realização dos meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

32. Graças a vocês, realizei o sonho de ser DOUTORA!
31. Muito obrigada por me ajudarem a chegar até aqui;
30. Muito obrigada pelas valiosas críticas e sugestões;
29. Muito obrigada pelos ensinamentos e belos exemplos;
28. Muito obrigada pela amizade, paciência e compreensão;
27. Muito obrigada pelo incentivo, apoio e carinho;
26. A todos os colaboradores que não foram citados nesse texto;
25. À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto de pesquisa;
24. À CAPES, pela bolsa de estudos durante o doutorado;
23. À Escola de Veterinária/UFMG, pela acolhida e oportunidade;
22. A todas as integrantes da República “Casa das Sete Mulheres”;
21. Ao professor Felipe Zandonadi Brandão;
20. À EPAMIG - Felixlândia, em especial, ao Arismar e José Reinaldo;
19. À Fazenda Bom Jardim, em especial, Alexandre, Vilmar e Sr. Miguel;
18. Aos membros das bancas de qualificação, pré-defesa e defesa de tese;
17. Aos colegas da Patologia, em especial, Juliana, Ana Patrícia e Auricélio;
16. Às ex-colegas da Reprodução, em especial, à Luiza, Betina e Michele;
15. Às colegas da Reprodução: Rebeca, Patrícia, Laura e Ana Maria;
14. Aos ex-integrantes da equipe: Henrique, Vinícius, Ígor, Lucas, Philipe;
13. À atual equipe de pesquisa do Álan: Clarice, Virgílio, Ana Carolina, Natália;
12. Aos técnicos da Reprodução, Dário e Eliane;
11. Aos professores da Reprodução, em especial, aos professores Pinho e Vicente;
10. À minha coorientadora, professora Tatiane Alves da Paixão;
9. Ao meu coorientador, professor Renato de Lima Santos;
8. Ao meu orientador, professor Álan Maia Borges;
7. Ao meu namorado, Nilson Dornellas;
6. A todos os meus familiares, em especial, à tia Dalva e tia Assunção;
5. Aos meus sobrinhos, Marco Túlio e Thélío Júnior;
4. À minha cunhada, Juliene Pereira;
3. Aos meus irmãos, Thaís, Thiago e Thélío;
2. Aos meus pais, José Maria e Aparecida da Mata;
1. A Deus, base da minha vida;

*Eu sou o sujeito das minhas ações,
o autor do meu personagem,
o artesão do meu mundo.*

(Henry Ey)

LISTA DE ABREVIATURAS

AGNE	Ácidos Graxos Não Esterificados
BEN	Balanco Energético Negativo
BHBA	β -hidroxibutirato
BS	Bulbo Seco
BU	Bulbo Úmido
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
CD14	<i>Cluster of Differentiation 14</i>
cDNA	DNA complementar
CLRs	<i>C-type Lectin Receptors</i>
Ct	<i>Cycle Treshold</i>
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Molecular Patterns</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIP	Doença Inflamatória Pélvica
DNA	<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>
dpp	Dias pós-parto
ECC	Escore de Condição Corporal
eCG	<i>Equine Chorionic Gonadotropin</i>
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
FBJ	Fazenda Bom Jardim
FEFX	Fazenda Experimental da EPAMIG de Felixlândia
FSH	<i>Follicle-Stimulating Hormone</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
hCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
IM	Intramuscular
ITU	Índice de Temperatura e Umidade
IU	Involução uterina
LBP	<i>LPS-Binding Protein</i>
LH	<i>Luteinizing Hormon</i>
LPS	Lipossacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
MAMPs	<i>Microbe-Associated Molecular Patterns</i>
MD2	<i>Myeloid Differentiation protein 2</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response gene 88</i>
NLRs	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain Receptors or NOD-Like Receptors</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding Domain</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PGFM	Metabólito da PGF2 α ou 15-ceto-13,14-dihidroprostaglandina F2 α
PVE	Período Voluntário de Espera
qPCR	<i>Quantitative or Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative or Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RAOL	Retorno da Atividade Ovariana Luteal
RAOLC	Retorno da Atividade Ovariana Luteal Cíclica

RLRs	<i>Retinoic acid-Inducible Gene (RIG) I-Like Receptors</i>
RNA	<i>RiboNucleic Acid</i>
RNAm	RNA mensageiro
RP	Retenção de Placenta
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SC	Subcutânea
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
TIR	<i>Toll/IL-1R gene homology</i>
TLRs	<i>Toll-Like Receptors</i>
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
TR	Temperatura Retal
UR	Umidade Relativa

1	INTRODUÇÃO.....	58
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1	Local, período e grupos experimentais.....	59
2.2	Monitoramento do puerpério.....	60
2.3	Biópsias endometriais, extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e <i>Real Time quantitative Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i> (qRT-PCR)	61
2.4	Análises estatísticas.....	64
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.1	Escore de condição corporal durante o período experimental.....	64
3.2	Ocorrências de partos gemelares e partos auxiliados.....	66
3.3	Temperatura retal no primeiro e no sétimo dia após o parto.....	67
3.4	Ocorrências de infecções uterinas.....	68
3.5	Isolamento de bactérias a partir de amostras do conteúdo uterino.....	70
3.6	Involução uterina e retorno da atividade ovariana luteal.....	73
3.7	Transcrição gênica endometrial de receptores tipo <i>Toll</i> 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, CD14 e MD2.....	74
3.8	Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos no primeiro e no sétimo dia após o parto, a temperatura retal e o período de involução uterina.....	81
4	CONCLUSÕES.....	84
CAPÍTULO III		
OCORRÊNCIAS PUERPERAIS E TRANSCRIÇÃO GÊNICA ENDOMETRIAL DE RECEPTORES DE PADRÕES MOLECULARES MICROBIANOS EM VACAS GIR E F1 HOLANDÊS X GIR.....		
		85
1	INTRODUÇÃO.....	85
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1	Local, período e grupos experimentais.....	85
2.2	Monitoramento do puerpério.....	86
2.3	Biópsias endometriais, extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e <i>Real Time quantitative Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction</i> (qRT-PCR)	86
2.4	Análises estatísticas.....	87
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
3.1	Escore de condição corporal durante o período experimental.....	87
3.2	Temperatura retal no primeiro e no sétimo dia após o parto.....	88
3.3	Ocorrências de infecções uterinas.....	88
3.4	Involução uterina e retorno da atividade ovariana luteal.....	89
3.5	Transcrição gênica endometrial de receptores tipo <i>Toll</i> 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, CD14 e MD2.....	91
3.6	Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos no primeiro e no sétimo dia após o parto, a temperatura retal e o período de involução uterina.....	94
3.7.	Relação entre as ocorrências puerperais e os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos.....	96
4	CONCLUSÕES.....	100

CAPÍTULO IV		
HISTOPATOLOGIA DO ENDOMÉTRIO DE VACAS ZEBU		
SUBMETIDAS A INFUSÃO UTERINA DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>		
INATIVADA NA FASE DE ESTRO.....		101
1	INTRODUÇÃO.....	101
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	102
2.1	Obtenção de <i>E. coli</i> inativada.....	102
2.2	Sincronização do estro, infusão uterina de <i>E. coli</i> inativada e realização de biópsias endometriais no estro e no diestro.....	103
2.3	Procedimentos laboratoriais.....	104
2.4	Análises estatísticas.....	104
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
3.1	Parâmetros reprodutivos e fisiológicos obtidos antes e após a infusão uterina de PBS ou <i>E. coli</i> inativada.....	105
3.2	Análises histopatológicas do endométrio no estro (antes e após a infusão uterina de PBS ou <i>E. coli</i> inativada) e no diestro.....	106
4	CONCLUSÕES.....	112
	PERSPECTIVAS.....	112
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
	ANEXOS.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Período de involução uterina de vacas Holandesas, Gir e mestiças Holandês x Zebu em diferentes estudos.....	30
Tabela 2	Localização dos receptores tipo <i>Toll</i> (TLR), principais padrões moleculares microbianos (MAMPs) e microrganismos de origem.....	43
Tabela 3	Período de ocorrência e sinais clínicos dos principais tipos de infecções uterinas ocorridos em vacas leiteiras de alta produção.....	49
Tabela 4	Ocorrências de endometrite clínica em vacas Holandesas em diferentes estudos.....	50
Tabela 5	Ocorrências de endometrite subclínica em diferentes estudos.....	56
Tabela 6	Parâmetros climáticos diários obtidos na Fazenda Bom Jardim durante o período experimental.....	59
Tabela 7	Variação do número de vacas monitoradas entre um e 42 dias pós-parto (dpp)..	60
Tabela 8	Sequências dos <i>primers</i> para amplificação de RNAm dos receptores tipo <i>Toll</i> (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores MD2 e CD14, e normalizadores β -actina e GAPDH, tamanho do produto (pares de base, pb) e média da temperatura de <i>melting</i> das reações (Tm).....	63
Tabela 9	Escore de condição corporal (ECC) ao parto e aos 42 dias após o parto (médias \pm desvios padrão) de acordo com o grupo experimental.....	64
Tabela 10	Temperatura retal (TR) no momento da biópsia (médias \pm desvios padrão), no primeiro e no sétimo dia após o parto, de acordo com o grupo experimental.....	67
Tabela 11	Ocorrências de metrite puerperal aguda, metrite e endometrite clínicas em vacas Holandesas.....	68
Tabela 12	Ocorrências de endometrite citológica em vacas Holandesas.....	68
Tabela 13	Bactérias aeróbicas presentes no conteúdo uterino das vacas Holandesas de acordo com o grau de patogenicidade. Entre parênteses, a porcentagem correspondente ao total de bactérias isoladas ($n = 88$) nas avaliações semanais realizadas entre o 1º e o 42º dia após o parto.....	70
Tabela 14	Período de involução uterina e retorno da atividade ovariana luteal (RAOL) de acordo com o grupo experimental (médias \pm desvios padrão).....	74
Tabela 15	Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores tipo <i>Toll</i> (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em vacas Holandesas sem retenção de placenta (RP) no primeiro e no sétimo dia após o parto.....	82
Tabela 16	Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores tipo <i>Toll</i> (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em vacas Holandesas com retenção de placenta (RP) no primeiro e no sétimo dia após o parto.....	82
Tabela 17	Correlações (r) entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo <i>Toll</i> (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores CD14 e MD2, e a temperatura retal (TR) das vacas Holandesas sem retenção de placenta (RP) e com RP no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).....	83
Tabela 18	Correlações (r) entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo <i>Toll</i> (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores CD14 e MD2, e o período de involução uterina (IU) das vacas Holandesas sem e com retenção de placenta (RP), no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).....	84
Tabela 19	Parâmetros climáticos diários obtidos na Fazenda Experimental da EPAMIG de Felixlândia durante o período experimental.....	86

Tabela 20	Escore de condição corporal (ECC) ao parto e aos 42 dias após o parto (médias \pm desvios padrão) de acordo com o grupo experimental.....	87
Tabela 21	Temperatura retal (TR) no momento da biópsia (médias \pm desvios padrão), no primeiro e no sétimo dia após o parto, de acordo com o grupo experimental.....	88
Tabela 22	Ocorrências de metrite puerperal aguda e metrite clínica em vacas Gir e F1 Holandês x Gir.....	89
Tabela 23	Ocorrências de endometrite clínica em vacas Gir e F1 Holandês x Gir.....	89
Tabela 24	Ocorrências de endometrite citológica em vacas Gir e F1 Holandês x Gir.....	89
Tabela 25	Período de involução uterina e retorno da atividade ovariana luteal (RAOL) de acordo com o grupo experimental (médias \pm desvios padrão).....	90
Tabela 26	Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores tipo <i>Toll</i> (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em vacas Gir, no primeiro e no sétimo dia após o parto.....	95
Tabela 27	Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores tipo <i>Toll</i> (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em vacas F1 Holandês x Gir, no primeiro e no sétimo dia após o parto.....	95
Tabela 28	Correlações (<i>r</i>) entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo <i>Toll</i> (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores CD14 e MD2, e a temperatura retal (TR) das vacas Holandesas das vacas Gir e F1 Holandês x Gir no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).....	96
Tabela 29	Correlações (<i>r</i>) entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo <i>Toll</i> (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores CD14 e MD2, e o período de involução uterina (IU) das vacas Gir e F1 Holandês x Gir, no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).....	96
Tabela 30	Análises de regressão múltipla: efeitos da ordem de parto (OP), do escore de condição corporal (ECC) e da ocorrência de retenção de placenta (RP) sobre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos no primeiro dia pós-parto (dpp).....	97
Tabela 31	Análise de regressão múltipla: efeito dos níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp) sobre a ocorrência de metrite puerperal aguda (MPA).....	98
Tabela 32	Análise de regressão múltipla: efeito dos níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp) sobre as ocorrências de endometrite clínica (EC) aos 28 dias após o parto.....	98
Tabela 33	Análise de regressão múltipla: efeito dos níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp) sobre o período de involução uterina.....	99
Tabela 34	Distribuição das vacas da Fazenda Experimental da EPAMIG de Felixlândia (FEFX) e da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa (Igarapé) nos diferentes grupos experimentais.....	104
Tabela 35	Porcentagens de animais que estavam ciclando no início do protocolo hormonal e de animais que ovularam ao final do protocolo, de acordo com o grupo experimental.....	105
Tabela 36	Temperatura retal (TR) no momento da biópsia (médias \pm desvios padrão) de acordo com o momento de avaliação.....	106
Tabela 37	Temperatura retal elevada (TR \geq 39,5°C) de acordo com o momento de avaliação.....	106

Tabela 38	Escores de hiperemia e hemorragia (médias \pm desvios padrão) em amostras do endométrio de vacas Zebu submetidas a biópsias uterinas no estro e no diestro. Escala considerada: 0 a 3.....	107
Tabela 39	Ocorrências de hiperemia e hemorragia em amostras do endométrio de vacas Zebu submetidas a biópsias uterinas no estro e no diestro.....	107
Tabela 40	Escores de edema (médias \pm desvios padrão) em amostras do endométrio de vacas Zebu submetidas a biópsias uterinas no estro e no diestro.....	107
Tabela 41	Ocorrências de edema em amostras do endométrio de vacas Zebu submetidas a biópsias uterinas no estro e no diestro.....	107
Tabela 42	Escores de inflamação (médias \pm desvios padrão) em amostras do endométrio de vacas Zebu submetidas a biópsias uterinas no estro e no diestro.....	108
Tabela 43	Ocorrências de processos inflamatórios em amostras do endométrio de vacas Zebu submetidas a biópsias uterinas no estro e no diestro.....	108
Tabela 44	Achados histopatológicos relacionados com a ocorrência ou não de inflamação endometrial após infusão uterina de <i>E. coli</i> inativada em vacas Zebu na fase de estro.....	110

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Porcentagens de isolados uterinos de vacas Holandesas sem retenção de placenta e com retenção de placenta, com presença de <i>Escherichia coli</i> no 1º, 7º, 14º e 21º dias após o parto.....	71
Gráfico 2	Ocorrências de febre (temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$) em vacas Holandesas sem retenção e com retenção de placenta no 1º, 7º, 14º e 21º dias após o parto.....	71
Gráfico 3	Amostras de conteúdo uterino de vacas Holandesas sem retenção e com retenção de placenta, com odor fétido, no 1º, 7º, 14º e 21º dias após o parto.....	71
Gráfico 4	Transcrição gênica de receptores de padrões moleculares microbianos (médias \pm erros padrão) no endométrio de vacas Holandesas sem retenção de placenta, no primeiro e no sétimo dia após o parto.....	75
Gráfico 5	Transcrição gênica de receptores de padrões moleculares microbianos (médias \pm erros padrão) no endométrio de vacas Holandesas com retenção de placenta, no primeiro e no sétimo dia após o parto.....	75
Gráfico 6	Transcrição gênica de receptores de padrões moleculares microbianos (médias \pm erros padrão) no endométrio de vacas Gir, no primeiro e no sétimo dia após o parto.....	92
Gráfico 7	Transcrição gênica de receptores de padrões moleculares microbianos (médias \pm erros padrão) no endométrio de vacas F1 Holandês x Gir, no primeiro e no sétimo dia após o parto.....	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Amostras de endométrio de vaca que receberam infusão uterina de <i>E. coli</i> inativada na fase de estro, sem sinais de inflamação, antes da infusão (A), depois da infusão (B) e no diestro (C).....	109
----------	--	-----

LISTA DE ANEXOS

Protocolo 1	Certificado de aprovação dos procedimentos adotados nos capítulos II e III	128
Protocolo 2	Certificado de aprovação dos procedimentos adotados no capítulo IV.....	129
Quadros 1 e 2	Composição da dieta das vacas em lactação na Fazenda Bom Jardim: composição média dos alimentos retirada da tabela CQBAL e composição da dieta fornecida para o lote pós-parto.....	130
Quadro 3	Temperaturas de bulbo seco (BS) e bulbo úmido (BU) utilizadas para cálculo da umidade relativa do ar.....	131
Quadro 4	Índice de Temperatura e Umidade para gado de leite.....	132
Quadro 5	Composição do concentrado fornecido às vacas em lactação na Fazenda Experimental da EPAMIG de Felixlândia.....	133
Gráfico A1	Transcrição gênica de TLR1/6, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, NOD1, NOD2 e CD14 em amostras de macrófagos bovinos (médias \pm erros padrão).....	134
Gráfico A2	Evolução da posição do útero durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B)....	135
Gráfico A3	Evolução da simetria dos cornos uterinos durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B).....	136
Gráfico A4	Presença ou ausência de conteúdo uterino durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B).....	137
Gráfico A5	Evolução da condição da cérvix durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B)....	138
Gráfico A6	Presença de secreção cervicovaginal durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B).....	139
Gráfico A7	Evolução do aspecto da secreção cervicovaginal durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B).....	140
Gráfico A8	Evolução do odor da secreção cervicovaginal durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B).....	141
Gráfico A9	Evolução da posição do útero durante o puerpério de vacas Gir (A) e F1 Holandês x Gir (B).....	142
Gráfico A10	Evolução da simetria dos cornos uterinos durante o puerpério de vacas Gir (A) e F1 Holandês x Gir (B).....	143
Gráfico A11	Presença ou ausência de conteúdo uterino durante o puerpério de vacas Gir (A) e F1 Holandês x Gir (B).....	144
Gráfico A12	Evolução da condição da cérvix durante o puerpério de vacas Gir (A) e F1 Holandês x Gir (B).....	145
Gráfico A13	Presença de secreção cervicovaginal durante o puerpério de vacas Gir (A) e F1 Holandês x Gir (B).....	146
Gráfico A14	Evolução do aspecto da secreção cervicovaginal durante o puerpério de vacas Gir (A) e F1 Holandês x Gir (B).....	147
Gráfico A15	Evolução do odor da secreção cervicovaginal durante o puerpério de vacas Gir (A) e F1 Holandês x Gir (B).....	148
Tabelas	TABELAS ESTATÍSTICAS.....	149

RESUMO

Variações dos níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos na primeira semana após o parto podem implicar suscetibilidade ou resistência às infecções uterinas em vacas taurinas, zebuínas e mestiças. Para testar essa hipótese, 9 vacas Holandesas com retenção de placenta (RP) e 10 sem RP foram submetidas a biópsias endometriais no primeiro e no sétimo dia após o parto. O puerpério foi monitorado por meio de exames ginecológicos. Na sequência do estudo, os mesmos procedimentos foram realizados em 9 vacas Gir e 12 F1 Holandês x Gir sem RP. Houve transcrição endometrial dos TLRs 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em todas as vacas. Entre os dois momentos de avaliação, as transcrições de TLR2, TLR4 e CD14 reduziram significativamente ($P < 0,05$) em vacas Holandesas com RP. Houve maior transcrição de TLR5 em vacas Gir e menor transcrição de TLR9 em vacas F1 no primeiro dia após o parto. As associações entre ocorrências puerperais e transcrições gênicas indicaram que a RP pode interferir na imunidade endometrial no primeiro dia após o parto, aumentando a transcrição de CD14. Maiores níveis de transcrição de CD14 foram associados a infecções e atraso da involução uterina. Na última parte do estudo, 9 vacas Zebu foram inoculadas por meio de infusão uterina com PBS e 10 com suspensão de *E. coli* inativada, com o objetivo de avaliar a resposta inflamatória endometrial. Infiltrados neutrofílicos presentes em 90% das amostras do grupo *E. coli* na fase de estro caracterizaram diferentes graus de inflamação, sugerindo que a regulação da resposta imunológica varia inclusive dentro da mesma raça.

Palavras-chave: *Bos taurus*; imunidade inata endometrial

ABSTRACT

Changes in the endometrial gene transcription of microbial molecular patterns receptors in the first postpartum week may result in susceptibility or resistance to uterine infections in taurine, zebu and crossbred cows. To test this hypothesis, 9 Holstein cows with retained placenta (RP) and 10 without RP were submitted to endometrial biopsies in the first and seventh postpartum days. The puerperium was monitored by gynecological exams. Following this study, the same procedures were applied in 9 Gir cows and 12 F1 Holstein x Gir cows without RP. All animals had endometrial transcription of TLRs 1/6, 2, 4, 5 and 9, NODs 1 and 2, and co-receptors CD14 and MD2. The transcriptions of TLR2, TLR4 and CD14 in Holstein cows with RP significantly reduced ($P < 0.05$) between the first and the seventh postpartum day. There was a higher transcription of TLR5 in Gir cows and lower transcription of TLR9 in F1 cows on the first postpartum day. The associations between puerperal occurrences and gene transcripts indicated that RP could interfere with endometrial immunity on the first postpartum day, increasing the transcription of CD14. Higher levels of transcription of CD14 were associated with uterine infections and delay of the involution process. In the last part of the study, 9 Zebu cows were inoculated by uterine infusion with PBS and 10 with suspension of inactivated *E. coli*, aiming to evaluate the endometrial inflammatory response. Neutrophilic infiltrates in 90% of samples of *E. coli* group at the stage of estrus characterized differing degrees of inflammation, suggesting that regulation of the immune response varies even within the same breed.

Keywords: *Bos taurus*; endometrial innate immunity

CAPÍTULO I

IMUNIDADE INATA UTERINA EM VACAS HOLANDESAS, GIR E F1 HOLANDÊS X GIR

1. INTRODUÇÃO GERAL

A identificação do patógeno pelo hospedeiro é o primeiro passo para a elaboração de uma resposta imunológica, visando a eliminação do microrganismo invasor (Werling e Coffey, 2007; Horne et al., 2008; Sordillo et al., 2009). Desde o início da década de 90, houve considerável aumento das informações sobre os mecanismos moleculares relacionados com o reconhecimento inicial de determinadas moléculas presentes na estrutura de bactérias, vírus e outros microrganismos invasores (Rietdijk et al., 2008).

Receptores específicos, localizados na membrana externa e/ou no citoplasma das células de defesa, células epiteliais e células estromais dos tecidos suscetíveis à invasão por patógenos, são responsáveis pelo reconhecimento de moléculas altamente conservadas no processo de evolução dos microrganismos. Em geral, essas moléculas são importantes componentes estruturais denominados "padrões moleculares associados a patógenos" ou PAMPs (do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), termo amplamente utilizado na literatura (Medzhitov e Janeway, 1997; Janeway e Medzhitov, 2002; Horne et al., 2008; Takeuchi e Akira, 2010; Turner et al., 2012). Como microrganismos não-patogênicos também apresentam padrões moleculares ou componentes altamente conservados, a terminologia "padrões moleculares microbianos" ou MAMPs (do inglês *Microbe-Associated Molecular Patterns*) é considerada a mais adequada (Ausubel, 2005).

Entre outros, a endotoxina LPS, lipossacarídeo presente na membrana

externa da *Escherichia coli* e demais bactérias Gram-negativas, é um dos MAMPs mais estudados (Medzhitov e Janeway, 1997; Janeway e Medzhitov, 2002; Horne et al., 2008; Takeuchi e Akira, 2010; Turner et al., 2012). O reconhecimento dos MAMPs pelos seus respectivos receptores celulares desencadeia respostas inflamatórias que levam à produção de quimiocinas, citocinas e peptídeos antimicrobianos (Akira, 2003; Schaefer et al., 2004; Werling e Coffey, 2007; Swangchan-Uthai et al., 2012).

Atualmente, os receptores de padrões moleculares microbianos mais conhecidos são os receptores tipo *Toll* ou TLRs (do inglês *Toll-Like Receptors*) e os receptores tipo NOD (do inglês *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain*) ou NLRs (do inglês *NOD-Like Receptors*) (Athman e Philpott, 2004; Rietdijk et al., 2008; Takeuchi e Akira, 2010; Turner et al., 2012). Estudos sobre a atuação desses receptores são importantes para elucidar os mecanismos que regulam a resposta do hospedeiro contra patógenos, a qual pode evoluir para a proteção imunológica ou para o estabelecimento de patologias, nos casos de falhas na ativação da resposta inflamatória que resultam em danos teciduais (Rietdijk et al., 2008).

A transcrição de TLRs, NODs e outros imunomediadores no endométrio de vacas Holandesas após o parto tem sido relatada em diferentes estudos nos últimos anos (Ritter, 2007; Herath et al., 2009a; Chapwanya et al., 2009; Martins et al., 2011). Altas incidências de infecções uterinas são observadas no puerpério desses animais, sendo que um dos fatores relacionados com essas ocorrências é a capacidade de regular a resposta inflamatória endometrial. Quando os mecanismos de defesa atuam de forma eficiente, os microrganismos que contaminam o útero podem ser eliminados durante o processo de involução uterina nas

primeiras semanas após o parto. Respostas imunológicas inadequadas favorecem a multiplicação de bactérias com potencial patogênico no ambiente uterino, enquanto quadros inflamatórios exacerbados e persistentes resultam em lesões endometriais que podem influenciar na fertilidade das vacas (Herath et al., 2009a; Sheldon et al., 2009; Chapwanya et al., 2009; Yunhe et al., 2013).

O principal fator de risco para a ocorrência de infecções uterinas em vacas Holandesas é a retenção de placenta (Kim e Kang, 2003; Bell e Roberts, 2007; Martins et al., 2013). A permanência da placenta no útero interfere na contratilidade do miométrio, dificulta a eliminação do conteúdo remanescente da gestação e influencia na atuação dos mecanismos de defesa, favorecendo a multiplicação bacteriana e o estabelecimento de infecções uterinas (Dohmen et al., 2000; Sheldon et al., 2004a; Hammon et al., 2006). Estudos sobre a influência da retenção de placenta na transcrição endometrial de receptores de padrões moleculares microbianos são incipientes (Martins et al., 2011).

Por outro lado, vacas zebuínas e mestiças Holandês x Zebu, representadas no presente estudo pelas vacas Gir e mestiças F1 Holandês x Gir, apresentam baixas incidências de retenção de placenta e infecções uterinas (Lara, 1985; González Sánchez et al., 1999a; 2008; Carvalho, 2009; Camargos et al., 2013). A transcrição de receptores de padrões moleculares microbianos no endométrio desses animais é desconhecida. Apesar da relação entre os níveis de transcrição de imunomediadores e a suscetibilidade ou resistência a infecções uterinas ainda não ter sido elucidada, acredita-se que variações genéticas podem explicar diferenças nas respostas individuais na presença de patógenos (Horne et al., 2008; Sordillo et al., 2009; Martins et al., 2011; Pinedo et al., 2013).

A grande importância da bovinocultura para a agropecuária e o considerável impacto econômico causado pela ocorrência de doenças uterinas em vacas leiteiras, estimulam a realização de pesquisas que visam compreender os mecanismos moleculares envolvidos na imunidade inata do trato reprodutivo (Werling e Jungi, 2003; Herath et al., 2006; 2009a). Portanto, na segunda parte do presente estudo (Capítulo II), vacas Holandesas sem e com retenção de placenta, submetidas a biópsias uterinas no primeiro e no sétimo dia após o parto, foram comparadas em relação às ocorrências puerperais e à transcrição endometrial de receptores de padrões moleculares microbianos. Na terceira parte do estudo (Capítulo III), foram realizados os mesmos procedimentos e avaliações em vacas Gir e vacas F1 Holandês x Gir, sem retenção de placenta. Os imunomediadores considerados foram os TLRs 1, 2, 4, 5, 6 e 9, os NODs 1 e 2, e os coreceptores CD14 (do inglês *Cluster of Differentiation 14*) e MD2 (do inglês *Myeloid Differentiation protein 2*), que estão relacionados com o reconhecimento de bactérias, principais contaminantes do ambiente uterino.

Nas diferentes fases do ciclo estral, o estradiol e a progesterona podem ser os principais responsáveis pela regulação da resposta imunológica e do processo inflamatório desencadeado pelas células endometriais (Herath et al., 2006; Davies et al., 2008; Borges et al., 2012), porém os mecanismos de atuação desses hormônios ainda não foram esclarecidos (Sheldon e Bromfield, 2011; Turner et al., 2012). Sendo assim, na quarta e última parte do estudo atual (Capítulo IV), foram realizadas análises histopatológicas de amostras do endométrio de vacas zebuínas, após a inoculação com suspensão de *E. coli* inativada por meio de infusão uterina, com o objetivo de verificar variações nas respostas inflamatórias teciduais nas fases de estro e diestro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Vacas taurinas, zebuínas e mestiças e a produção de leite no Brasil

Todos os tipos de bovinos domésticos pertencem à família Bovidae, subfamília Bovinae, gênero *Bos*, espécie *Bos taurus*, subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, mundialmente conhecidos como taurinos e zebuínos, respectivamente. Esses animais possuem um ancestral comum, que foi domesticado na Ásia Ocidental cerca de 4.500 aC. Apesar da origem comum, taurinos e zebuínos apresentam diferenças morfológicas e fisiológicas, provavelmente devido à adaptação em diferentes ambientes. O gado taurino se adaptou em regiões de clima temperado, enquanto os zebuínos se adaptaram em regiões tropicais e subtropicais (Abeygunawardena e Dematawewa, 2004). Os zebuínos apresentam diferenças relacionadas com a resistência natural ou suscetibilidade a determinadas doenças. Em relação à brucelose por exemplo, doença infecciosa crônica que diminui significativamente a eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos bovinos, já foi relatado que algumas raças zebuínas apresentam diferenças genotípicas (Paixão et al., 2006) e fenotípicas (Macedo et al., 2013) associadas à resistência natural contra essa doença, quando comparados a taurinos da raça Holandesa.

Estima-se que mais da metade da população mundial de bovinos seja constituída de gado Zebu (Abeygunawardena e Dematawewa, 2004). Os zebuínos foram introduzidos no Brasil no final do século XIX, sendo que as primeiras raças foram importadas da África. Porém, a entrada expressiva de zebuínos no território nacional ocorreu a partir do início do século XX, quando milhares de animais representantes de diversas raças foram trazidos da Índia. Verifica-se que, em geral, os rebanhos zebuínos são mantidos em

pastagens de baixa qualidade, são adaptados ao clima quente e úmido, se tornaram tolerantes a longos períodos de seca e suportam a alta carga parasitária das pastagens. Devido a falhas ocorridas na seleção desses animais, a maioria das raças apresenta limitado potencial genético para as características reprodutivas e produtivas (Santiago, 1960; Euclides Filho, 2009; Alencar e Barbosa, 2009).

Atualmente, diferentes sistemas de produção caracterizam a atividade leiteira no Brasil, com predomínio do manejo extensivo ou semi-intensivo de vacas mestiças, produtos do cruzamento entre o gado taurino e o gado zebuíno (Sartori, 2007; Ruas et al., 2008). O Brasil é o quinto maior produtor mundial de leite. A composição do rebanho de leite brasileiro é de, aproximadamente, 74% de vacas mestiças, 20% de vacas sem qualquer especialização em produção de leite e 6% de vacas especializadas (Vilela, 2003). Para o ano de 2014, a produção nacional de leite fluido foi estimada em 33.375 toneladas, o que corresponde à produtividade de 1.600 litros de leite fluido por vaca. Em comparação aos maiores produtores mundiais, com exceção da Índia, a produtividade do rebanho leiteiro nacional é considerada baixa. A União Européia, os Estados Unidos, a Índia e a China têm produtividades de 10.067, 6.073, 1.200 e 8.900 litros de leite fluido por vaca, respectivamente (USDA, 2013). Entre outros fatores, essa diferença pode ser decorrente de peculiaridades dos sistemas de produção de leite do Brasil, tais como, falhas nos manejos reprodutivo, nutricional e sanitário, instalações inadequadas e limitado potencial genético da maioria dos rebanhos (Ferreira e Teixeira, 2000; Facó et al., 2002; Euclides Filho, 2009).

Uma das formas de melhorar o potencial genético dos nossos rebanhos é a realização de seleção dos melhores animais de cada raça, porém, o prazo necessário para obter

melhorias nos desempenhos reprodutivo e produtivo por meio desse método é longo. A alternativa mais rápida para melhorar o potencial genético dos zebuínos é o cruzamento com raças que apresentam maior diversidade genética para os atributos de interesse. Os taurinos são geneticamente melhores em relação à reprodução e produção, porém, não são adaptados às condições tropicais. É necessário manter o equilíbrio nos cruzamentos entre zebuínos e taurinos para que os produtos sejam mantidos em sistemas de produção de baixo custo e os benefícios econômicos sejam alcançados. A capacidade de adaptação ao ambiente tropical diminui com o aumento do grau de sangue *Bos taurus taurus*. Animais F1 apresentam melhor desempenho em relação às médias das características desejadas devido à heterose. Os benefícios econômicos acumulados tendem a ser maiores nos cruzamentos com 50% do grau de sangue de cada raça, quando comparados com os desempenhos individuais das raças originais puras (Abeygunawardena e Dematawewa, 2004; Alencar e Barbosa, 2009).

Com o objetivo de aumentar a produtividade do rebanho leiteiro nacional, o cruzamento entre as raças Holandês e Gir é o que mais se destaca (Facó et al., 2005; Sartori, 2007). A expressão da heterose e a complementaridade entre essas raças originam animais mais eficientes quanto às características produtiva e reprodutiva, adaptados às condições tropicais (Facó et al., 2002; Guimarães et al., 2002), sendo que os efeitos máximos são obtidos nos animais com 50% da composição genética taurina e 50% zebuína, denominados F1 Holandês x Gir (Madalena et al., 2001).

2.2. Desempenhos reprodutivo e produtivo e a ocorrência de doenças puerperais

As eficiências reprodutiva e produtiva determinam o sucesso da atividade leiteira.

Em geral, todos os sistemas de produção de leite buscam aumentar a produtividade, o número de bezerros nascidos por ano e a vida útil da vaca no rebanho (Marques Júnior, 1993; Leite et al., 2001; Kask et al., 2003; Sheldon et al., 2006). A vida útil da vaca está diretamente relacionada com a idade ao primeiro parto e com o intervalo de partos. O intervalo de partos compreende o período de serviço e o período da gestação. Como a duração da gestação é estável, o período de serviço determina o intervalo de partos. O período de serviço é diretamente influenciado pela duração do puerpério. Portanto, a vida útil de uma vaca está diretamente relacionada com os eventos que ocorrem no puerpério (Peters, 1984; Marques Júnior, 1993; Fernandes et al., 2001; Bellows et al., 2002; Kask et al., 2003; Sartori, 2007).

O puerpério é o período entre o parto e a restauração da atividade reprodutiva, caracterizada por ajustes fisiológicos e morfológicos no útero e nos ovários. Para as vacas, o puerpério compreende o intervalo entre o parto e o aparecimento do primeiro estro compatível com o estabelecimento de uma nova gestação (Marques Júnior, 1993; Horta, 1995). O puerpério pode ser dividido em três fases, sendo que na primeira, a hipófise encontra-se refratária ao GnRH (do inglês *Gonadotropin-Releasing Hormone*). A segunda fase abrange o período de sensibilidade da hipófise ao GnRH até a ocorrência da primeira ovulação. A terceira fase é caracterizada pelo término da involução uterina. As três fases do puerpério são denominadas precoce, intermediária e pós-ovulatória, respectivamente. A duração de cada fase depende das condições fisiológicas do animal (Olson et al., 1986).

Os eventos que ocorrem no puerpério influenciam na fertilidade e na produtividade de uma vaca. Quanto menor a ocorrência de transtornos puerperais, mais

rápido será o retorno à reprodução, maior a probabilidade da vaca se tornar gestante nos primeiros serviços após o parto, maior o número de bezerros nascidos, mais curto o intervalo de partos, menor a interferência na produção de leite, menor a chance da vaca ser descartada, maior a sua vida útil e maior o lucro dos sistemas de produção de leite (Marques Júnior, 1993; Horta, 1995; Leite et al., 2001; Kask et al., 2003).

O elevado crescimento da produtividade e do tamanho dos rebanhos leiteiros, visando atender a crescente demanda mundial de leite e seus derivados, tem sido acompanhado de redução da eficiência reprodutiva, o que compromete o desempenho atual das propriedades leiteiras, uma vez que a produção de leite depende diretamente da capacidade da vaca se tornar gestante. As adaptações fisiológicas para a alta produção de leite e a elevada ocorrência de doenças puerperais estão diretamente relacionadas com a redução da fertilidade e da longevidade das vacas leiteiras especializadas (Lucy, 2001; Oltenacu e Algers, 2005). Entre 1957 e 2002, a média de produção de leite aumentou de 5.000 Kg para 11.000 Kg por lactação no nordeste dos Estados Unidos. A proporção de vacas vivas aos 48 meses de idade diminuiu de 80 para 60% nesse período, sugerindo que a vida útil das vacas de alta produção reduziu significativamente (Oltenacu e Algers, 2005).

O periparto é caracterizado por diminuição da ingestão de alimentos e aumento súbito na demanda energética, imposta pelo início de lactação. Vacas leiteiras de alta produção recém-paridas geralmente apresentam redução da ingestão de alimentos e depressão do sistema imunológico, tornando-se mais suscetíveis ao estabelecimento de doenças após o parto (Van Saun, 2000; Butler, 2006; Sordillo, 2009). A compreensão das alterações que ocorrem no metabolismo desses animais durante a gestação e o período de

preparação para a nova lactação é primordial para estabelecer programas de controle para as afecções puerperais. As adaptações metabólicas ocorrem em todos os animais, inclusive naqueles que apresentam boa condição corporal. No entanto, estas alterações são mais intensas nos casos de deficiências nutricionais, contribuindo para a depressão do sistema imunológico e o estabelecimento de doenças. Cuidados especiais devem ser tomados em relação à nutrição no periparto, pois este fator está diretamente relacionado com as ocorrências de transtornos puerperais (Van Saun, 2000). A identificação precoce do animal doente e a adoção de cuidados para promover a sua recuperação podem minimizar as consequências para a reprodução e para produção, além de diminuir os prejuízos dos sistemas de produção (Smith e Risco, 2005; Van Saun, 2000).

Os custos totais relacionados com as ocorrências de transtornos puerperais como abortos, natimortos, distocias, retenção de placenta, infecções uterinas e infertilidade em vacas leiteiras de rebanhos dos Estados Unidos foram estimados em aproximadamente 53 dólares por animal por ano. Esse valor foi seis vezes maior que os gastos com doenças respiratórias. A redução na fertilidade e na produção de leite foram os fatores que mais contribuíram para os altos custos, pois implicaram em aumento do descarte de animais (Bellows et al., 2002). Considerando somente as ocorrências de infecção uterina até 10 dias após o parto, Overton e Fetrow (2008) estimaram um custo de 358 dólares para cada vaca afetada de um grande rebanho leiteiro da Califórnia. Foram incluídos nos cálculos, os prejuízos com descarte involuntário, morte de animais, redução do desempenho reprodutivo, gastos com tratamento e diminuição da produção de leite. Adicionalmente, Martins et al. (2013) monitoraram 103 vacas Holandesas de um rebanho brasileiro durante o puerpério. As

perdas causadas pela redução na produção de leite devidas às ocorrências de retenção de placenta e infecções uterinas até 42 dias após o parto foram equivalentes a 600 litros de leite por vaca.

2.3. Monitoramento do puerpério

A identificação precoce de vacas doentes requer o monitoramento diário dos lotes do pós-parto e adoção de protocolos terapêuticos ou preventivos, tais como, fluidoterapia, suplementos de cálcio e probióticos (Van Saun, 2000). Dentre os principais parâmetros utilizados para monitorar a saúde de vacas recém-paridas, os mais utilizados são a temperatura retal e a avaliação da condição corporal. A produção de leite diária, o comportamento do animal, os exames de sangue, a concentração de cetonas na urina ou no leite e a avaliação dos movimentos ruminais são outros parâmetros que podem ser adotados (Smith e Risco, 2005). Para minimizar possíveis transtornos reprodutivos e produtivos, o acompanhamento do processo de involução uterina e do retorno da atividade ovariana luteal cíclica (RAOLC) é importante para reconhecer alterações patológicas, permitindo intervenções precoces (McEntee, 1990; González Sánchez et al., 1999a; Sheldon et al., 2006).

2.3.1. Temperatura corporal

A temperatura corporal varia de acordo com o estado de saúde, idade, raça, estação do ano, horário do dia, entre outros fatores (Smith e Risco, 2005). A temperatura de 39,5°C é considerada como limite superior para animais sadios (Van Saun, 2000). A febre pode ser detectada nos quadros de infecção uterina com presença de outros sinais sistêmicos, sendo necessário intervir com tratamento de suporte (fluidoterapia, antipiréticos) e antibióticos específicos (Van Saun, 2000; Smith e Risco, 2005; Drillich et al., 2003; 2006a; 2006b; Benzaquen et al., 2007).

2.3.2. Escore de condição corporal

A avaliação da condição corporal é amplamente utilizada para estimar o balanço energético das vacas. Ao parto, vacas leiteiras de alta produção devem apresentar reservas de tecido em quantidade suficiente para atender as demandas energéticas e protéicas necessárias para a produção de leite durante o início da lactação. A condição corporal ideal é aquela que favorece maior produção de leite, minimiza os transtornos de saúde e os distúrbios reprodutivos, maximizando o retorno econômico (Gearhart et al., 1990).

A avaliação do escore de condição corporal (ECC) é um método de monitoramento não invasivo, subjetivo e rápido, baseado na observação visual e tátil da quantidade de gordura armazenada nas regiões caudal e dorsal, sendo atribuída pontuação específica a partir de uma escala numérica (Edmonson et al., 1989; Waltner et al., 1993). Variados parâmetros e escalas de pontuação foram criados para a avaliação da condição corporal das vacas leiteiras, vacas de corte e mestiças. Para vacas Holandesas, criou-se um método específico baseado numa escala de 1 a 5, na qual 1 equivale a uma vaca muito magra e 5, a um animal obeso (Edmonson et al., 1989). Para as vacas de corte, Richards et al., (1986) criou uma escala que varia de 1 a 9, na qual 1 equivale a uma vaca extremamente magra e 9, a uma vaca extremamente obesa. Ruas et al. (2000) criou uma escala mais simples, utilizada principalmente para avaliar a condição corporal de vacas mestiças, que varia de 3 a 5, na qual 3 equivale a uma vaca magra e 5, a uma vaca obesa.

Lactações muito curtas e aumento do intervalo de partos podem favorecer a obesidade ao parto, verificando-se aumento da deposição de gordura durante a gestação iniciada no final da lactação ou durante o período seco (Jones et al., 1993). Utilizando-se como referência a escala de 1

a 5, recomenda-se que o ECC ao parto de vacas leiteiras seja de 3,0 a 3,5. A obesidade (ECC igual ou maior a 4,0) aumenta o risco de ocorrência de distúrbios metabólicos (Butler, 2006). Vacas obesas tendem a ingerir menor quantidade de alimentos após o parto e apresentar redução da condição corporal mais acentuada, verificando-se que, geralmente, a perda de peso está relacionada com a queda na produção de leite no início da lactação (Waltner et al., 1993). Para vacas de alta produção, alguns autores recomendam ECC ao parto entre 2,75 e 3,0, com perda restrita a no máximo 0,5 unidades durante o puerpério. Além da diminuição do desempenho produtivo, as vacas que perdem mais de 1 unidade no escore ECC após o parto podem apresentar redução do desempenho reprodutivo devido ao atraso no RAOLC (Crowe, 2008). A interferência da perda de condição corporal após o parto no RAOLC é potencializada por outros fatores, como a amamentação. Vacas leiteiras lactantes com baixa condição corporal apresentam acentuada depressão da frequência de GnRH no hipotálamo e da liberação pulsátil de LH (do inglês *Luteinizing Hormone*) pela hipófise anterior, o que resulta em prolongamento do anestro pós-parto (Grimard et al., 1995).

2.3.3. Involução uterina

A involução uterina completa é caracterizada pela redução do tamanho dos cornos, perda tecidual, reepitelização, diminuição do conteúdo uterino e do diâmetro cervical (Gier e Marion, 1968; McEntee, 1990). Macroscopicamente, o término da involução uterina coincide com o retorno do útero ao tamanho anterior à gestação, mas são necessários mais alguns dias para ocorrer o restabelecimento das funções fisiológicas e a involução microscópica, caracterizada pela regeneração endometrial, o que possibilita a ocorrência da concepção e a manutenção da gestação (McEntee, 1990).

2.3.3.1. Involução macroscópica do útero

Nos primeiros dias após o parto, a involução uterina de vacas Holandesas é lenta, sendo proporcionada pela redução das fibras musculares proporcionada pela vasoconstrição e pelas contrações peristálticas. A redução do tamanho do útero desses animais é mais rápida entre o 5º e o 15º dia após o parto, mais lenta entre o 16º e o 30º dia, e imperceptível entre o 40º e o 50º dia (Gier e Marion, 1968). No estudo de Kocamuftuoglu e Vural (2008), a involução uterina de vacas Holandesas foi mais rápida entre 20 e 30 dias após o parto e mais lenta entre 30 e 40 dias, em animais que tiveram puerpério patológico ou não. Adicionalmente, Araújo et al. (1974) verificaram que o útero de vacas mestiças Holandês x Zebu involuiu rapidamente entre 10 e 30 dias após o parto.

A involução uterina macroscópica pode ser monitorada por meio de palpação transretal, avaliação da secreção cervicovaginal e ultrassonografia. A palpação transretal é o método mais utilizado, sendo que os parâmetros adotados são a posição do útero em relação à pelve, o comprimento, o diâmetro e a simetria dos cornos, o diâmetro da cérvix, o tônus e a consistência da parede uterina, a presença de conteúdo no útero e de secreção na vagina (Rasbeck, 1950; Araújo et al., 1974; Madej et al., 1984; Zain et al. 1995; González Sánchez et al., 1999a,b; Martins et al., 2013).

Quanto ao posicionamento, na primeira semana após o parto, o útero de vacas Holandesas permanece na cavidade abdominal. Os cornos uterinos encontram-se assimétricos, com presença de conteúdo no lúmen e paredes espessadas (Buch et al., 1955; Zain et al., 1995; Lopes, 2007; Martins et al., 2013). O aumento da espessura da parede uterina é causado pela contração das camadas circular e longitudinal do miométrio durante o processo de involução (Johanns et al.,

1967). Ao final da segunda semana após o parto, o útero começa a retornar à cavidade pélvica, apresentando acentuada redução de volume e consistência firme. Entre 10 e 15 dias após o parto é possível contornar toda a superfície do útero. Aos 40 dias após o parto, o útero apresenta-se morfologicamente involuído (Buch et al., 1955; Zain et al., 1995; Lopes, 2007; Martins et al., 2013). De maneira semelhante às vacas Holandesas, o útero das vacas mestiças Holandês x Zebu permanece na cavidade abdominal na primeira semana após o parto (Lara, 1985). O mesmo ocorre com as vacas Gir (González Sánchez et al., 1999a; 2008). Aos 30 dias após o parto, o útero das vacas mestiças Holandês x Zebu e das vacas Gir encontra-se morfologicamente involuído.

A involução do corno anteriormente gestante é mais rápida que a do corno não gestante, verificando-se assimetria no processo de involução nas primeiras semanas após o parto (Gier e Marion, 1968; Caravajal, 1989; Sheldon et al., 2002a; Martins et al., 2013). A parede do corno anteriormente gestante pode permanecer mais espessada, mesmo após o término da involução uterina (Gier e Marion, 1968; Morrow et al., 1969; Lara, 1985). Aos 60 dias após o parto, ainda é possível notar diferença na simetria, espessura da parede e no diâmetro dos cornos uterinos (Albuquerque, 1985).

Considera-se como término da involução uterina, o restabelecimento da simetria dos cornos entre duas palpações retais consecutivas, e a constatação de consistência e tônus uterino normais. O número médio de dias entre duas palpações consecutivas é considerado como o final da involução (González Sánchez et al., 1999a). Porém, a avaliação da involução uterina por meio de palpação transretal apresenta limitações, principalmente na fase final do processo de involução dos cornos. Mesmo na ausência de patologias, pode ocorrer

persistência da assimetria e alterações na consistência e no tônus do corno anteriormente gestante, que são difíceis de detectar. Fatores hormonais por exemplo, podem dificultar o reconhecimento clínico do retorno do útero à normalidade, sendo frequente a presença de grandes folículos durante a fase final da involução uterina, com consequente aumento da concentração de estrógeno circulante e do tônus uterino (González Sánchez et al., 1999a).

O aspecto da secreção cervicovaginal é importante para avaliar o processo de involução uterina (Morrow, 1980; Mateus et al., 2002; Martins et al., 2013). Inicialmente, a secreção cervicovaginal apresenta aspecto serosanguinolento, com restos de tecido endometrial e quantidades variáveis de sangue provenientes da degeneração das carúnculas (Morrow, 1980). A perda de tecido endometrial é devida às reorganizações estruturais, redução dos vasos sanguíneos, regressão das glândulas uterinas e contrações do miométrio (Gier e Marion, 1968). Restos de fragmentos teciduais, sangue e secreções provenientes de hemorragias endometriais constituem o lóquio (Marques Júnior, 1988). O lóquio de vacas sadias apresenta coloração vermelho brilhante nos primeiros dias após o parto. Em seguida, o aspecto torna-se marrom escuro, sem odor (Morrow, 1980; McEntee, 1990; LeBlanc et al., 2002a; Sheldon e Dobson, 2004). Normalmente, o conteúdo uterino é expelido até a terceira semana após o parto (Morrow, 1980; Mateus et al., 2002). Quando a involução uterina está atrasada, é possível observar conteúdo escuro com áreas esbranquiçadas, formadas pelo acúmulo de pus com odor fétido (Morrow, 1980; McEntee, 1990; LeBlanc et al., 2002a; Sheldon e Dobson, 2004). Algumas vacas continuam expelindo secreção com aspecto anormal a partir da terceira semana após o parto (Morrow, 1980; García-Ispierto et al., 2007; Kocamuftuoglu e Vural; 2008; Martins et al., 2013).

Durante o processo de involução, o peso médio do útero de vacas leiteiras sofre redução de 9 kg, logo após o parto, para 1 kg aos 30 dias, e 750 g aos 50 dias após o parto. O volume do conteúdo uterino varia de 1500 mL, para 500 mL e 75 mL, no 1º, no 8º e no 21º dia após o parto, respectivamente (Gier e Marion, 1968). Adicionalmente, McEntee (1990) verificou que o peso médio do útero de vacas Holandesas abatidas em diferentes momentos após o parto foi, em média, de 7 kg no 2º dia e 500 g no 30º dia após o parto. Nesse estudo, o volume do conteúdo uterino variou de 1000 mL para 165 mL do 1º ao 9º dia após o parto. Pouco conteúdo foi encontrado no útero a partir de 12 dias.

Juntamente com a palpação transretal e a inspeção da secreção cervicovaginal, a ultrassonografia pode ser útil para diferenciar a involução uterina normal da atrasada (Rajamahendran et al., 1994; Zain et al., 1995; Kask et al., 2003; Sheldon et al., 2003). O uso da ultrassonografia possibilita verificar com maior precisão o diâmetro dos cornos e da cérvix, o aspecto e a quantidade de conteúdo presente no lúmen uterino (Rajamahendran et al., 1994; Zain et al., 1995; Kask et al., 2003; Sheldon et al., 2003).

No processo de involução uterina normal, pequena quantidade de conteúdo pode ser observada no interior do útero no final do processo de involução uterina, em torno de quatro semanas após o parto. Esse conteúdo nem sempre é perceptível à palpação transretal. No exame ultrassonográfico, esse conteúdo é visualizado como áreas anecogênicas (escuras) no interior dos cornos uterinos de vacas sadias. Na presença de infecção, é possível observar diferentes quantidades de conteúdo uterino com material purulento em suspensão, visualizadas como partículas ecogênicas (esbranquiçadas) em movimento. Nesses casos, a parede uterina pode encontrar-se espessada devido à presença de processos

inflamatórios (Kähn e Leidl, 1989). Por meio da ultrassonografia, verifica-se a ocorrência desse quadro após a restauração da forma, ausência de conteúdo uterino e redução máxima do diâmetro do corno anteriormente gestante (Kamimura et al., 1993; Zain et al., 1995; Kask et al. 2003; Sheldon et al., 2003).

É difícil comparar os resultados de estudos sobre involução uterina, pois o período de involução varia de acordo com os critérios de avaliação, sistemas de produção e características dos animais. Observam-se divergências consideráveis entre animais da mesma raça ou de raças diferentes. Períodos de involução uterina de vacas Holandesas, Gir e mestiças Holandês x Zebu, obtidos em diferentes estudos, estão apresentados na Tabela 1.

2.3.3.2. Involução microscópica do útero

Crerios de avaliação da involução uterina baseados em alterações histológicas são mais confiáveis (Albuquerque, 1985). Microscopicamente, as mudanças mais evidentes ocorridas durante a involução uterina encontram-se nas áreas carunculares (Archbald et al., 1972; McEntee, 1990). A seqüência de eventos inclui a degeneração vascular da base das carúnculas, seguida de isquemia periférica, necrose e desprendimento do tecido caruncular (Archbald et al., 1972). No 2º dia após o parto, áreas avermelhadas, irregulares e proeminentes são observadas na superfície das carúnculas. No 4º dia, as carúnculas apresentam coloração escura e encontram-se friáveis (McEntee, 1990). No 5º dia, verifica-se necrose avançada da base das carúnculas devido à vasoconstrição das artérias e intensa infiltração leucocitária (Gier e Marion, 1968). Do 9º ao 12º dia após o parto, o útero apresenta superfície granular com focos hemorrágicos por causa da necrose e desprendimento das carúnculas (McEntee, 1990).

Tabela 1. Período de involução uterina de vacas Holandesas, Gir e mestiças Holandês x Zebu em diferentes estudos.

Referências	<i>n</i>	Local	Bases genéticas	Involução uterina
Buch et al., 1955	323 (88 + 164) ¹ / (23+ 48) ²	Wiscosin, EUA	Holandesas	(42 e 50 dias) ¹ / (48 e 56 dias) ²
Menge et al., 1962	229	Wiscosin, EUA	Holandesas	42,3 dias ⁴
Araújo et al., 1974	160	Rio de Janeiro, Brasil	Mestiças Holandês x Zebu	24,5 e 28,3 dias ¹
Lara, 1985	151	Minas Gerais, Brasil	Mestiças Holandês x Zebu	28,2 ± 5,2 e 31,7 ± 5,7 dias ¹
Guilhermino et al., 1992	100	São Paulo, Brasil	Gir leiteiro	36,2 ± 3,2 e 41,7 ± 3,4 dias ¹
Kamimura et al., 1993	40	Hokkaido, Japão	Holandesas	41,5 ± 5,8 dias ⁴
Zain et al., 1995	72	Hokkaido, Japão	Holandesas	30,8 ± 0,8 e 35,5 ± 0,9 dias ¹
Kozicki et al., 1998	18	Paraná, Brasil	Holandesas	24,1 ± 8,1 dias ⁴
González Sánchez et al., 1999a	111	Minas Gerais, Brasil	Gir leiteiro	29,7 ± 9,6 dias ¹
González Sánchez et al., 1999b	78	Minas Gerais, Brasil	Gir leiteiro	30,3 ± 10,1 dias ⁴
Lopes, 2007	24	Goiás, Brasil	Holandesas	40,3 dias ⁴
Carvalho, 2009	78	Minas Gerais, Brasil	Holandês x Zebu	25,2 ⁵
Martins et al., 2013	92 (06 +29) ¹ / (15 + 42) ³	Minas Gerais, Brasil	Holandesas	(31,2 ± 4,1 e 27,5 ± 5,9 dias) ¹ / (36,1 ± 8,4 e 37,0 ± 13,4 dias) ³

1. Referente a primíparas e pluríparas, respectivamente; 2. Primíparas e pluríparas com complicações no parto; 3. Primíparas e pluríparas com infecção uterina durante o puerpério; 4. Média de primíparas e pluríparas com puerpério fisiológico e patológico; 5. Pluríparas sem complicações puerperais.

A eliminação da porção apical das carúnculas ocorre entre o 5º e o 15º dia após o parto (Marques Júnior, 1988; McEntee, 1990). Em vacas Holandesas, as carúnculas apresentam redução de aproximadamente 70 mm para 25 mm, entre o 5º e o 25º dia após o parto. O início da reepitelização das áreas carunculares ocorre a partir do 19º dia após o parto (Archbald et al., 1972). A regeneração endometrial completa acontece a partir de 25 dias após o parto (Gier e Marion, 1968; Marques Júnior, 1988; McEntee, 1990).

Ao estudarem a involução histológica do útero de vacas leiteiras sem retenção de placenta, Archbald et al. (1972) observaram degeneração vascular progressiva entre o 1º e o 19º dia após o parto. Essas alterações consistiram basicamente em degeneração hidrópica do citoplasma, picnose das células musculares lisas e necrose da túnica média dos vasos. A regeneração das áreas intercarunculares foi observada a partir do 15º dia após o parto. No miométrio, as alterações consistiram em degeneração do sarcoplasma e vacuolização das células musculares lisas. Tais alterações foram visualizadas entre o 3º e o 27º dia após o parto. No 31º dia, as fibras musculares apresentavam-se normais e o miométrio encontrava-se totalmente involuído.

2.3.3.3. Fatores que podem interferir na involução uterina

Diversos fatores podem influenciar no processo de involução uterina das vacas, sendo que os mais estudados são: idade, ordem de parto e ocorrência de afecções puerperais. Quanto à idade e ordem de parto, geralmente, as primíparas apresentam regressão uterina mais rápida que as pluríparas (Buch et al., 1955; Araújo et al., 1974; Lara, 1985; Guilhermino et al., 1992; Zain et al., 1995). Esses achados são atribuídos à idade mais elevada das pluríparas e ao maior número de partições. Araújo et al. (1974) reportaram que quanto

maior é a idade e o número de partições de vacas mestiças Holandês x Zebu, mais lenta é a involução uterina em relação às primíparas, sendo que nesse estudo, a involução uterina foi mais lenta nos animais com mais de seis anos de idade. Esses achados são decorrentes de alterações fisiológicas ocorridas no útero de animais mais velhos, que incluem fibrose, relaxamento das fibras musculares e dos ligamentos de sustentação desse órgão, com consequente diminuição da contratilidade durante o processo de involução (González Sánchez et al., 2008).

O útero de vacas com complicações durante o parto, tais como doenças metabólicas, distocias, gestações gemelares e retenção de placenta, involui mais lentamente que o de vacas com parto normal. Isso se deve às alterações nos mecanismos de defesa, que favorecem o estabelecimento de infecções uterinas e diminuem a velocidade da involução em animais com puerpério patológico (Buch et al., 1955; Gier e Marion, 1968; González Sánchez et al., 1999a; 2008; Mateus et al., 2002; Sheldon, 2007; Senosy et al., 2009; Martins et al., 2013). O útero de vacas que apresentam complicações puerperais permanece por mais tempo na cavidade abdominal após o parto, dificultando a drenagem do conteúdo uterino pelas contrações do miométrio e favorecendo a ocorrência de infecções uterinas (González Sánchez et al., 2008).

Outros fatores podem influenciar no processo de involução uterina, porém, existem controvérsias entre os estudos. Esses fatores são a condição corporal, o peso do bezerro ao nascimento, o nível de produção de leite, o número de ordenhas, a presença do bezerro, a presença do touro, terapias hormonais e o retorno da atividade ovariana luteal (RAOL).

A quantidade e a qualidade da dieta determinam a condição corporal dos animais em diferentes estações e épocas do

ano, e, indiretamente, contribuem para a ocorrência ou não de diferenças nos períodos de involução uterina. Em um estudo com vacas Holandesas que não tiveram complicações puerperais, foi observado efeito significativo da estação do ano sobre o período de involução uterina, sendo obtidas médias de 42 dias no verão e 51 dias no inverno (Buch et al., 1955). No estudo de Lara (1985), o período de involução uterina de vacas mestiças Holandês x Zebu foi mais curto na primavera ($28,4 \pm 5,0$ dias) e no verão ($27,8 \pm 5,8$ dias), quando comparado ao outono ($31,8 \pm 5,9$ dias) e ao inverno ($34,2 \pm 4,8$ dias). Adicionalmente, no estudo de Rekwot et al. (2000) vacas zebuínas que pariram na seca tiveram involução uterina mais rápida (24,4 dias vs 26,5 dias) que as vacas que pariram na época das chuvas.

O peso do bezerro ao nascimento afetou significativamente o período de involução uterina de vacas F1 Jersey x Hariara no estudo de Agasti et al. (1975). Quanto maior o peso ao nascimento, maior foi o período de involução uterina. No estudo de Guilhermino et al. (1992) foi observado o contrário, quanto maior o peso do bezerro ao nascimento, menor o período de involução uterina das vacas Gir. Esse achado foi relacionado ao bom ECC das vacas e à baixa média de peso dos bezerros Gir ao nascimento, que, geralmente, não causam danos ao trato genital das vacas.

Vacas Holandesas com maiores médias de produção de leite durante a lactação tiveram menor tempo de involução uterina no estudo de Menge et al. (1962). No estudo de Araújo et al. (1974) não houve interferência da quantidade de leite produzida durante a lactação no período de involução do útero de vacas mestiças Holandês x Zebu. As médias de produção de leite até 30 dias após o parto e durante a lactação, a duração do período seco anterior e a duração da lactação não interferiram no tempo de involução uterina das vacas Gir no estudo

de González Sánchez et al. (1999b). De acordo com esses autores, os achados demonstram importância secundária ou inexistência de efeitos da produção de leite na velocidade de regressão do útero de vacas Gir.

O período de involução uterina de vacas Holandesas foi de 15 a 25 dias para vacas mantidas com os bezerros durante a lactação, e de 25 a 30 dias para vacas separadas dos bezerros, no estudo de Carruthers e Hafs (1980), sugerindo que o estímulo da sucção estaria relacionado com a liberação de ocitocina pela hipófise posterior. O aumento da contratilidade do miométrio, promovido pela ação da ocitocina nas fibras musculares, teria contribuído para acelerar a involução uterina. Nesse estudo, a ordenha de vacas Holandesas quatro vezes ao dia até o 25º dia após o parto também resultou em redução do período de involução uterina. Porém, Cameron e Fosgate (1964) estudaram o efeito da aplicação de 150 a 200 UI de ocitocina por via subcutânea, em intervalos de 12 horas nos primeiros 42 dias após o parto, sobre o período de involução uterina de vacas Holandesas e Jersey. O término da involução uterina dos animais, tratados ou não, ocorreu em média, aos 41,0 dias e aos 42,7 dias após o parto, respectivamente. Nesse estudo, as dosagens de ocitocina exógena e os intervalos de aplicação foram insuficientes para aumentar a contratilidade das fibras musculares lisas do miométrio.

No estudo de González Sánchez et al. (1999b), não foi observada influência da presença ou não do bezerro no momento da ordenha, no período de involução uterina de vacas Gir. As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia, sendo que para um grupo, os bezerros eram aleitados artificialmente, e para o outro, os bezerros mamavam um dos tetos durante a ordenha. Concluiu-se que o apoio das vacas, realizado em ambos os tratamentos, suprimiu possíveis

interferências do tipo de ordenha no período de involução uterina. O apoio consiste na condução do bezerro até a vaca no momento da ordenha, permitindo a amamentação por alguns segundos para estimular a descida do leite.

Quanto à bioestimulação proporcionada pela presença do touro, Landaeta-Hernández et al. (2004) não verificaram diferença significativa nos períodos de involução uterina de 90 vacas Angus com bezerros ao pé, expostas ou não a um rufião a partir da primeira semana após o parto. Os períodos de involução uterina foram de $17,1 \pm 1,1$ dias e $20,1 \pm 1,6$ dias, respectivamente. Adicionalmente, Rekwot et al. (2000) utilizaram 135 vacas zebuínas com bezerro ao pé, mantidas em pastagens e suplementadas com concentrado, para avaliar a influência da presença de um rufião no desempenho reprodutivo até 150 dias após o parto. A presença do rufião também não influenciou no período de involução uterina (25,7 dias para o grupo de vacas mantidas com o rufião vs 25,0 dias para o grupo mantido sem o rufião).

Segundo alguns estudos, além de induzir a luteólise, a prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) exerce efeito no tônus uterino, auxiliando na contração da musculatura lisa do útero (Albuquerque, 1985; Lopes et al., 2007). No experimento conduzido por Albuquerque (1985), 70 vacas mestiças Holandês x Zebu receberam 500 μ g de cloprostenol (análogo da $PGF2\alpha$) por via intramuscular em diferentes períodos após o parto. A involução macroscópica do útero foi mais rápida para o grupo de animais que receberam o tratamento entre 12 e 18 dias após o parto (média de 24,6 dias), quando comparado aos grupos de animais tratados entre 6 e 12 dias após o parto (média de 29,2 dias) e não tratados (média de 31,5 dias). Microscopicamente, não houve diferença entre os tratamentos. Em um estudo com 96 vacas Holandesas, Lopes (2007) observou diferença significativa nos

períodos de involução uterina de animais tratados com 530 mg de cloprostenol sódico entre o 3º o 14º dia após o parto (média de 32,95 dias), quando comparados aos animais não tratados (média de 40,33 dias). Adicionalmente, Caravajal (1989) não observou diferenças nos períodos de involução uterina de vacas mestiças Holandês x Zebu tratadas ou não com $PGF2\alpha$ após o parto.

Os estudos sobre o efeito do RAOL no processo de involução uterina são contraditórios. Alguns autores relatam que quanto mais precoce a ocorrência da primeira ovulação após o parto de vacas com puerpério normal, mais rápido é o processo de involução uterina, visto que o estrógeno potencializa a defesa imunológica do útero ao aumentar a vascularização do endométrio, aumentar a contratilidade do miométrio e favorecer a produção de muco, auxiliando na limpeza do ambiente uterino (Sheldon et al., 2003; Azawi, 2008). No estudo de Sheldon et al. (2003), por exemplo, o RAOL interferiu na velocidade de regressão dos cornos uterinos. Por meio da ultrassonografia, esses autores monitoraram a involução uterina de 29 vacas Holandesas até o 28º dia após o parto e observaram que os animais que ovularam apresentaram maior velocidade de regressão dos cornos uterinos quando comparados aos animais que tiveram atresia do folículo dominante. Porém, a maioria dos estudos não relatam relação entre involução uterina e RAOL, verificando-se involução macroscópica e histológica do útero antes da ocorrência da primeira ovulação em vacas Holandesas (Menge et al., 1962; Martins et al., 2013), vacas mestiças Holandês x Zebu (Araújo et al., 1974) e vacas Gir (González Sánchez et al., 1999b).

2.3.4. Retorno da atividade ovariana luteal

No primeiro e no segundo trimestre da gestação, as ondas foliculares mantêm

intervalos de sete a dez dias. No final da gestação, o acentuado *feedback* negativo proporcionado pelas altas concentrações de progesterona (de origem luteal e placentária) e estrógenos (de origem placentária) suprimem a liberação de FSH (do inglês *Follicle-Stimulating Hormone*) e o crescimento folicular. O padrão das ondas foliculares é interrompido, principalmente nos últimos 30 dias da gestação. Após o parto, a liberação da placenta e a luteólise resultam em queda das concentrações de estrógeno e progesterona, com consequente aumento na concentração de FSH e crescimento dos folículos entre sete e dez dias (Roche et al., 1992; Yavas e Walton, 2000; Crowe, 2008; Forde et al., 2011).

A primeira ovulação e o retorno da ciclicidade dependem do restabelecimento das ondas foliculares com formação de um folículo dominante que, sob ação de determinada frequência e amplitude de pulsos de LH, seja capaz de alcançar sua maturação final, ovular e formar um corpo lúteo funcional (Roche et al., 1992; Butler, 2006). Fisiologicamente, a recuperação do eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano pode ocorrer até três semanas após o parto. O acúmulo de LH na hipófise anterior aumenta gradualmente entre 15 e 20 dias após o parto, sendo que concentrações de LH semelhantes às de vacas cíclicas podem ser observadas até 30 dias após o parto. O aumento da secreção de estradiol 17 β pelo folículo dominante reduz a amplitude e aumenta a frequência da secreção pulsátil de LH, que por sua vez, estimula o crescimento final do folículo dominante, a produção de mais estradiol 17 β , até a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH, que resulta na ovulação e formação do corpo lúteo. A primeira ovulação após o parto pode não ser precedida de manifestação do estro, devido à ausência de um *priming* de progesterona no centro de controle do comportamento sexual no cérebro. O corpo lúteo formado na primeira ovulação pode sofrer luteólise precoce por

causa da liberação alterada de PGF2 α pelo endométrio durante a involução uterina, levando à ocorrência de um ciclo estral de curta duração (Yavas e Walton, 2000).

A fisiologia é semelhante, porém, diferenças genéticas e no manejo após o parto resultam em particularidades para o anestro de vacas leiteiras e de corte (Short et al., 1990). A duração do anestro após o parto em vacas leiteiras geralmente é menor que a de vacas de corte lactantes (Roche et al., 1992). Nos casos em que o manejo nutricional é adequado e os animais apresentam bom ECC, verifica-se RAOL entre duas e três semanas após o parto em vacas leiteiras sem presença do bezerro, enquanto vacas de corte que amamentam suas crias podem apresentar RAOL a partir de 60 dias após o parto (Yavas e Walton, 2000; Forde et al., 2011). Vacas de corte lactantes com baixo ECC apresentam RAOL ainda mais tardio, em torno de 70 a 100 dias após o parto (Forde et al., 2011). Falhas na ovulação dos primeiros folículos dominantes são as principais causas do prolongamento do período de anestro em vacas de corte (Roche et al., 1992).

2.3.4.1. Retorno da atividade ovariana luteal em vacas de corte

Diversos fatores podem influenciar no RAOL em vacas de corte após o parto, sendo que a nutrição e a amamentação são os mais importantes (Short et al., 1990; Rekwot et al., 2000; Roche, 2000; Yavas e Walton, 2000; Abeygunawardena e Dematawewa, 2004). Estes fatores podem atuar isoladamente ou em conjunto, determinando a duração do anestro após o parto (Short et al., 1990).

Os efeitos nutricionais são determinados pela interação entre quantidade e qualidade dos alimentos ingeridos, reservas corporais e partição dos nutrientes (alocação de nutrientes para a manutenção de diferentes funções do organismo). Reservas corporais

de nutrientes armazenados pelos bovinos nos períodos de maior disponibilidade das forrageiras são utilizadas para manter as diferentes funções fisiológicas nas épocas de baixa disponibilidade de alimentos. Os nutrientes são alocados de acordo com uma escala de prioridades, primeiramente, para a manutenção, e em seguida, para manutenção da espécie. A ordem de prioridade para a partição dos nutrientes é basicamente: metabolismo basal, crescimento, reservas corporais, gestação, lactação e reservas corporais adicionais (Short et al., 1990).

Em sistemas de criação extensivos, mais típicos para vacas de corte, verifica-se naturalmente, maior ocorrência de partos no final da seca e início da estação chuvosa. A estação chuvosa coincide com maior oferta de pastagens e durante esse período, as vacas têm melhores condições nutricionais para satisfazer suas necessidades totais de manutenção, lactação e reprodução (Abeygunawardena e Dematawewa, 2004). O efeito da nutrição no RAOL após o parto está diretamente relacionado com a condição corporal das vacas no pré-parto e ao parto (Short et al., 1990). A nutrição deficiente resulta em perda da condição corporal, atrasando o RAOL e prolongando o período de anestro. A fertilidade é reestabelecida somente após a recuperação da condição corporal (Rekwot et al., 2000; Abeygunawardena e Dematawewa, 2004). O balanço energético é o mais utilizado para avaliar a influência da nutrição na reprodução, porém, outros nutrientes são igualmente importantes (Short et al., 1990). Modificações fisiológicas e metabólicas, podem resultar em balanço energético negativo (BEN). A magnitude do BEN depende da condição corporal ao parto e do manejo nutricional (Roche, 2000).

A duração do anestro após o parto pode ser diminuída quando os bezerros são desmamados precocemente, são separados temporariamente das vacas, ou são manejados para mamar durante períodos

limitados de tempo. A resposta a esses tratamentos varia de acordo com a interação com outros fatores, como o genótipo, a ordem de parto, a condição corporal da vaca e a idade do bezerro (Short et al., 1990). Inicialmente, acreditava-se que o efeito da sucção durante a amamentação estava relacionado com a supressão da liberação de LH (Williams et al., 1987). Posteriormente, verificou-se que sinais exteroceptivos associados ao vínculo da vaca com sua própria cria eram responsáveis pela inibição da secreção de LH após o parto e atraso do RAOL (Silveira et al., 1993).

Para testar a influência de diferentes estímulos proporcionados pela interação da vaca com seu próprio bezerro ou com bezerros de outras vacas na liberação pulsátil de LH após o parto, Griffith e Williams (1996) estudaram a influência da visão, da olfação e da mamada pelo próprio bezerro ou bezerro de outra vaca, na secreção de LH em vacas F1 Hereford x Brahman. Os resultados demonstraram a importância da ligação materna visual e/ou olfativa para a supressão da liberação pulsátil de LH.

O prolongamento do anestro após o parto em vacas lactantes foi atribuído à interferência dos peptídeos opióides endógenos no controle da liberação de GnRH e LH durante o período de amamentação (Short et al., 1990; Silveira et al., 1993). Os peptídeos opióides endógenos são produzidos no sistema nervoso central e na hipófise anterior, sendo que seus representantes mais estudados são as endorfinas, as encefalinas e as dinorfinas. Essas substâncias são responsáveis pela inibição da secreção de GnRH, diminuição da sensibilidade da hipófise ao GnRH, inibição da secreção de gonadotrofinas, menor crescimento folicular e falhas na ovulação. O desmame precoce e a separação temporária do bezerro resultam em aumento da secreção de GnRH e da

sensibilidade da hipófise ao GnRH, seguido de restabelecimento do eixo hipotálamo-hipófise-ovário (Yavas e Walton, 2000).

O sucesso das técnicas de desmame e regimes de amamentação estratégicos dependem da viabilidade econômica do aleitamento artificial dos bezerros. Além disso, as vacas zebuínas, geralmente, dependem do estímulo da sucção para ejetarem o leite. Sendo assim, o desmame precoce e as estratégias de amamentação temporárias podem resultar em aumento do custo da cria e diminuição da produção de leite. Outra estratégia para melhorar a fertilidade de vacas zebuínas, consiste na utilização de hormônios exógenos, como o GnRH, o eCG, o hCG, o FSH, os implantes de progesterona e os hormônios estrogênicos, com o objetivo de reduzir o anestro pós-parto (Short et al., 1990; Abeygunawardena e Dematawewa, 2004).

Para alcançar desempenhos reprodutivo e produtivo rentáveis, os ganhos obtidos com a melhoria da nutrição, o desmame precoce, a amamentação controlada, a adoção de hormônios exógenos e outras intervenções no manejo após o parto devem ser acompanhados de melhoria do potencial genético dos zebuínos (Abeygunawardena e Dematawewa, 2004).

Outros fatores que podem interferir no RAOL de vacas zebuínas incluem: variações genéticas, raça, presença do touro e ordem de parto (Short et al., 1990; Rekwot et al., 2000; Roche, 2000; Yavas e Walton, 2000; Abeygunawardena e Dematawewa, 2004). Os efeitos das variações genéticas e das raças no RAOL podem ser observados ao comparar vacas leiteiras com vacas de corte. As raças de vacas leiteiras ordenhadas apresentam menor duração do anestro pós-parto que as raças de vacas de corte lactantes. Porém, quando as vacas leiteiras são mantidas com suas crias, elas também apresentam anestro prolongado. Não se sabe como a variação

genética influencia no anestro, os efeitos podem ser devidos a diferenças fisiológicas entre as raças e/ou podem ser confundidos com variações na produção de leite e na ingestão de alimentos (Short et al., 1990). Vários estudos relatam que a presença do touro acelera o RAOL (Short et al., 1990; Rekwot et al., 2000; Landaeta-Hernández et al., 2004). A introdução de rufiões em lotes de vacas de corte recém-paridas implicou menor duração do anestro após o parto (71,7 dias vs 77,8 dias) no estudo de Rekwot et al. (2000), e maior frequência de retorno da atividade ovariana até seis semanas após o parto (53% vs 26,6%) no estudo de Landaeta-Hernández et al. (2004). Sinais exteroceptivos presentes na interação entre vacas e touros incluem estímulos visuais, auditivos e olfativos, como a liberação de feromônios. A natureza dos sinais transmitidos pelo touro e captados pela vaca ainda não foi esclarecida. Devido à interferência de outros fatores, como os diferentes níveis nutricionais da dieta, o efeito da bioestimulação na atividade reprodutiva necessita de investigações mais profundas. Quanto à ordem de parto, as primíparas apresentam anestro mais prolongado que as pluríparas, já que além das necessidades de manutenção e lactação, esses animais ainda se encontram em fase de crescimento após o parto (Short et al., 1990).

2.3.4.2. Retorno da atividade ovariana luteal em vacas leiteiras

Dentre os diferentes fatores que podem influenciar no RAOL de vacas leiteiras após o parto, o BEN é um dos mais estudados, principalmente em vacas de alta produção (Britt, 1992; De Vries e Veerkamp, 2000; Butler, 2006; Sheldon et al., 2008). O BEN está relacionado com nutrição inadequada, perda da condição corporal e aumento da produção de leite durante o puerpério. Outros fatores que podem interferir no RAOL desses animais são a ocorrência de doenças metabólicas e a ordem de partos

(Opsomer et al., 2000; Crowe, 2008), elevadas incidências de partos gemelares, distocias, retenção de placenta e infecções uterinas (Forde et al., 2011).

O grande desafio para acelerar o RAOL de vacas leiteiras é fornecer nutrição adequada no pré-parto, para que as vacas possam parir com bom ECC. Vacas que perdem mais de 1 unidade no escore ECC após o parto apresentam atraso no RAOL (Crowe, 2008). A interferência da perda de condição corporal após o parto no RAOL é potencializada por outros fatores, como a amamentação. Os efeitos da baixa condição corporal e da amamentação atuam suprimindo a frequência de GnRH no hipotálamo e a liberação pulsátil de LH pela hipófise anterior (Grimard et al., 1995).

Em rebanhos de alta produção bem manejados, a maioria das vacas apresentam RAOL entre duas e quatro semanas após o parto. Vacas com BEN mais grave e com transtornos puerperais apresentam RAOL mais tardio. Portanto, é importante estimular a máxima ingestão de alimentos após o parto e minimizar a ocorrência de transtornos puerperais para adiantar o RAOL (Britt, 1992; Grimard et al., 1995; Butler, 2006; Sheldon et al., 2008; Crowe, 2008). Uma das estratégias de manejo utilizadas para estimular o consumo de ingestão de matéria seca pelas vacas paridas consiste em fornecer alimentação fresca várias vezes ao dia. O aumento do consumo implica maior produção de leite e menor intervalo do parto à primeira ovulação (Stevenson, 2006). A proporção de vacas que não apresentam RAOL 42 dias após o parto é um bom indicador da nutrição adequada de um rebanho. Se essa taxa ultrapassar 25%, a dieta dos animais deve ser examinada com cuidado, visando adotar estratégias para aumentar a ingestão de alimentos e minimizar o BEN (Britt, 1992).

Durante o BEN, a disponibilidade de insulina e glicose encontram-se reduzidas,

sendo necessário mobilizar reservas corporais para manter a produção de leite. Dependendo da extensão e da gravidade do BEN, as vacas apresentam elevação das concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e corpos cetônicos circulantes (Grimard et al., 1995). A influência do BEN no RAOL está relacionada com o atraso no aumento dos pulsos de gonadotropinas na presença de altas concentrações de AGNE, altas concentrações de corpos cetônicos, hipoglicemia e hipoinsulinemia. Baixas concentrações de insulina também estão relacionadas com menor produção do fator semelhante à insulina tipo 1, reduzindo ainda mais a resposta dos ovários às gonadotropinas após o parto (Grimard et al., 1995; Butler, 2006). As primíparas são mais sensíveis aos efeitos do BEN no RAOL (Grimard et al., 1995).

A duração do BEN determina o momento da primeira ovulação após o parto, pois influencia no destino do primeiro folículo dominante (Butler, 2006). Falhas na ovulação do primeiro folículo dominante são responsáveis pelo atraso no RAOL após o parto (Diskin et al., 2003). O primeiro folículo dominante, que surge a partir da primeira semana após o parto, pode ter como destino: a atresia, o encistamento, a formação de um folículo persistente ou a ovulação seguida da formação de um corpo lúteo persistente (Sheldon et al., 2002a; Butler, 2006). Nos casos de atresia ou encistamento do primeiro folículo dominante, pode ocorrer um atraso de três a quatro semanas para a ocorrência da primeira ovulação (Butler, 2006).

Como observado em vacas de corte, a primeira ovulação das vacas leiteiras pode ser precedida de ausência de manifestação de estro, e, geralmente, é seguida por ciclo estral de curta duração, no qual verifica-se apenas uma onda folicular. O aumento inicial da liberação de PGF2 α pelo endométrio lesado está relacionado com

essa ocorrência, resultando em luteólise antecipada entre oito a dez dias após a ovulação (Crowe, 2008). Outro fator que pode contribuir para a ocorrência de ciclo estral de curta duração é o tamanho do corpo lúteo formado após a primeira ovulação. Corpos lúteos menores produzem menos progesterona e sofrem luteólise precocemente, o que contribui para atrasar o retorno da ciclicidade após o parto (Kamimura et al., 1993).

Além de apresentar rápido RAOL e um corpo lúteo apto a secretar progesterona em quantidade suficiente para manter uma nova gestação, o ideal é que as vacas sejam capazes de manifestar o estro (Royal et al., 2000). A incidência de animais que ovulam, mas não manifestam sinais de estro após o parto geralmente é muito elevada. No estudo de Lara (1985), 63,9% das vacas das vacas mestiças Holandês x Zebu monitoradas durante o puerpério não manifestaram estro antes da primeira ovulação e 10,3% apresentaram ciclos estrais de curta duração. Ocorrências mais elevadas foram relatadas por Carvalho (2009), verificando-se que 90,2% das primeiras ovulações após o parto de vacas Holandês x Zebu não foram precedidas de manifestação de estro. Dos animais que ovularam, 85,0% apresentaram ciclos estrais de curta duração. Contudo, a segunda ovulação geralmente é precedida de manifestação do estro e seguida de ciclo estral normal, com duração de 18 a 24 dias (Lara, 1985; Carvalho, 2009; Crowe, 2008).

2.4. Contaminação x Infecção uterina

A abertura das barreiras anatômicas constituídas pela vulva, vagina e cérvix possibilita a invasão do útero por microrganismos presentes no ambiente, nas fezes, na pele e no trato genital dos animais, sendo que até 100% das vacas podem apresentar contaminação bacteriana ascendente durante o parto (Sheldon et al., 2002a; Sheldon e Dobson, 2004; Rocha et

al., 2004; Sheldon, 2007). Diversos tipos de bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbicas e anaeróbicas, podem ser encontradas no ambiente uterino após o parto (Sheldon et al., 2004b; Azawi, 2008). As bactérias aeróbicas mais comuns são: *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* (anteriormente denominada *Arcanobacterium pyogenes*), *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.; enquanto as anaeróbicas mais isoladas em amostras do conteúdo uterino são: *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides* spp. e *Prevotella melaninogenica* (Kask et al., 2003; Rocha et al., 2004; Willians et al., 2005; Lopes, 2007; McDougall et al., 2011).

O contato direto com o conteúdo uterino remanescente da gestação favorece a multiplicação das bactérias (Azawi, 2008). Verifica-se maior taxa de multiplicação das bactérias nas duas primeiras semanas após o parto. O processo de involução do útero, a abertura da cérvix e a eliminação do conteúdo uterino favorecem a eliminação das bactérias em vacas que apresentam puerpério fisiológico (Rocha et al., 2004). Dessa forma, a contaminação uterina é debelada sem manifestação dos sinais clínicos que caracterizam a ocorrência de doenças uterinas.

Dentre outros fatores ocorridos no periparto, as distocias, os partos gemelares e a retenção de placenta podem causar danos ao endométrio e alterar a ação dos mecanismos de defesa locais, possibilitando o estabelecimento de infecções uterinas (Potter et al. 2010). Alterações nos mecanismos de defesa durante o processo de involução uterina permitem que bactérias aeróbicas como *E. coli* e *T. pyogenes*, e anaeróbicas, como *F. necrophorum* e *Prevotella* spp. passem a atuar sinergicamente, favorecendo mutuamente o crescimento e a patogenicidade de todas (Sheldon e Dobson, 2004; Willians et al., 2005; Sheldon, 2007).

2.4.1. Bactérias associadas às ocorrências de infecções uterinas

Vacas Holandesas com quadros de infecção uterina aguda associados à presença de *E. coli* e *T. pyogenes* aos sete dias após o parto, apresentam alteração na função ovariana e menor crescimento folicular. Esses achados estão relacionados com a diminuição da sensibilidade dos ovários ao FSH, uma vez que a concentração de FSH é semelhante entre vacas com e sem infecção uterina. Os corpos lúteos formados após a primeira ovulação das vacas com infecção uterina apresentam menor diâmetro e baixa capacidade de produzir progesterona devido à alteração da função das células luteais promovida pelo LPS e outros componentes bacterianos (Willians et al., 2007).

Os efeitos da infecção uterina sobre o crescimento folicular e a ovulação podem ser diretos ou indiretos, proporcionados pela diminuição da ação das gonadotrofinas nos folículos e pela inibição da secreção de LH, respectivamente (Sheldon et al., 2002a). Em geral, verifica-se diminuição do crescimento folicular, redução da secreção de estradiol pelos folículos dominantes e atraso do RAOL (LeBlanc et al., 2002a; Sheldon et al., 2008; Sheldon e Dobson, 2004; Willians et al., 2007). O atraso do RAOL em vacas que apresentam transtornos puerperais pode estar relacionado com o grau de contaminação do ambiente uterino. Por meio de *swabs* realizados entre sete e 28 dias após o parto, Sheldon et al. (2002a) observaram relação do grau contaminação uterina com o destino do primeiro folículo dominante. Animais com maior nível de contaminação bacteriana aos sete dias após o parto apresentaram folículo dominante com menor diâmetro, com posicionamento contra-lateral ao corno previamente gestante, e menor concentração de estradiol circulante. Esses achados indicaram que a alta contaminação bacteriana influenciou na seleção, na taxa de crescimento e na função

do folículo dominante, ao interferir no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano.

Quadros de infecção uterina persistentes promovem alterações no controle hormonal das funções endometriais resultando em atraso da luteólise, visto que a produção de prostaglandina F2 α ocorre primariamente no endométrio. Endotoxinas bacterianas podem atuar diretamente no epitélio e no estroma endometriais induzindo a produção de prostaglandina E2, a qual é luteotrófica, ou seja, impede a ocorrência da luteólise. Devido à persistência do corpo lúteo, a alta concentração de progesterona pode resultar em imunossupressão, agravando e prolongando o quadro de infecção uterina (Herath et al., 2006; 2009b; Sheldon et al., 2009). Animais com infecção uterina crônica apresentam longos períodos de serviço, menores taxas de gestação e maiores chances de serem descartados devido à subfertilidade (Sheldon, 2007).

A subfertilidade associada às infecções uterinas envolve efeitos diretos sobre os ovários e o útero, além de alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano, podendo persistir mesmo após a resolução do quadro clínico da doença (Sheldon e Dobson, 2004). Nos casos de altas densidades de bactérias patogênicas, as endotoxinas presentes no ambiente uterino podem alcançar a circulação sanguínea, e juntamente com citocinas pró-inflamatórias, podem suprimir a liberação de GnRH pelo hipotálamo e a secreção de LH pela hipófise. As consequências da alteração do controle do eixo hipotálamo-hipófise-ovário implicam em atraso no retorno da atividade ovariana luteal, maiores incidências de cistos ovarianos e prolongamento do anestro após o parto (Sheldon, 2007; Sheldon et al., 2009).

Ao contrário da *E. coli*, *T. pyogenes* não é capaz de estimular a produção de prostaglandinas (Miller et al., 2007). Nesse estudo, foram comparados os mecanismos

de atuação de *T. pyogenes* e *E. coli* na presença de células endometriais. Somente *E. coli* foi capaz de estimular a produção de prostaglandinas e promover o aumento da transcrição de fatores pró-inflamatórios. Essa diferença foi atribuída à expressão da endotoxina LPS pela *E. coli*, que é reconhecida como um fator altamente imunogênico. A ação de *T. pyogenes* consistiu na secreção de uma exotoxina hemolítica termossensível, associada a danos endometriais irreversíveis.

Intervalos mais longos do parto ao primeiro serviço ou à concepção estão associados com maior quantidade de *T. pyogenes* no conteúdo uterino em vacas Holandesas aos 28 dias após o parto. Devido à ação sinérgica com bactérias anaeróbicas, *T. pyogenes* está presente em grande quantidade na secreção cervicovaginal com aspecto purulento, característica de animais com quadros infecção uterina no pós-parto tardio (Willians et al., 2005). Földi et al. (2008) relataram que o isolamento de *T. pyogenes* no final do processo de involução está relacionado com quadros de subfertilidade em vacas Holandesas.

No pós-parto tardio, a presença de bactérias no conteúdo uterino é mais comum em vacas Holandesas que tiveram retenção de placenta (Kaneko et al., 1997). Nesse estudo, em torno de 48% das vacas com retenção de placenta tiveram culturas bacterianas positivas aos 30 dias após o parto. *T. pyogenes* foi a bactéria mais frequente nos isolados das vacas com retenção de placenta, indicando que o útero desses animais é mais suscetível à infecção por *T. pyogenes* nessa ocasião.

A permanência de bactérias consideradas patogênicas no ambiente uterino após o parto pode estar relacionada com um maior grau de inflamação endometrial e com o estabelecimento de quadros de infecção uterina mais graves (Willians et al., 2005). Apesar da gravidade da infecção uterina

depender da patogenicidade das bactérias, o estabelecimento e a persistência da doença são influenciados por fatores genéticos e pelos mecanismos de defesa do útero (Willians et al., 2005; 2007).

2.4.2. Mecanismos de defesa do útero

O sistema imunológico é constituído pelas imunidades inata e adquirida. A imunidade inata é considerada inespecífica, pois apresenta mecanismos de resistência contra todos os tipos de antígenos. Ela atua na proteção inicial, quando o hospedeiro é exposto pela primeira vez a um agente infeccioso (Sordillo et al., 2009). A imunidade inata inclui as barreiras fisiológicas da pele e das mucosas, os peptídeos antimicrobianos, o sistema complemento e as células hematopoiéticas que detectam e eliminam os patógenos, tais como monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e células *natural killer*. As células do epitélio e do estroma de alguns tecidos também estão associadas à defesa do hospedeiro contra determinadas substâncias e microrganismos potencialmente patogênicos. Além de constituírem barreiras passivas contra a infecção, as células epiteliais e estromais são reconhecidas pelas estratégias de defesa mediadas pela imunidade inata e ativação da imunidade adquirida (Takeuchi e Akira, 2010; Turner et al., 2012). Quando a imunidade inata não é capaz de evitar a infecção, a resposta imunológica adquirida é ativada (Janeway e Medzhitov, 2002). Dessa forma, o sistema imunológico inato é responsável pela primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de patógenos e pela ativação da imunidade adquirida (Aderem e Ulevitch, 2000; Horne et al., 2008).

A imunidade adquirida elabora uma resposta específica para cada desafio antigênico. A formação de uma memória imunológica proporciona proteção ao hospedeiro quando ele entra em contato

com o mesmo antígeno mais de uma vez. As respostas desencadeadas pela imunidade adquirida são a imunidade humoral e a imunidade celular, que são proporcionadas pelos linfócitos B e T contra patógenos extracelulares ou intracelulares, respectivamente (Werling e Jungi, 2003; Sordillo et al., 2009). Para que a resistência do hospedeiro seja eficiente, as imunidades inata e adquirida devem interagir de forma coordenada e equilibrada. A eliminação do patógeno deve ser realizada por meio de respostas imunológicas reguladas para evitar danos aos tecidos do hospedeiro (Sordillo et al., 2009).

Estudos atuais têm questionado as definições clássicas de imunidade inata e adquirida. A descoberta dos receptores de padrões moleculares microbianos indica que a imunidade inata não pode ser considerada inespecífica. Outro achado recente é a capacidade de formação de memória imunológica pela imunidade inata, verificando-se aumento das respostas desencadeadas por células de defesa associadas a esse tipo de imunidade após a ocorrência de reinfecções (Bowdish et al., 2007; Netea et al., 2011).

Após o parto, parte dos mecanismos de defesa uterinos relacionados com as imunidades inata e adquirida encontram-se debilitados. Os impactos decorrentes do estabelecimento de doenças comprometem a eficiência produtiva e reprodutiva (Lewis, 1997; Sordillo et al., 2009). A compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais as vacas detectam e respondem às doenças uterinas pode resultar no desenvolvimento de melhores estratégias para o diagnóstico e o tratamento dos quadros de infecção, o que será importante para diminuir os custos dessas afecções nos sistemas de produção de leite (Swangchan-Uthai et al., 2012).

O principal mecanismo de defesa responsável pelo controle da contaminação uterina em vacas após o parto é a imunidade

inata, a qual atua por meio de respostas fisiológicas, fagocitárias e inflamatórias (King et al., 2003; Sheldon e Dobson, 2004; Herath et al., 2006; Turner et al., 2012). As contrações do miométrio após o parto e a produção de muco pelas glândulas endometriais, principalmente durante o estro, são importantes respostas fisiológicas contra a contaminação bacteriana (Sheldon e Dobson, 2004; Azawi, 2008). A invasão do ambiente uterino por neutrófilos em resposta ao desafio proporcionado pela presença de bactérias é considerada a mais importante resposta fagocitária (Hussain e Daniel, 1992; Lewis, 1997; Sheldon e Dobson, 2004; Hammon et al., 2006; Azawi, 2008). No pós-parto recente, as carúnculas promovem a migração dessas células da circulação sanguínea para a superfície do endométrio por meio da quimiotaxia (Marques Júnior, 1988; Hussain e Daniel, 1992). Na presença de patógenos, os neutrófilos são as células de defesa recrutadas mais rapidamente da circulação sanguínea para o ambiente uterino. Posteriormente, macrófagos também auxiliam na remoção dos patógenos (Sheldon e Dobson, 2004). Além de promover a remoção dos patógenos, a resposta inflamatória atua na cicatrização dos tecidos. A resposta inflamatória aguda é caracterizada por: liberação de mediadores solúveis, vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, extravasamento de líquidos e elevado metabolismo celular (Sordillo et al., 2009). A resposta inflamatória endometrial em bovinos inclui a liberação de citocinas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos, proteínas de fase aguda, prostaglandinas, entre outras substâncias imunomodulatórias (Sheldon e Dobson, 2004). Quando atua de forma eficiente, a resposta inflamatória é capaz de remover rapidamente os patógenos e manter a integridade do tecido (Sordillo et al., 2009).

O reconhecimento dos componentes estruturais das bactérias patogênicas invasoras do ambiente uterino é realizado

por receptores específicos localizados nas células de defesa e nas células endometriais. Atualmente, quatro classes de receptores de padrões moleculares microbianos já foram identificadas: os TLRs e os CLRs (do inglês *C-type Lectin Receptors*), que são proteínas transmembranares, e, os NLRs e os RLRs (do inglês *Retinoic acid-inducible gene I-Like Receptors*), que são proteínas citoplasmáticas (Janeway e Medzhitov, 2002; Athman e Philpott, 2004; Horne et al., 2008; Rietdijk et al., 2008; Takeuchi e Akira, 2010; Turner et al., 2012). Sabe-se que as células do epitélio e do estroma do endométrio expressam a maioria desses receptores, com respostas comprovadas após a purificação e o tratamento dessas células com MAMPs bacterianos *in vitro* (Turner et al., 2012). A interação entre os TLRs e os MAMPs induz a ativação de cascatas de sinalização celular, com o objetivo de desencadear a resposta imunológica e combater a contaminação, verificando-se fagocitose dos patógenos, ativação da resposta inflamatória e transcrição de imunomediadores (Akira, 2003; Beutler, 2004; Schaefer et al., 2004; Takeda e Akira, 2004; Athman e Philpott, 2004). Entre outras citocinas pró-inflamatórias, verifica-se a expressão gênica de quimiocinas e peptídeos antimicrobianos, que estão envolvidos na modulação da sinalização celular pelos receptores de padrões moleculares microbianos (Takeuchi e Akira, 2010).

2.4.2.1. Transcrição de *Toll-Like Receptors* (TLRs) e seus coreceptores

A identificação dos receptores de padrões moleculares microbianos teve início na década de 90, com a descoberta dos TLRs, que são proteínas transmembrana tipo 1, compostas por um domínio extracelular rico em leucinas e uma porção citoplasmática conservada entre os componentes da família de receptores de interleucina-1, conhecidos pela sigla TIR (do inglês *Toll/IL-1R gene*

homology). Inicialmente, os TLRs foram identificados em *Drosophila*, atuando no estabelecimento do padrão dorsoventral durante a embriogênese dessas espécies. Posteriormente, verificou-se que os TLRs eram responsáveis pela resistência à infecção por fungos (Lemaitre et al., 1996; Akira, 2004; Takeda e Akira, 2004). Esses estudos incentivaram o desenvolvimento de pesquisas que relacionam o sistema imunológico inato com a detecção precoce de patógenos.

Receptores homólogos aos encontrados em *Drosophila* foram identificados em mamíferos, sendo expressos por células de defesa, tais como células T efectoras, linfócitos B, células dendríticas, neutrófilos, macrófagos, células *Natural Killer* e por células epiteliais de diferentes tecidos, estéreis ou não (Aderem e Ulevitch, 2000; Takeda e Akira, 2004; Athman e Philpott, 2004). Essas células são ativadas no início da resposta inflamatória, a qual pode estar relacionada com quadros de infecção dependendo da patogenicidade do microrganismo (Janeway e Medzhitov, 2002). Para evitar quadros de inflamação indesejados, a atuação dos TLRs é limitada nas regiões que têm contato constante com microrganismos, como a superfície intestinal (Athman e Philpott, 2004).

Em bovinos, já foram identificados 10 tipos de TLRs (McGuire et al., 2005). Em humanos, já foram identificados 11 tipos de TLRs. Adicionalmente, 13 tipos de TLRs já foram identificados em ratos. A ampla distribuição desses receptores e a diversidade de respostas imunológicas induzidas por vias de sinalização celular estão relacionadas com a suscetibilidade ou resistência a infecções, assim como a doenças autoimunes (Lin et al., 2011). Os TLRs podem atuar isolados ou em conjunto, por exemplo, o TLR1 e o TLR6 formam dímeros entre si e com o TLR2 (Akira, 2003; Young et al., 2004; Buwitt-Beckmann et al., 2006). Os principais

ligantes dos TLRs estão listados na Tabela 2, a qual foi adaptada a partir dos relatos de diferentes estudos (Medzhitov e Janeway, 1997; Aderem e Ulevitch, 2000; Janeway e Medzhitov, 2002, Werling e Jungi, 2003; Akira, 2004; Takeda e Akira, 2004).

Crescentes evidências destacam a importância da localização celular dos TLRs para o reconhecimento dos ligantes. Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 estão presentes na membrana plasmática e reconhecem ligantes presentes na parede celular das bactérias, enquanto os TLRs 3, 7 e 9 são encontrados principalmente nos endossomas e reconhecem ácidos nucleicos e outros MAMPs internos (Takeuchi e Akira, 2010).

A resposta imunológica desencadeada imediatamente após o reconhecimento dos MAMPs pode ser localizada ou pode ocorrer mobilização de agentes de defesa provenientes da circulação (Sordillo et al., 2009). O tipo de resposta do hospedeiro depende da via de sinalização que é ativada, por sua vez, a ativação de uma via depende do tipo de interação entre TLRs e moléculas adaptadoras (Athman e Philpott, 2004). A maioria das respostas inflamatórias induzidas pelos TLRs depende de uma via de sinalização mediada pela molécula adaptadora MyD88 (do inglês *Myeloid Differentiation primary response gene 88*), a qual desempenha importante papel na transdução do sinal da interação do TLR com seu ligante (Takeda e Akira, 2004).

Tabela 2. Localização dos receptores tipo *Toll* (TLR), principais padrões moleculares microbianos (MAMPs) e microrganismos de origem.

Receptor	Localização do receptor	Principais MAMPs	Origem
TLR1	Extracelular (membrana plasmática)	Triacil-lipoproteínas e modulinas	Bactérias Gram-positivas
TLR2	Extracelular (membrana plasmática)	Ácido lipoteicoico, peptideoglicanos e lipoproteínas	Bactérias Gram-positivas
TLR3	Intracelular (endossomas)	Dupla fita de RNA	Vírus
TLR4	Extracelular (membrana plasmática)	Lipossacarídeos	Bactérias Gram-negativas
TLR5	Extracelular (membrana plasmática)	Flagelinas	Bactérias
TLR6	Extracelular (membrana plasmática)	Diacil-lipoproteínas e modulinas	Bactérias Gram-positivas
TLR7	Intracelular (endossomas)	Fita simples de RNA	Vírus
TLR8	Intracelular (endossomas)	Fita simples de RNA	Vírus
TLR9	Intracelular (endossomas)	DNA não metilado e grupo heme	Bactérias
TLR10	Extracelular (membrana plasmática)	Peptideoglicanos	Bactérias

Estudos “*in vitro*” realizados com culturas de células endometriais de humanos detectaram RNAm para os TLRs 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 9 (Young et al., 2004), e TLRs 1 a 9 (Schaefer et al., 2004), por meio da técnica de RT-PCR (do inglês *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*). Por meio de imunohistoquímica, Fazeli et al. (2005), demonstraram a distribuição dos TLRs em amostras de tecidos do trato genital de humanos. Verificou-se que a transcrição dos TLRs 1, 2, 3, 5 e 6 ocorre em todo o trato reprodutivo da mulher, sendo que o TLR4 encontra-se ausente na porção inferior da cérvix e na vagina, e presente na porção superior da cérvix, no endométrio e nas tubas uterinas.

Por meio da técnica de RT-PCR, Soboll et al. (2006a) verificaram a presença de RNAm dos TLRs 1 a 9 nas células epiteliais da vagina e do útero de camundongos, sendo que o TLR4 foi o que mais se expressou nas amostras provenientes do útero. Em outro estudo, os mesmos autores verificaram transcrição significativa somente dos TLRs 1 a 6 nas células epiteliais do endométrio de camundongos (Soboll et al., 2006b).

Em seguida, alguns estudos já relataram que o endométrio dos bovinos, considerado como primeira linha de defesa uterina contra patógenos invasores, é capaz de expressar os dez tipos de TLRs citados anteriormente, na fase inicial do diestro (Davies et al., 2008), durante a gestação (Silva et al., 2012a) e após o parto (Herath et al., 2009a). Em um estudo realizado com três grupos de vacas Holandesas, antes, durante e após o parto, Ritter (2007) avaliou os níveis de transcrição dos TLRs 2, 3, 4, 6 e 9, e verificou que houve aumento significativo da transcrição desses receptores após o parto, principalmente nas áreas carunculares. Diferenças na transcrição dos TLRs foram relacionadas com a patogenicidade das bactérias isoladas em amostras do conteúdo uterino.

Além de funcionarem como barreira mecânica contra a infecção, verifica-se que as células endometriais apresentam amplo potencial de defesa contra a invasão de inúmeros tipos de patógenos (Quayle et al., 2002; Schaefer et al., 2004; Horne et al., 2008). As células endometriais são capazes de produzir vários agentes antimicrobianos, incluindo proteínas do sistema complemento, lisozimas, lactoferrinas, defensinas, inibidores de proteases, citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios que atuam por meio da imunidade inata ou adquirida (Quayle, 2002; King et al., 2003; Herath et al., 2006; Davies et al., 2008; Chapwanya et al., 2009; Herath et al., 2009a,b; Silva et al., 2012a; Turner et al., 2012).

Herath et al. (2006) foram os primeiros a demonstrar a relação do TLR4 com quadros de endometrite em bovinos, a partir de um estudo realizado com culturas de células endometriais. Ao estimular essas células com *E. coli* ou LPS, observou-se aumento da transcrição de TLR4, citocinas, prostaglandinas e outras moléculas associadas à ativação das vias de sinalização dependente e independente de MyD88 (Herath et al., 2006; Yunhe et al., 2013). A importância do TLR4 e da via de sinalização celular dependente de MyD88 para a defesa uterina de bovinos foi demonstrada por meio de técnicas de silenciamento do TLR4 e do MyD88 em culturas de células endometriais expostas ao LPS (Cronin et al., 2012). Nesse estudo, células do epitélio e do estroma endometrial de bovinos foram isoladas e tratadas com inibidores bioquímicos e *short interfering RNA* (siRNA). A segmentação do RNAm do TLR4 com siRNA foi capaz de reduzir sua transcrição nas células epiteliais e estromais. O mesmo ocorreu com o MyD88. As transfecções com TLR4 siRNA e MyD88 siRNA reduziram a transcrição de RNAm das interleucinas 1, 6 e 8 após o tratamento com LPS.

O TLR4 depende dos coreceptores CD14 (do inglês *Cluster of Differentiation 14*) e MD2 (do inglês *Myeloid Differentiation factor 2*) para reconhecer o LPS. Uma porção do LPS denominada lipídeo A, é responsável pela sua toxicidade. Diversos estudos têm esclarecido as etapas do seu reconhecimento pelo TLR4, sendo verificada a necessidade de três moléculas adicionais para desencadear a resposta inflamatória, a LBP (do inglês *LPS-Binding Protein*), o CD14 e o MD2. As LBPs são proteínas presentes na circulação ou na membrana plasmática das células, que funcionam como transferases, catalisando a transferência do LPS da membrana externa das bactérias Gram-negativas para o CD14. O CD14 é uma glicoproteína que se liga ao lipídeo A do LPS e apresenta essa endotoxina para o complexo TLR4-MD2. Na ausência de LBP e CD14, a interação do LPS com o complexo TLR4-MD2 é muito fraca (Triantafilou e Triantafilou, 2002; Miyake, 2006; Park et al., 2009).

O CD14 não é capaz de desencadear a ativação da resposta celular, pois este coreceptor é um glicosilfosfatidilinositol ancorado à membrana celular (Triantafilou e Triantafilou, 2002). Um importante passo para entender o reconhecimento do LPS pelo TLR4 foi a descoberta do coreceptor MD2. A detecção do LPS pelo heterodímero TLR4-MD2 é essencial para desencadear a resposta celular e controlar a infecção bacteriana. Falhas na ativação das vias de sinalização podem resultar em evasão dos patógenos e quadros septicêmicos (Park et al., 2009; Bryant et al., 2010).

Diferentes tipos de células expressam TLR4, CD14 e MD2, incluindo células de defesa, células epiteliais, endoteliais e vasculares (Park et al., 2009; Bryant et al., 2010). Observa-se que a transcrição de TLR4 e MD2 é muito baixa nas células intestinais. Nas vias aéreas, somente a transcrição de MD2 é muito baixa. Os

tecidos do trato intestinal e das vias aéreas apresentam resposta imunológica diminuída quando estimulados com LPS. O contato constante com bactérias comensais poderia desencadear respostas inflamatórias indesejadas, razão pela qual ocorre baixa transcrição de MD2. Considerando que a transcrição de TLR4 e MD2 pelas células epiteliais é induzida, acredita-se que sua função pode não ser a primeira linha de defesa, mas sim, de um amplificador da resposta inflamatória na presença de microrganismos invasores (Miyake et al., 2006). A transcrição dos coreceptores MD2 e CD14 em células endometriais de bovinos foi demonstrada em alguns estudos (Herath et al., 2006; 2009a,b).

2.4.2.2. Transcrição de *NOD-Like Receptors* (NLRs)

Os NLRs também podem ser denominados *CARD-Like Receptors*, pois apresentam um domínio CARD (do inglês *Caspase Recruitment Domain*), o qual é composto por uma sequência de aminoácidos presentes em diversas proteínas relacionadas com os processos de inflamação e apoptose. Mais de 20 tipos de NLRs já foram identificados em humanos (Rietdijk et al., 2008; Philpott e Girardin, 2010). Patógenos não reconhecidos por receptores presentes na membrana celular, que são capazes de escapar dos endossomas, podem ser detectados pelos NLRs no citoplasma (Athman e Philpott, 2004; Rietdijk et al., 2008).

Nos últimos anos, a identificação da natureza dos ligantes de NLRs tem sido amplamente investigada. O papel dos NLRs na detecção citoplasmática de MAMPs e DAMPs (do inglês *Damage-Associated Molecular Patterns*) está sendo esclarecido. Em humanos, polimorfismos do NOD1 estão associados à suscetibilidade ao vitiligo e à diabetes tipo I, e alterações na transcrição do NOD2 estão envolvidas na patogênica da Doença de Crohn. Porém, o

mecanismo de detecção de MAMPs e DAMPs pelos NLRs ainda não é bem compreendido (Philpott e Girardin, 2010).

Os NODs 1 e 2 são os NLRs mais estudados. O NOD1 ou CARD4 reconhece peptídeos que contêm ácido diaminofílico, o qual é derivado de peptidoglicanos de bactérias Gram-negativas. O ácido diaminofílico é produzido durante a síntese ou degradação das bactérias (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003a). O NOD 2 ou CARD15 reconhece o muramyl dipeptídeo, derivado de peptidoglicanos de bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas (Girardin et al., 2003b). Entre outros tipos de microrganismos, já foi relatado que o NOD1 participa da resposta imunológica contra *E. coli* e *Campylobacter* spp. Já o NOD2 reconhece a *Salmonella* spp., a *Listeria* spp. e o *Streptococcus* spp. (Rietdijk et al., 2008).

Acredita-se que os ligantes dos NLRs são internalizados por meio de endocitoses mediadas por clatrina, processo no qual vesículas muito pequenas, revestidas por essas proteínas citosólicas, são transportadas para compartimentos específicos no interior das células. Em macrófagos, observa-se que o ligante do NOD2 é transportado por meio dessas vesículas até os lisossomos, de onde é exportado para o citosol para ser detectado. Porém, não se sabe como ocorre essa interação nas outras células que expressam os NODs 1 e 2 (Philpott e Girardin, 2010).

A interação entre os NODs e seus respectivos ligantes pode resultar na produção de citocinas que induzem o processo de destruição do microrganismo, por meio da degradação lisossomal e morte celular (Turner et al., 2012). Microrganismos invasores são sequestrados em vesículas e transportados até os lisossomas, onde são destruídos. NOD1 e NOD2 podem mediar a morte bacteriana (Philpott e Girardin, 2010).

Um estudo recente (Tan et al., 2012), relatou que neutrófilos isolados do sangue de vacas Holandesas até 21 dias após o parto apresentam redução significativa da transcrição de NOD1 e NOD2, quando comparados aos neutrófilos isolados entre 150 e 200 dias de lactação. Os autores sugeriram que a redução da função dos neutrófilos verificada no pós-parto de vacas de alta produção pode ser potencializada pela baixa transcrição desses receptores.

2.4.2.3. Papel dos hormônios na defesa uterina

O estrógeno e a PGF2 α são os principais hormônios envolvidos no mecanismo de defesa hormonal, sendo que a progesterona é considerada imunossupressora. A imunidade do ambiente uterino é reforçada durante o estro, quando o útero encontra-se mais suscetível à invasão de patógenos, e suprimida durante a fase luteal, quando o útero é preparado para receber o concepto (Lewis, 2003; Azawi, 2008). Após o parto, o retorno ao estro na ausência de infecção uterina pode ser benéfico, uma vez que o aumento da concentração de estrógenos favorece a eliminação do conteúdo uterino e, conseqüentemente, a remoção dos patógenos. A ação indireta do estrógeno na limpeza do ambiente uterino é devida ao estímulo da produção de muco pelas glândulas endometriais e à atuação nas fibras musculares promovendo o aumento das contrações miométriais (Horta, 1995; Sheldon et al., 2004a, Fernandes e Figueiredo, 2007; Azawi, 2008).

Por outro lado, a ovulação precoce após o parto na presença de altas densidades de bactérias patogênicas no útero, resulta em aumento da concentração de progesterona e pode piorar a condição do ambiente uterino, verificando-se a resolução dos processos infecciosos somente após a luteólise (Lewis, 1997; Seals et al., 2002; Sheldon et al., 2006). Sob a ação da progesterona e na presença de alta densidade de patógenos,

verifica-se maior predisposição do útero ao estabelecimento de processos infecciosos, com consequente atraso no período de involução (Del Vecchio et al., 1992; Dhaliwal et al., 2001; Seals et al., 2002; Lewis, 2003; 2004). Acredita-se que o estrógeno e a progesterona são importantes reguladores da imunidade inata e da inflamação no endométrio, particularmente em relação à função dos TLRs (Herath et al., 2006; Davies et al., 2008; Borges et al., 2012; Turner et al., 2012), porém os mecanismos de atuação desses hormônios ainda não foram esclarecidos.

A PGF 2α , produzida pelo endométrio, promove a destruição do corpo lúteo e estimula a produção de citocinas responsáveis pela síntese de leucotrieno B 4 (LTB 4). A PGF 2α e o LTB 4 apresentam propriedades quimiotáticas, atraindo neutrófilos e outras células de defesa para o ambiente uterino. Além disso, o LTB 4 estimula a atividade das células fagocitárias e dos linfócitos (Lewis, 1997; 2003; 2004). A concentração circulante de PGF 2α é alta durante os primeiros sete dias após o parto, período que coincide com a maior velocidade da involução uterina. Os níveis mais baixos são observados em torno de 15 dias após o parto, quando ocorre elevação da concentração de progesterona (Madej et al., 1984; Kozicki, 1998). A progesterona diminui a síntese de PGF 2α e LTB 4 (Lewis, 2003; 2004; Fernandes e Figueiredo, 2007). A mensuração de 15-ceto-13,14-dihidroprostaglandina F 2α , metabólito da PGF 2α (PGFM), na circulação periférica está diretamente relacionada com a liberação de PGF 2α pelo endométrio. Vacas com complicações puerperais, como retenção de placenta e infecções uterinas, apresentam maior concentração de PGFM inicialmente (Del Vecchio et al., 1992; Nakao et al., 1997; Seals et al., 2002), indicando que há aumento da liberação de PGF 2α pelo endométrio, visando conter a infecção (Seals et al., 2002; Kask et al., 2003). Altas concentrações de progesterona

coincidem com baixas concentrações de PGFM. A administração de análogos da PGF 2α com o objetivo de induzir a luteólise é um dos tratamentos de escolha de infecção uterina na presença de um corpo lúteo. O tratamento diminui a concentração de progesterona e estimula a produção de PGF 2α endógena e LTB 4 , favorecendo a ação dos leucócitos no ambiente uterino (Lewis, 1997; Nakao et al., 1997; Dhaliwal et al., 2001; Seals et al., 2002).

2.4.2.3.1. Regulação hormonal da transcrição endometrial de imunomediadores

A transcrição gênica de imunomediadores no endométrio de bovinos durante a gestação (Ritter, 2007; Silva et al., 2012a) e após o parto (Ritter, 2007; Chapwanya et al., 2009; Herath et al., 2009; Martins et al., 2011) já foi demonstrada em diferentes estudos, porém, a transcrição desses imunomediadores nas diferentes fases do ciclo estral, ainda é desconhecida. Em humanos, a transcrição endometrial de imunomediadores varia nas diferentes fases do ciclo menstrual (Aflatoonian et al., 2007). Por meio de RT-PCR, verificou-se que o endométrio de mulheres jovens saudáveis, sem histórico de doenças uterinas, foi capaz de expressar os TLRs de 1 a 10, sendo que as transcrições relativas dos TLRs 2, 3, 4, 5, 6, 9 e 10 foram mais baixas durante a fase proliferativa (maior concentração plasmática de hormônios estrogênicos) e mais elevadas na fase secretora (maior concentração plasmática de progesterona). Portanto, acredita-se que o estradiol e a progesterona podem apresentar efeito modulador na transcrição gênica endometrial de TLRs.

Esses achados não são comparáveis ao ciclo estral de bovinos. Como relatado anteriormente, a função imunológica das vacas é aumentada no estro, quando o útero encontra-se suscetível a invasão por patógenos, e suprimida no diestro, quando

ocorre a preparação para a gestação (Lewis, 2003; Azawi, 2008). Portanto, verifica-se necessidade de realizar novos estudos para compreender os mecanismos que atuam na regulação da transcrição endometrial de receptores de padrões moleculares microbianos (Herath et al., 2006; Aflatoonian et al., 2007; Hickey et al., 2011).

Diferenças significativas na transcrição de TLRs durante as fases do ciclo estral e no período de anestro também já foram relatadas em cadelas (Silva et al., 2012b). Por meio de RT-PCR, foi observada transcrição gênica dos TLRs 1 a 7 e TLR9 no endométrio em diferentes fases do ciclo estral desses animais. A transcrição endometrial dos TLRs 2 e 4 foi significativamente menor no início do diestro, quando comparada às outras fases (início do diestro, proestro, estro e período de anestro). De acordo com a autora, esse achado pode justificar a maior suscetibilidade do útero de cadelas à infecção por *E. coli* nesta fase do ciclo estral e o estabelecimento de piometra, infecção uterina frequente em cadelas. Ao contrário, no final do diestro, no proestro e no estro, os níveis de transcrição gênica de TLR2 e TLR4 encontravam-se significativamente mais elevados. Explantes endometriais obtidos em cada fase do ciclo estral foram estimulados com os ligantes de TLR2 e TLR4, ácido lipoteicóico e LPS, respectivamente. O estímulo com LPS induziu maior produção de prostaglandinas que o estímulo por LTA. Curiosamente, a produção de prostaglandinas pelos explantes endometriais obtidos no final do diestro foi maior que nas outras fases e no anestro, sugerindo a atuação de fatores estimuladores e inibidores da resposta imunológica ao longo do ciclo estral.

Herath et al. (2006) avaliaram a possível regulação da resposta imune inata por hormônios esteróides em células epiteliais e estromais do endométrio de bovinos, na

presença de *E. coli* inativada ou cultura purificada de LPS. Neste estudo, houve redução mais acentuada da produção de prostaglandinas pelas células endometriais na presença de progesterona quando comparada à produção total na presença de estrógeno. A produção de PGE2 foi maior que a produção de PGF2 α nos dois momentos de avaliação. *In vivo*, essa ocorrência pode implicar em persistência do corpo lúteo, aumentando a suscetibilidade de vacas recém-paridas ao estabelecimento de infecções uterinas.

2.4.3. Ocorrências de infecções uterinas

A expressão dos sinais clínicos dos diferentes quadros de infecção depende da interação entre sistema imunológico, condição do ambiente uterino, quantidade e patogenicidade dos agentes microbianos (Sheldon e Dobson, 2004; Sheldon et al., 2006; Azawi, 2008). Falhas ocorridas nos mecanismos de defesa do útero podem resultar em quadros inflamatórios exacerbados e/ou persistentes, com diferentes graus de infecções uterinas, e em alguns casos pode levar à morte do animal (Yunhe et al., 2013).

Os casos de metrite puerperal aguda estão relacionados com a ocorrência de respostas inflamatórias uterina e sistêmica contra altas densidades de bactérias patogênicas, como alguns patótipos de *E. coli*, principal microrganismo isolado no conteúdo uterino nas primeiras semanas após o parto. A *E. coli* aumenta a suscetibilidade do ambiente uterino à contaminação por patógenos anaeróbicos por meio da produção de fatores de crescimento e redução da atividade neutrofílica. A *E. coli* também está relacionada com a presença de sinais clínicos sistêmicos, devido à passagem da endotoxina LPS do ambiente uterino para a circulação sanguínea, o que pode desencadear quadros de febre. Por outro lado, os quadros de endometrite estão relacionados com a permanência de

bactérias patogênicas no útero além da terceira semana após o parto, e, conseqüentemente, com a persistência do quadro inflamatório. Os danos acarretados ao endométrio podem ser permanentes (Lewis, 1997; Dohmen et al., 2000; Willians et al., 2005; 2007; Sheldon, 2007; Földi et al., 2008; Sheldon et al., 2009).

2.4.3.1. Definições e incidências dos quadros clínicos de infecção uterina

Mais de 500 trabalhos sobre infecções uterinas em vacas foram publicados nos últimos 40 anos, demonstrando a importância da compreensão dos mecanismos que levam ao estabelecimento dessas doenças. Entre as diferentes terminologias e definições de infecções uterinas, as mais utilizadas atualmente foram propostas por Sheldon et al. (2006). De acordo com a classificação desses autores, os quadros de infecção uterina podem ser definidos de acordo com os sinais clínicos e o período de ocorrência após o parto (Tabela 3).

De acordo com a classificação histopatológica, a metrite está relacionada

com a inflamação de todas as camadas do útero, enquanto a endometrite está associada à inflamação das camadas superficiais, que não se estendem além do estrato esponjoso (Bondurant, 1999).

Nos quadros de metrite, todas as camadas da parede uterina incluindo o endométrio, a submucosa, o miométrio e a serosa, são afetadas pela resposta inflamatória, apresentando hemorragia, edema, infiltração de leucócitos e degeneração tecidual. Nos quadros de endometrite, são observadas alterações na superfície do epitélio uterino, com infiltração de células inflamatórias e congestão vascular, relacionadas com atraso no processo de involução uterina. Durante o processo de recuperação do endométrio, pode ocorrer fibrose e leucocitose, seguidas de atrofia e depleção das glândulas endometriais. Em ambas as condições a mucosa encontra-se congestionada, verificando-se infiltrações de leucócitos em resposta a bactérias patogênicas, tais como *E. coli*, *T. pyogenes*, *F. necrophorum* e *P. melaninogenica* (Bondurant, 1999; Sheldon e Dobson, 2004; Sheldon et al., 2006; Chapwanya et al., 2009; 2010).

Tabela 3. Período de ocorrência e sinais clínicos dos principais tipos de infecções uterinas ocorridos em vacas leiteiras de alta produção (Adaptado de Sheldon et al., 2006).

Definição	Período de ocorrência	Sinais clínicos
Metrite puerperal aguda	Principalmente, na primeira semana após o parto	- Secreção cervicovaginal sanguinopurulenta com odor fétido - Febre (temperatura retal > 39,5°C) - Desidratação - Queda na produção de leite - Inapetência
Metrite clínica	Até a terceira semana após o parto	- Secreção cervicovaginal purulenta - Aumento de volume anormal do útero
Endometrite clínica	Entre 21 e 26 dias após o parto A partir de 26 dias após o parto	- Secreção cervicovaginal purulenta - Secreção cervicovaginal mucopurulenta
Piometra	Em qualquer fase do puerpério	- Retenção de conteúdo com aspecto purulento ou mucopurulento no útero, com aumento de volume anormal ou não - Corpo lúteo funcional - Cérvix fechada

A incidência de infecções uterinas é bastante variável dependendo da definição adotada para os quadros de infecção, do período após o parto no qual a doença é detectada, dos métodos de diagnóstico, da raça, da ordem de parto, das características do rebanho e das práticas de manejo (Lewis, 1997; LeBlanc, 2002b; Barlund et al., 2008; Dubuc et al., 2010b).

Até 40% dos animais mantidos em sistemas intensivos de produção de leite podem apresentar quadros de metrite nas três primeiras semanas após o parto, sendo que a doença persiste na forma de endometrite clínica em até 20% dos animais (Sheldon et al., 2008, 2009). No estudo de Martins et al. (2013), de 103 vacas Holandesas avaliadas 41,2% apresentaram metrite puerperal aguda até duas semanas após o parto. Somados os casos de metrite e endometrite clínicas, verificou-se que 63,9% das vacas tiveram pelo menos um tipo de infecção uterina até 42 dias após o parto. Incidências menores foram relatadas por Bell e Roberts (2007). Ao acompanharem 2.914 lactações de vacas Holandesas, esses autores verificaram a incidência de 13,8% de casos de infecção uterina, sendo que 60% dos casos foram classificados como metrites (ocorrências até 21 dias após o parto) e 40% como endometrite clínica (depois de 21 dias após o parto). Considerando somente casos de endometrite clínica, as incidências variam de 10,4% a 47,4% (Tabela 4).

Os quadros de endometrite clínica podem ser classificados de acordo com o grau de severidade, dependendo do aspecto da secreção cervicovaginal a partir de 21 dias após o parto. A classificação proposta por Gautam et al. (2010) foi: grau 1, secreção cervicovaginal com estriações de pus; grau 2, secreção mucopurulenta; grau 3, secreção purulenta; e grau 4, secreção mucopurulenta ou purulenta, com presença de conteúdo uterino. Quanto mais grave o processo infeccioso, maior foi a sua influência na recuperação espontânea ou persistência do quadro de infecção. Dos animais avaliados, 23,6% apresentaram algum grau de endometrite, sendo que desses, 25,3% tiveram persistência do quadro além de 60 dias após o parto. Somente 40% das vacas diagnosticadas com endometrite persistente haviam se tornado gestantes aos 210 dias após o parto. Na mesma ocasião, 78,3% dos animais que não tiveram endometrite encontravam-se gestantes.

As vacas zebuínas e mestiças Holandês x Zebu apresentam incidências menores de infecções uterinas quando comparadas às vacas Holandesas. González Sánchez et al. (1999b) relataram a ocorrência de 6,3% de casos de infecções uterinas durante o acompanhamento da involução uterina de 104 vacas Gir. Camargos et al. (2013) verificaram a incidência de 3,95% casos de infecção uterina em 380 vacas mestiças Holandês x Zebu durante o puerpério.

Tabela 4. Ocorrências de endometrite clínica em vacas Holandesas em diferentes estudos.

Autores	Nº de animais avaliados	Período de avaliação	Incidência
LeBlanc et al. (2002)	<i>n</i> = 1.865	Entre 20 e 33 dias após o parto	16,9%
Willians et al. (2005)	<i>n</i> = 328	Aos 21 dias após o parto Aos 28 dias após o parto	31,0% 27,0%
Barlund et al. (2008)	<i>n</i> = 221	Entre 28 e 41 dias após o parto	10,4%
Potter et al. (2010)	<i>n</i> = 293	Entre 21 e 28 dias após o parto	27,0%
Baránski et al. (2012)	<i>n</i> = 422	Entre 21 e 28 dias após o parto	47,4%

2.4.3.2. Retenção de placenta e outros fatores de risco associados às ocorrências de infecções uterinas

Distocias, partos gemelares, maior ordem de partos, abortos, natimortos, adiantamento do parto e nutrição inadequada no pré-parto são importantes fatores de risco para a ocorrência de retenção de placenta, a qual é considerada como principal fator de risco para a ocorrência de infecções uterinas (Van Werven et al., 1992; Laven e Peters, 1996; Lewis, 1997; Kim e Kang, 2003; Kasimanickam et al., 2004; Sheldon et al., 2006; Bell e Roberts, 2007; Dubuc et al., 2010b; Potter et al., 2010; Martins et al., 2013). A retenção de placenta pode ser definida como a não expulsão dos anexos fetais até 12 horas após o parto (Lara, 1985; Santos, 1996; Santos et al., 2002; García-Ispuerto, 2007) ou até 24 horas após o parto (Kaneko et al., 1997; Kim e Kang, 2003; Benzaquen et al., 2007; Dubuc et al., 2010a,b; Martins et al., 2013).

Em geral, a retenção de placenta em bovinos está relacionada com alterações nos processos de separação/liberação dos anexos fetais, devido ao não reconhecimento dos mesmos como “corpos estranhos” pelo sistema imunológico materno (Grunert, 1980; Horta, 1994). As falhas corridas na fase de separação e liberação da placenta podem ser devidas: à consanguinidade (semelhança do complexo de histocompatibilidade maior de classe I entre a mãe e o feto); ao adiantamento do parto (a regressão precoce do corpo lúteo e a baixa concentração de cortisol fetal circulante podem influenciar na migração de células binucleadas do epitélio do córion para o endometrial, interferindo no processo de liberação da placenta); à exposição das vacas a fatores estressantes (a elevação da concentração de cortisol materno pode suprimir a resposta imunológica) e aos baixos níveis de selênio e vitamina E na dieta das vacas no pré-parto (favorecem a

depressão da resposta imunológica) (Wiltbank, 2008).

A permanência da placenta no útero por tempo prolongado após o parto, seguida de putrefação e liquefação, contribui para o aumento da multiplicação bacteriana, interfere na contratilidade do miométrio e possibilita o acúmulo de fluidos (Dohmen et al., 2000; Königsson et al., 2001). O estabelecimento secundário de processos infecciosos pode atrasar a involução uterina, causar febre e desconforto aos animais, com conseqüente redução da ingestão de alimentos (Fernandes et al., 2001; Königsson et al., 2001), diminuição da condição corporal (Van Werven et al., 1992), queda na produção de leite (Roberts, 1986; Fernandes et al., 2001) e no desempenho reprodutivo (Han e Kim, 2005).

A incidência de retenção de placenta em um rebanho normalmente varia de 2 a 5%, porém essa taxa é maior nos locais onde as ocorrências de partos gemelares e distocias são elevadas, conseqüentemente, maiores são as ocorrências de infecções uterinas (Sheldon et al., 2008). Martins et al. (2013) verificaram a ocorrência de 38,8% de casos de retenção de placenta ao monitorar 103 vacas Holandesas após o parto, sendo que 81,1% das vacas com retenção de placenta desenvolveram quadros de metrite puerperal aguda. Incidência bem menor de retenção de placenta foi relatada em um estudo mais amplo. De 1.363 vacas Holandesas monitoradas, 11,8% tiveram retenção de placenta, e destas, 33,2% apresentaram metrite puerperal aguda (Dubuc et al., 2010b). Em outro estudo, foi relatada a ocorrência de 15,7% de casos de retenção de placenta no pós-parto de 769 vacas Holandesas e mestiças Holandês x Gir, sendo que 57,85% dos animais que tiveram retenção de placenta apresentaram endometrite clínica entre 25 e 40 dias após o parto (Fernandes et al., 2012).

As infecções uterinas podem atrasar o RAOL, mas ainda não foi esclarecido se o retorno da ciclicidade ovariana pode influenciar na ocorrência de endometrites (Sheldon, 2004; Martins et al., 2013). Em muitos casos, verifica-se o estabelecimento de quadros de infecção uterina antes da ovulação do primeiro folículo dominante (Sheldon et al., 2002a). Em outras situações, a ocorrência de infecções uterinas é favorecida pela formação de um corpo lúteo e liberação de progesterona de forma precoce após o parto (Lewis, 1997; 2004). A infusão experimental de *T. pyogenes* e *E. coli* no útero após o parto, só desencadeou quadros de infecção quando houve aumento da concentração plasmática de progesterona no estudo de Del Vecchio et al. (1992). O efeito imunossupressor da progesterona pode contribuir para a progressão de um quadro de contaminação para um quadro de infecção uterina e persistência dessa patologia (Sheldon et al., 2006; Silvestre et al., 2009a,b; Heppelmann et al., 2013).

Outros fatores que podem contribuir para a ocorrência de infecções uterinas são: alterações metabólicas, como o aumento das concentrações de AGNE e β -hidroxibutirato, (BHBA) (Kim e Kang, 2003; Hammon et al., 2006; Sheldon, 2007; Dubuc et al., 2010b), baixo ECC ao parto (Dubuc et al., 2010b; McDougall et al., 2011), elevado ECC ao parto (Gearhart et al., 1990), estresse calórico (Gautam et al., 2010; Martins et al., 2013), baixa ingestão diária de matéria seca no pré-parto (McDougall et al., 2011) e no pós-parto (Hammon et al., 2006; Bell e Roberts, 2007).

2.4.3.3. Consequências, métodos de prevenção, controle e diagnóstico dos quadros clínicos de infecções uterinas

As consequências das infecções uterinas podem variar de acordo com a gravidade do quadro, tempo de ocorrência após o parto e saúde geral do rebanho (Lewis, 1997). Os

principais efeitos da infecção uterina estão associados aos gastos com tratamento, à diminuição da ingestão de alimentos, à redução na produção de leite, ao atraso no processo de involução uterina, à interferência no RAOL e aos quadros secundários de subfertilidade ou infertilidade, que podem levar ao descarte involuntário dos animais (Lewis, 1997; Mateus et al., 2002; Sheldon e Dobson, 2004; Bell e Roberts, 2007; Sheldon, 2007; Sheldon et al., 2008; Martins et al., 2013).

Para elaborar programas de prevenção e controle estratégicos, o desafio atual consiste em usar o conhecimento dos fatores de risco e dos mecanismos relacionados com o estabelecimento de doenças uterinas, que envolvem a resposta imunológica, a resposta inflamatória e a regulação endócrina do ambiente uterino (Sheldon e Dobson, 2004; Sheldon et al., 2006; Azawi, 2008). Com o objetivo de diminuir a incidência das infecções uterinas, recomenda-se controlar os fatores de risco para ocorrência de retenção de placenta. Algumas medidas importantes consistem em adotar o uso de sêmen sexado para fêmea ou selecionar touros específicos para a cobertura das novilhas visando diminuir o risco de distocias e a necessidade de intervenções ao parto. Recomenda-se também adotar dietas adequadas no pré e no pós-parto para diminuir a ocorrência de doenças metabólicas, ter cuidados com a sanidade do rebanho e com a higiene e o conforto das instalações (Lewis, 1997; Sheldon e Dobson, 2004; Hammon et al., 2006; Sheldon, 2007; Bell e Roberts, 2007).

O monitoramento das vacas após o parto deve considerar as alterações fisiológicas ocorridas durante o processo de involução uterina normal, a adoção de tratamentos na presença de alterações patológicas e o tempo de recuperação dos animais antes de retornarem à reprodução. O objetivo do tratamento de doenças uterinas é reverter as

alterações inflamatórias que podem levar à subfertilidade, reforçando os mecanismos de defesa e reparação do ambiente uterino. O problema é que todas as vacas no pós-parto apresentam algum grau de inflamação do endométrio relacionado com a involução uterina normal. No entanto, os veterinários devem ser capazes de identificar as vacas doentes e adotar tratamentos mais apropriados (Sheldon et al., 2006).

O diagnóstico precoce das infecções uterinas é importante para a adoção de tratamentos rápidos e apropriados, para prever a gravidade do quadro e fornecer o prognóstico quanto à fertilidade subsequente. Infelizmente, não existe um método de diagnóstico ideal, geralmente, a sensibilidade e a especificidade de todos eles é bastante variável. Os métodos de diagnóstico mais comuns são a palpação transretal, a ultrassonografia e a vaginoscopia (Sheldon et al., 2006).

A palpação transretal possibilita avaliar o tamanho, a simetria, a consistência dos cornos uterinos, a presença de conteúdo no útero e a espessura da cérvix (Azawi, 2008; Chapwanya et al., 2010; Fernandes et al., 2012). Apresenta a vantagem de diagnóstico imediato das alterações ocorridas no processo de involução uterina (Barlund et al., 2008), porém não é uma técnica muito confiável para detectar a presença de infecção, principalmente no pós-parto tardio. Diferenças entre raças, ordem de partos e outros fatores podem influenciar no processo de involução uterina, o que dificulta o estabelecimento de diferenças entre ocorrências fisiológicas e patológicas (Sheldon et al., 2006).

Por meio da ultrassonografia, é possível verificar a espessura da parede uterina, o diâmetro dos cornos, o diâmetro da cérvix, a presença, a localização e o aspecto do conteúdo uterino (Kasimanickam et al., 2004; Barlund et al., 2008). O acúmulo de conteúdo uterino pode estar relacionado

com a presença de bactérias e com atraso no processo de involução do útero (Mateus et al., 2002). A vaginoscopia fornece informações sobre a origem, volume, aspecto e odor da secreção cervicovaginal, presença de feridas na vagina e condição da cérvix (Sheldon e Dobson, 2004; Willians et al., 2005; Sheldon, 2007; Gautam et al., 2010; Barlund et al., 2008; Martins et al., 2013). A vaginoscopia pode ser utilizada na rotina dos exames puerperais, sendo que os achados devem levar em consideração o período no qual o exame é realizado, uma vez que todas as vacas apresentam algum grau de inflamação uterina após o parto decorrente do processo de involução (Sheldon et al., 2006; Barlund et al., 2008).

A avaliação da secreção cervicovaginal também pode ser feita por meio de uma mão enluvada (Sheldon et al., 2002b) ou por meio de um dispositivo denominado *Metricheck*, que consiste em uma borracha com 40 mm de diâmetro adaptada à ponta de uma haste inoxidável com 50 cm de comprimento. É utilizado para coletar uma amostra do conteúdo presente na porção cranial da vagina. De maneira semelhante ao vaginoscópio, o *Metricheck* facilita o exame de pequenas quantidades de secreção cervicovaginal após o parto (Dubuc et al., 2010a). Porém, não é possível diferenciar o conteúdo proveniente de uma infecção uterina, do conteúdo proveniente de casos de vaginite, cervicite, cistite ou nefrite (Sheldon et al., 2006; Dubuc et al., 2010a).

A visualização da secreção cervicovaginal pode ser influenciada pela gravidade do quadro de infecção uterina, pela capacidade de contração do miométrio, pela posição do útero em relação à pelve, pela conformação da região perineal, pela condição corporal e pela postura do animal no momento do exame. Vacas com presença de secreção cervicovaginal em quantidades muito pequenas podem ser ignoradas pelos exames com vaginoscópio ou *Metricheck*. Portanto, a combinação de técnicas de

diagnóstico e a repetição dos exames tem efeito benéfico no diagnóstico das endometrites (Kasimanickam et al., 2004; Barlund et al., 2008; Gautam et al., 2010; Mc Dougall et al., 2011).

Para determinar a etiologia das infecções uterinas, o isolamento bacteriano a partir de culturas de amostras do conteúdo uterino coletado por meio de *swabs* é uma ferramenta essencial (Sheldon et al., 2002b; Willians et al., 2005). O estabelecimento de um processo infeccioso está relacionado inicialmente com a presença de *E. coli*, e posteriormente com a interação entre *T. pyogenes*, *F. necrophorum* e *P. melaninogenica* (Bondurant, 1999; Sheldon, 2007; Willians et al., 2007; Sheldon et al., 2008).

Os microrganismos presentes na secreção cervicovaginal podem refletir o grau de contaminação uterina nas primeiras semanas após o parto, devido à abertura da cérvix durante esse período. Os tipos de secreção cervicovaginal encontrados após o parto podem ser classificados em escores dependendo da quantidade de pus que apresentam (Rocha et al., 2004; Willians et al., 2005). O pus é resultado de infecções bacterianas, formado por tecido necrótico, fluidos liberados pelo tecido lesado, bactérias patogênicas, neutrófilos e outras células de defesa. Quanto maior o escore da secreção cervicovaginal, maior a quantidade de pus e de bactérias patogênicas presentes no ambiente uterino (Sheldon e Dobson, 2004; Willians et al., 2005). Esses autores classificaram a secreção encontrada na vagina aos 21 e/ou aos 28 dias após o parto em: escore 0 (muco cristalino), escore 1 (muco com estriações de pus), escore 2 (mucopurulenta, com menos de 50% de pus) ou escore 3 (purulenta, com mais de 50% de pus, e, ocasionalmente, com presença de sangue). Quanto maior o escore da secreção cervicovaginal, maior o intervalo do parto ao primeiro serviço.

O aspecto e o odor da secreção cervicovaginal apresentam alta correlação com resultados de culturas bacterianas realizadas a partir de amostras do conteúdo uterino (Sheldon e Dobson, 2004; Willians et al., 2005). Aos 21 e aos 28 dias após o parto, a secreção purulenta está relacionada com a presença de *T. pyogenes* e *Proteus* sp. no conteúdo uterino, a secreção mucopurulenta está relacionada com a presença de *F. necrophorum*, enquanto as secreções com odor fétido estão relacionadas com a presença de *T. pyogenes*, *E. coli*, *Streptococcus* não hemolítico e *Manheimia haemolytica* (Willians et al., 2005).

O diagnóstico rápido e o tratamento adequado são essenciais para minimizar os efeitos das doenças uterinas sobre a eficiência reprodutiva dos animais (Sheldon e Dobson, 2004). O sucesso do tratamento depende da eliminação do conteúdo uterino, da suscetibilidade dos agentes infecciosos aos medicamentos, da concentração, do número de vezes que o medicamento é utilizado e da exposição do endométrio ao medicamento (Bondurant, 1999; LeBlanc et al., 2002a; Azawi, 2008).

2.4.3.4. Ocorrências de quadros subclínicos de infecção uterina

Ocorrências de infecções uterinas sem manifestação de sinais clínicos são mais comuns a partir de 21 dias após o parto, caracterizando quadros de endometrite subclínica. A endometrite subclínica pode ser identificada por meio de citologias endometriais, verificando-se a porcentagem de neutrófilos presentes no ambiente uterino em relação às células epiteliais. As vacas acometidas não apresentam sinais clínicos de endometrite como a presença de pus na secreção cervicovaginal, porém, a porcentagem de neutrófilos encontra-se aumentada nos exames citológicos devido à inflamação endometrial (Kasimanickam et al., 2004; Sheldon et al., 2006).

Técnicas complementares de diagnóstico, tais como biópsias e raspados endometriais, são sensíveis para o diagnóstico de endometrite subclínica. Por meio de pinças de biópsia específicas, uma pequena amostra do endométrio pode ser coletada para realização de exames histopatológicos, nos quais é possível verificar aumento focal ou difuso de células inflamatórias (Azawi, 2008; Chapwanya et al., 2009, 2010). Os inconvenientes dessa técnica são o alto custo, a demora em obter o resultado e o difícil acesso na prática (Kasimanickam et al., 2004; Sheldon et al., 2006; Barlund et al., 2008; Baránski et al., 2012).

Nos últimos anos, as biópsias uterinas têm sido empregadas em estudos que visam compreender os mecanismos moleculares e imunológicos, fisiológicos ou patológicos, ocorridos no endométrio de vacas Holandesas após o parto (Herath et al., 2009a; Chapwanya et al., 2009; Martins et al., 2011). Acredita-se que essa técnica tem uso limitado por causa da preocupação com a saúde geral e fertilidade dos animais (Chapwanya et al., 2010). Com o objetivo de verificar as consequências das biópsias, esses autores coletaram amostras do endométrio de vacas de algumas raças taurinas no 15º, 30º e 60º dia após o parto e verificaram que não houve alteração da temperatura retal, coloração das mucosas e das frequências cardíaca e respiratória, 1 hora, 6, 24 e 48 horas após as coletas. As biópsias não interferiram na eficiência reprodutiva dos animais. A taxa de concepção foi de 77% aos 118 dias após o parto, assegurando que a biópsia é uma técnica segura e eficiente para a avaliação da saúde do ambiente uterino após o parto. A partir das amostras de endométrio, foram feitos cortes histológicos e foi obtido RNA, ambos com alta qualidade, demonstrando a importância da técnica para o acompanhamento da regeneração endometrial durante a involução uterina e para estudos moleculares, respectivamente.

A citologia para diagnóstico de endometrite subclínica pode ser realizada por meio de lavados uterinos, porém o processo de lavagem do útero pode implicar menor concentração celular nas lâminas e/ou afetar a integridade das células devido à necessidade de centrifugar as amostras e à diferença de pH entre o meio de lavagem e o conteúdo uterino (Kasimanickam et al., 2005; Barlund et al., 2008).

Portanto, o método de diagnóstico mais utilizado para verificar a presença de endometrite subclínica é a realização de raspados endometriais por meio da técnica de *cytobrush* (Kasimanickam et al., 2004; Barlund et al., 2008; Dubuc et al., 2010a; Carneiro et al., 2011; McDougall et al., 2011; Baránski et al., 2012). Esse método consiste na coleta de amostras por meio de uma escova ginecológica humana adaptada a uma haste inoxidável e protegida por uma bainha francesa. A partir da avaliação microscópica dos esfregaços obtidos, a proporção de neutrófilos e células endometriais é calculada, podendo ser considerada ou não significativa de acordo com a definição de endometrite subclínica utilizada como critério de avaliação.

As porcentagens de neutrófilos para diagnóstico de endometrite subclínica consideradas nas citologias endometriais, realizadas a partir da técnica de *cytobrush*, ainda não estão bem definidas, sendo que vários estudos têm sido realizados na tentativa de estabelecer limites padrões (Tabela 5). Nos estudos de Kasimanickam et al. (2004), Carneiro et al. (2011) e Baránski et al. (2012), vacas com endometrite clínica foram desconsideradas. Nos demais estudos citados na Tabela 5, animais com ou sem sinais de endometrite clínica foram incluídos nos exames. Todos os estudos estabeleceram como limite para definição de endometrite subclínica, a porcentagem de neutrófilos que não influenciou na fertilidade.

Tabela 5. Ocorrências de endometrite subclínica em diferentes estudos.

Autores	Animais avaliados	Período de avaliação	Limiar de neutrófilos	Incidência de end. subclínica
Kasimanickam et al. (2004)	215 vacas Holandesas	20 a 33 dias	> 18%	45,1%
		34 a 47 dias	> 10%	41,4%
Barlund et al. (2008)	221 vacas Holandesas	28 a 41 dias	> 8%	11,8%
Dubuc et al. (2010a)	1.044 vacas Holandesas	35 dias	> 5%	13,5%
		56 dias	> 3%	9,6%
Carneiro et al. (2011)	172 vacas mestiças Holandês x Gir	32 a 70 dias	> 5%	26%
McDougall et al. (2011)	303 vacas Holandesas, Jersey e mestiças	28 dias	> 8%	9%
		42 dias	> 6%	
Baránski et al. (2012)	118 vacas Holandesas	21 a 28,	> 18%	22,3%
		35 a 42 dias	> 8%	25,2%
			> 5%	33,3%
Baránski et al. (2012)	104 vacas Holandesas	21 a 28,	> 10%	7,5%
		35 a 42 dias	> 8%	7,4%
			> 5%	13,8%

A combinação dos métodos de diagnóstico das endometrite clínica e subclínica pode aumentar a sensibilidade dos exames. Kasimanickam et al. (2004) utilizaram a palpação transretal, a vaginoscopia, a ultrassonografia e a citologia endometrial obtida por meio de *cytobrush* para identificar a presença de endometrites clínica e subclínica em vacas que não apresentavam secreção cervicovaginal, e aprovaram a associação de ultrassonografia e citologia endometrial para o diagnóstico de endometrite subclínica. Porém, a ultrassonografia do conteúdo uterino e da espessura da parede uterina pode ser influenciada pelo posicionamento da probe (Barlund et al., 2008).

As vacas apresentam endometrite devido à resposta celular a um quadro inflamatório,

com ou sem acúmulo de conteúdo no útero, com diferentes concentrações de células de defesa. Para diagnóstico de endometrite subclínica, a adoção de ultrassonografia e citologia endometrial obtida por meio de *cytobrush* pode ser útil somente nos casos de acúmulo de conteúdo no útero. A ultrassonografia apresenta baixa sensibilidade como método de diagnóstico da endometrite subclínica, pois na ausência de conteúdo uterino não é possível diagnosticar essa patologia (Kasimanickam et al., 2004; Barlund et al., 2008).

A ocorrência de endometrite subclínica pode estar associada à recuperação do endométrio após o parto e não a infecções bacterianas (Baránski et al., 2012). Para todos os limiares de diagnóstico considerados nesse estudo, a maioria das

vacas com endometrite subclínica não apresentou cultura bacteriológica positiva, verificando-se baixa correlação entre citologia e bacteriologia. Houve redução significativa na porcentagem de animais positivos entre 35 e 42 dias após o parto, em relação aos animais examinados entre 21 e 28 dias após o parto, indicando que a involução uterina pode ser responsável pela diminuição dos neutrófilos, já que essas células de defesa participam ativamente do processo de regeneração endometrial.

Dubuc et al. (2010a) também encontraram baixas correlações entre as observações clínicas e os exames laboratoriais para o diagnóstico de endometrites. Esses autores compararam os resultados de diferentes exames para o diagnóstico de endometrites: citologias endometriais, *Metrichcek* e avaliação do diâmetro cervical por meio de palpação transretal. Entre as vacas Holandesas com endometrite clínica, apenas 38,0% e 35,6% apresentaram endometrite subclínica aos 35 e aos 56 dias após o parto, respectivamente. A combinação dos métodos de diagnóstico não aumentou a acurácia dos exames, nem a interação entre os dois tipos de endometrite. Vacas com endometrite clínica e/ou citológica tiveram baixas taxas de gestação aos 120 dias após o parto. Apesar das endometrites influenciarem negativamente na fertilidade, inclusive com efeito aditivo quando presentes simultaneamente, não houve interação significativa entre elas, indicando que podem se manifestar por meio de diferentes quadros infecciosos e inflamatórios, e, portanto, podem apresentar diferentes fatores de risco.

Com o objetivo de detectar os fatores de risco para as ocorrências de infecções uterinas, Dubuc et al. (2010b) investigaram 1.363 vacas Holandesas recém-paridas e verificaram que os fatores de risco para metrite foram: concentração de AGNE maior ou igual a 0,6 mmol/L no pré-parto, distocia, retenção de placenta e

concentração de haptoglobina maior ou igual a 0,8 g/L na primeira semana após o parto. Os fatores de risco relacionados com a presença de secreção cervicovaginal purulenta depois de 21 dias após o parto, foram: parto gemelar, distocia e metrite. Nos casos de endometrite citológica, os fatores de risco foram ECC ao parto menor ou igual a 2,75, concentração de BHBA maior ou igual a 1.100 mmol/L e concentração de haptoglobina maior ou igual a 0,8 g/L na primeira semana após o parto. Esses resultados confirmam a hipótese de que os fatores de risco para metrite, endometrites clínica e subclínica são distintas, portanto essas doenças se manifestam de diferentes formas.

Nos casos de endometrite clínica, acredita-se que a secreção presente na porção caudal da vagina é proveniente do lúmen uterino, mas não existem dados disponíveis na literatura para suportar essa hipótese (Dubuc et al., 2010a,b). Nesses estudos, o uso do termo endometrite clínica foi questionado, pois nem sempre a presença de secreção cervicovaginal purulenta foi indicativa de inflamação do endométrio. O termo endometrite citológica foi sugerido para substituir o termo endometrite subclínica, pois no segundo estudo, apenas 22,8% dos animais com secreção vaginal purulenta apresentaram endometrite citológica. As diferenças entre os fatores de risco relacionados com as ocorrências desses tipos de infecções uterinas podem explicar os achados. Os fatores de risco para a presença de secreção vaginal purulenta estão associados ao aumento das lesões endometriais após o parto e ao aumento da densidade bacteriana, enquanto os fatores de risco relacionados com endometrite citológica refletem quadros de imunossupressão e/ou desequilíbrios metabólicos. Algumas vacas apresentam endometrite citológica e secreção vaginal purulenta, porém, essa secreção pode não ser reflexo de inflamação endometrial, e sim, resultante de cervicite e/ou vaginite.

CAPÍTULO II

OCORRÊNCIAS PUERPERAIS E TRANSCRIÇÃO GÊNICA ENDOMETRIAL DE RECEPTORES DE PADRÕES MOLECULARES MICROBIANOS EM VACAS HOLANDEAS SEM E COM RETENÇÃO DE PLACENTA

1. INTRODUÇÃO

Durante o parto, a abertura das barreiras anatômicas constituídas pela vulva, vagina e cérvix possibilita a invasão do útero por microrganismos presentes no ambiente, nas fezes, na pele e no trato genital dos animais, sendo que até 100% das vacas podem apresentar contaminação bacteriana ascendente (Sheldon et al., 2002a; Rocha et al., 2004; Sheldon, 2007). Receptores de padrões moleculares microbianos localizados no endométrio são responsáveis pelo reconhecimento inicial das bactérias invasoras (Janeway e Medzhitov, 2002; Athman e Philpott, 2004; Rietdijk et al., 2008; Takeuchi e Akira, 2010), ativando a resposta inflamatória e a mobilização de células de defesa especializadas (Sordillo et al., 2009; Sheldon e Bromfield, 2011).

A resposta imunológica deve ser capaz de remover rapidamente os patógenos e manter a integridade do tecido. Respostas inadequadas resultam em ambiente permissivo para a multiplicação de patógenos, enquanto respostas exacerbadas causam danos ao endométrio (Herath et al., 2009a; Chapwanya et al., 2009; Yunhe et al., 2013). Nesses casos, verifica-se o estabelecimento de processos infecciosos agudos ou crônicos, que podem atrasar a involução uterina e o retorno da atividade ovariana luteal cíclica, resultando em subfertilidade. Até 40% das vacas Holandesas podem apresentar metrite nas primeiras semanas após o parto, sendo que a doença persiste na forma de endometrite em 20% dos animais (Sheldon et al., 2009).

O principal fator de risco associado às ocorrências de infecções uterinas em vacas Holandesas é a retenção de placenta (Kim e Kang, 2003; Bell e Roberts, 2007; Martins et al., 2013). A retenção da placenta influencia nas contrações miometriais, dificulta a drenagem do conteúdo uterino e interfere na atuação dos mecanismos de defesa, favorecendo a multiplicação de bactérias e o estabelecimento de infecções uterinas (Dohmen et al., 2000; Sheldon et al., 2004a; Hammon et al., 2006).

A transcrição endometrial de receptores de padrões moleculares microbianos em vacas Holandesas já foi relatada em diferentes momentos após o parto (Ritter, 2007; Chapwanya et al., 2009; Herath et al., 2009a), porém, ainda não foi esclarecido se a retenção de placenta pode interferir na transcrição desses receptores (Martins et al., 2011). Sendo assim, os objetivos da segunda parte desse estudo são:

- Comparar aspectos do puerpério, tais como, ocorrências de infecções uterinas, período de involução uterina e retorno da atividade ovariana, entre vacas Holandesas sem e com retenção de placenta;
- Comparar os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos entre os grupos de vacas Holandesas, no primeiro e no sétimo dia após o parto;
- Verificar se há relação entre as ocorrências puerperais e a transcrição dos imunomediadores considerados.

Como hipóteses, acredita-se que:

- As vacas Holandesas com retenção de placenta apresentam maiores incidências de transtornos puerperais;
- As vacas Holandesas sem e com retenção de placenta apresentam diferentes níveis de transcrição endometrial de receptores de padrões moleculares microbianos, no primeiro e no sétimo dia após o parto;
- Existe relação entre as ocorrências puerperais e os níveis de transcrição gênica dos imunomediadores avaliados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local, período e grupos experimentais

O experimento foi realizado na Fazenda Bom Jardim, localizada em Oliveira (MG), latitude-20°41'47"S, longitude-44°49'38"W e altitude média de 982 metros. O período experimental foi de 9 de fevereiro a 11 de maio de 2012, época na qual ocorreu a maior concentração de partos nessa propriedade. Dezenove vacas Holandesas pluríparas de segunda à quinta ordem de lactação, sendo 10 sem e 9 com retenção de placenta, foram submetidas a biópsias endometriais no primeiro e no sétimo dia após o parto. Considerou-se como retenção de placenta, a não expulsão das membranas fetais até 24 horas após o parto.

As vacas foram mantidas em confinamento tipo *free-stall*, e receberam dieta completa duas vezes ao dia (Quadros 1 e 2, em anexo). Ao apresentarem sinais de parto, os animais foram encaminhados para um solário ao lado do *free-stall*, onde permaneceram com a cria nas primeiras horas após o parto até a próxima ordenha. As ordenhas eram realizadas três vezes ao dia, sendo que a média diária da produção

de leite das vacas do presente estudo foi de $18,6 \pm 6,6$ litros, até 42 dias após o parto.

O parto foi auxiliado quando não ocorreu expulsão da cria em torno de uma hora após o rompimento da bolsa amniótica. Após a primeira ordenha, todas as vacas receberam *drench* via sonda orogástrica (100 g de sulfato de magnésio, 100 g de cloreto de potássio, 100 g de cloreto de cálcio e 300 mL de propilenoglicol, diluídos 30 litros de água). Em seguida, esses animais foram vermifugados com levamisol (3,75 mg/kg de peso vivo, SC), conforme o manejo adotado na propriedade.

Durante o período experimental, a variação da temperatura ambiente foi obtida por meio da aferição das temperaturas diárias máxima e mínima. A umidade relativa do ar foi calculada a partir das médias das temperaturas de bulbo seco (BS) e bulbo úmido (BU) obtidas diariamente às 7, 12 e 17 horas (Quadro 3, em anexo). O índice de temperatura e umidade (ITU) foi calculado pela fórmula sugerida por Pires et al. (1999), na qual: $ITU = 0,72 \times (BS + BU) + 40,6$ (Quadro 4, em anexo). A pluviosidade diária foi estimada a partir de dados de pluviômetros localizados na propriedade (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros climáticos diários obtidos na Fazenda Bom Jardim durante o período experimental.

Horário	Parâmetro	Médias \pm desvios padrão
7:00	Temperatura (°C)	19 \pm 2
	Umidade Relativa (%)	65 \pm 34
	ITU	67 \pm 3
12:00	Temperatura (°C)	27 \pm 3
	Umidade Relativa (%)	54 \pm 16
	ITU	75 \pm 3
17:00	Temperatura (°C)	25 \pm 3
	Umidade Relativa (%)	58 \pm 20
	ITU	74 \pm 3
Variação diária	Temperatura máxima (°C)	29 \pm 2
	Temperatura mínima (°C)	16 \pm 2
Média diária	Pluviosidade (mm)	2 \pm 5

Todos os procedimentos adotados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, CETEA/UFMG (Protocolo nº 049 / 2011, em anexo).

2.2. Monitoramento do puerpério

O puerpério foi monitorado do 1º ao 42º dia após o parto. Durante o período experimental, houve variação do tamanho dos grupos devido à morte, venda ou descarte involuntário de animais (Tabela 7). As vacas remanescentes foram monitoradas semanalmente quanto ao escore de condição corporal (ECC). Nessas ocasiões, foram realizados exames ginecológicos para acompanhar a involução uterina, o retorno da atividade ovariana luteal e a ocorrência de infecções uterinas. A posição do útero em relação à pelve, a simetria dos cornos, a presença de conteúdo, de folículos e corpos lúteos foram verificados por meio de palpação transretal e ultrassonografia (Ultrassom Mindray P/B, DP 2200 VET - Shenzhen, Guangdong Province, China). A abertura da cérvix, o aspecto e o odor da secreção cervicovaginal foram examinados por meio de vaginoscopia.

A temperatura retal foi aferida diariamente após a ordenha da manhã, durante as duas primeiras semanas após o parto. As vacas com temperatura retal acima de 39,5°C, desidratação, apatia e secreção cervicovaginal sanguinopurulenta fétida, foram diagnosticadas com quadros de metrite puerperal aguda, de acordo com as definições de infecções uterinas propostas por Sheldon et al. (2006). Para prevenir a ocorrência dessa afecção, as vacas com retenção de placenta foram tratadas previamente com oxitetraciclina de longa duração (20 mg/kg de peso vivo, IM).

Como tratamento de suporte, receberam solução de hidratação via sonda orogástrica (160 g de cloreto de sódio, 20 g de cloreto de potássio, 10 g de cloreto de cálcio e 300 mL de propilenoglicol, diluídos em 30 litros de água). Nos casos de estabelecimento e persistência dos quadros de metrite puerperal aguda, os antibióticos utilizados foram o ceftiofur (2 mg/kg, IM), a tilosina (10 mg/kg, IM), o florfenicol (20 mg/kg, IM) e a norfloxacin (5 mg/kg, IM), como primeira, segunda, terceira e quarta opções de tratamento, respectivamente. Essas medicações foram baseadas em protocolos adotados na propriedade.

A presença de secreção purulenta na vagina aos 14 dias após o parto, na ausência de sinais sistêmicos, foi diagnosticada como metrite clínica. Secreção cervicovaginal com aspecto purulento aos 21 dias após o parto, e/ou mucopurulento aos 28 dias após o parto, caracterizou quadros de endometrite clínica (Sheldon et al., 2006). Os animais com metrite e/ou endometrite clínica (s) foram tratados com antibioticoterapia sistêmica (oxitetraciclina de longa duração ou ceftiofur, para vacas com baixa ou alta produção média diária de leite, respectivamente) ou local (50 mL de gentamicina), dependendo da gravidade dos casos.

A involução uterina foi considerada completa quando o útero retornou à pelve, com simetria dos cornos, ausência de conteúdo ou presença de conteúdo uterino anecóico, ausência de secreção ou presença de secreção cervicovaginal cristalina. Após o término da involução uterina, as vacas foram inseminadas ao manifestarem o primeiro estro, dependendo da condição corporal e da presença de secreção cervicovaginal com aspecto cristalino.

Tabela 7. Variação do número de vacas monitoradas entre um e 42 dias pós-parto (dpp).

Grupos	1dpp	7dpp	14 dpp	21 dpp	28 dpp	35 dpp	42 dpp
Holandesas sem retenção de placenta	11	10	10	10	08	08	07
Holandesas com retenção de placenta	09	09	08	07	05	03	03

Ao final de cada exame ginecológico, foram coletadas amostras do conteúdo uterino, com o objetivo de identificar as bactérias presentes no útero durante o processo de involução. Seringas descartáveis de 20 mL foram acopladas a pipetas plásticas rígidas utilizadas para infusão uterina em vacas, as quais eram protegidas por uma camisa sanitária. Após a devida contenção dos animais e higienização externa da vulva, a pipeta era guiada até o corpo uterino, onde a camisa sanitária era rompida. O êmbolo da seringa era puxado e conseqüentemente, uma amostra do conteúdo uterino era aspirada pela pipeta. Ao ser retirada do útero, a pipeta era novamente envolvida pela camisa sanitária para evitar a contaminação da amostra pela secreção cervicovaginal. A amostra do conteúdo uterino coletada era injetada na ponta de dois *swabs*, os quais eram acondicionados em tubos contendo meio de Stuart, específico para o transporte de bactérias. Os tubos eram armazenados a -20°C e enviados quinzenalmente para o Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Goiás, onde foram realizadas culturas bacterianas de acordo com a metodologia proposta por Koneman et al. (2001). Somente bactérias aeróbias foram pesquisadas no presente estudo.

Após a coleta de amostras do conteúdo uterino, foram feitos raspados endometriais no 21º, 28º, 35º e 42º dias após o parto, com o objetivo de estimar a porcentagem de neutrófilos presentes no útero. Para a realização dos raspados endometriais, escovas genitais humanas foram adaptadas à haste inoxidável de uma pipeta de inseminação artificial em bovinos, e em seguida foram protegidas por uma bainha francesa e por uma camisa sanitária, de acordo com o método de *cytobrush*, descrito por Kasimanickam et al. (2004). Na entrada do útero, a camisa sanitária era rompida e a escova genital era exteriorizada, fazendo-se o raspado em diferentes pontos do corpo e início dos

cornos uterinos. Em seguida, a escova era novamente revestida pela bainha francesa e pela camisa sanitária, para evitar contaminação da amostra pela secreção cervicovaginal. Imediatamente após a coleta, a escova genital era pressionada contra lâminas de vidro, obtendo-se dois esfregaços de cada animal. Após secagem em temperatura ambiente, os esfregaços foram submetidos à coloração rápida com corante Panótico (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil).

As lâminas foram avaliadas em um microscópio óptico, sob aumento de 100X. Dois examinadores avaliaram cada lâmina, fazendo-se em seguida, uma média dos resultados encontrados. A porcentagem de neutrófilos em relação ao número de células epiteliais presentes em cada lâmina foi relacionada com a ocorrência de endometrite citológica, de acordo com Kasimanickam et al. (2004). Animais com mais de 18% de neutrófilos aos 21 e 28 dias após o parto, ou mais de 10% de neutrófilos aos 35 e 42 dias após o parto, apresentavam quadros de endometrite citológica.

2.3. Biópsias endometriais, extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e Real Time quantitative Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

As vacas foram submetidas a duas biópsias endometriais, sendo que a primeira foi realizada no primeiro dia (intervalo entre 24 e 30 horas após o parto), e a segunda, no sétimo dia após o parto. Com o auxílio de uma mão enluvada, uma pinça de biópsia específica (Hauptner, Solingen, NRW, Alemanha) envolvida por uma camisa sanitária foi encaminhada através da vagina e da cérvix até a entrada do útero, protegendo-se sua extremidade com a ponta do dedo indicador. Após o rompimento da camisa sanitária, duas amostras de endométrio com tamanho aproximado de 8 mm x 4 mm, provenientes de áreas

intercarunculares, foram coletadas de cada vaca. Para evitar a contaminação das amostras pela secreção cervicovaginal, a pinça foi envolvida pela camisa sanitária ao ser retirada do útero. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em tubos criogênicos estéreis livres de DNases e RNases, os quais foram armazenados em botijões contendo nitrogênio líquido. Ao final do período experimental, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária da UFMG, onde foram mantidas a -80°C.

O reagente Trizol (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado para extração do RNA total das amostras de tecido endometrial. Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas em 500 µL de Trizol com o auxílio de um homogeneizador manual. Após a adição de mais 500 µL de Trizol, a mistura foi incubada durante 5 minutos no gelo. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio e a mistura foi agitada em vórtex durante 15 segundos, incubada no gelo durante dois minutos e centrifugada (12000 g, 15 minutos a 4°C). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, no qual foi adicionado 500 µL de isopropanol. O tubo foi agitado por inversão e incubado durante 10 minutos no gelo para permitir a precipitação do RNA. Logo após, a solução foi centrifugada (12000 g, 10 minutos a 4°C), o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de etanol 75% e a solução foi centrifugada novamente (7500 g, 5 minutos a 4°C). O novo sobrenadante foi descartado e o tubo foi invertido sobre um papel toalha para possibilitar a secagem do precipitado em temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 20 µL de água DEPC (Ambion, São Paulo, SP, Brasil) e incubado durante 10 minutos a 55°C. Logo após, uma alíquota da solução foi retirada para verificação da pureza e da concentração de RNA, por meio de

espectrofotometria. Outra alíquota foi retirada para verificar a integridade do RNA por meio de um gel específico. O restante da solução foi armazenado a -80°C.

As duas amostras de tecido endometrial de cada animal coletadas no primeiro dia após o parto e as duas amostras coletadas no sétimo dia foram processadas para extração do RNA total. Para síntese do cDNA, foi escolhida a melhor amostra, de acordo com os critérios de pureza, concentração e qualidade no gel de RNA. Inicialmente, o RNA total foi diluído em água DEPC para a concentração padrão de 500 ng/mL.

A metodologia proposta pelo fabricante do Kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada para a obtenção do cDNA, utilizando-se *Random Hexamers* na etapa inicial. Ao final das reações, realizadas no termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil), foram feitos testes do cDNA obtido a partir dos controles positivos de cada conjunto de reações. Os controles foram testados por meio de PCR convencional e corrida em gel de agarose 1%.

As sequências dos *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR foram gentilmente cedidas pelo professor Andrey Pereira Lage (Laboratório de Bacteriologia, EV/UFMG), com exceção do TLR2, MD2 e GAPDH. Todos os *primers* foram delineados com o auxílio do programa *Primer 3* (Rozen e Skaletsky, 2000), a partir de sequências de RNAm dos receptores de padrões moleculares microbianos considerados no presente estudo, as quais foram obtidas no NCBI/GenBank (do inglês *National Center for Biotechnology Information*), disponível por meio do link <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>. Para os TLRs 1 e 6, o *primer* foi delineado a partir de uma sequência do gene conservada entre esses receptores, sendo capaz de amplificar ambos (Tabela 8).

Tabela 8. Sequências dos *primers* para amplificação de RNAm dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores MD2 e CD14, e normalizadores β -actina e GAPDH, tamanho do produto (pares de base, pb) e média da temperatura de *melting* das reações de qRT-PCR (T_m).

Gene	Primer	Sequência	Produto (pb)	T_m (°C)	Referência (GenBank)
TLR1/6	Forward	TGATCTTGCTGGATCCCATT	107	76,2	NM_001046504.1
	Reverse	ACTCTTCTCCTTGGGCCATT			
TLR2	Forward	AAATTCTGCTGCGTTGGTTT	96	76,2	NM_174197.2
	Reverse	GGCATTGTCCAGTGATTTGA			
TLR4	Forward	GACCCTTGCGTACAGGTTGT	103	77,7	NM_174198.6
	Reverse	GGTCCAGCATCTTGGTTGAT			
TLR5	Forward	TCAATGGGAGCCAGATTTTC	104	77,5	NM_001040501.1
	Reverse	CCCAGCAAAGGTGTGGTAGT			
TLR9	Forward	GCATCTCACAGGCGGTTAAT	94	83,4	NM_183081.1
	Reverse	CCATGGTACAGGTCCAGCTT			
MD2	Forward	GCCACCGTTTGGTACGACTA	106	75,2	AF_368418.1
	Reverse	TTCCACGGCTTCCCTTCAAT			
CD14	Forward	CGTGAGCCACTGTAAAGGAA	94	79,6	NM_174008.1
	Reverse	GCACGCACACCATAGTCAGT			
NOD1	Forward	CAGTGGGGTGAAGGTGCTAT	102	76,2	XM_598513.4
	Reverse	ATGTACCTGGCTCCGACATC			
NOD2	Forward	GGCCCTTGAAAAGAATGACA	95	77,8	NM_001002889.1
	Reverse	TGGTATCCTGGTGGCTGAGT			
β ACTINA	Forward	TCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTG	121	84,6	NM_173979.3
	Reverse	TTGCCGATGGTGATGACCT			
GAPDH	Forward	TTCTGGCAAAGTGGACATCGT	121	79,8	NM_001034034.2
	Reverse	GCCTTGACTGTGCCGTTGA			

A β -actina e o GAPDH foram utilizados como normalizadores das reações. Os *primers* foram sintetizados comercialmente (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e foram testados por meio de qRT-PCR utilizando-se quatro amostras de cDNA de macrófagos derivados de monócitos isolados do sangue de bovinos, os quais sabidamente expressam todos os receptores de padrões moleculares microbianos (ver Gráfico A1 com os níveis de transcrição em anexo). Os procedimentos adotados foram estabelecidos por Silva et al. (2012a).

Para realização do qRT-PCR, foi utilizado o *SYBER Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil). Para cada gene alvo foi preparada uma solução contendo 12,5 μ L de *SYBER Green PCR Master Mix*, 1 μ L do *primer forward* (10 μ M), 1 μ L do *primer reverse* (10 μ M) e 8 μ L de água DEPC, à qual eram adicionados 2,5 μ L de cDNA. As misturas foram preparadas em placas de 96 poços, as quais foram centrifugadas e em seguida, acondicionadas na máquina *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Applied

Biosystems, São Paulo, SP, Brasil), para amplificação do cDNA. As placas foram submetidas a 50°C durante dois minutos (incubação) e 95°C durante 10 minutos (ativação das reações), e em seguida, a 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante um minuto (desnaturação, anelamento e extensão das fitas de DNA).

2.4. Análises estatísticas

Para comparação das médias de temperatura retal no primeiro e no sétimo dia após o parto, período de involução uterina e intervalo do parto à detecção do primeiro corpo lúteo entre os grupos de vacas Holandesas sem e com retenção de placenta, foi utilizado o teste *t* de Student, sendo que as médias foram previamente submetidas à avaliação da normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os testes de Mann Whitney e Wilcoxon foram utilizados para comparar as médias do ECC ao parto e aos 42 dias após o parto, entre os grupos e entre os momentos de avaliação, respectivamente. As ocorrências de febre, presença de *E. coli* no conteúdo uterino e incidências de infecções uterinas foram comparadas pelo teste Exato de Fisher.

Os resultados da transcrição endometrial dos receptores de padrões moleculares microbianos no presente estudo foram analisados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar os valores de delta *Ct* (do inglês *Cycle threshold*, referente ao número de ciclos no qual a fluorescência emitida durante a amplificação do cDNA é superior ao limiar de detecção) obtidos para cada gene alvo no primeiro e no sétimo dia após o parto. O teste de Mann Whitney foi utilizado para comparar os valores de delta *Ct* de cada gene alvo entre os dois grupos de vacas. A transcrição relativa ou número de cópias de RNA mensageiro transcrito de cada receptor foi relacionada com as transcrições de β -actina e GAPDH, os quais são

considerados normalizadores por apresentarem transcrição estável. Cada 3,3 *Cts* (n) de diferença entre a transcrição do gene alvo e a transcrição da β -actina ou do GAPDH, corresponderam a 10ⁿ vezes menor número de cópias do gene alvo.

Correlações não paramétricas de Spearman foram utilizadas para verificar a relação entre os níveis de transcrição de cada receptor, e desses, com a temperatura retal e com o período de involução uterina, no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Os programas *GraphPad Instat*, versão 3.10 (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA) e SAEG, versão 9.1 (Fundação Arthur Bernardes, Viçosa, MG, Brasil), foram utilizados para realização das análises estatísticas. O nível de significância considerado para todos os testes foi de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Escore de condição corporal durante o período experimental

O monitoramento da variação da condição corporal das vacas leiteiras no final da lactação, no pré-parto, ao parto e no início da lactação, é importante para estimar os efeitos do balanço energético nas ocorrências puerperais desses animais (Gearhart et al., 1990). Considerando os critérios de avaliação da condição corporal propostos por Edmonson et al. (1989), foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto ao ECC médio ao parto (Tabela 9). De acordo com a escala que varia de 1 (vaca muito magra) a 5 (vaca muito gorda), as vacas sem retenção apresentaram ECC ao parto maior ($P < 0,05$) que as vacas com retenção de placenta. Aos 42 dias após o parto, os grupos apresentaram médias de ECC semelhantes, verificando-se que as vacas sem retenção perderam condição corporal de forma significativa ($P < 0,05$) entre o parto e o final do experimento.

Tabela 9. Escore de condição corporal (ECC) ao parto e aos 42 dias após o parto (médias \pm desvios padrão) de acordo com o grupo experimental.

Grupo	<i>n</i>	ECC ao parto (1 a 5)	<i>n</i>	ECC aos 42 dpp (1 a 5)
Holandesas sem retenção de placenta	11	4,0 \pm 0,2Aa	07	3,1 \pm 0,3Ab
Holandesas com retenção de placenta	09	3,4 \pm 0,5Ba	03	3,2 \pm 0,8Aa

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma coluna e letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelos testes de Mann Whitney ($P < 0,05$) e Wilcoxon ($P < 0,05$), respectivamente.

Vacas leiteiras obesas apresentam queda acentuada na ingestão de alimentos após o parto. Para atender as demandas energéticas impostas pelo início da lactação, esses animais mobilizam reservas corporais e apresentam redução significativa da condição corporal (Waltner et al., 1993). Vacas obesas à secagem, ao parto e no início da lactação apresentam maior incidência de transtornos puerperais, quando comparadas às vacas com boa condição corporal (Gearhart et al., 1990).

O monitoramento do ECC no periparto é essencial para prever como será a interferência do balanço energético no retorno do animal à reprodução. Vacas que perdem mais de 1 unidade no ECC após o parto podem apresentar redução da fertilidade posteriormente (Crowe, 2008). Esses animais apresentam balanço energético negativo (BEN) mais acentuado, e, conseqüentemente, maiores incidências de alterações metabólicas, as quais podem interferir nos mecanismos de defesa do útero, retardando o processo de involução (Swangchan-Uthai et al., 2012). A diminuição da função neutrofílica, por exemplo, é mais marcante nas vacas com BEN mais acentuado, por causa da presença de altas concentrações sanguíneas de AGNE e BHBA. Portanto, o BEN aumenta o risco de estabelecimento de infecções uterinas (Hammon et al., 2006).

Em rebanhos leiteiros de alta produção é importante monitorar o ECC de forma constante, pois este é um dos métodos mais úteis para prever alterações relacionadas com a ocorrência de doenças e diminuição

do desempenho reprodutivo (Gearhart et al., 1990; Waltner et al., 1993; Butler, 2006; Crowe, 2008). Desde o início do período seco, as vacas de alta produção devem manter o ECC entre 3,0 e 3,5 visando diminuir as ocorrências de doenças metabólicas, cistos ovarianos, transtornos reprodutivos e alterações do aparelho locomotor após o parto, minimizando dessa forma, os prejuízos com descartes involuntários (Jones et al., 1993).

Crowe (2008) sugere que o ECC de vacas leiteiras de alta produção ao parto deve ser ainda mais baixo, em torno de 2,75 a 3,0, com perda restrita a no máximo 0,5 unidade durante o puerpério, para evitar o efeito do BEN no retorno à ciclicidade. A condição corporal ideal ao parto é aquela que favorece maior produção de leite, minimiza os transtornos de saúde e os distúrbios reprodutivos, aumentando o retorno econômico (Gearhart et al., 1990).

Alguns autores notaram relação entre retenção de placenta e ECC ao parto, como Santos et al. (2002), que observaram maior incidência dessa patologia em vacas obesas. No estudo de Markusfeld et al. (1987) houve maior risco de retenção de placenta em vacas com baixo ECC. Esses achados indicam que animais com ECC inadequado ao parto têm maior probabilidade de apresentar retenção de placenta.

Porém, no presente estudo, não houve relação entre o ECC e a ocorrência de retenção de placenta, verificando-se que as vacas com retenção apresentaram boa condição corporal ao parto (Tabela 9).

Santos (1996) também não observou influência da condição corporal ao parto sobre a ocorrência de retenção de placenta em vacas leiteiras. O tempo requerido para liberação da placenta e a incidência dessa patologia foi semelhante entre as vacas consideradas magras ou obesas. Achados semelhantes foram relatados por Fernandes et al. (2001) e Martins et al. (2013), sugerindo que outros fatores de risco podem estar relacionados com a ocorrência de retenção de placenta no presente estudo.

3.2. Ocorrências de partos gemelares e partos auxiliados

As gestações gemelares são importantes fatores de risco para as ocorrências de distocia e retenção de placenta (Beerepoot et al., 1992; Fricke, 2000). No presente estudo, as vacas com retenção de placenta apresentaram 22% (2/9) de partos gemelares, sendo que um deles foi auxiliado.

A ocorrência de gestações gemelares em rebanhos leiteiros está relacionada com duplas ovulações. Os principais fatores de risco associados às duplas ovulações são ordem de parto e produção de leite, sendo que as pluríparas de alta produção são mais suscetíveis (Fricke e Wiltbank, 1999; Wiltbank et al., 2000; Fricke, 2000). Alterações ocorridas no momento da divergência de uma onda folicular podem possibilitar a codominância, seguida de dupla ovulação. Vacas de alta produção são mais suscetíveis devido ao desequilíbrio endócrino decorrente do aumento do metabolismo hepático de hormônios esteróides e maior concentração de FSH (Fricke e Wiltbank, 1999; Wiltbank et al., 2000; Fricke, 2000).

A incidência de partos gemelares em rebanhos leiteiros de alta produção pode variar de 0 a 10% (Kinsel et al., 1998). Os prejuízos para o sistema de produção estão relacionados com o estabelecimento de

quadros secundários de metrite puerperal aguda, verificando-se gastos com medicamentos, redução da produtividade e descarte de leite contaminado com resíduos de antibiótico (Beerepoot et al., 1992; Fricke, 2000). Os partos gemelares contribuem para a ocorrência de metrite puerperal aguda de forma direta, devido aos danos acarretados ao endométrio no momento do parto, e indireta, ao favorecer a ocorrência de retenção de placenta (Martins et al., 2013). No presente estudo, a vaca que teve gestação gemelar seguida de retenção de placenta apresentou metrite puerperal aguda e metrite clínica, sendo tratada durante três semanas. A vaca que teve gestação gemelar e distocia seguida de retenção de placenta morreu 11 dias após o parto devido a complicações puerperais.

A ocorrência de distocia em vacas Holandesas pode variar de 5,3% (Leite et al., 2001) a 20,6% (Koivisto et al., 2001). A incompatibilidade entre as medidas do feto e o canal do parto ou a apresentação fetal incorreta são consideradas casos de distocia e implicam necessidade de auxílio ao parto. Gestações gemelares, primíparas e bezerras muito pesados são os principais fatores de risco (Bell e Roberts, 2007).

Além das gestações gemelares e da intervenção ao parto, fatores nutricionais e ambientais estão relacionados com a ocorrência de retenção de placenta no presente estudo. Todos esses fatores podem favorecer a interrupção dos mecanismos fisiológicos de liberação da placenta e/ou causar depressão do sistema imunológico, resultando em falhas nos processos de separação e liberação dos anexos fetais (Wiltbank, 2008).

A incidência de retenção de placenta pode variar de 1 a 50%, dependendo do tipo de rebanho, da sua localização e de fatores climáticos (Wiltbank, 2008). Incidências entre 2 e 5% são mais frequentes, sendo que essas porcentagens são maiores em

rebanhos com elevadas ocorrências de partos gemelares e distocias (Sheldon et al., 2008). Martins et al. (2013) verificaram a incidência de 38,8% de retenção de placenta, 11,7% de gestações gemelares e 20,4% de partos auxiliados em vacas Holandesas na mesma propriedade onde foi realizado este estudo.

3.3. Temperatura retal no primeiro e no sétimo dia após o parto

A temperatura retal é um indicador da temperatura corporal, amplamente utilizado para verificar a presença de febre em bovinos (Van Saun, 2000; Drillich et al., 2003; 2006a,b; Benzaquen et al., 2007). A média da temperatura retal considerada normal varia de acordo com o estado de saúde, idade, raça, estação do ano, horário do dia, entre outros fatores (Smith e Risco, 2005), sendo que na maioria dos estudos, a temperatura igual a 39,5°C é considerada como limite superior para animais sadios (Van Saun, 2000; Koivisto et al., 2001; Sheldon et al., 2006; Martins et al., 2013).

No primeiro e no sétimo dia após o parto, as vacas sem e com retenção de placenta apresentaram médias de temperatura retal semelhantes (Tabela 10). Mais de 40% das vacas apresentaram temperatura $\geq 39,5^\circ\text{C}$ no primeiro e no sétimo dia pós-parto, nos dois grupos experimentais.

A elevação da temperatura retal, juntamente com a avaliação do aspecto e odor da secreção cervicovaginal são importantes métodos de diagnóstico de infecções uterinas. A elevação da temperatura retal na primeira semana após o parto pode estar

relacionada com ocorrência de febre, importante sinal clínico da metrite puerperal aguda (Sheldon et al., 2004b; Smith e Risco, 2005; Drillich et al., 2003; 2006a,b; Benzaquen et al., 2007).

As ocorrências diárias de febre durante o monitoramento de vacas Holandesas que tiveram retenção de placenta variaram de 65,5 a 92,1% entre o primeiro e o décimo dia após o parto, no estudo de Drillich et al. (2006a). Ao monitorar o puerpério de vacas Holandesas da mesma propriedade onde foi realizado o estudo atual, Martins et al. (2013) verificaram que as ocorrências de temperatura retal elevada foram mais frequentes do quarto ao sexto dia após o parto no grupo de vacas que tiveram retenção de placenta seguida de metrite. As porcentagens de animais com febre nesse período variaram de 41% a 46%.

A elevação da temperatura retal ocorre dois dias antes do diagnóstico da metrite puerperal aguda, sendo que a adoção de terapias sistêmicas é importante para abaixar a temperatura retal e melhorar o conforto dos animais. Como critério para a adoção de medicamentos, somente nos casos de presença de febre durante dois dias consecutivos os animais devem ser tratados. É necessário considerar que alguns animais podem apresentar metrite puerperal com sinais sistêmicos não acompanhados de elevação da temperatura corporal (Drillich et al., 2006b). Diferenças no horário do dia no qual a temperatura é aferida, fatores climáticos, estações do ano e conforto térmico das instalações, são fatores que podem interferir na variação da temperatura corporal (Smith e Risco, 2005).

Tabela 10. Temperatura retal (TR) no momento da biópsia (médias \pm desvios padrão), no primeiro e no sétimo dia após o parto, de acordo com o grupo experimental.

Grupo	<i>n</i>	TR um dia após o parto (°C)	<i>n</i>	TR sete dias após o parto (°C)
Holandesas sem retenção de placenta	10	39,5 \pm 0,3	10	39,4 \pm 0,6
Holandesas com retenção de placenta	09	39,6 \pm 0,4	09	39,5 \pm 0,8

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais, nem entre os momentos de avaliação (Teste *t* de Student, $P > 0,05$).

3.4. Ocorrências de infecções uterinas

Considerando as definições de infecções uterinas propostas por Sheldon et al. (2006), não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre vacas sem e com retenção de placenta quanto às ocorrências de metrite puerperal aguda aos 7 dias após o parto, metrite clínica aos 14 dias após o parto, e endometrite clínica aos 21 e aos 28 dias após o parto (Tabela 11). As vacas com retenção de placenta apresentaram maior ($P < 0,05$) incidência de endometrite citológica que as vacas sem retenção aos 21 dias após o parto (Tabela 12). Devido à redução do número de vacas durante o período experimental, não foram feitas comparações entre os grupos quanto às ocorrências de endometrites clínica e citológica aos 35 e aos 42 dias após o parto.

Como já comentado, a retenção de placenta é o principal fator de risco relacionado com o estabelecimento de metrites (Laven e Peters, 1996; Fernandes et al., 2001; Königsson et al., 2001; Han e Kim, 2005). No estudo de Martins et al. (2013), 81% das vacas Holandesas com retenção de placenta tiveram metrite puerperal aguda, enquanto apenas 17% das vacas sem retenção apresentaram esse tipo de infecção. No presente estudo, os dois grupos de vacas tiveram altas incidências de metrite puerperal aguda (Tabela 11).

Com o objetivo de minimizar a ocorrência de metrite puerperal aguda, a adoção de antibioticoterapia sistêmica, antitérmicos e fluidoterapia oral é indicada nos casos de retenção de placenta seguidos de elevação da temperatura retal (Königsson et al., 2001; Sheldon e Dobson, 2004; Drillich et al., 2006a; Wiltbank, 2008). Mesmo adotando esses procedimentos, 88,8% das vacas com retenção de placenta apresentou sinais clínicos de metrite puerperal aguda no presente estudo (Tabela 11).

Em sistemas de produção de leite, até 100% das vacas mantidas em confinamento podem apresentar contaminação uterina nas primeiras semanas após o parto, porém, as bactérias são eliminadas ao longo do processo de involução uterina normal (Olson et al., 1986; McEntee, 1990; Sheldon e Dobson, 2004; Sheldon et al., 2008, 2009). Na presença de bactérias patogênicas, alterações nos mecanismos de defesa do útero possibilitam o estabelecimento de processos infecciosos (Olson et al., 1986; Horta, 1995; Sheldon e Dobson, 2004, Sheldon et al., 2006). Geralmente, as causas das infecções ocorridas no útero nas primeiras semanas após o parto estão associadas à presença de lesões no endométrio e à presença de debris celulares no conteúdo uterino, favorecendo a rápida multiplicação bacteriana (Azawi, 2008).

Tabela 11. Ocorrências de metrite puerperal aguda, metrite e endometrite clínicas em vacas Holandesas.

Grupo	7dpp	14dpp	21 dpp	28 dpp
Holandesas sem retenção de placenta	60,0% (6/10)	60,0% (6/10)	30,0% (3/10)	37,5% (3/8)
Holandesas com retenção de placenta	88,8% (8/9)	75,0% (6/8)	71,4% (5/7)	100,0% (5/5)

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Teste Exato de Fisher, $P > 0,05$).

Tabela 12. Ocorrências de endometrite citológica em vacas Holandesas.

Grupo	21 dpp	28 dpp
Holandesas sem retenção de placenta	10,0% (1/10) ^A	37,5% (3/8) ^A
Holandesas com retenção de placenta	85,7% (6/7) ^B	80,0% (4/5) ^A

Percentuais seguidos de letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste Exato de Fisher ($P < 0,05$).

Portanto, a involução uterina séptica normal evolui para uma involução séptica anormal, sendo que até 40% das vacas de alta produção podem apresentar sinais clínicos de infecção até três semanas após o parto (Sheldon et al., 2008, 2009). Em outros estudos, as incidências de metrites em rebanhos leiteiros variaram de 21,0% (Benzaquen et al., 2007) a 36,1% (Markusfeld, 1987). Vacas que apresentam metrite puerperal aguda e/ou clínica são mais suscetíveis ao estabelecimento de endometrite a partir da terceira semana após o parto. Entre 20 e 40% dos casos de metrites evoluem para quadros de endometrite clínica (Benzaquen et al., 2007; Sheldon et al., 2008, 2009).

A alta incidência de infecções uterinas em vacas Holandesas, superior à média relatada na literatura, sugere a presença de fatores de risco não controlados no presente estudo. De acordo com Lewis (1997) e Sordillo et al. (2009), determinados fatores de risco às vezes não justificam elevadas ocorrências de infecções uterinas, verificando-se que vacas aparentemente normais podem ser afetadas. Após o parto, a competência do sistema imunológico pode estar relacionada com as diferentes respostas individuais na presença de contaminação uterina.

Em relação às ocorrências de endometrite citológica, o aumento da porcentagem de neutrófilos está relacionado com o grau de inflamação endometrial. Kasimanickam et al. (2004) também observaram maior incidência de endometrite citológica em vacas Holandesas com retenção de placenta aos 21 dias após o parto, quando comparadas às vacas sem retenção. Os limiares de neutrófilos estabelecidos por esses autores foram adotados nos exames citológicos do presente estudo (Tabela 12).

A comparação de achados relacionados com a endometrite citológica é questionável devido às variações dos limiares de neutrófilos estabelecidos nos diversos

estudos, aos distintos métodos de diagnóstico, além da exposição dos rebanhos a diferentes desafios. Em geral, verifica-se que as bactérias mais frequentes nas culturas de amostras do conteúdo uterino, coletadas por ocasião dos exames citológicos, são *E. coli* e *Streptococcus acidominimus*. A maioria das vacas com endometrite citológica não apresenta cultura bacteriana positiva, verificando-se baixa correlação entre citologia e bacteriologia. Portanto, a endometrite citológica ocorrida após o parto pode estar mais associada à recuperação do endométrio que às infecções bacterianas (Baránski et al., 2102).

Ao comparar as incidências de endometrite clínica e citológica nos diferentes momentos de avaliação, observa-se que a presença de endometrite clínica não implicou necessariamente na presença de endometrite citológica (Tabelas 11 e 12). No estudo de Dubuc et al. (2010a), aos 35 dias após o parto, 13,5%, 9,4% e 5,8% das vacas Holandesas avaliadas tiveram endometrite citológica, clínica ou ambas, respectivamente. Entre as vacas com endometrite clínica, apenas 38,0% apresentaram endometrite citológica nessa ocasião. Os autores sugeriram que essas doenças podem apresentar diferentes formas de manifestação e questionaram a imprecisão do termo endometrite clínica, uma vez que foi verificado por meio de exames citológicos, que as vacas com secreção mucopurulenta ou purulenta na porção caudal da vagina, nem sempre apresentavam inflamação endometrial. Esses achados indicam que a avaliação clínica do trato reprodutivo pode revelar a presença de endometrite, cervicite ou vaginite, e estas condições podem ser confundidas ao observar apenas o aspecto da secreção presente na vagina.

Em outro estudo (Dubuc et al., 2010b), a utilização do termo endometrite citológica foi sugerida para substituir o termo endometrite subclínica, pois apenas 22,8%

das vacas Holandesas examinadas foram diagnosticadas com secreção vaginal purulenta e endometrite citológica, simultaneamente. Diferenças entre os fatores de risco estão relacionadas com esses achados. Os fatores de risco para a presença de secreção vaginal purulenta são parto gemelar, distocia e ocorrência anterior de quadros de metrite, verificando-se que estão associados ao aumento das lesões endometriais e ao aumento da densidade bacteriana. Os fatores de risco relacionados com a endometrite citológica são a baixa condição corporal, a cetose e o aumento da concentração de haptoglobina, uma das proteínas da fase aguda da inflamação, verificando-se que esses fatores refletem quadros de imunossupressão e/ou desequilíbrios metabólicos. Embora algumas vacas apresentem endometrite citológica e secreção vaginal purulenta, essa secreção pode não ser reflexo de inflamação do endométrio, e sim resultado de quadros isolados de cervicite e/ou vaginite.

3.5. Isolamento de bactérias a partir de amostras do conteúdo uterino

As bactérias aeróbicas isoladas no presente estudo (Tabela 13) foram classificadas em diferentes graus de patogenicidade de acordo com os estudos de Sheldon et al. (2004) e Willians et al. (2005): 1. Bactérias patogênicas: bactérias altamente associadas a lesões endometriais; 2. Bactérias potencialmente patogênicas: bactérias frequentemente isoladas do útero nos casos

de infecções uterinas, geralmente, não associadas às lesões endometriais; 3. Bactérias oportunistas: bactérias que podem ser ocasionalmente isoladas, mas não estão relacionadas com infecções uterinas.

As porcentagens de amostras de conteúdo uterino das vacas sem retenção de placenta com presença de bactérias no 1º, 7º, 14º e 21º dia após o parto foram de 100%, 80%, 87,5% e 16,7%, respectivamente. Para as vacas com retenção de placenta, as porcentagens de amostras positivas foram de 100%, 100%, 85,7% e 75%, respectivamente. Os dois grupos apresentaram *E. coli* no ambiente uterino até 21 dias após o parto (Gráfico 1). As incidências de febre nesse período podem ser observadas no Gráfico 2. A maioria das amostras de conteúdo uterino apresentava odor fétido até 21 dias após o parto (Gráfico 3). Para todas essas ocorrências, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos de vacas sem e com retenção de placenta, nem entre os diferentes momentos de coleta das amostras de conteúdo uterino.

As culturas bacterianas do conteúdo uterino e da secreção cervicovaginal geralmente são positivas nas primeiras semanas após o parto devido à contaminação pré-estabelecida. Fisiologicamente, as bactérias são eliminadas até a terceira semana após o parto das vacas leiteiras (Rocha et al., 2004; Sheldon et al., 2002b; Sheldon et al., 2006; Herath et al., 2009a).

Tabela 13. Bactérias aeróbicas presentes no conteúdo uterino de vacas Holandesas de acordo com o grau de patogenicidade. Entre parênteses, a porcentagem correspondente ao total de bactérias isoladas ($n = 88$) nas avaliações semanais realizadas entre o 1º e o 42º dia após o parto.

Patogênicas	Potencialmente patogênicas	Oportunistas
<i>Escherichia coli</i> ² (34,1%)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva ¹ (9,4%)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa ¹ (20,0%)
	<i>Streptococcus</i> spp. ¹ (5,9%)	<i>Enterobacter</i> spp. ² (22,5%)
	<i>Pseudomonas</i> spp. ² (7,0%)	<i>Nocardia</i> spp. ¹ (1,1%)

1. Bactérias Gram-positivas;

2. Bactérias Gram-negativas.

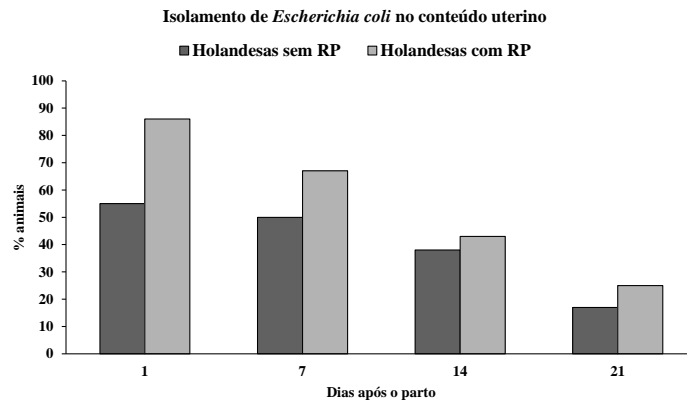


Gráfico 1. Porcentagens de isolados uterinos de vacas Holandesas sem retenção ($n = 11$; $n = 10$; $n = 8$; $n = 6$) e com retenção de placenta ($n = 7$; $n = 7$; $n = 7$; $n = 4$), com presença de *Escherichia coli* no 1º, 7º, 14º e 21º dias após o parto, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de vacas.

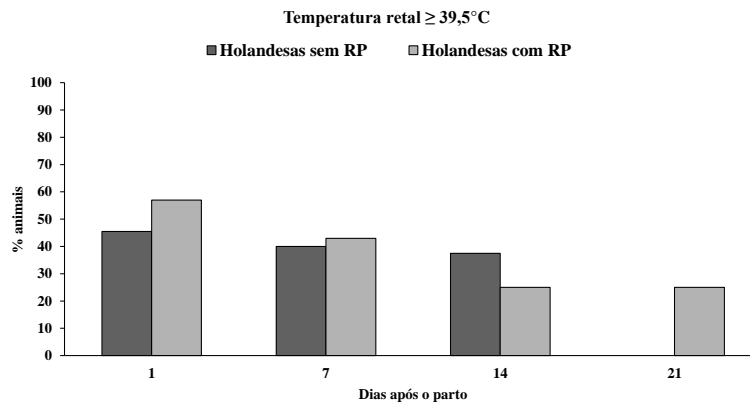


Gráfico 2. Ocorrências de febre (temperatura retal $\geq 39,5^\circ\text{C}$) em vacas Holandesas sem retenção ($n = 11$; $n = 10$; $n = 8$; $n = 6$) e com retenção de placenta ($n = 7$; $n = 7$; $n = 7$; $n = 4$) no 1º, 7º, 14º e 21º dias após o parto, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de vacas.

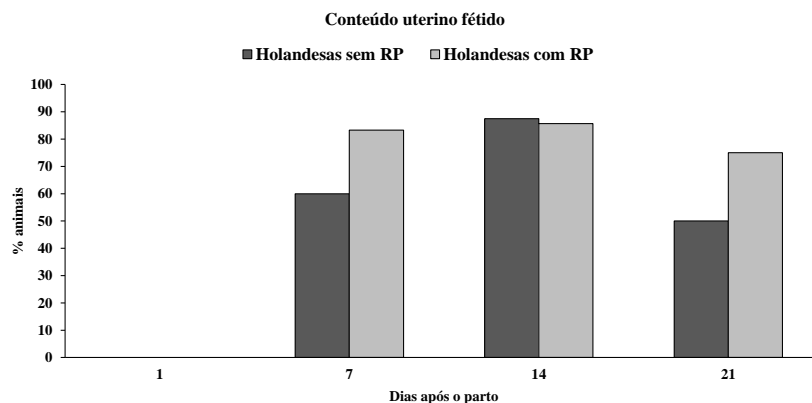


Gráfico 3. Amostras de conteúdo uterino de vacas Holandesas sem retenção ($n = 11$; $n = 10$; $n = 8$; $n = 6$) e com retenção de placenta ($n = 7$; $n = 7$; $n = 7$; $n = 4$), com odor fétido, no 1º, 7º, 14º e 21º dias após o parto, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de vacas.

E. coli é o patógeno mais frequente no conteúdo uterino das vacas leiteiras nas primeiras semanas após o parto (Rocha et al., 2004; Sheldon et al., 2002b; 2004b; 2006; Willians et al., 2007; Herath et al., 2009a; Baránski et al., 2012), como observado no presente estudo (Tabela 13). Vacas sem e com retenção de placenta apresentaram ocorrências semelhantes ($P > 0,05$) de *E. coli* no útero entre o 1º e o 21º dia após o parto (Gráfico 1).

No estudo de Sheldon et al., (2004b), as bactérias mais frequentes em 360 culturas provenientes de amostras do conteúdo uterino de 97 vacas Holandesas, coletadas no 7º, 14º, 21º e 28º dias após o parto foram *E. coli* (38,9%), *Streptococcus* não hemolítico (36,4%), *T. pyogenes* (30,8%), *Bacillus licheniformis* (24,2%), *Prevotella* sp. (21,7%) e *F. necrophorum* (15,3%), A ocorrência de febre foi relacionada com a presença de *E. coli*, *T. pyogenes*, *Fusobacterium* spp., e, particularmente, *Prevotella* sp.. A ocorrência de febre em vacas sem e com retenção de placenta do 1º ao 21º dia após o parto pode ser observada no Gráfico 2 do presente estudo.

A temperatura retal pode ser utilizada como sinal de inflamação endometrial após o parto, porém, deve ser associada a outros sinais clínicos, tais como, conteúdo uterino fétido e atraso do processo de involução uterina, para o diagnóstico de infecções uterinas bacterianas (Sheldon et al., 2004b). O aspecto e o odor da secreção cervicovaginal apresentam alta correlação com resultados de culturas bacterianas realizadas a partir de amostras do conteúdo uterino (Sheldon e Dobson, 2004; Willians et al., 2005). Secreções fétidas estão relacionadas com a presença de *E. coli*, *T. pyogenes*, *Streptococcus* não hemolítico e *Manheimia haemolytica* (Willians et al., 2005). No presente estudo as quantidades de amostras de conteúdo uterino enviadas para cultura bacteriana que apresentavam odor fétido nas avaliações realizadas

semanalmente até 21 dias após o parto, podem ser observadas no Gráfico 3.

É extremamente importante diferenciar os quadros de contaminação bacteriana e infecção uterina (Sheldon e Dobson, 2004). A partir de um quadro de contaminação uterina, a resposta imunológica, os patótipos e a quantidade de bactérias podem contribuir para o estabelecimento ou não de infecções uterinas após o parto (Bondurant, 1999; Sheldon, 2007; Sheldon et al., 2006; Willians et al., 2007; Sheldon et al., 2008; Potter et al., 2010). A presença de *E. coli* no ambiente uterino até 14 dias após o parto está relacionada com quadros de metrite, sendo que as toxinas produzidas podem desencadear sinais sistêmicos e atrasar a involução uterina (Dohmen et al., 2000; Zerbe et al., 2001; Willians et al., 2007).

No estudo de Willians et al. (2007), *E. coli*, *T. pyogenes* e *Proteus* spp. foram as bactérias mais isoladas a partir do conteúdo uterino de vacas Holandesas. *E. coli* foi isolada até sete dias após o parto, enquanto *T. pyogenes*, foi isolado depois de 14 dias pós-parto. Enquanto a concentração de *E. coli* diminuiu, a densidade de *T. pyogenes* aumentou durante o período de avaliação, sugerindo que a *E. coli* aumenta a suscetibilidade do útero à infecção por *T. pyogenes*. A presença anterior de *E. coli* no útero afeta a função das células de defesa, favorecendo a coinfeção por *T. pyogenes* (Dohmen et al., 2000; Zerbe et al., 2001).

No estudo de Mateus et al. (2002), *E. coli*, *T. pyogenes*, *Fusobacterium* sp. e *Bacteroides* sp. foram as principais bactérias isoladas do conteúdo uterino de vacas Holandesas com sinais de endometrite clínica. *T. pyogenes*, *Fusobacterium* sp. e *Bacteroides* sp. foram isoladas até quatro semanas após o parto em vacas que apresentavam secreção cervicovaginal purulenta sem cheiro, e até seis semanas após o parto, em vacas com secreção cervicovaginal purulenta fétida.

A presença de bactérias no conteúdo uterino a partir da quarta semana após o parto é mais comum em vacas Holandesas que tiveram retenção de placenta. Aproximadamente 50% das vacas com retenção de placenta podem apresentar culturas bacterianas positivas aos 30 dias após o parto, sendo que *T. pyogenes* é a bactéria mais frequente nos isolados (Kaneko et al., 1997). Os protocolos de isolamento de bactérias adotados pelo laboratório que realizou as culturas bacterianas do presente estudo não identificaram *T. pyogenes* nas amostras de conteúdo uterino das vacas Holandesas. O isolamento desse patógeno seria importante para verificar a sua associação com a ocorrência de endometrite clínica.

3.6. Involução uterina e retorno da atividade ovariana luteal

Os períodos de involução uterina e retorno da atividade ovariana luteal dos grupos de vacas sem e com retenção de placenta foram semelhantes ($P > 0,05$; Tabela 14). A evolução dos parâmetros de monitoramento da involução uterina encontra-se em anexo (Gráficos A2 a A8). As elevadas incidências de infecções uterinas nos dois grupos podem ter contribuído para o prolongamento da involução uterina, porém, não influenciaram no retorno da atividade ovariana luteal (Tabelas 11 e 12).

No estudo de Martins et al. (2013), a presença isolada de retenção de placenta não influenciou no período de involução uterina, porém, pluríparas Holandesas que tiveram algum tipo de infecção uterina até 42 dias após o parto apresentaram período de involução uterina significativamente maior ($37,0 \pm 13,4$ dias) que as sem infecção uterina ($27,5 \pm 5,9$ dias). O efeito prejudicial de infecções sobre a involução uterina ocorre nas primeiras semanas após o parto, quando são observadas alterações nos mecanismos de defesa, aumento da multiplicação de patógenos e danos ao

endométrio, decorrentes da exacerbação e persistência da resposta inflamatória (Lewis, 1997; Bondurant, 1999; Sheldon e Dobson, 2004; Sheldon, 2007, 2008, 2009; Herath et al., 2009a; Sordillo et al., 2009).

A média de dias para a detecção da primeira ovulação após o parto (Tabela 14) foi semelhante à relatada por Kamimura et al. (1993) e Kozicki et al. (1998), que verificaram ocorrência da primeira ovulação aos $21,2 \pm 9,6$ e aos $28,5 \pm 9,7$ dias após o parto, respectivamente. Contudo, foi menor que as médias encontradas por Nakao et al. (1992), de Vries e Veerkamp (2000) e Senosy et al. (2009), que foram de $38,0 \pm 17,0$ dias, $29,7$ dias e $31,6 \pm 7,0$ dias, respectivamente. No estudo de Martins et al. (2013), as vacas Holandesas sem e com infecção uterina apresentaram RAOL, em média, aos $35,0 \pm 18,3$ dias e aos $49,4 \pm 21,7$ dias após o parto, verificando-se diferença significativa entre os grupos. No presente estudo, não houve interferência das altas incidências de infecções uterinas no RAOL.

Na presença de infecção, a ação imunossupressora da progesterona ocorrida após a primeira ovulação pode favorecer o atraso da involução uterina (Del Vecchio et al., 1992; Dhaliwal et al., 2001; Seals et al., 2002; Lewis, 2003; 2004). Estudos recentes com vacas Holandesas relatam que a ocorrência precoce da primeira ovulação após o parto atrasa a involução uterina. A presença de bactérias patogênicas no útero dos animais que ovulam precocemente após o parto está relacionada com maior gravidade dos quadros de inflamação endometriais, aumento da produção de PGE2 (luteotrófica), redução da produção de PGF2 α (luteolítica), e, conseqüentemente, persistência do corpo lúteo. A ação imunossupressora da progesterona e o relaxamento do miométrio contribuem para atrasar o processo de involução uterina (Silvestre et al., 2009a,b; Heppelmann et al., 2013).

Tabela 14. Período de involução uterina e retorno da atividade ovariana luteal (RAOL) de acordo com o grupo experimental (médias \pm desvios padrão).

Grupo	<i>n</i>	Involução uterina (dias)	<i>n</i>	RAOL (dias)
Holandesas sem retenção de placenta	07	35,0 \pm 5,7	09	26,4 \pm 7,7
Holandesas com retenção de placenta	03	39,7 \pm 4,0	06	24,5 \pm 3,8

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Teste *t* de Student, $P > 0,05$).

O tratamento com deslorelina (agonista do GnRH) até 36 dias após o parto suprimiu a ovulação e favoreceu a involução uterina de vacas sem complicações puerperais nos estudos de Silvestre et al. (2009a,b). A supressão da ovulação por meio da aspiração dos folículos com diâmetro maior que 6 mm até 42 dias após o parto descartou o efeito de hormônios exógenos e acelerou a involução uterina de vacas com puerpério normal (vacas sadias) ou patológico (com retenção de placenta e/ou infecção uterina até 21 dias após o parto) no estudo de Heppelmann et al. (2013).

3.7. Transcrição gênica endometrial de receptores tipo *Toll* 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, CD14 e MD2

Como os valores de *Ct* da β -actina apresentaram maior estabilidade quando comparados aos valores de *Ct* do GAPDH, a β -actina foi escolhida como normalizador para o cálculo da transcrição endometrial relativa dos receptores tipo *Toll* 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e dos coreceptores CD14 e MD2, em vacas sem retenção (Gráfico 4) e com retenção de placenta (Gráfico 5).

Em estudo recente do nosso grupo de pesquisa (Martins et al., 2011), 103 vacas Holandesas foram submetidas a biópsias endometriais entre seis e doze horas após o parto. Em seguida, a involução uterina desses animais foi monitorada semanalmente, até 42 dias após o parto. Nessa ocasião, 20 amostras de endométrio foram selecionadas para verificação da transcrição gênica dos TLRs 1/6, 2, 4 e 5. Dez amostras eram provenientes de vacas que haviam apresentado retenção de

placenta seguida de metrite puerperal aguda e endometrite clínica, e dez amostras, provenientes de animais com puerpério normal. A transcrição gênica dos receptores avaliados foi relativamente baixa e não houve diferença entre os grupos. Apesar dos resultados indicarem que a transcrição endometrial de TLRs imediatamente após o parto não é preditiva para a suscetibilidade a infecções uterinas, não foi excluída a possibilidade de ocorrer aumento dos níveis de transcrição desses receptores e variações entre os grupos de vacas Holandesas sem e com retenção de placenta em momentos mais tardios. Sendo assim, no presente estudo, as biópsias endometriais foram realizadas entre 24 e 30 horas após o parto (primeiro dia) e no sétimo dia após o parto, sendo que todas as vacas eram provenientes do mesmo rebanho do estudo anterior.

Como ilustrado nos Gráficos 4 e 5, os grupos de vacas Holandesas sem e com retenção de placenta apresentaram níveis de transcrição gênica endometriais semelhantes ($P > 0,05$) para todos os receptores de padrões moleculares microbianos considerados, no primeiro e no sétimo dia após o parto. Em relação ao estudo anterior (Martins et al., 2011), os níveis de transcrição gênica endometriais dos TLRs 1/6, 2, 5 e 9 continuaram baixos nos dois momentos de coleta das amostras. Os níveis de transcrição gênica do NOD1, NOD2 e do coreceptor MD2 também foram relativamente baixos nos dois momentos de avaliação. No primeiro dia após o parto, o TLR4 e o coreceptor CD14 foram os imunomediadores com mais alto nível de transcrição endometrial relativa nos dois grupos experimentais.

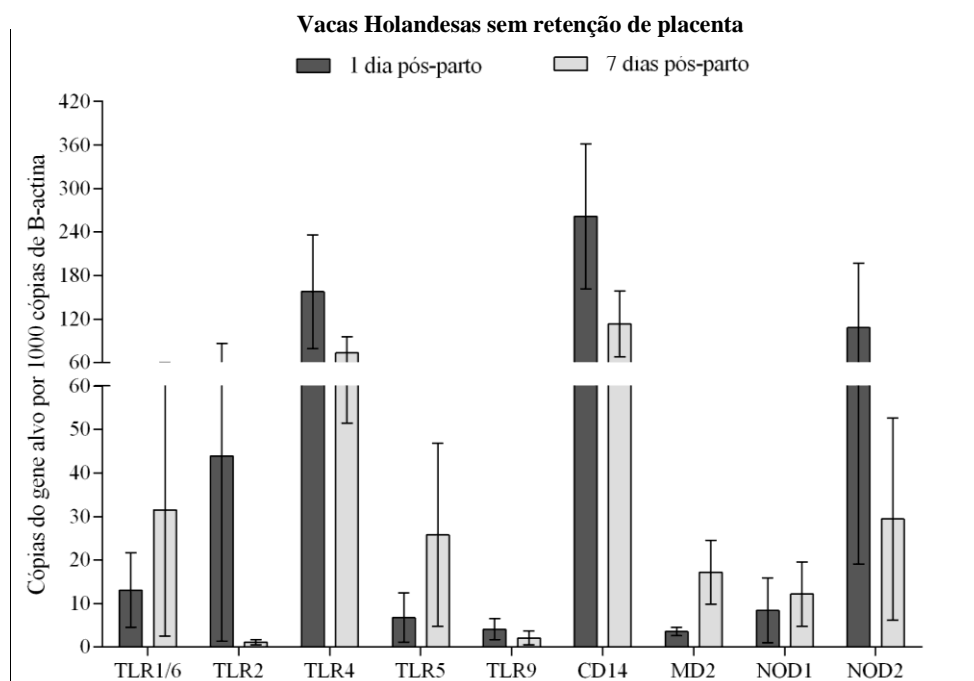


Gráfico 4. Transcrição gênica de receptores de padrões moleculares microbianos (médias \pm erros padrão) no endométrio de vacas Holandesas sem retenção de placenta ($n = 8$), no primeiro e no sétimo dia após o parto. Não foram observadas diferenças significativas, $P > 0,05$ (Teste de Wilcoxon).

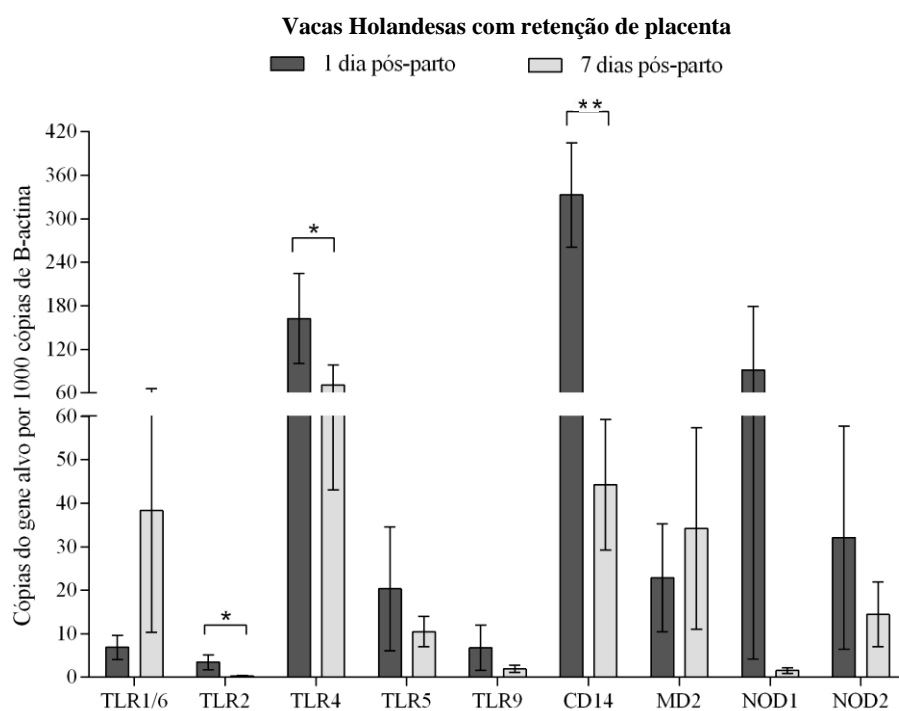


Gráfico 5. Transcrição gênica de receptores de padrões moleculares microbianos (médias \pm erros padrão) no endométrio de vacas Holandesas com retenção de placenta ($n = 8$), no primeiro e no sétimo dia após o parto. * Diferenças significativas, $P < 0,05$; ** Diferença altamente significativa, $P < 0,01$ (Teste de Wilcoxon).

Do primeiro para o sétimo dia após o parto, os níveis de transcrição gênica relativa dos receptores de padrões moleculares microbianos apresentaram variações parecidas nos dois grupos de vacas Holandesas, com exceção do TLR5 e do NOD1. Entre os dois momentos de avaliação, os níveis de transcrição endometrial de TLR5 e NOD1 aumentaram no grupo de vacas sem retenção de placenta, e diminuíram no grupo de vacas com retenção de placenta. No sétimo dia após o parto, houve redução significativa ($P < 0,05$) dos níveis de transcrição gênica de TLR2, TLR4 e CD14 somente no grupo de vacas com retenção de placenta.

Histologicamente, o endométrio das vacas taurinas e zebuínas apresenta duas camadas: uma camada superficial composta por células epiteliais colunares simples, e uma camada profunda constituída de células estromais, células de defesa e vasos sanguíneos. Ambas formam a primeira linha de defesa contra o estabelecimento de infecções uterinas (Monteiro et al., 2003; Davies et al., 2008; Swangchan-Uthai et al., 2012). As células adjacentes do epitélio endometrial são unidas por *tight junctions*. Esse tipo de conexão intercelular é proporcionado por uma rede de proteínas transmembranares com domínios intra e extracelulares que interagem para manter a forte adesão entre as células. As *tigh junctions* mantêm a integridade da camada superficial do endométrio e restringem o contato entre os compartimentos apical e basolateral, controlando a permeabilidade paracelular. Sendo assim, a camada epitelial do endométrio confere proteção contínua ao útero e é considerada uma importante barreira física contra microrganismos invasores (Hickey et al., 2011; Amjadi, et al, 2014).

Durante a maior parte do ciclo reprodutivo, o ambiente uterino encontra-se estéril, ou, potencialmente livre de microrganismos patogênicos. Porém, durante a relação

sexual e durante o parto, o endométrio é exposto à contaminação bacteriana. Ao entrarem em contato com os microrganismos, as células epiteliais do endométrio ativam mecanismos relacionados com as respostas imunológicas inata e adaptativa (Herath et al., 2006; Turner et al., 2012). Portanto, além de constituírem importante barreira física de proteção uterina, as células epiteliais do endométrio são capazes de reconhecer microrganismos invasores por meio de receptores de padrões moleculares microbianos, desencadeando respostas imunológicas que consistem na secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e prostaglandinas (Sheldon e Roberts, 2010).

Lesões e traumas ocorridos durante o parto das vacas afetam a integridade da camada epitelial do endométrio, favorecendo a exposição das células do estroma às bactérias presentes no ambiente uterino (Potter et al, 2010). Embora o epitélio endometrial seja considerado a primeira barreira contra microrganismos invasores, as células do estroma são mais abundantes e podem contribuir de maneira significativa para combater a contaminação uterina após o parto (Sheldon e Roberts, 2010).

Estudos realizados *in vitro*, com células endometriais purificadas, relatam que de maneira semelhante às células do epitélio, as células do estroma apresentam ampla capacidade de expressar receptores de padrões moleculares microbianos e ativar respostas inflamatórias endometriais em bovinos (Herath et al., 2006; Davies et al., 2008; Swangchan-Uthai et al., 2012). Por meio da técnica de RT-PCR, verifica-se a transcrição gênica dos TLRs 1 a 10 em amostras de tecido endometrial de vacas Holandesas (Davies et al., 2008). Nas culturas de células epiteliais purificadas, esses autores observaram a transcrição dos TLRs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9. E nas culturas de células estromais purificadas, constataram a transcrição dos TLRs 1, 2, 3,

4, 6, 7, 9 e 10. Ao serem expostas a diferentes MAMPs, as células epiteliais e estromais foram capazes de responder ao desafio aumentando a produção de PGE2, demonstrando que os receptores transcritos são funcionais.

A ocorrência de retenção de placenta em bovinos pode causar lesões e traumas adicionais ao tecido endometrial, aumentando o risco de ocorrência de infecções uterinas (Potter et al, 2010). Ao contrário do esperado, os grupos de vacas Holandesas sem e com retenção de placenta não apresentaram diferenças em relação aos níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos considerados no presente estudo, no primeiro e no sétimo dia após o parto. Porém, os grupos experimentais não apresentaram o mesmo comportamento em relação à variação dos níveis de transcrição gênica desses receptores entre os dois momentos de avaliação. Houve redução significativa da transcrição endometrial de TLR2, TLR4 e CD14 somente no grupo de vacas com retenção de placenta (Gráfico 5).

Diferenças quanto à capacidade de regular a resposta imunológica endometrial na primeira semana após o parto podem estar relacionadas com os achados obtidos no presente estudo. A diminuição dos níveis de transcrição gênica de determinados receptores no grupo de vacas com retenção de placenta pode estar relacionada com um maior grau de comprometimento da integridade do epitélio nas áreas intercarunculares, onde foram coletadas as amostras de endométrio. Como relatado anteriormente, a permanência da placenta no útero dificulta a eliminação do conteúdo remanescente da gestação, interfere na atuação dos mecanismos de defesa locais e favorece a multiplicação de bactérias, contribuindo para o estabelecimento de processos infecciosos (Dohmen et al., 2000; Sheldon et al., 2004a; Hammon et al., 2006).

A importância do TLR4 e do CD14 para a imunidade uterina das vacas recém-paridas está relacionada com a atuação de ambos no reconhecimento da endotoxina LPS, lipossacarídeo presente na membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas (Sheldon e Roberts, 2010; Swangchan-Uthai et al., 2012). Após o parto, a bactéria Gram-negativa mais frequente em amostras do conteúdo uterino de vacas Holandesas é a *E. coli* (Sheldon et al., 2002b; 2004b; Willians et al., 2007; Herath et al., 2009a; Baránski et al., 2012). No presente estudo, essa bactéria foi isolada em 86% e 67% das amostras de conteúdo uterino das vacas Holandesas com retenção de placenta, no primeiro e no sétimo dia após o parto, respectivamente (Gráfico 1).

O reconhecimento da *E. coli* pelo TLR4 depende dos coreceptores CD14 e MD2. Inicialmente, proteínas de ligação denominadas LBPs transferem o LPS para o coreceptor CD14, presente na membrana das células endometriais, formando o complexo CD14-LPS-LBP. Em seguida, esse complexo é apresentado ao complexo TLR4-MD2, que é responsável pela ativação de uma das vias de sinalização da resposta imunológica, dependentes ou não da molécula adaptadora MyD88. A resposta inflamatória ativada a partir da interação entre LPS, LBP, CD14, TLR4 e MD2 inclui a liberação de citocinas, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos, proteínas da fase aguda, prostaglandinas e outros imunomoduladores. Na ausência de CD14, a interação do LPS com o complexo TLR4-MD2 é fraca (Triantafilou e Triantafilou, 2002; Miyake, 2006; Park et al., 2012).

Ao observar os Gráficos 4 e 5, verificamos que o TLR4 e os coreceptores CD14 e MD2 apresentaram diferentes níveis de transcrição gênica relativa nos dois grupos de vacas Holandesas, principalmente no primeiro dia após o parto. Em média, o nível de transcrição endometrial de CD14 foi duas vezes maior que o de TLR4 nos

dois grupos de vacas. Por sua vez, o nível de transcrição de MD2 foi muito baixo quando comparado ao CD14 e ao TLR4 nos dois grupos experimentais, sugerindo que a atuação desses imunomediadores quanto ao reconhecimento de *E. coli* e outras bactérias Gram-negativas presentes no ambiente uterino pode ter sido comprometida. Falhas ocorridas nos mecanismos de regulação da ativação do TLR4 podem resultar em quadros inflamatórios exacerbados e/ou persistentes, seguidos de ocorrências de diferentes graus de infecções uterinas (Yunhe et al., 2013).

Os mecanismos relacionados com a ativação da resposta inflamatória mediada pelo TLR2 são semelhantes à via mediada pelo TLR4. Vários ligantes de TLR2 já foram descritos, verificando-se que esse receptor reconhece diferentes MAMPs de bactérias Gram-positivas, tais como, ácido lipoteicóico, lipopeptídeos e peptideoglicanos. Como estruturalmente esses componentes bacterianos são distintos, a promiscuidade do TLR2 é questionada (Zähringer et al., 2008). Para interagir com seus ligantes, o TLR2 se associa ao TLR1 e/ou ao TLR6, formando dímeros ou heterodímeros. O reconhecimento do ácido lipoteicóico, componente da membrana externa de *S. aureus* e outras bactérias Gram-positivas, pode ser dependente da atuação das LBPs, do TLR2 e do coreceptor CD14 (Yoshimura et al., 1999; Takeuchi e Akira, 2000; Schröder et al., 2003), porém, para ocorrer a ativação dos fatores de transcrição da via de inflamação comum entre o TLR2 e o TLR4, dependente da molécula adaptadora MyD88, são necessárias concentrações de ácido lipoteicóico três a quatro vezes mais elevadas em comparação à concentração de LPS (Schröder et al., 2003). A participação do CD14 no reconhecimento de outros ligantes do TLR2, como os lipopeptídeos, foi relatada em estudos recentes (Raby et al., 2013; Ranoa et al., 2013).

Em caninos, os níveis de transcrição endometrial de TLR2, juntamente com os níveis de transcrição de LBPs, TLR4 e CD14 encontram-se mais elevados em cadelas com quadros de piometra quando comparadas a cadelas sadias na fase de diestro (Mateus et al., 2009; Silva et al., 2010). Como observado em bovinos, a *E. coli* é a principal bactéria presente no ambiente uterino das cadelas com piometra.

A transcrição gênica e a atuação do TLR4 e do CD14 em células endometriais de bovinos, na presença de *E. coli* inativada ou LPS purificado, foram relatadas primeiramente por Herath et al. (2006). Em resposta ao aumento das concentrações de *E. coli* ou LPS no meio de cultura, os explantes endometriais produziram quantidades crescentes de prostaglandinas. A capacidade de responder ao estímulo com *E. coli* ou LPS foi dependente da transcrição endometrial de TLR4 e CD14, em células estromais e epiteliais. Verificou-se que as células epiteliais responderam ao estímulo com concentrações de *E. coli* ou LPS mais baixas que as células estromais. Estes autores demonstraram que podem existir diferenças entre o epitélio e o estroma endometriais quanto à capacidade de regular a resposta imunológica na presença de patógenos, sugerindo que as células epiteliais apresentam maior sensibilidade para reconhecer os MAMPs e promover respostas imunológicas. Sheldon e Roberts (2010) relataram que essas diferenças podem estar relacionadas com a localização das células epiteliais e estromais do endométrio. Como as células epiteliais estão em contato direto com o lúmen uterino, na presença de microrganismos invasores elas devem ser capazes de desencadear respostas mais rápidas que as células do estroma, as quais são ativadas somente quando a integridade do epitélio endometrial é comprometida.

É necessário considerar que a *E. coli* possui diferentes patótipos, que podem ser

patogênicos ou não. Nas primeiras semanas após o parto, as infecções uterinas estão associadas à presença de patótipos patogênicos de *E. coli* no útero de bovinos. O reconhecimento da endotoxina LPS pelo TLR4 e seus coreceptores CD14 e MD2, induz respostas inflamatórias, que podem se manifestar de forma discreta, moderada ou acentuada (Sheldon et al., 2010). Esses autores relatam que patótipos específicos de *E. coli*, isolados a partir do conteúdo uterino de vacas Holandesas com sinais clínicos de metrite puerperal aguda, possuem mecanismos de adesão às células endometriais mais eficientes, são mais invasivos, induzem resposta inflamatória celular mais exacerbada, são mais resistentes a antibioticoterapia e possuem fatores de virulência específicos, quando comparados aos patótipos considerados não patogênicos, mais frequentes no conteúdo uterino de animais que não apresentavam sinais clínicos de infecção uterina. Bactérias vivas e LPS purificado a partir de amostras dos dois patótipos de *E. coli* foram infundidos no útero de camundongos, sendo observado o estabelecimento de processos infecciosos associados a sinais sistêmicos 24 horas após a infusão uterina, somente no grupo de animais inoculados com *E. coli* e LPS de patótipos considerados patogênicos.

O período decorrido entre a contaminação uterina pela *E. coli* e o desencadeamento da resposta inflamatória no endométrio de bovinos ainda não foi determinado. Acredita-se que a resposta seja imediata, porém, nosso grupo de pesquisa verificou baixos níveis de transcrição endometrial de TLR4 no útero de vacas Holandesas entre seis e doze horas após o parto, observando-se, em média, 10 cópias de TLR4 por 1000 cópias de β -actina, sem diferença entre os grupos sem e com retenção de placenta (Martins et al., 2011). No estudo atual, o nível de transcrição gênica de TLR4 em vacas submetidas a biópsias endometriais entre 24 e 30 horas após o parto foi relativamente maior que o obtido no estudo

anterior, verificando-se, em média, 160 cópias de TLR4 por 1000 cópias de β -actina nos grupos com e sem retenção de placenta.

No estudo de Ritter (2007), foram observadas diferenças significativas dos níveis de transcrição dos TLRs 2, 3, 4, 6 e 9 em amostras do endométrio de vacas Holandesas coletadas entre quatro e seis horas após o parto, em relação às amostras coletadas entre 24 e 30 horas após o parto. Houve aumento dos níveis de transcrição dos TLRs avaliados, com exceção do TLR9, em amostras de endométrio coletadas de áreas intercarunculares entre 24 a 30 horas após o parto. Esses resultados indicam que a interação prévia das células endometriais com os microrganismos pode ser necessária para estimular a expressão de determinados imunomediadores.

Com o objetivo de calcular o intervalo entre a exposição ao LPS e o desencadeamento da resposta imunológica, Swangchan-Uthai et al. (2012), adicionaram LPS (100 ng/ml) a culturas purificadas de células do epitélio e do estroma endometrial de bovinos. Após 24 horas de exposição ao LPS, foi observada diferença significativa na transcrição de TLR4, CD14 e várias citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos relacionados com a resposta imunológica ao LPS. As leituras foram realizadas por meio de qRT-PCR imediatamente antes da adição de LPS, 1 hora, 6, 12, 24 e 48 horas após a exposição das células endometriais ao LPS. Os autores verificaram que as expressões dos 17 genes avaliados voltaram a ser basais na leitura realizada 48 horas depois da exposição ao LPS, o que confirma a existência de mecanismos de regulação do processo inflamatório para evitar respostas exacerbadas e danos às células.

A regulação da resposta inflamatória endometrial na presença de microrganismos com potencial patogênico está diretamente relacionada com a manutenção da

fertilidade das vacas. Mesmo quando expostos a semelhantes condições de contaminação microbiana após o parto, alguns animais são capazes de combater a contaminação uterina rapidamente, enquanto outros desenvolvem diferentes graus de infecção uterina, que podem persistir e levar a infertilidade (Willians et al., 2005; Herath et al., 2009; Chapwanya et al., 2009; Sheldon et al., 2010).

Em estudo semelhante ao atual, 80 vacas Holandesas provenientes de um mesmo rebanho foram submetidas a biópsias endometriais e monitoradas na primeira, na terceira, na quinta e na sétima semanas após o parto, com o objetivo de verificar a relação entre transcrição gênica de receptores de padrões moleculares microbianos, ocorrências de infecções uterinas e fertilidade (Herath et al., 2009a). Foram selecionados quatro animais que tiveram metrite puerperal e metrite clínica seguidas de endometrite clínica e endometrite subclínica, que não ficaram gestantes nas três primeiras inseminações realizadas até 200 dias após o parto, mais quatro animais que não tiveram sinais de infecção uterina durante o puerpério e se tornaram gestantes na primeira inseminação, realizada entre 59 e 74 dias após o parto. Os animais do primeiro grupo, considerados inférteis, tiveram maior nível de transcrição gênica endometrial de TLR4 na primeira semana após o parto quando comparados aos férteis. Verificou-se maiores níveis de transcrição gênica endometriais de TLR4, CD14 e MD2 no endométrio de animais inférteis nas avaliações realizadas na primeira semana após o parto em relação às demais semanas. O isolamento de *E. coli* no conteúdo uterino na primeira semana após o parto foi relacionado com esse achado, uma vez que o reconhecimento dessas bactérias ocorre por meio do LPS, principal ligante do TLR4. Por sua vez, o TLR4 depende dos coreceptores CD14 e MD2 para reconhecer o LPS, como descrito anteriormente.

Em outro estudo sobre transcrição de genes pró-inflamatórios em vacas Holandesas, Chapwanya et al. (2009) realizaram biópsias endometriais com o objetivo de realizar exames histopatológicos e moleculares em nove vacas que tiveram diferentes graus de inflamação endometrial na segunda semana após o parto, e quatro vacas cíclicas sem sinais clínicos de doenças uterinas, não gestantes na nona semana após o parto. Os níveis de transcrição dos TLRs 4, 5, 6, 10 e do coreceptor CD14 foram maiores no primeiro grupo, sendo que o aumento do nível de transcrição dos TLRs 4, 6 e 10 foi relacionado com a maior gravidade dos processos inflamatórios. De acordo com os autores, a relação direta entre o aumento da transcrição endometrial de determinados receptores de padrões moleculares microbianos e a gravidade da inflamação pode estar relacionada com maior suscetibilidade à ocorrência de doenças uterinas. A *E. coli* foi a bactéria mais isolada em amostras do conteúdo uterino até duas semanas após o parto, não sendo verificadas no grupo de vacas com nove semanas de lactação. As outras bactérias isoladas foram *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., as quais também foram isoladas no presente estudo (Tabela 13).

É importante ressaltar que o aumento dos níveis de transcrição dos receptores de padrões moleculares microbianos pode estar associado não somente à presença de bactérias com potencial patogênico no ambiente uterino após o parto, mas também, aos DAMPs (do inglês *Damage-Associated Molecular Pattern Molecules*), que, geralmente, são moléculas endógenas, provenientes do núcleo ou do citoplasma de células lesadas, mortas ou necrosadas (Kannaki et al., 2011). Os DAMPs podem interagir com os receptores de padrões moleculares microbianos presentes nas células endometriais, ativando vias pró-inflamatórias e contribuindo para aumentar a resposta inflamatória uterina. O TLR2 e o

TLR4 são receptores associados ao reconhecimento de DAMPs, tendo sido confirmada a participação desses dois imunomediadores na indução de respostas inflamatórias quando estimulados com componentes da matriz celular, tais como, ácido hialurônico e proteoglicanos, *in vivo* e *in vitro* (Chen e Nunez, 2010). Portanto, não é possível afirmar que os maiores níveis de transcrição de TLR2 e TLR4 no primeiro dia após o parto nas vacas que apresentaram retenção de placenta estava relacionado somente com a presença de MAMPs, mas também, com o acúmulo de DAMPs no ambiente uterino.

Outros fatores podem estar relacionados com os achados do presente estudo, tais como, componentes genéticos e fatores metabólicos. Variações genéticas podem explicar diferenças nas respostas individuais do hospedeiro na presença de microrganismos com potencial patogênico no ambiente uterino (Horne et al., 2008; Sordillo et al., 2009). Em estudo recente, Pinedo et al. (2013) tentaram elucidar a associação entre ocorrências de infecções uterinas em vacas Holandesas e alterações genotípicas nas sequências de DNA dos TLRs relacionados com o reconhecimento de bactérias: TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 9 e 10. Porém, devido à interferência de fatores externos ligados aos animais e ao ambiente, como diferenças entre as ordens de parto, ocorrências de distocias e outras complicações puerperais, não foi possível estimar o verdadeiro papel dos componentes genéticos na suscetibilidade ou resistência às infecções uterinas.

Fatores metabólicos também podem influenciar na imunidade uterina das vacas Holandesas. Inicialmente, a defesa do ambiente uterino depende do reconhecimento dos MAMPs por seus respectivos receptores, presentes na superfície ou no interior das células endometriais. Em segundo plano, a defesa uterina depende também da atração de

células de defesa mais especializadas, como os neutrófilos, os macrófagos e os linfócitos. Quimiocinas liberadas pelas células endometriais são responsáveis pela atração dos leucócitos da circulação sanguínea. A CXCL8 por exemplo, é uma das quimiocinas mais estudadas, sendo reconhecida como principal fator de atração de neutrófilos para o ambiente uterino (Sheldon e Bromfield, 2011). A atuação dos neutrófilos no ambiente uterino é fundamental para combater a contaminação bacteriana em bovinos, porém, verifica-se que durante o periparto, a função neutrofílica encontra-se significativamente reduzida. Alterações metabólicas ocorridas no início da lactação das vacas de alta produção estão diretamente relacionadas com a redução acentuada da função neutrofílica e com o prolongamento do quadro de imunossupressão, aumentando o risco de ocorrência de metrite puerperal aguda. A gravidade do BEN está associada à menor atividade neutrofílica em vacas Holandesas com infecção uterina, verificando-se que esses animais apresentam menor ingestão de matéria seca e maiores concentrações plasmáticas de NEFA e BHBA, quando comparadas às vacas sadias, sem sinais de infecção uterina (Hammon et al., 2006).

3.8. Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos no primeiro e no sétimo dia após o parto, a temperatura retal e o período de involução uterina

Ao correlacionar os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos avaliados no presente estudo, foram observadas algumas correlações positivas ou negativas, significativas ($P < 0,05$) e altas ($r \geq 0,70$) nos grupos de vacas Holandesas sem retenção (Tabela 15) e com retenção de placenta (Tabela 16), no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Tabela 15. Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em vacas Holandesas sem retenção de placenta (RP), no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Transcrição gênica endometrial em vacas Holandesas sem RP no primeiro dia após o parto (r)								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,57	0,10	0,50	0,10	0,31	0,64	0,62	-0,07
TLR2		0,12	0,64	-0,31	0,33	0,41	0,19	-0,64
TLR4			0,21	0,10	-0,26	0,41	0,64	-0,43
TLR5				0,07	0,69	0,69	0,50	-0,43
TLR9					0,10	0,62	0,40	-0,21
NOD1						0,33	0,26	-0,46
NOD2							0,81*	-0,43
CD14								-0,21
Transcrição gênica endometrial em vacas Holandesas sem RP no sétimo dia após o parto (r)								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,29	-0,07	0,81*	0,43	0,43	0,40	0,76*	-0,43
TLR2		0,21	0,69	0,52	0,19	0,74*	0,81*	-0,36
TLR4			0,02	0,14	-0,52	0,14	0,26	0,25
TLR5				0,62	0,57	0,81*	0,93*	-0,75
TLR9					0,14	0,50	0,57	-0,79*
NOD1						0,55	0,33	-0,79*
NOD2							0,74*	-0,82*
CD14								-0,54

(*) Correlação de Spearman significativa ($P < 0,05$), nível alto ($r \geq 0,70$).

Tabela 16. Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em vacas Holandesas com retenção de placenta (RP), no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Transcrição gênica endometrial em vacas Holandesas com RP no primeiro dia após o parto (r)								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,62	0,10	0,83*	0,76*	0,62	0,98*	-0,12	-0,64
TLR2		-0,21	0,50	0,55	0,29	0,55	-0,17	-0,14
TLR4			0,29	0,19	0,21	0,19	-0,33	-0,07
TLR5				0,69	0,79*	0,90*	-0,14	-0,71
TLR9					0,33	0,81*	-0,14	-0,10
NOD1						0,69	0,07	-0,92*
NOD2							0,93	-0,64
CD14								-0,04
Transcrição gênica endometrial em vacas Holandesas com RP no sétimo dia após o parto (r)								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,40	0,14	0,62	-0,24	0,64	0,71	0,17	0,07
TLR2		-0,12	0,17	-0,33	0,50	0,74*	0,36	-0,39
TLR4			-0,33	0,02	-0,14	-0,24	0,33	-0,29
TLR5				0,02	0,43	0,62	-0,10	0,35
TLR9					-0,21	-0,31	-0,17	0,64
NOD1						0,38	-0,24	0,39
NOD2							0,48	-0,07
CD14								-0,29

(*) Correlação de Spearman significativa ($P < 0,05$), nível alto ($r \geq 0,70$).

A variação dos níveis de transcrição gênica endometriais relativas de forma simultânea entre dois ou mais receptores de padrões moleculares microbianos pode estar relacionada com a quantidade e com a patogenicidade das bactérias presentes no ambiente uterino (Herath et al., 2009a; Sheldon et al., 2010). O aumento ou a diminuição dos níveis de transcrição de forma simultânea depende da interação desses receptores com seus respectivos MAMPs. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que quanto maior a concentração de MAMPs, maior é a variação simultânea dos níveis de transcrição de determinados receptores em tecidos desafiados experimentalmente (Goldammer et al., 2004; Schaefer et al., 2004; Ibeagha-Awemu et al., 2007). No presente estudo, a ausência de correlações significativas entre os níveis de transcrição do TLR4 e dos coreceptores CD14 e MD2 nos dois grupos de vacas, sugere falhas no reconhecimento do LPS, o que pode favorecer a permanência de *E. coli* e outras bactérias Gram-negativas no ambiente uterino nas primeiras semanas após o parto.

Nas correlações entre os níveis de transcrição endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos e a temperatura retal no primeiro e no sétimo dia após o parto, foram encontradas apenas correlações não significativas ($P > 0,05$), médias ($0,40 < r < 0,70$) ou baixas ($r \leq 0,40$) nos dois grupos de vacas (Tabela 17).

Em geral, a presença de *E. coli* no ambiente uterino nas primeiras semanas após o parto pode resultar em elevação da temperatura corporal em animais com metrite puerperal aguda, devido à passagem da endotoxina LPS do ambiente uterino para a corrente sanguínea (Sheldon et al., 2004b). A interação entre o LPS, TLR4 e os seus coreceptores CD14 e MD2, ativa vias de sinalização celular que levam à produção de citocinas e quimiocinas, como o fator de necrose tumoral e as interleucinas 6 (CXCL6) e 8 (CXCL8). A presença dessas citocinas e quimiocinas na circulação sanguínea pode resultar em elevação da temperatura corporal, proporcionando um circuito de retroalimentação positiva para aumentar a mobilização de células de defesa (Sheldon e Dobson, 2004).

Apesar de terem sido observados elevados percentuais de vacas com isolados de conteúdo uterino positivos para *E. coli* (Gráfico 1) apresentando quadros febris (Gráfico 2) nos dois grupos experimentais, não houve relação entre os níveis de transcrição dos receptores de padrões moleculares microbianos e a temperatura retal no primeiro e no sétimo dia após o parto. Portanto, pode-se inferir que o aumento da temperatura retal pode estar relacionado com a liberação de citocinas a partir da ativação de imunomediadores que são capazes de responder ao estímulo sem necessidade de ocorrer aumento prévio dos níveis de transcrição gênica.

Tabela 17. Correlações (r) entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores CD14 e MD2, e a temperatura retal (TR) das vacas Holandesas sem retenção de placenta (RP) e Holandesas com RP no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).

Grupo	TR	TLR1/6	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
Holandesas sem RP	1 dpp	0,43	0,68	-0,30	0,11	-0,42	0,32	-0,02	-0,04	0,38
	7 dpp	0,07	0,02	0,37	0,23	-0,08	-0,16	0,22	0,17	0,29
Holandesas com RP	1 dpp	-0,48	0,08	0,54	0,00	0,04	0,11	0,02	0,38	-0,25
	7 dpp	0,10	0,06	-0,37	-0,13	-0,51	-0,58	-0,11	-0,41	-0,22

Não foram observadas correlações significativas (Spearman, $P > 0,05$).

Tabela 18. Correlações (r) entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores CD14 e MD2, e o período de involução uterina (IU) das vacas Holandesas sem e com retenção de placenta (RP), no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).

Grupo	IU	TLR1/6	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
Holandesas	1 dpp	0,57	0,83*	0,21	0,78*	0,51	0,42	0,68	0,64	-0,38
s/ e c/ RP	7 dpp	0,80*	0,30	-0,21	0,82*	0,06	0,50	0,65	0,17	-0,24

(*) Correlação de Spearman significativa ($P < 0,05$), nível alto ($r \geq 0,70$).

Devido à redução do número de animais durante o período experimental, foi necessário considerar conjuntamente os grupos de vacas sem e com retenção de placenta, sendo obtidas correlações significativas ($P < 0,05$) e altas ($r \geq 0,70$), positivas ou negativas, entre o período de involução uterina e os níveis de transcrição endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos, no primeiro e no sétimo dia após o parto (Tabela 18).

Respostas inflamatórias endometriais exacerbadas ocorridas na primeira semana após o parto estão associadas com persistência do quadro de infecção e atraso da involução uterina (Herath et al., 2009a). Como relatado anteriormente, no presente estudo foram observadas altas incidências de infecções uterinas nos grupos de vacas Holandesas sem e com retenção de placenta até 28 dias após o parto (Tabelas 11 e 12), com consequente atraso do processo de involução uterina (Tabela 14). Entre as correlações obtidas, verificou-se que maiores níveis de transcrição gênica endometriais de TLR2 e TLR5 no primeiro dia após o parto, e de TLR1/6 e TLR5 no sétimo dia após o parto, foram relacionados com maiores períodos de involução uterina. As variações dos níveis de transcrição gênica desses receptores podem estar relacionadas com o grau de inflamação do endométrio nos dois momentos de coleta das amostras, porém, por meio das análises utilizadas, não foi possível verificar se houve relação entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores em questão e a velocidade do processo de involução uterina das vacas avaliadas.

4. CONCLUSÕES

Os grupos de vacas Holandesas sem e com retenção de placenta apresentaram níveis de transcrição gênica endometriais semelhantes para todos os receptores de padrões moleculares microbianos considerados no presente estudo, no primeiro e no sétimo dia após o parto. Porém, os grupos experimentais não apresentaram o mesmo comportamento em relação à variação dos níveis de transcrição desses receptores entre os dois momentos de avaliação, sendo observada redução significativa da transcrição endometrial de TLR2, TLR4 e CD14 somente no grupo de vacas que tiveram retenção de placenta.

As lesões e traumas ocorridos nas camadas epitelial e estromal do endométrio, ocasionados pela retenção de placenta, podem ter influenciado nos mecanismos de defesa do útero, diminuindo a sua capacidade de regular a resposta inflamatória na primeira semana após o parto. As vacas com retenção de placenta apresentaram altas incidências de infecções uterinas, com persistência dos quadros clínicos até 28 dias após o parto e consequente atraso da involução uterina. Ao contrário do esperado, as vacas Holandesas sem retenção de placenta também tiveram altas incidências de infecções uterinas e atraso no processo de involução do útero.

Por meio das análises utilizadas, não foi possível verificar a existência de relação entre as ocorrências puerperais e os níveis de transcrição endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos.

CAPÍTULO III

OCORRÊNCIAS PUERPERAIS E TRANSCRIÇÃO GÊNICA ENDOMETRIAL DE RECEPTORES DE PADRÕES MOLECULARES MICROBIANOS EM VACAS GIR E F1 HOLANDÊS X GIR

1. INTRODUÇÃO

Comparadas às vacas Holandesas, as vacas zebuínas e mestiças Holandês x Zebu apresentam baixas incidências de infecções uterinas durante o puerpério, verificando-se ocorrências de 6% em vacas Gir (González Sánchez et al., 2008), 4% em vacas Holandês x Zebu (Camargos et al., 2013) e 0% em vacas F1 Holandês x Gir (Carvalho, 2009). A transcrição gênica de receptores de padrões moleculares microbianos no endométrio de vacas Holandesas após o parto já foi relatada, porém, ainda é desconhecida em vacas zebuínas e mestiças Holandês x Zebu, representadas no presente estudo pelas vacas Gir e F1 Holandês x Gir, respectivamente. Entre outros fatores, a suscetibilidade ou resistência das diferentes bases genéticas às infecções uterinas pode estar relacionada com a capacidade de reconhecer os microrganismos e regular a resposta inflamatória endometrial após o parto. Sendo assim, os objetivos da terceira parte desse estudo, são:

- Monitorar aspectos do puerpério, tais como, ocorrências de infecções uterinas, período de involução uterina e retorno da atividade ovariana, em grupos de vacas Gir e F1 Holandês x Gir;
- Avaliar os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos em vacas Gir e F1 no primeiro e no sétimo dia após o parto;
- Verificar se há relação entre as ocorrências puerperais e os níveis de transcrição endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos.

Como hipóteses, acredita-se que:

- As vacas Gir e F1 Holandês x Gir apresentam baixas incidências de transtornos puerperais;
- As vacas Gir e F1 apresentam níveis semelhantes de transcrição endometrial de receptores de padrões moleculares microbianos, no primeiro e no sétimo dia após o parto;
- Existe relação entre as ocorrências puerperais e os níveis de transcrição gênica dos imunomediadores avaliados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local, período e grupos experimentais

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental da EPAMIG de Felixlândia (MG), latitude $-18^{\circ}45'29''S$, longitude $-44^{\circ}53'56''W$ e altitude média de 614 metros. O período experimental foi de 18 de novembro de 2010 a 27 de março de 2011, época na qual ocorreu a maior concentração de partos nessa propriedade. Nove vacas Gir e 12 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta, foram submetidas a biópsias endometriais no primeiro e no sétimo dia após o parto. O grupo de vacas Gir foi composto por animais de 2^a à 5^a ordem de lactação, e o de vacas F1, por animais de 2^a à 11^a ordem de lactação.

Não ocorreram partos gemelares e não houve necessidade de intervenção nos partos das vacas Gir e F1 Holandês x Gir. As vacas Gir foram mantidas com a cria ao pé e com um touro da raça Holandesa, em pastagens de *Brachiaria decumbens* e/ou *Brachiaria brizantha*. Esses animais foram suplementados apenas com sal mineral, fornecido à vontade em cochos cobertos. As vacas F1 foram mantidas com um touro da raça Nelore em pastagens de *Brachiaria decumbens* e/ou *Brachiaria brizantha* e foram suplementadas com concentrado (Quadro 5, em anexo) durante a ordenha, a qual era realizada duas vezes ao dia. As vacas recebiam 1 Kg de ração para cada 3

litros de leite produzidos acima da média diária de 8 litros de leite. O sal mineral era fornecido em cochos presentes nas pastagens. Os bezerros das vacas F1 mamavam um dos tetos durante a ordenha e/ou mamavam o leite residual após a ordenha, dependendo do seu desenvolvimento. Nos intervalos entre as ordenhas, os bezerros eram mantidos separados das vacas. Até 42 dias após o parto, a média da produção diária de leite das vacas F1 foi de $20,3 \pm 3,9$ litros.

Durante o experimento, a variação da temperatura ambiente foi obtida por meio da aferição das temperaturas diárias máxima e mínima. A umidade relativa do ar foi calculada a partir das médias das temperaturas de bulbo seco (BS) e bulbo úmido (BU) obtidas diariamente às 7, 12 e 16 horas (Quadro 3, em anexo). O índice de temperatura e umidade (ITU) foi calculado pela fórmula sugerida por Pires et al. (1999), na qual: $ITU = 0,72 \times (BS + BU) + 40,6$ (Quadro 4, em anexo). A pluviosidade diária foi estimada a partir de dados pluviométricos da propriedade (Tabela 19).

Os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em

Experimentação Animal, CETEA/UFMG (Protocolo nº 049 / 2011, em anexo).

2.2. Monitoramento do puerpério

O puerpério foi monitorado, semanalmente, do 1º ao 42º dia após o parto. Foram avaliados o escore de condição corporal (ECC), a temperatura retal, a involução uterina, o retorno da atividade ovariana luteal (RAOL) e as ocorrências de infecções uterinas. Independente do quadro, as vacas Gir e F1 diagnosticadas com infecção uterina foram tratadas com oxitetraciclina de longa duração (20 mg/kg de peso vivo, IM). Os exames ginecológicos foram realizados por meio de palpação transretal, vaginoscopia e ultrassonografia. No 21º, 28º, 35º e 42º dias após o parto, foram feitos raspados endometriais com o objetivo de estimar a porcentagem de neutrófilos presentes no útero. Todos os procedimentos citados foram semelhantes aos adotados para as vacas Holandesas (Capítulo II).

2.3. Biópsias endometriais, extração de RNA, síntese de DNA complementar (cDNA) e Real Time quantitative Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Tabela 19. Parâmetros climáticos diários obtidos na Fazenda Experimental da EPAMIG de Felixlândia durante o período experimental.

Horário	Parâmetro	Médias \pm desvios padrão
7:00	Temperatura (°C)	22 \pm 2
	Umidade Relativa (%)	82 \pm 18
	ITU	72 \pm 2
12:00	Temperatura (°C)	30 \pm 4
	Umidade Relativa (%)	67 \pm 19
	ITU	80 \pm 4
16:00	Temperatura (°C)	32 \pm 4
	Umidade Relativa (%)	64 \pm 21
	ITU	83 \pm 4
Variação diária	Temperatura máxima (°C)	32 \pm 3
	Temperatura mínima (°C)	19 \pm 2
Média diária	Pluviosidade (mm)	5,9 \pm 12,7

Os procedimentos para realização das biópsias endometriais em vacas Gir e F1 Holandês x Gir e os protocolos laboratoriais para extração do RNA, síntese do cDNA e realização do qRT-PCR foram semelhantes aos descritos para as vacas Holandesas na metodologia do Capítulo II dessa tese. Os *primers* para amplificação de RNAm dos TLRs 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores MD2 e CD14, e normalizadores β -actina e GAPDH, foram os mesmos listados na Tabela 8.

2.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas adotadas no presente estudo foram semelhantes às descritas anteriormente no Capítulo II.

Na tentativa de elucidar se houve relação entre as ocorrências puerperais e os níveis de transcrição endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos, foram realizadas análises de regressão múltipla, sendo que os grupos de vacas anteriormente propostos (Holandesas com retenção de placenta, Holandesas, Gir e F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta) foram desconsiderados. As equações modelo foram determinadas a partir do exemplo $Y = \beta_0 + \beta_1 (X_1) + \beta_2 (X_2) + \dots$, em que:
 Y = Variável dependente ou explicada;
 $X_1; X_2; \dots$ = Variáveis independentes ou explicativas;
 $\beta_0; \beta_1; \beta_2; \dots$ = Parâmetros a estimar.

Nos modelos de equação obtidos a partir das análises de regressão múltipla, as ocorrências puerperais foram consideradas variáveis dependentes e os níveis de

transcrição endometrial dos receptores de padrões moleculares microbianos foram considerados variáveis independentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Escore de condição corporal durante o período experimental

De acordo com os critérios de avaliação da condição corporal de vacas leiteiras, propostos por Edmonson et al. (1989), não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos de vacas Gir e F1 Holandês x Gir quanto ao ECC médio ao parto e aos 42 dias após o parto (Tabela 20). Considerando a escala que varia de 1 (vaca muito magra) a 5 (vaca muito gorda), houve manutenção do ECC dos dois grupos de vacas durante o período experimental.

Para atender as demandas energéticas impostas pelo início da lactação, as vacas leiteiras mobilizam reservas corporais e apresentam redução significativa da condição corporal nas primeiras semanas após o parto. Vacas com ECC elevado ao parto tendem a apresentar maior mobilização de reservas corporais devido à redução acentuada na ingestão de alimentos (Waltner et al., 1993). Ao avaliar as mudanças no ECC (escala de 1 a 5) de vacas mestiças Holandês x Zebu, Freitas Júnior et al. (2008), observaram maior mobilização de reservas corporais entre o 1º e o 45º dia após o parto em vacas que apresentavam ECC ao parto maior ou igual a 3,25 (média igual a 3,71), quando comparadas ao grupo com ECC ao parto menor que 3,25 (média igual a 2,58).

Tabela 20. Escore de condição corporal (ECC) ao parto e aos 42 dias após o parto (médias \pm desvios padrão) de acordo com o grupo experimental.

Grupo	<i>n</i>	ECC ao parto (1 a 5)	<i>n</i>	ECC aos 42 dpp (1 a 5)
Gir sem retenção de placenta	09	3,7 \pm 0,4	09	3,6 \pm 0,4
F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	12	3,5 \pm 0,5	12	3,2 \pm 0,5

Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos de vacas (Teste de Mann Whitney) e entre os momentos de avaliação (Teste de Wilcoxon).

De maneira semelhante às vacas Holandesas, o monitoramento do ECC durante o periparto das vacas mestiças é essencial para prever como será a interferência do balanço energético negativo (BEN) nas ocorrências puerperais e no retorno à reprodução. Sugere-se que o ECC de vacas Holandês x Gir seja de 3,5 a 4,0 (escala de 1 a 5) no momento do parto, para evitar os efeitos do BEN na ocorrência de doenças puerperais e no RAOL (Ferreira et al., 2000). Esses autores observaram que a perda de até um ponto no ECC entre o 1º e o 90º dia após o parto não interferiu no RAOLC desses animais. No presente estudo, 83,3% (10/12) das vacas F1 Holandês x Gir apresentavam ECC de 3,5 a 4,0 ao parto. Esses animais foram capazes de manter a condição corporal e apresentaram baixas incidências de transtornos puerperais, porém, apenas 50% (6/12) ovularam até 42 dias após o parto.

3.2. Temperatura retal no primeiro e no sétimo dia após o parto

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) da temperatura retal média entre vacas Gir e F1 Holandês x Gir, no primeiro e no sétimo dia após o parto (Tabela 21). Aproximadamente 22% (2/9) das vacas Gir e 25% (3/12) das vacas F1 apresentaram temperatura retal elevada ($\geq 39,5^\circ\text{C}$) nos dois momentos de avaliação.

Como relatado no capítulo II, a temperatura retal é utilizada para estimar a temperatura corporal das vacas e varia de acordo com o estado de saúde, idade, raça, estação do ano, horário do dia, entre outros fatores (Smith e Risco, 2005). A temperatura de

$39,5^\circ\text{C}$ é considerada como limite superior para animais saudáveis. A hipertermia é um dos indicadores da presença de infecções uterinas agudas na primeira semana após o parto (Sheldon et al., 2006; Martins et al., 2013), porém, no presente estudo não houve relação entre essas ocorrências.

3.3. Ocorrências de infecções uterinas

De acordo com as definições de infecções uterinas propostas por Sheldon et al. (2006), não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos de vacas Gir e F1 Holandês x Gir, quanto às ocorrências de metrite puerperal aguda aos 7 dias após o parto, metrite clínica aos 14 dias após o parto, e, endometrite clínica aos 21, 28, 35 e 42 dias após o parto (Tabelas 22 e 23). Em relação às ocorrências de endometrite citológica, também não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos (Tabela 24).

As vacas zebuínas e mestiças Holandês x Zebu apresentaram baixas incidências de infecções uterinas quando comparadas às vacas Holandesas (Tabelas 11 e 12). González Sánchez et al. (1999b) relataram a ocorrência de 6,3% de casos de infecções uterinas durante o acompanhamento da involução uterina de 104 vacas Gir. Camargos et al. (2013) verificaram a incidência de 3,95% casos de infecção uterina em 380 vacas mestiças Holandês x Zebu durante o puerpério. Curiosamente, Carvalho (2009) não observou ocorrências de infecções uterinas ao monitorar o puerpério de 78 vacas Holandês x Zebu na mesma propriedade onde foi realizado o estudo atual.

Tabela 21. Temperatura retal (TR) no momento da biópsia (médias \pm desvios padrão), no primeiro e no sétimo dia após o parto, de acordo com o grupo experimental.

Grupo	<i>n</i>	TR um dia após o parto ($^\circ\text{C}$)	<i>n</i>	TR sete dias após o parto ($^\circ\text{C}$)
Gir sem retenção de placenta	09	39,2 \pm 0,3	09	38,8 \pm 0,5
F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	12	39,2 \pm 0,3	12	39,1 \pm 0,8

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de vacas (Teste *t* de Student, $P > 0,05$).

Tabela 22. Ocorrências de metrite puerperal aguda e metrite clínica em vacas Gir e F1 Holandês x Gir.

Grupo	7dpp	14dpp
Gir sem retenção de placenta	0,0% (0/9)	22,2% (2/9)
F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	8,3% (1/12)	16,6% (2/12)

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Teste Exato de Fisher, $P > 0,05$).

Tabela 23. Ocorrências de endometrite clínica em vacas Gir e F1 Holandês x Gir.

Grupo	21 dpp	28 dpp	35 dpp	42 dpp
Gir sem retenção de placenta	11,1% (1/9)	11,1% (1/9)	0,0% (0/9)	0,0% (0/9)
F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	8,3% (1/12)	0,0% (0/12)	16,6% (2/12)	0,0% (0/12)

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Teste Exato de Fisher, $P > 0,05$).

Tabela 24. Ocorrências de endometrite citológica em vacas Gir e F1 Holandês x Gir.

Grupo	21 dpp	28 dpp	35 dpp	42 dpp
Gir sem retenção de placenta	0,0% (0/9)	22,2% (2/9)	11,1% (1/9)	0,0% (0/9)
F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	25,0% (3/12)	8,3% (1/12)	8,3% (1/12)	0,0% (0/12)

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Teste Exato de Fisher, $P > 0,05$).

As baixas incidências de infecções uterinas em vacas zebuínas e mestiças Holandês x Zebu pode ser atribuída a ausência de fatores de risco, como partos gemelares, distocias e retenção de placenta. A boa condição higiênico-sanitária dos locais onde os animais foram mantidos também pode ser associada aos achados (Carvalho, 2009).

É difícil comparar as incidências de infecções uterinas entre diferentes estudos, por causa das variações inerentes às raças, ao período após o parto no qual a doença é detectada, aos métodos de diagnóstico, à ordem de parto dos animais avaliados, às características do rebanho, às práticas de manejo e às definições adotadas para os quadros de infecção (Lewis, 1997; LeBlanc, 2002b; Barlund et al., 2008; Dubuc et al., 2010b). Portanto, variações genotípicas e fenotípicas podem estar relacionadas com diferenças individuais nas respostas imunológicas ocorridas no ambiente uterino das vacas nas primeiras semanas após o parto (Horne et al., 2008; Sordillo et al., 2009; Pinedo et al., 2013).

3.4. Involução uterina e retorno da atividade ovariana luteal

Os períodos de involução uterina dos grupos de vacas Gir e F1 Holandês x Gir foram semelhantes ($P > 0,05$; Tabela 25). A evolução dos parâmetros de monitoramento da involução uterina encontra-se em anexo (Gráficos A9 a A15). Até 42 dias após o parto, não foi observada a presença de corpo lúteo em vacas Gir, e apenas 50% das vacas F1 haviam ovulado (Tabela 25).

O período de involução uterina das vacas Gir foi semelhante às médias relatadas nos estudos de González Sánchez et al. (1999a,b), que foram de $29,7 \pm 9,6$ e $30,3 \pm 10,1$ dias, respectivamente. Contudo, foi menor que a média obtida por Guilhermino et al. (1992): $41,7 \pm 3,4$ dias. No caso das vacas F1 Holandês x Gir, o período de involução uterina foi semelhante aos verificados por Araújo et al. (1974) e Carvalho (2009), e inferior ao de Lara (1985). A involução uterina de pluríparas mestiças Holandês x Zebu nesses estudos foi, em média, de 28,3 dias, 25,2 dias e 31,7 dias, respectivamente. Baixas incidências de infecções uterinas durante o puerpério podem estar relacionadas com a rápida involução uterina nos grupos de vacas Gir e F1 Holandês x Gir no presente estudo.

Tabela 25. Período de involução uterina e retorno da atividade ovariana luteal (RAOL) de acordo com o grupo experimental (médias \pm desvios padrão).

Grupo	n	Involução uterina (dias)	n	RAOL (dias)
Gir sem retenção de placenta	09	27,7 \pm 10,1	00	-
F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	12	25,1 \pm 4,7	06	38,5 \pm 5,9

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Teste *t* de Student, $P > 0,05$).

A ocorrência tardia da primeira ovulação, detectada após o término da involução uterina nos dois grupos de vacas, confirma que o período de involução não é afetado pelo atraso do RAOL (Paisley et al., 1986; González Sánchez et al., 1999b). O intervalo do parto à primeira ovulação das vacas Gir (média de 64,0 dias) foi muito superior ao período de involução uterina (média de 29,5 dias) no estudo de González Sánchez et al. (1999b), verificando-se que o aumento da concentração de progesterona, decorrente da formação do corpo lúteo, não influenciou na involução do útero.

Fatores genéticos exercem efeito significativo sobre a ocorrência da primeira ovulação, principalmente em condições tropicais. Raças taurinas apresentam anestro pós-parto mais curto que as raças zebuínas (Roche et al., 1992; Abeygunawardena e Dematawewa, 2004; Crowe, 2008; Ford et al., 2011). A influência da raça no RAOL ainda não é bem compreendida. Ao fazer comparações, diferentes manejos adotados após o parto não podem ser negligenciados (Short et al., 1990; Crowe, 2008).

A presença do bezerro pode ter sido o principal fator que contribuiu para a ausência de RAOL em vacas Gir no presente estudo, já que esses animais apresentavam boa condição corporal ao parto, a qual foi mantida durante o período experimental (Tabela 20). Borges et al. (2004) também não observaram ocorrência de ovulação em vacas Gir mantidas com seus bezerros e monitoradas por meio de ultrassonografia até 50 dias após o parto.

Enquanto as vacas leiteiras ordenhadas apresentam retorno da atividade ovariana

entre 15 e 45 dias após o parto, as vacas de corte que amamentam suas crias podem ovular pela primeira vez entre 30 e 130 dias após o parto, dependendo da condição corporal (Forde et al., 2011). Devido ao baixo estoque de LH na hipófise anterior, a supressão da ciclicidade no pós-parto precoce é independente do efeito da amamentação. A partir da segunda semana após o parto, o acúmulo de LH na hipófise é restabelecido, porém, observa-se supressão da liberação pulsátil desse hormônio e atraso do RAOL quando a vaca é mantida com seu bezerro (Williams et al., 1987; Grimard et al., 1995; Griffith e Williams, 1996). O prolongamento do anestro pós-parto é devido à ação inibitória dos peptídeos opióides endógenos sobre a liberação de GnRH e LH (Silveira et al., 1993). Essas substâncias são produzidas no sistema nervoso central e na hipófise anterior das vacas que amamentam suas crias e estão relacionadas com sinais exteroceptivos proporcionados pela visão e pelo olfato (Griffith e Williams, 1996).

Em relação aos 50% das vacas F1 Holandês x Gir que ovularam até 42 dias após o parto no presente estudo, a média de dias para detecção do primeiro corpo lúteo foi superior às relatadas por Araújo et al. (1974) e Lara (1985) para vacas mestiças Holandês x Zebu, que foram de 29,9 e 27,3 dias respectivamente.

A proporção de vacas leiteiras que não apresentam RAOL até 42 dias após o parto é um bom indicador da nutrição adequada de um rebanho. Se essa taxa ultrapassar 25%, a dieta deve ser examinada com cuidado, visando adotar estratégias para aumentar a ingestão de alimentos e

minimizar o BEN (Britt, 1992). O BEN está relacionado com nutrição inadequada, redução do ECC e aumento da produção de leite nas primeiras semanas após o parto, verificando-se atraso no RAOL (Opsomer et al., 2000; Rekwot et al., 2000; Abeygunawardena e Dematawewa, 2004; Crowe, 2008). Na presença de BEN, o atraso no RAOL é devido à menor pulsatilidade do LH, que resulta em falhas na ovulação do folículo dominante (Diskin et al., 2003; Butler, 2006). Como verificado na Tabela 20, o ECC das vacas F1 Holandês x Gir aos 42 dias após o parto foi semelhante ($P < 0,05$) ao ECC observado no dia do parto. Portanto, esses animais não tiveram redução da condição corporal durante o período experimental, indicando que não houve BEN, nem influência da condição corporal no RAOLC.

A supressão da liberação de GnRH pelo hipotálamo e dos pulsos de LH pela hipófise anterior nas primeiras semanas após o parto podem ser potencializados pela amamentação (Grimard et al., 1995). No presente estudo, as vacas F1 Holandês x Gir amamentavam seus bezerros duas vezes ao dia, durante e/ou após a ordenha. Contudo, no estudo de Ruas et al. (2006), diferentes manejos de ordenha não influenciaram no intervalo do parto ao primeiro estro de vacas Holandês x Zebu. Vacas ordenhadas sem a presença do bezerro, com presença momentânea ou com presença constante do bezerro, manifestaram o primeiro estro após o parto, em média, aos $100,1 \pm 66,7$ dias, $130,8 \pm 70,8$ dias e $119,8 \pm 52,6$ dias, respectivamente. A diminuição do ECC foi relacionada com o atraso do RAOLC.

No estudo de Carvalho (2009), vacas mestiças Holandês x Zebu com boa condição corporal, ovularam, em média, aos $51,6 \pm 23,3$ e aos $44,6 \pm 17,7$ dias após o parto nas estações chuvosa e seca, respectivamente. Do total de 51 vacas avaliadas, 80,0% ovularam até 90 dias após o parto. Esses dados sugerem que o

monitoramento das vacas F1 Holandês x Gir durante 42 dias no presente estudo foi insuficiente para detectar a ocorrência da primeira ovulação desses animais, a qual pode ocorrer, fisiologicamente, em momentos mais tardios após o parto.

3.5. Transcrição gênica endometrial de receptores tipo *Toll* 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, CD14 e MD2

Como relatado no Capítulo II da tese em questão, os valores de *Ct* da β -actina apresentaram maior estabilidade quando comparados aos valores de *Ct* do GAPDH, portanto, a β -actina foi escolhida como normalizador para o cálculo da transcrição gênica endometrial relativa dos receptores tipo *Toll* 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e dos coreceptores CD14 e MD2, em vacas Gir (Gráfico 6) e F1 (Gráfico 7).

De maneira semelhante às vacas Holandesas, o endométrio das vacas Gir e F1 Holandês x Gir possui amplo potencial de defesa contra bactérias patogênicas, sendo capaz de expressar todos os receptores de padrões moleculares microbianos considerados no presente estudo. Até o momento, a transcrição endometrial de imunomediadores em vacas Zebu e mestiças Holandês x Zebu não havia sido relatada. No primeiro dia após o parto, o nível de transcrição endometrial relativa de TLR5 em vacas Gir foi maior que os demais. Com exceção do TLR9 e do CD14, as variações dos níveis de transcrição dos receptores de padrões moleculares microbianos em vacas F1 Holandês x Gir entre o primeiro e o sétimo dia após o parto, foram parecidas com as observadas em vacas Gir. Foram encontradas diferenças pontuais entre os momentos de coleta das amostras ($P < 0,05$): as vacas Gir apresentaram maior nível de transcrição endometrial relativa de TLR5 no primeiro dia após o parto, enquanto as vacas F1, apresentaram maior nível de transcrição de TLR9 no sétimo dia após o parto.

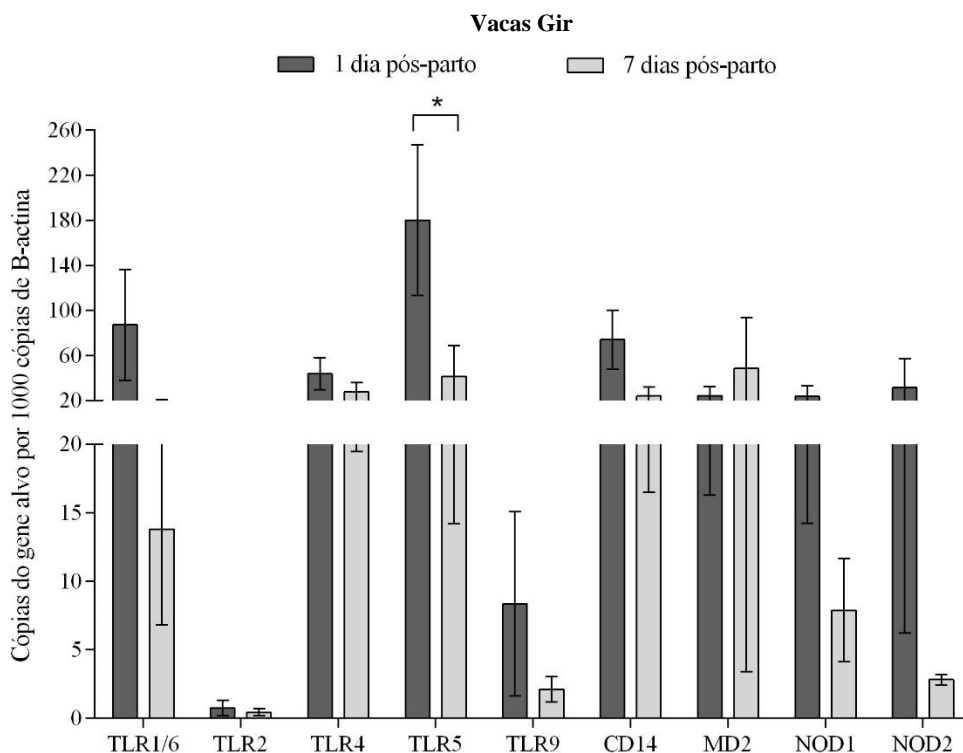


Gráfico 6. Transcrição gênica de receptores de padrões moleculares microbianos (médias \pm erros padrão) no endométrio de vacas Gir ($n = 7$), no primeiro e no sétimo dia após o parto. * Diferença significativa (teste de Wilcoxon), $P < 0,05$.

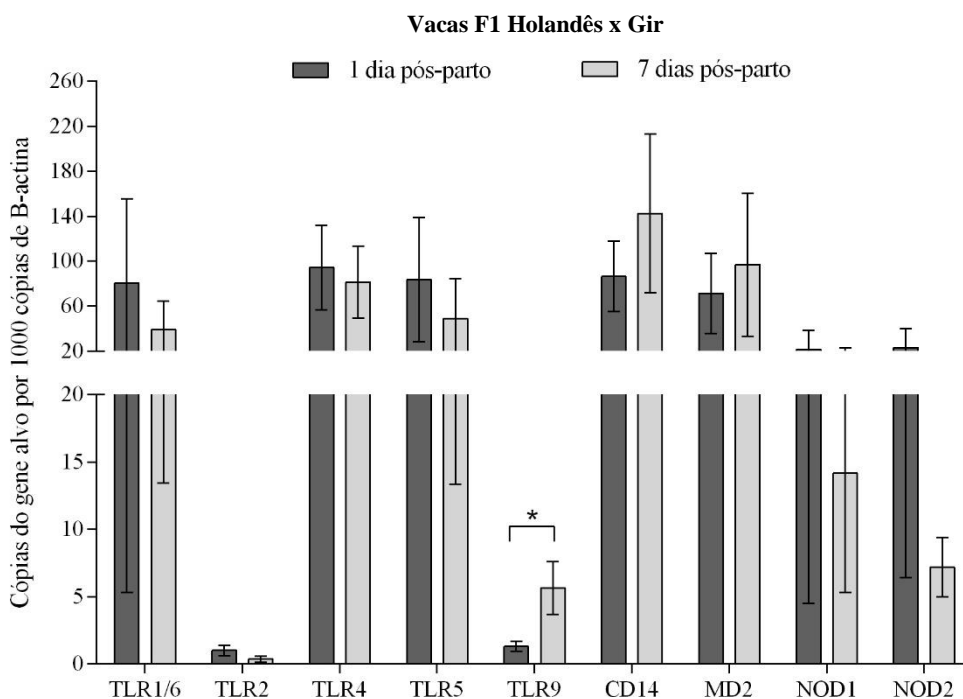


Gráfico 7. Transcrição gênica de receptores de padrões moleculares microbianos (médias \pm erros padrão) no endométrio de vacas F1 Holandês x Gir ($n = 9$), no primeiro e no sétimo dia após o parto. * Diferença significativa (teste de Wilcoxon), $P < 0,05$.

Diferentes fatores podem estar relacionados com as variações dos níveis de transcrição gênica de TLR5 e TLR9, entre os dois momentos de coleta das amostras de endométrio das vacas Gir e F1 Holandês x Gir, respectivamente. Entre outros, podemos citar: diferenças na quantidade e patogenicidade das bactérias presentes no ambiente uterino, mecanismos individuais de regulação da resposta imunológica e componentes genéticos.

O TLR5 é responsável pelo reconhecimento de um sítio altamente conservado da flagelina, essencial para a formação de protofilamentos e movimentação de bactérias flageladas (Hayashi et al., 2001; Smith et al., 2003). A motilidade por meio de flagelos, juntamente com a capacidade de aderência às células do hospedeiro por meio de fímbrias e a liberação de toxinas, são considerados importantes fatores de virulência associados à patogenicidade das bactérias que contaminam o útero de bovinos (Sheldon et al., 2010; Bicalho et al., 2012). Por sua vez, o TLR9 reconhece dinucleotídeos CpG (do inglês *cytosine-phosphate-guanosine*) não metilados, presentes em grande quantidade no DNA de células procariotas e raramente observado no DNA de eucariotas. Portanto, diferentes espécies de bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, são reconhecidas pelo TLR9 de acordo com a frequência de dinucleotídeos CpG não metilados presentes nas suas sequências de DNA (Dalpke et al., 2006).

As bactérias contaminantes do ambiente uterino das vacas após o parto são provenientes das fezes, do trato genital, da pele e do ambiente (Noakes et al., 1991; Rocha et al., 2004; Potter et al. 2010; Bicalho et al., 2012). No estudo de Rocha et al. (2004), as bactérias mais frequentes em amostras de conteúdo cervicovaginal de vacas mestiças Holandês x Gir obtidas durante o parto foram: *E. coli* (27,7%),

Staphylococcus coagulase negativa (21,8%) e *Streptococcus* spp. (19,8%). As bactérias menos frequentes nos isolados foram: *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium bovis*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva, *Enterobacter aerogenes*, *T. pyogenes*, *Citrobacter freundii* e *Citrobacter amalonaticus*. Verifica-se portanto, que a maioria dessas bactérias são semelhantes às isoladas a partir de amostras do conteúdo uterino de vacas Holandesas (Tabela 13). Porém, o útero de vacas mantidas em sistemas de manejo extensivo, intensivo ou semi-intensivo, está exposto a diferentes desafios bacterianos devido aos variados níveis de contaminação fecal do ambiente durante o parto.

No presente estudo, as vacas Gir foram mantidas em pastagens de *Brachiaria* spp. durante todo o período experimental, sendo trazidas ao curral somente no primeiro e no sétimo dia após o parto, para realização das biópsias endometriais. As vacas F1 Holandês x Gir também foram mantidas em pastagens de *Brachiaria* spp. durante o parto e o puerpério, porém, eram trazidas ao curral duas vezes ao dia e permaneciam nesse ambiente durante o período da ordenha e da suplementação com concentrado. Portanto, pode-se inferir que a diminuição do nível de transcrição gênica endometrial do TLR5 em vacas Gir e o aumento do nível de transcrição do TLR9 em vacas F1, entre o primeiro e o sétimo dia após o parto, podem estar relacionados com a exposição do útero desses animais a diferentes desafios bacterianos.

O estabelecimento de infecções uterinas depende do balanço entre a quantidade, patogenicidade dos microrganismos invasores e a capacidade de regular os mecanismos relacionados com a resposta inflamatória endometrial nas primeiras semanas após o parto (Noakes et al., 1991; Potter et al. 2010; Bicalho et al., 2012). No presente estudo, nenhuma vaca Gir

apresentava sinais clínicos de metrite puerperal aguda e somente uma vaca F1 Holandês x Gir apresentava essa afecção aos sete dias após o parto. Nos exames ginecológicos realizados até 42 dias após o parto, as incidências de infecções uterinas foram relativamente baixas nos dois grupos experimentais (Tabelas 22, 23 e 24) quando comparadas às incidências de infecções uterinas observadas nos grupos de vacas Holandesas sem e com retenção de placenta (Tabelas 11 e 12).

Variações genéticas podem explicar diferenças nas respostas individuais do hospedeiro na presença de patógenos (Horne et al., 2008; Sordillo et al., 2009). Ao observar os Gráficos 6 e 7, verificamos que as vacas Gir e F1 Holandês x Gir apresentaram níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos relativamente diferentes daqueles obtidos para as vacas Holandesas sem e com retenção de placenta (Gráficos 4 e 5), principalmente no primeiro dia após o parto. Porém, devido à interferência de fatores externos ligados aos animais e/ou ao ambiente, tais como, ordem de parto, distocias e outras complicações puerperais, não é possível estimar o verdadeiro papel dos componentes genéticos na suscetibilidade ou resistência à ocorrência de infecções uterinas (Pinedo et al., 2013).

3.6. Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos no primeiro e no sétimo dia após o parto, a temperatura retal e o período de involução uterina

Ao correlacionar os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos obtidos no primeiro e no sétimo dia após o parto, foram observadas algumas correlações positivas ou negativas, significativas ($P < 0,05$) e altas ($r \geq 0,70$) nos grupos de vacas

Gir (Tabela 26) e F1 Holandês x Gir (Tabela 27).

Como relatado no capítulo II, o aumento ou a diminuição dos níveis de transcrição dos receptores de padrões moleculares microbianos de forma simultânea depende da interação com seus respectivos MAMPs. Quanto maior a concentração de componentes imunostimuladores, maior é a variação simultânea dos níveis de transcrição de alguns imunomediadores (Goldammer et al., 2004; Schaefer et al., 2004; Ibeagha-Awemu et al., 2007).

Nas correlações entre os níveis de transcrição endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos e a temperatura retal no primeiro e no sétimo dia após o parto, foram encontradas apenas relações não significativas ($P > 0,05$), médias ($0,40 < r < 0,70$) ou baixas ($r \leq 0,40$) nos grupos de vacas Gir e F1 Holandês x Gir (Tabela 28).

A presença de *E. coli* no ambiente uterino pode resultar em elevação da temperatura corporal em vacas com metrite puerperal aguda, devido à passagem da endotoxina LPS do ambiente uterino para a corrente sanguínea (Sheldon et al., 2004b). No presente estudo foram observadas incidências relativamente baixas de metrite puerperal aguda (Tabela 22) e hipertermia (Item 3.2) na primeira semana após o parto, o que pode explicar a ausência de relação entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos e a variação da temperatura retal em vacas Gir e F1.

Entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos e o período de involução uterina, os grupos de vacas Gir e F1 apresentaram algumas correlações significativas ($P < 0,05$) e altas ($r \geq 0,70$), positivas ou negativas, no primeiro e no sétimo dia após o parto (Tabela 29).

Tabela 26. Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em vacas Gir, no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Transcrição gênica endometrial em vacas Gir no primeiro dia após o parto (r)								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,43	0,29	0,82*	0,61	0,39	0,14	0,93*	0,60
TLR2		0,75	0,25	0,46	-0,25	0,43	0,57	-0,37
TLR4			0,50	0,54	-0,29	0,57	0,39	-0,09
TLR5				0,57	0,43	0,14	0,79*	0,83
TLR9					0,18	0,75	0,43	-0,09
NOD1						-0,21	0,39	0,60
NOD2							0,04	-0,31
CD14								0,66
Transcrição gênica endometrial em vacas Gir no sétimo dia após o parto (r)								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,86*	0,57	0,79*	0,54	0,68	0,64	0,64	-0,17
TLR2		0,43	0,57	0,46	0,54	0,36	0,71	0,12
TLR4			0,43	0,04	0,04	0,79*	0,86*	-0,12
TLR5				0,86*	0,57	0,71	0,32	-0,67
TLR9					0,43	0,29	0,04	-0,46
NOD1						0,25	0,21	-0,06
NOD2							0,50	-0,76
CD14								0,35

(*) Correlação de Spearman significativa ($P < 0,05$), nível alto ($r \geq 0,70$).

Tabela 27. Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em vacas F1 Holandês x Gir, no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Transcrição gênica endometrial em vacas F1 Holandês x Gir no primeiro dia após o parto (r)								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	-0,22	0,08	0,78*	0,68	0,37	0,72*	0,55	0,45
TLR2		-0,40	-0,23	0,00	0,18	-0,23	0,17	0,21
TLR4			-0,32	0,13	-0,47	-0,27	0,27	-0,52
TLR5				0,68	0,70*	0,60	0,10	0,57
TLR9					0,47	0,17	0,57	0,09
NOD1						0,43	-0,10	0,36
NOD2							0,20	0,64
CD14								-0,14
Transcrição gênica endometrial em vacas F1 Holandês x Gir no sétimo dia após o parto (r)								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,29	0,12	0,83*	-0,10	0,87*	0,67	0,70*	0,57
TLR2		0,00	0,45	0,76*	0,55	0,21	0,64	-0,19
TLR4			0,13	-0,33	0,02	0,08	0,08	0,02
TLR5				-0,02	0,95*	0,37	0,52	0,55
TLR9					0,20	0,23	0,50	-0,48
NOD1						0,48	0,73*	0,45
NOD2							0,65	0,02
CD14								0,24

(*) Correlação de Spearman significativa ($P < 0,05$), nível alto ($r \geq 0,70$).

Tabela 28. Correlações (r) entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores CD14 e MD2, e a temperatura retal (TR) das vacas Gir e F1 Holandês x Gir, no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).

Grupo	TR	TLR1/6	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
Gir	1dpp	0,47	0,44	-0,09	-0,05	0,16	0,09	0,25	0,47	0,03
sem RP	7 dpp	0,20	0,02	0,52	0,63	0,58	-0,07	0,54	0,25	0,49
F1	1 dpp	-0,43	0,01	-0,30	-0,06	-0,43	0,01	-0,37	-0,44	-0,11
sem RP	7 dpp	-0,27	0,17	0,33	0,07	0,26	0,01	0,06	-0,09	0,61

Não foram observadas correlações significativas (Spearman, $P > 0,05$).

Tabela 29. Correlações (r) entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores CD14 e MD2, e o período de involução uterina (IU) das vacas Gir e F1 Holandês x Gir, no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).

Grupo	IU	TLR1/6	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
Gir	1dpp	0,19	-0,13	0,23	0,46	0,47	0,35	-0,04	0,08	0,00
sem RP	7 dpp	0,77*	0,46	0,15	0,73	0,69	0,81*	0,27	0,23	0,05
F1	1 dpp	-0,33	-0,75*	0,33	-0,33	-0,32	-0,44	-0,04	-0,33	-0,36
sem RP	7 dpp	-0,77*	-0,32	0,04	-0,36	0,08	-0,48	-0,84*	-0,62	-0,26

(*) Correlação de Spearman significativa ($P < 0,05$), nível alto ($r \geq 0,70$).

Ao considerar as correlações entre os níveis de transcrição endometrial de receptores de padrões moleculares microbianos e o período de involução uterina obtidas para o grupo de vacas Gir, quanto maiores os níveis de transcrição gênica de TLR1/6 e NOD1 no sétimo dia após o parto, maior o período de involução uterina desses animais. Ao contrário, no grupo de vacas F1, menores níveis de transcrição endometrial de TLR2 no primeiro dia após o parto, e de TLR1/6 e NOD2 no sétimo dia após o parto, foram associados a períodos mais prolongados de involução uterina (Tabela 29). As variações dos níveis de transcrição gênica de alguns receptores de padrões moleculares microbianos podem estar relacionadas com o grau de inflamação do endométrio no primeiro e no sétimo dia após o parto, porém, como ocorrido no estudo com vacas Holandesas (capítulo II), por meio das análises utilizadas, não foi possível verificar se houve relação entre os níveis de transcrição

endometrial desses receptores e a velocidade do processo de involução uterina das vacas Gir e F1.

3.7. Relação entre as ocorrências puerperais e os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos

Como tentativa de esclarecer se houve relação entre as ocorrências puerperais e os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares de patógenos obtidos no primeiro e no sétimo dia após o parto, foram criados diferentes modelos de equação a partir da realização de análises de regressão múltipla, sendo que os quatro grupos de vacas considerados anteriormente no presente estudo (Holandesas com retenção de placenta, Holandesas, Gir e F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta) foram analisados em conjunto visando aumentar o n amostral e a confiabilidade dos resultados.

Ao associar a ordem de parto (igual a 2 ou maior que 2), o escore de condição corporal ao parto (menor ou igual a 3,5 ou maior que 3,5) e a ocorrência ou não de retenção de placenta, com o nível de transcrição endometrial de cada receptor avaliado, verificou-se que a ordem de parto e a condição corporal das vacas ao parto não interferiram nos níveis de transcrição endometrial de nenhum receptor nos dois momentos de avaliação. Por sua vez, a ocorrência de retenção de placenta foi

associada de forma altamente significativa ($r = 0,4050$; $P < 0,01$) com o aumento dos níveis de transcrição endometrial de CD14 no primeiro dia após o parto (Tabela 30).

Os níveis de transcrição endometrial de todos os imunomediadores avaliados no presente estudo não foram associados com a variação da temperatura retal, nem com a ocorrência de febre (temperatura retal maior ou igual a $39,5^{\circ}\text{C}$) no primeiro e no sétimo dia após o parto ($P > 0,05$).

Tabela 30. Análises de regressão múltipla: efeitos da ordem de parto (OP), do escore de condição corporal (ECC) e da ocorrência de retenção de placenta (RP) sobre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores de padrões moleculares microbianos no primeiro dia pós-parto (dpp).

Parâmetros	R ² (%)	Parâmetro	Coefficiente	Intervalo de confiança (95%)	P
TLR1/6 1dpp	15,10	OP > 2	38,466	-63,010 a 139,94	0,4441
		ECC 1dpp > 3,5	-79,728	-180,34 a 20,880	0,1158
		RP	-78,186	-192,15 a 35,783	0,1710
TLR2 1dpp	8,53	OP > 2	-29,774	-77,079 a 17,531	0,2079
		ECC 1dpp > 3,5	12,568	-34,332 a 59,468	0,5875
		RP	-8,822	-61,951 a 44,306	0,7363
TLR4 1dpp	13,16	OP > 2	-100,03	-218,35 a 18,277	0,0943
		ECC 1dpp > 3,5	6,028	-111,27 a 123,33	0,9169
		RP	59,712	-73,165 a 192,59	0,3653
TLR5 1dpp	18,10	OP > 2	82,514	-17,344 a 182,37	0,1017
		ECC 1dpp > 3,5	-44,312	-143,32 a 54,692	0,3672
		RP	-77,132	-189,28 a 35,019	0,1700
TLR9 1dpp	6,03	OP > 2	4,335	-4,699 a 13,370	0,3342
		ECC 1dpp > 3,5	-2,258	-11,216 a 6,699	0,6097
		RP	1,890	-8,256 a 12,037	0,7057
CD14 1dpp	28,73	OP > 2	-49,409	-63,048 a 257,81	0,4895
		ECC 1dpp > 3,5	131,74	-11,507 a 274,98	0,0701
		RP	233,45	71,187 a 395,72	0,0064**
MD2 1dpp	10,60	OP > 2	30,544	-14,048 a 75,135	0,1717
		ECC 1dpp > 3,5	-15,814	-60,024 a 28,395	0,4699
		RP	-14,915	-64,996 a 35,166	0,5468
NOD1 1dpp	19,30	OP > 2	72,382	-20,702 a 165,47	0,1225
		ECC 1dpp > 3,5	75,215	-17,071 a 167,50	0,1062
		RP	102,20	-2,342 a 206,74	0,0550
NOD2 1dpp	6,69	OP > 2	-29,392	-136,93 a 78,145	0,5801
		ECC 1dpp > 3,5	56,716	-49,900 a 163,33	0,2852
		RP	-4,265	-125,04 a 116,51	0,9429

(**) Associação altamente significativa ($P < 0,01$) entre as variáveis.

Nos modelos de regressão múltipla utilizados para avaliar a eventual interferência dos níveis de transcrição endometrial dos receptores de padrões moleculares microbianos nas ocorrências de infecções uterinas aos 7 (metrite puerperal aguda), 14 (metrite clínica), 21 e 28 (endometrite clínica) dias após o parto, foram considerados somente os receptores que apresentaram alguma diferença significativa nas comparações realizadas anteriormente, entre o primeiro e o sétimo dia após o parto (TLR2, TLR4, TLR5, TLR9 e CD14). Algumas associações significativas ($P < 0,05$) foram observadas:

- O aumento da transcrição endometrial de CD14 ($r = 0,4700$) no primeiro dia após o parto foi associado com a ocorrência de metrite puerperal aguda (Tabela 31);

- A diminuição da transcrição endometrial de TLR2 ($r = -0,3956$) e o aumento da transcrição de CD14 ($r = 0,3297$) no primeiro dia após o parto, foram associados com a ocorrência de endometrite clínica aos 28 dias após o parto (Tabela 32).

Não foram encontradas associações significativas ($P > 0,05$) entre os níveis de transcrição gênica dos receptores de padrões moleculares microbianos e as ocorrências de endometrite subclínica aos 21 e aos 28 dias após o parto.

Menores níveis de transcrição de CD14 no primeiro dia após o parto foram associados de forma significativa ($r = -0,4643$; $P < 0,05$) com a ocorrência de involução uterina até 28 dias após o parto (Tabela 33).

Tabela 31. Análise de regressão múltipla: efeito dos níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp) sobre a ocorrência de metrite puerperal aguda (MPA).

Parâmetro	R ² (%)	Imunomediador	Coefficiente	Intervalo de confiança (95%)	P
MPA (7dpp)	47,09	TLR2 1dpp	-0,001444	-0,005843 a 0,002955	0,5013
		TLR2 7dpp	0,1327	-0,08785 a 0,3532	0,2239
		TLR4 1dpp	0,0004098	-0,001999 a 0,002819	0,7264
		TLR4 7dpp	-3,977E-05	-0,004720 a 0,004640	0,9860
		TLR5 1dpp	-0,001324	-0,003215 a 0,0005683	0,1600
		TLR5 7dpp	-0,0001124	-0,004035 a 0,003810	0,9529
		TLR9 1dpp	-0,001387	-0,01854 a 0,01577	0,8678
		TLR9 7dpp	-0,003570	-0,06267 a 0,05553	0,9010
		CD14 1dpp	0,001263	8,317E-05 a 0,002443	0,0371*
		CD14 7dpp	-0,001049	-0,002704 a 0,0006050	0,2007

(*) Associação significativa ($P < 0,05$) entre as variáveis.

Tabela 32. Análise de regressão múltipla: efeito dos níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp) sobre as ocorrências de endometrite clínica (EC) aos 28 dias após o parto.

Parâmetro	R ² (%)	Imunomediador	Coefficiente	Intervalo de confiança (95%)	P
EC (28dpp)	47,07	TLR2 1dpp	-0,004838	-0,009618 a -5,739E-05	0,0477*
		TLR2 7dpp	-0,002526	-0,2277 a 0,2226	0,9812
		TLR4 1dpp	-0,0001245	-0,002829 a 0,002580	0,9231
		TLR4 7dpp	0,0002735	-0,004833 a 0,005380	0,9106
		TLR5 1dpp	-0,001068	-0,003141 a 0,001006	0,2898
		TLR5 7dpp	0,001710	-0,002372 a 0,005791	0,3862
		TLR9 1dpp	-0,004446	-0,02591 a 0,01702	0,6653
		TLR9 7dpp	-0,02307	-0,08791 a 0,04177	0,4601
		CD14 1dpp	0,001987	0,0005086 a 0,003466	0,0118*
		CD14 7dpp	-7,406E-05	-0,001662 a 0,001514	0,9222

(*) Associação significativa ($P < 0,05$) entre as variáveis.

Tabela 33. Análise de regressão múltipla: efeito dos níveis de transcrição gênica endometriais de receptores de padrões moleculares microbianos no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp) sobre o período de involução uterina.

Parâmetro	R ² (%)	Imunomediador	Coefficiente	Intervalo de confiança (95%)	P
Inv. útero até 28dpp	44,97	TLR2 1dpp	0,002249	-0,006483 a 0,01098	0,5822
		TLR2 7dpp	0,1473	-0,1512 a 0,4459	0,3006
		TLR4 1dpp	0,002115	-0,002116 a 0,006346	0,2947
		TLR4 7dpp	-0,005166	-0,01276 a 0,002427	0,1624
		TLR5 1dpp	-0,0002079	-0,003003 a 0,002587	0,8729
		TLR5 7dpp	-0,0007091	-0,006033 a 0,004614	0,7748
		TLR9 1dpp	0,006579	-0,02050 a 0,03	0,6035
		TLR9 7dpp	0,03172	-0,05407 a 0,1175	0,4330
		CD14 1dpp	-0,003313	-0,006585 a -4,067E-05	0,0477*
		CD14 7dpp	0,001052	-0,001154 a 0,003258	0,3165

(*) Associação significativa ($P < 0,05$) entre as variáveis.

Apesar das poucas associações significativas obtidas a partir da realização das análises de regressão múltipla, os resultados foram relevantes. Verificou-se que a ocorrência de retenção de placenta implicou aumento do nível de transcrição gênica endometrial de CD14 no primeiro dia após o parto. Maiores níveis de transcrição de CD14 foram relacionados com a ocorrência de metrite puerperal aguda. Como verificado na Tabela 11, 88,8% das vacas Holandesas que tiveram retenção de placenta apresentaram esse tipo de infecção uterina aos sete dias após o parto. Maiores níveis de transcrição de CD14 também foram associados à ocorrência de endometrite clínica aos 28 dias após o parto. Nessa ocasião, 100% das vacas Holandesas que tiveram retenção de placenta apresentavam endometrite clínica (Tabela 11). Adicionalmente, maiores níveis de transcrição endometrial de CD14 no primeiro dia após o parto foram relacionados com atraso da involução uterina. Como observado na Tabela 14, as vacas Holandesas com retenção de placenta não haviam finalizado o processo de involução uterina até 28 dias após o parto. Ao contrário, a maioria das vacas Gir e F1 Holandês x Gir apresentavam involução uterina completa nessa ocasião (Tabela 25).

Até o momento, já havia sido relatado que a permanência da placenta no útero após o

parto interfere na contratilidade do miométrio, dificulta a drenagem do conteúdo remanescente da gestação e favorece a multiplicação de bactérias (Dohmen et al., 2000; Sheldon et al., 2004a; Hammon et al., 2006; Potter et al., 2010). Os resultados do presente estudo sugerem que a retenção de placenta também pode interferir nos mecanismos de regulação da resposta imunológica endometrial.

As lesões endometriais decorrentes de falhas na regulação da resposta inflamatória endometrial nas primeiras semanas após o parto podem resultar em infertilidade, e, conseqüentemente, aumento do descarte involuntário de vacas. Juntamente com as LBPs, o TLR4 e o MD2, o coreceptor CD14 apresenta papel fundamental no reconhecimento da *E. coli*, principal bactéria associada à ocorrência de metrite puerperal aguda na primeira semana após o parto. Falhas ocorridas na ativação desses receptores podem resultar em quadros inflamatórios exacerbados e/ou persistentes, seguidos de ocorrências de processos infecciosos e atraso da involução uterina (Rietdijk et al., 2008; Yunhe et al., 2013).

No estudo de Chapwanya et al. (2009), no qual foram comparados os níveis de transcrição gênica de diversos receptores de padrões moleculares microbianos e mediadores pró-inflamatórios em amostras

do endométrio de vacas Holandesas com diferentes graus de inflamação (na segunda semana após o parto) e vacas Holandesas sem sinais de inflamação (com nove semanas após o parto), a transcrição gênica de CD14, juntamente com outros receptores (TLRs 4, 5, 6 e 10) foi maior no primeiro grupo. A relação direta entre o aumento da transcrição endometrial desses receptores e a gravidade da resposta inflamatória foi relacionada com maior suscetibilidade à ocorrência de doenças uterinas.

Por meio das análises de regressão, foi possível verificar também que menores níveis de transcrição gênica endometriais de TLR2 no primeiro dia após o parto foram associados com a ocorrência de endometrite clínica no 28º dia após o parto. Os níveis de transcrição endometrial de TLR2 foram relativamente baixos para todos os grupos de vacas avaliados no presente estudo (Gráficos 4, 5, 6 e 7), no primeiro e no sétimo dia após o parto. Porém, somente o grupo de vacas Holandesas com retenção de placenta apresentaram redução significativa da transcrição de TLR2 entre o primeiro e o sétimo dia após o parto. Como relatado, o TLR2 está relacionado com o reconhecimento de MAMPs de bactérias Gram-positivas, tais como, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* spp. e *T. pyogenes*. As duas primeiras são frequentemente isoladas no conteúdo uterino após o parto, porém, geralmente, não estão associadas a lesões endometriais (Sheldon et al., 2004b; Willians et al., 2005). Por sua vez, a *T. pyogenes* é uma bactéria altamente patogênica e está diretamente relacionada com a ocorrência de infecções uterinas crônicas. Essa bactéria secreta uma exotoxina hemolítica termossensível, que causa danos irreversíveis ao endométrio (Miller et al, 2007). No estudo de Kaneko et al. (1997), *T. pyogenes* foi a bactéria mais frequente no conteúdo uterino de vacas com retenção de placenta aos 30 dias após o parto, indicando maior suscetibilidade à infecção por *T. pyogenes* nessa ocasião.

4. CONCLUSÕES

De maneira semelhante às vacas Holandesas, as vacas Gir e F1 Holandês x Gir apresentaram transcrição gênica endometrial de todos os receptores de padrões moleculares microbianos considerados no presente estudo. Entre o primeiro e o sétimo dia após o parto, houve diminuição do nível de transcrição gênica de TLR5 no grupo de vacas Gir e aumento do nível de transcrição de TLR9 no grupo de vacas F1. As diferenças observadas foram atribuídas a diversos fatores, tais como, quantidade e patogenicidade das bactérias presentes no ambiente uterino nos dois momentos de avaliação, capacidade de regular a resposta inflamatória endometrial e componentes genéticos.

Os dois grupos experimentais apresentaram baixas incidências de infecções uterinas até 42 dias após o parto. A involução uterina ocorreu antes da detecção da primeira ovulação e foi relativamente rápida. A presença constante da cria foi relacionada com o anestro pós-parto das vacas Gir, e a perda de condição corporal durante o período experimental, com as falhas de ovulação em 50% das vacas F1.

As associações entre ocorrências puerperais e transcrições relativas de imunomediadores indicam que a retenção de placenta pode interferir na modulação da resposta imunológica endometrial no primeiro dia após o parto, aumentando os níveis de transcrição gênica de CD14. Maiores níveis de transcrição endometrial de CD14 foram relacionados com a ocorrência de infecções uterinas agudas e crônicas, e com o atraso no processo de involução uterina.

Os resultados sugerem que vacas taurinas, zebuínas e mestiças apresentam diferentes mecanismos de regulação da imunidade inata uterina após o parto, os quais podem estar relacionados com suscetibilidade ou resistência às infecções uterinas.

CAPÍTULO IV

HISTOPATOLOGIA DO ENDOMÉTRIO DE VACAS ZEBU SUBMETIDAS A INFUSÃO UTERINA DE *ESCHERICHIA COLI* INATIVADA NA FASE DE ESTRO

1. INTRODUÇÃO

A contaminação do ambiente uterino pode ocorrer durante o coito ou após o parto. A contaminação do trato genital feminino superior durante a relação sexual está diretamente relacionada com a ocorrência de doença inflamatória pélvica e infertilidade em mulheres. Em rebanhos bovinos, as fêmeas são mais expostas a esse tipo de contaminação em propriedades que adotam a monta natural. A contaminação do útero durante o parto está associada à ocorrência de febre puerperal, doença responsável pela morte de milhares de mulheres nos países subdesenvolvidos. Em bovinos, altas incidências de infecções uterinas após o parto causam elevado impacto econômico para a atividade leiteira (Sheldon et al., 2009; Turner et al., 2012). As vacas podem ser utilizadas como modelos *in vivo* para estudar as interações patógeno-hospedeiro e os mecanismos relacionados com infecção e imunidade uterina, apesar das bactérias que causam infecções em humanos e bovinos serem diferentes (Sheldon et al., 2010; Sheldon e Bromfield, 2011).

Nas diversas fases do ciclo estral e da gestação, as células epiteliais e estromais do endométrio apresentam modificações nos mecanismos de defesa, que consistem em imunotolerância na presença de espermatozoides e do feto, considerados alogênicos, ou intolerância na presença de microrganismos com potencial patogênico. A regulação da resposta imunológica determina a importância do endométrio para a manutenção da fertilidade, verificando-se que processos inflamatórios

exacerbados e/ou persistentes são prejudiciais para o tecido (Kannaki et al., 2011; Turner et al., 2012). O estradiol e a progesterona parecem ser os principais responsáveis pela regulação da resposta imunológica e dos processos inflamatórios desencadeados pelas células endometriais (Herath et al., 2006; Davies et al., 2008; Borges et al., 2012), porém os mecanismos de atuação desses hormônios ainda não foram esclarecidos (Sheldon e Bromfield, 2011; Turner et al., 2012).

Herath et al. (2006) avaliaram a possível regulação da resposta imune inata por hormônios esteróides em células epiteliais e estromais do endométrio de bovinos, na presença de *E. coli* inativada ou cultura purificada de LPS, lipossacarídeo presente na parede celular dessa bactéria. O LPS está diretamente relacionado com a patogenicidade de determinados patótipos de *E. coli* e com a ocorrência de elevadas incidências de infecções uterinas agudas em vacas de alta produção nas primeiras semanas após o parto. Os autores observaram que houve redução acentuada da produção de PGE e PGF 2α pelas células endometriais na presença de progesterona quando comparada à produção obtida na presença de estradiol. Esses achados são condizentes com a interferência dos hormônios esteróides na imunidade uterina nas diferentes fases do ciclo estral dos bovinos. Verifica-se que a imunidade é reforçada no estro, quando o útero encontra-se mais suscetível à invasão de patógenos, e suprimida no diestro, quando o útero é preparado para receber o concepto (Lewis, 2003; Azawi, 2008).

Para compreender os mecanismos que atuam na regulação da resposta imune inata uterina dos bovinos, outros estudos foram realizados *in vitro* (Herath et al., 2009b; Cronin et al., 2012; Swangchan-Uthai et al., 2012; Borges et al., 2012; Yunhe et al., 2013). Um dos problemas verificados em estudos com culturas de células é a perda da

arquitetura do tecido e da relação intercelular, devido à remoção dos componentes da matriz extracelular, os quais são importantes para a manutenção da função do epitélio e do estroma endometriais (Borges et al., 2012).

Por outro lado, a caracterização histológica e molecular da resposta inflamatória endometrial *in vivo* depende da infusão uterina de microrganismos vivos ou inativados. A inoculação com determinados patótipos patogênicos de *E. coli* não inativados pode levar à ocorrência de quadros de endotoxemia e resultar na morte dos animais, como já foi relatado em estudos com bovinos (Del Vecchio et al., 1992), camundongos (Sheldon et al., 2010) e cabras (Shao et al., 2012). Portanto, para evitar a ocorrência indesejável de sinais clínicos de endotoxemia, optou-se no presente estudo pela inoculação dos animais com *E. coli* inativada. O objetivo foi avaliar as alterações teciduais ocorridas *in vivo*, no endométrio de vacas Zebu após a inoculação com suspensão de *E. coli* inativada por meio de infusão uterina na fase de estro. Espera-se que o LPS, juntamente com outros padrões moleculares microbianos da *E. coli*, estimulem a ocorrência de diferentes graus de inflamação endometrial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção de *E. coli* inativada

As amostras de *E. coli* foram obtidas a partir do isolamento de bactérias provenientes do conteúdo uterino de quatro vacas Holandesas com sinais clínicos de metrite puerperal aguda na primeira semana após o parto (secreção cervicovaginal sanguinopurulenta com odor fétido, temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$, desidratação e inapetência), as quais ainda não haviam sido submetidas a tratamento antibacteriano. Para coleta do conteúdo uterino de cada animal, uma seringa

descartável de 10 mL foi acoplada a uma pipeta rígida, utilizada para infusão uterina em vacas, protegida por uma camisa sanitária. Na entrada do útero, a camisa sanitária era rompida e após a coleta de uma amostra do conteúdo uterino, a pipeta era novamente envolvida pela camisa sanitária para evitar a contaminação do material pela secreção cervicovaginal. As amostras coletadas foram injetadas em tubos estéreis contendo um *swab* e ágar gel tipo Stuart, meio de transporte comercial específico para bactérias. Imediatamente após a coleta, os tubos foram encaminhados ao Laboratório de Bacteriologia da Escola de Veterinária da UFMG.

Com o auxílio de alças descartáveis estéreis, 0,1 mL de cada amostra de conteúdo uterino foi plaqueada em ágar MacConkey. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C , foram obtidas colônias de *E. coli* em todas as placas. Bactérias móveis e imóveis foram identificadas por meio de testes bioquímicos (meio de IAL). Em seguida, amostras dessas bactérias foram armazenadas a -80°C em solução contendo meio BHI e glicerol.

Para preparar as suspensões de *E. coli* inativada, soluções contendo bactérias móveis foram descongeladas e 0,1 mL de cada amostra foi plaqueado em ágar LB. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C , algumas colônias de bactérias foram inoculadas em meio LB líquido e mantidas em crescimento durante 18 horas, a 37°C , sob agitação. Em seguida, o meio inoculado foi centrifugado (3200 g, 10 minutos, 4°C) e o *pellet* de bactérias obtido foi ressuspenso em PBS estéril. As suspensões de *E. coli* foram ajustadas para concentrações de 1×10^7 UFC/mL e 1×10^9 UFC/mL por meio de um espectrofotômetro. Com o auxílio de pipetas sorológicas estéreis, as suspensões foram alíquotadas em tubos Falcon (30 mL de suspensão cada). As bactérias foram inativadas pelo calor em banho-maria (80°C

por 60 minutos) e as suspensões foram armazenadas a -4°C durante 48 horas. Para confirmar a ausência de contaminação e a inativação das bactérias, amostras das suspensões foram plaqueadas em ágar LB e mantidas em estufa a 37°C por aproximadamente 24 horas.

Duas amostras de suspensão de *E. coli* inativada com concentração de 1×10^7 UFC/mL e duas amostras com concentração de 1×10^9 UFC/mL foram infundidas em vacas Zebu cíclicas, com boa condição corporal, sem histórico de infecções uterinas. Os animais foram monitorados durante 48 horas e não foram observados sinais clínicos sistêmicos, como aumento da temperatura retal, diminuição da ingestão de alimentos e eliminação de secreção mucopurulenta pela vulva. Optou-se portanto, pela adoção da suspensão de *E. coli* inativada com concentração de 1×10^9 UFC/mL no presente estudo.

Todos os procedimentos adotados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA/UFMG (protocolo nº 335/2013, em anexo).

2.2. Sincronização do estro, infusão uterina de *E. coli* inativada e realização de biópsias endometriais no estro e no diestro

Na Fazenda Experimental da EPAMIG de Felixlândia - MG (FEFX), 11 vacas Zebu (bases genéticas Nelore e Gir) não gestantes, com ECC médio de $3,4 \pm 0,5$, foram selecionadas após a realização de exames ginecológicos seriados por meio de palpação transretal e ultrassonografia, nos quais não foram verificados sinais clínicos de infecção uterina e outras patologias reprodutivas. Os mesmos procedimentos foram adotados na Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa, localizada em Igarapé - MG, para selecionar 8 vacas Zebu (bases genéticas Nelore e outras) não gestantes, com ECC médio de $2,9 \pm 0,5$.

Para sincronizar o estro desses animais, foi adotado o seguinte protocolo hormonal:

- Dia 0: Aplicação IM de 1 mL de benzoato de estradiol (Estrogin®, Biofarm) e implante intravaginal de um dispositivo de progesterona de 1,9 g (CIDR®, Zoetis);
- Dia 7: Aplicação IM de 2 mL de cloprostenol sódico (Ciosin®, MSD Saúde Animal);
- Dia 8: Aplicação IM de 0,5 mL de cipionato de estradiol (ECP®, Pfizer) e retirada do dispositivo de progesterona.

A manifestação de estro foi monitorada de forma visual. Todos os animais foram submetidos a biópsias endometriais entre 36 e 48 horas após a retirada do implante de progesterona. A pinça de biópsia (protegida por uma camisa sanitária) foi conduzida através do trato genital até o corno direito para coleta de uma amostra do endométrio, a qual foi conservada em solução de formalina tamponada a 10%. Imediatamente após a realização da primeira biópsia endometrial, 30 mL de suspensão de *E. coli* inativada foram inoculados no útero de 6 animais da FEFX por meio de uma pipeta rígida, protegida por uma camisa sanitária e acoplada a uma seringa de 50 mL. Os outros 5 animais foram infundidos com 30 mL de PBS estéril. Os mesmos procedimentos foram adotados na Fazenda Experimental de Igarapé, onde foi realizada infusão uterina de *E. coli* inativada em 4 animais e infusão de PBS em outros 4 animais. Os critérios de escolha para infusão uterina de *E. coli* inativada ou PBS foram baseados na observação ou não de manifestação do estro ao final do protocolo hormonal, de acordo com a ordem de entrada dos animais no brete de contenção (Tabela 34).

No intervalo entre 8 e 12 horas após a infusão uterina de *E. coli* inativada ou PBS, os animais foram submetidos à segunda biópsia endometrial, sendo coletadas amostras do corno esquerdo.

Tabela 34. Distribuição das vacas da Fazenda Experimental da EPAMIG de Felixlândia (FEFX) e da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa (Igarapé) nos diferentes grupos experimentais.

Grupo	Local	Manifestaram estro	Não manifestaram estro	n parcial	n total
PBS	FEFX	03	02	05	09
	Igarapé	03	01	04	
<i>E. coli</i> inativada	FEFX	03	03	06	10
	Igarapé	03	01	04	

A temperatura retal foi monitorada antes e depois da realização das infusões uterinas de *E. coli* inativada ou PBS. Com o objetivo de prevenir o eventual estabelecimento de infecções uterinas, todos os animais receberam 30 mL de antibiótico intrauterino (Gentrin), após a realização da segunda biópsia endometrial.

Dez dias após a adoção dos procedimentos citados, os animais foram submetidos a novas biópsias endometriais na fase de diestro. A ocorrência da ovulação foi detectada por meio de ultrassonografia, verificando-se a presença e o tamanho do corpo lúteo.

Todas as amostras de endométrio foram encaminhadas ao Laboratório de Técnicas Histológicas do Setor de Patologia Geral do ICB/UFMG, em tubos contendo formalina tamponada a 10%.

2.3. Procedimentos laboratoriais

Para realização das análises histopatológicas, as amostras de endométrio fixadas em formalina tamponada a 10%, foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em blocos de parafina. Com o auxílio de um micrótomo, foram obtidos cortes histológicos de 4 µm de espessura. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina. As análises foram realizadas em microscópio óptico, sob aumento de 200X e/ou 400X. As amostras de um animal do grupo *E. coli* inativada foram descartadas devido à baixa qualidade dos cortes histológicos.

Os achados histopatológicos relacionados com hiperemia e hemorragia foram avaliados por meio dos escores: 0 (ocorrências ausentes); 1 (hiperemia discreta); 2 (hiperemia discreta a moderada e hemorragia discreta) ou 3 (hiperemia e hemorragia moderadas a intensas).

As ocorrências de edemas teciduais foram classificadas em escores: 0 (ausente); 1 (discreto); 2 (moderado) ou 3 (intenso).

Os achados associados à inflamação endometrial foram classificados em: 0 (ausente); 1 (discreta difusa ou superficial); 2 (moderada multifocal ou superficial) ou 3 (moderada difusa ou intensa multifocal).

2.4. Análises estatísticas

O teste Exato de Fischer foi utilizado para comparar os percentuais de alterações histopatológicas no endométrio (hiperemia/hemorragia, edema e inflamação), manifestação de estro, ovulação e ocorrências de febre entre os grupos experimentais (PBS e *E. coli* inativada) e entre os momentos de avaliação (antes das infusões uterinas no estro, após as infusões no estro, e no diestro).

Os testes *t* de Student e SNK foram utilizados para comparar as médias de temperatura retal e tamanho do corpo lúteo entre os dois grupos e entre os três momentos de avaliação, respectivamente. Previamente, os dados foram submetidos à avaliação da normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os testes de Mann Whitney e Friedman foram utilizados para comparar os escores de hiperemia/hemorragia, edema e inflamação endometrial, entre os grupos e entre os momentos de avaliação, respectivamente.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa *GraphPad InStat*, versão 3.10, considerando o nível de significância de 5% para todos os testes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Parâmetros reprodutivos e fisiológicos obtidos antes e após a infusão uterina de PBS ou *E. coli* inativada

As porcentagens de animais que manifestaram estro ao final do protocolo hormonal e de animais que ovularam dez dias depois de serem inoculados com PBS ou *E. coli* inativada por meio de infusão uterina foram semelhantes ($P > 0,05$; Tabela 35). Não foi observada diferença significativa do tamanho do corpo lúteo entre os animais que ovularam nos dois grupos, sendo encontradas médias de $2,42 \pm 0,9 \text{ cm}^2$ e $2,08 \pm 0,4 \text{ cm}^2$, respectivamente.

Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstram que o LPS pode interferir no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano das vacas, diminuindo a liberação de LH, ou, pode atuar diretamente nas células da granulosa do folículo dominante, interferindo na síntese de estradiol, com consequente atraso da ovulação, seguida de formação de corpos lúteo pequeno, com baixa capacidade de produzir progesterona (Sheldon et al., 2002a; Willians et al., 2007,

2008; Magata et al., 2014). No presente estudo, a ausência de diferenças significativas em relação à taxa de ovulação e ao tamanho do corpo lúteo entre os grupos de vacas inoculadas com PBS ou *E. coli* inativada na fase de estro, indica que a quantidade de LPS presente nas suspensões não foi suficiente para interferir na atividade ovariana e no ciclo estral desses animais.

As médias de temperatura retal dos grupos PBS e *E. coli* inativada não diferiram ($P > 0,05$) nos três momentos de avaliação (Tabela 36). A ocorrência de hipertermia (temperatura retal $\geq 39,5^\circ\text{C}$) foi observada em todos os grupos experimentais e em todos os momentos de avaliação, exceto no diestro para o grupo de vacas inoculadas com *E. coli* inativada (Tabela 37). As ocorrências de hipertermia antes e após a realização das infusões uterinas foram semelhantes entre os grupos, porém, a incidência de hipertermia em vacas inoculadas com *E. coli* inativada foi significativamente menor ($P < 0,05$) no diestro, quando comparada à incidência obtida após a infusão uterina no estro.

Em geral, a temperatura retal é utilizada para verificar a presença de febre em bovinos, sendo que o limite superior de $39,5^\circ\text{C}$ é fisiologicamente aceitável para os animais sadios (Van Saun, 2000; Koivisto et al., 2001; Sheldon et al., 2006; Martins et al., 2013). Porém, a temperatura corporal pode variar de acordo com a estação do ano e o horário do dia, verificando-se que nem sempre sua elevação está associada necessariamente à presença de febre (Smith e Risco, 2005).

Tabela 35. Percentuais de vacas que manifestaram estro ao final do protocolo hormonal e de animais que ovularam dez dias após receberem infusão uterina de PBS ou *E. coli* inativada, de acordo com o grupo experimental.

Parâmetro	PBS	<i>E. coli</i> inativada
Animais que manifestaram estro ao final do protocolo hormonal	66,7% (6/9)	60,0% (6/10)
Animais que ovularam dez dias depois da infusão	77,8% (7/9)	70,0% (7/10)

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (teste Exato de Fisher; $P > 0,05$).

Tabela 36. Temperatura retal no momento da biópsia (médias \pm desvios padrão) de acordo com o momento de avaliação.

Momento de avaliação	n	PBS	n	<i>E. coli</i> inativada
Antes da infusão uterina no estro (°C)	09	39,2 \pm 0,4Aa	10	39,0 \pm 0,6Aa
Após a infusão uterina no estro (°C)	09	39,3 \pm 0,3Aa	10	39,3 \pm 0,5Aa
No diestro (°C)	09	39,1 \pm 0,4Aa	10	38,9 \pm 0,5Aa

Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos (teste *t* de Student) e entre os momentos de avaliação (teste Student Newman Keuls).

Tabela 37. Ocorrências de hipertermia (temperatura retal $\geq 39,5^\circ\text{C}$) de acordo com o momento de avaliação.

Temperatura retal $\geq 39,5^\circ\text{C}$	PBS	<i>E. coli</i> inativada
Antes da infusão uterina no estro	22,2 % (2/9)Aa	30,0% (3/10)Aa
Após a infusão uterina no estro	33,3% (3/9)Aa	60,0% (6/10)Ba
No diestro	22,2 % (2/9)Aa	00,0% (0/10)Aa

Percentuais seguidos de letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Exato de Fisher ($P < 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Contudo, a maior incidência de hipertermia em vacas inoculadas com *E. coli* inativada na fase de estro, em relação à incidência observada no diestro, pode estar relacionada com a presença da endotoxina LPS no ambiente uterino. A interação entre o LPS, o TLR4 e os coreceptores CD14 e MD2, ativa uma das vias de sinalização celular, estimulando a produção endometrial de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, entre outros mediadores pró-inflamatórios. A passagem do LPS e/ou mediadores inflamatórios do ambiente uterino para a corrente sanguínea pode ser detectada por receptores hipotalâmicos responsáveis pela termorregulação, resultando em elevação do ponto de equilíbrio da temperatura corporal e ocorrência de quadros febris (Sheldon e Dobson, 2004; Sheldon et al., 2004b).

3.2. Análises histopatológicas do endométrio no estro (antes e após a infusão uterina de PBS ou *E. coli* inativada) e no diestro

Considerando os escores de hiperemia/hemorragia e edema tecidual que consistiram basicamente em: 0 (parâmetro ausente), 1 (ocorrência discreta), 2 (ocorrência moderada) e 3 (ocorrência grave), não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos de

vacas inoculadas com PBS ou *E. coli* inativada, nem entre os três momentos de avaliação (Tabelas 38 e 40). As incidências desses achados foram semelhantes, observando-se a presença de diferentes escores de hiperemia/hemorragia e edema nas fases de estro (antes e depois da infusão uterina de *E. coli* inativada ou PBS) e diestro (Tabelas 39 e 41).

Quanto aos achados histopatológicos relacionados com alterações inflamatórias no endométrio, caracterizadas por infiltrados neutrofílicos de distribuição superficial, multifocal, periglandular ou difusa, com intensidade variável, as vacas inoculadas com *E. coli* inativada apresentaram escore de inflamação significativamente maior ($P < 0,05$) que as vacas inoculadas com PBS. Entre os momentos de avaliação, o maior ($P < 0,05$) escore de inflamação endometrial foi obtido após a inoculação com *E. coli* inativada (Tabela 42). Ao comparar as ocorrências de inflamações endometriais após a infusão uterina de PBS ou *E. coli*, considerando a associação dos escores 0 ou 1 (ausente ou discreto) e 2 ou 3 (moderado ou grave), foi observada diferença altamente significativa ($P < 0,01$) entre os grupos. No diestro, nenhum animal apresentou inflamação endometrial grave (Tabela 43).

Tabela 38. Escores de hiperemia/hemorragia endometriais (médias, medianas, mínimo e máximo) em vacas Zebu submetidas a biópsias no estro (antes e depois da infusão uterina) e no diestro. Escala: 0 a 3.

Momento avaliação	n	Infusão uterina de PBS				Infusão uterina de <i>E. coli</i> inativada			
		Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
Estro antes	9	1,7	2	0	3	0,7	1	0	2
Estro depois	9	1,1	1	0	2	1,3	1	0	3
Diestro	9	1,6	2	0	3	2,0	2	0	3

Não foram observadas diferenças significativas (testes de Mann Whitney e Friedman; $P > 0,05$).

Tabela 39. Frequências dos escores de hiperemia/hemorragia em amostras do endométrio de vacas Zebu.

Momento da avaliação	Escores	PBS	<i>E. coli</i> inativada
Antes da infusão uterina no estro	0	11,1% (1/9)	44,4% (4/9)
	1	22,2% (2/9)	44,4% (4/9)
	2	55,6% (5/9)	11,1% (1/9)
	3	11,1% (1/9)	0,0% (0/9)
Após a infusão uterina no estro	0	11,1% (1/9)	22,2% (2/9)
	1	66,7% (6/9)	44,4% (4/9)
	2	22,2% (2/9)	11,1% (1/9)
	3	0,0% (0/9)	22,2% (2/9)
Diestro	0	22,2% (2/9)	11,1% (1/9)
	1	22,2% (2/9)	11,1% (1/9)
	2	33,3% (3/9)	44,4% (4/9)
	3	22,2% (2/9)	33,3% (3/9)

Não foram observadas diferenças significativas (teste Exato de Fisher; $P > 0,05$).

Tabela 40. Escores de edema endometrial (médias, medianas, mínimo e máximo) em vacas Zebu submetidas a biópsias uterinas no estro (antes e depois da infusão uterina) e no diestro. Escala: 0 a 3.

Momento avaliação	n	Infusão uterina de PBS				Infusão uterina de <i>E. coli</i> inativada			
		Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
Estro antes	9	1,3	1	0	3	0,9	1	0	2
Estro depois	9	1,0	1	0	2	1,3	1	0	3
Diestro	9	0,8	1	0	2	1,6	1	0	3

Não foram observadas diferenças significativas (testes de Mann Whitney e Friedman; $P > 0,05$).

Tabela 41. Frequências dos escores de edema em amostras do endométrio de vacas Zebu.

Momento da avaliação	Escores	PBS	<i>E. coli</i> inativada
Antes da infusão uterina no estro	0	22,2% (2/9)	33,3% (3/9)
	1	33,3% (3/9)	44,4% (4/9)
	2	33,3% (3/9)	22,2% (2/9)
	3	11,1% (1/9)	0,0% (0/9)
Após a infusão uterina no estro	0	22,2% (2/9)	22,2% (2/9)
	1	55,6% (5/9)	44,4% (4/9)
	2	22,2% (2/9)	11,1% (1/9)
	3	0,0% (0/9)	22,2% (2/9)
Diestro	0	33,3% (3/9)	11,1% (1/9)
	1	55,6% (5/9)	44,4% (4/9)
	2	11,1% (1/9)	22,2% (2/9)
	3	0,0% (0/9)	22,2% (2/9)

Não foram observadas diferenças significativas (teste Exato de Fisher; $P > 0,05$).

Tabela 42. Escores de inflamação endometrial (médias, medianas, mínimo e máximo) em vacas Zebu submetidas a biópsias uterinas no estro (antes e depois da infusão uterina) e no diestro. Escala: 0 a 3.

Momento avaliação	n	Infusão uterina de PBS				Infusão uterina de <i>E. coli</i> inativada			
		Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
Estro antes	9	0,0Aa	0	0	0	0,0Aa	0	0	0
Estro depois	9	0,6Aa	1	0	1	2,1Bb	2	0	3
Diestro	9	0,3Aa	0	0	2	0,2Aa	0	0	1

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma coluna e letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$) pelos testes de Friedman e Mann Whitney, respectivamente.

Tabela 43. Frequências dos escores de inflamação em amostras do endométrio de vacas Zebu.

Momento da avaliação	Escores	PBS	<i>E. coli</i> inativada
Antes da infusão uterina no estro	0	100,0% (9/9)	100,0% (9/9)
	1	0,0% (0/9)	0,0% (0/9)
	2	0,0% (0/9)	0,0% (0/9)
	3	0,0% (0/9)	0,0% (0/9)
Após a infusão uterina no estro	0	44,4% (4/9)	11,1% (1/9)
	1	55,5% (5/9)	11,1% (1/9)
	2	0,0% (0/9)	33,3% (3/9)
	3	0,0% (0/9)	44,4% (4/9)
Diestro	0	77,8% (7/9)	77,8% (7/9)
	1	11,1% (1/9)	22,2% (2/9)
	2	11,1% (1/9)	0,0% (0/9)
	3	0,0% (0/9)	0,0% (0/9)

^{a,b} Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença altamente significativa entre os grupos, considerando animais com escores 0 ou 1 e animais com escores 2 ou 3 (teste Exato de Fisher; $P < 0,01$).

Ao observar a Figura 1, referente às amostras do endométrio de uma vaca do presente estudo que não apresentou sinais de inflamação nas fases de estro, antes (A) e depois (B) da infusão uterina de *E. coli* inativada, e de diestro (C), verifica-se que os achados histológicos são semelhantes aos descritos por Monteiro et al. (2003), em um estudo comparativo com vacas e novilhas zebuínas, no qual os autores verificaram que, histologicamente, o endométrio de fêmeas da raça Nelore é revestido por epitélio pseudoestratificado cilíndrico, frequentemente intercalado por epitélio simples, cilíndrico ou cúbico. Glândulas endometriais e vasos sanguíneos de diferentes calibres podem ser observados no estroma. As glândulas endometriais são revestidas por epitélio cilíndrico simples e na fase de estro, podem apresentar dilatação devido ao aumento da produção de muco.

Ohtanil et al. (1993) observaram a ocorrência de hemorragia e hiperemia endometriais somente nos dias 0 e 1 do ciclo estral, em um estudo no qual foram caracterizadas as alterações histológicas ocorridas no epitélio e no estroma do endométrio entre o dia 0 (dia da manifestação do estro) e o dia 20 do ciclo estral de fêmeas bovinas. No presente estudo, diferentes escores de hiperemia e hemorragia foram observados nas amostras de endométrio obtidas no dia da manifestação do estro, por meio das biópsias realizadas antes e depois da infusão uterina de *E. coli* inativada ou PBS. Porém, a maioria das amostras de endométrio dos dois grupos experimentais também apresentou hemorragia e hiperemia na fase de diestro (Tabela 39), apesar da baixa ocorrência de quadros inflamatórios nessa ocasião (Tabela 43).

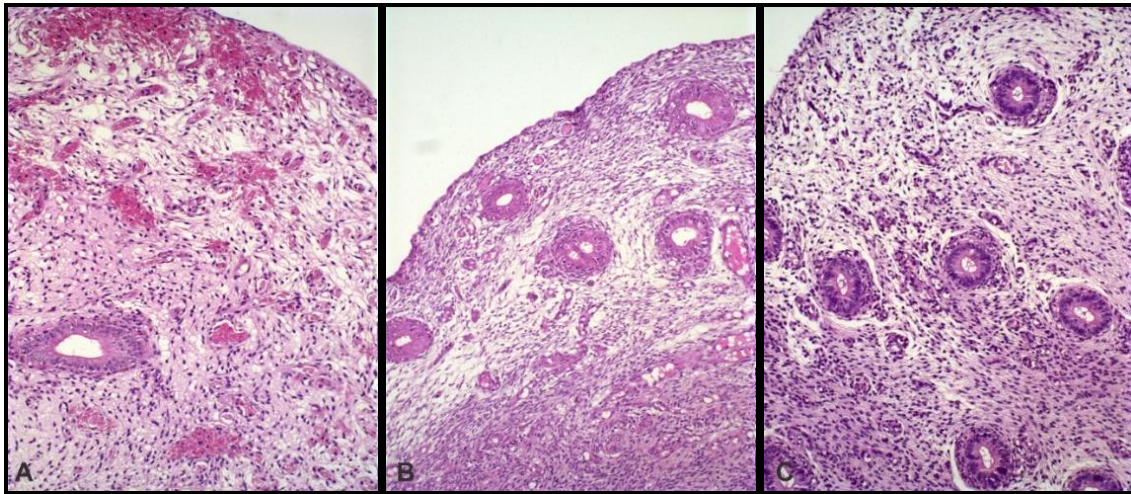


Figura 1. Amostras do endométrio de vaca Zebu inoculada com *Escherichia coli* inativada por meio de infusão uterina na fase de estro. Ausência de sinais de inflamação antes da infusão (A), depois da infusão (B) e no diestro (C). H.E., 200X.

Quanto à presença de edema tecidual, nas caracterizações histológicas do endométrio realizadas por Ohtanil et al. (1993) durante as diferentes fases do ciclo estral de fêmeas bovinas, essa ocorrência foi mais evidente no dia da manifestação do estro, porém, foi observada na maioria das amostras avaliadas durante todo o ciclo estral, o que justifica os achados obtidos no presente estudo. Na fase de estro, a maior intensidade de edema no estroma endometrial está relacionada com elevadas concentrações plasmáticas de hormônios estrogênicos em bovinos, verificando-se vasodilatação local, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da produção de muco e dilatação das glândulas endometriais (Lewis, 2003; Azawi, 2008).

Além de atuarem como barreiras físicas, as células epiteliais e estromais do endométrio são consideradas fundamentais para a ativação das respostas imunológicas inata e adquirida. Variações nas concentrações de hormônios esteróides durante o ciclo estral podem influenciar na organização das camadas endometriais, resultando em alterações histológicas, funcionais e imunológicas. Alguns microrganismos com potencial patogênico, como a *E. coli*, são capazes de alterar a integridade do epitélio

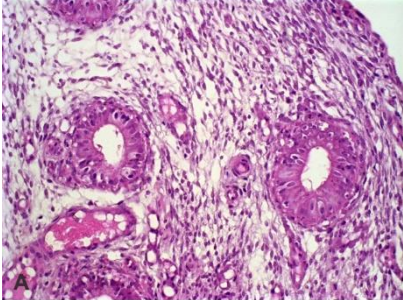
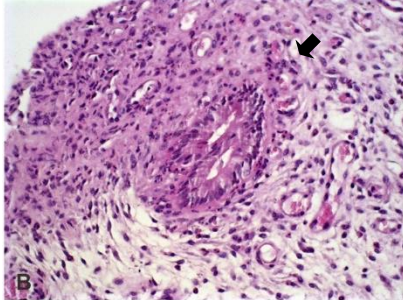
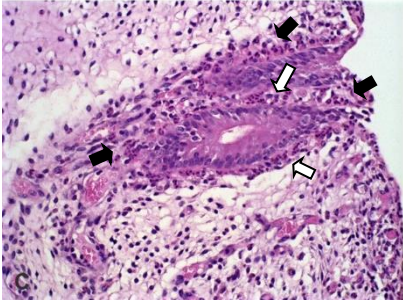
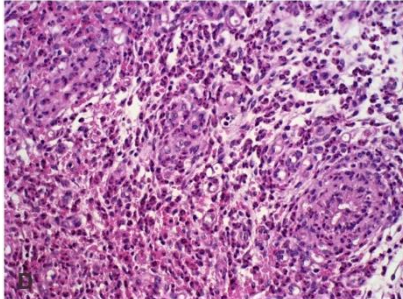
endometrial, interferindo nas conexões intercelulares e na permeabilidade seletiva das células epiteliais. Na presença de microrganismos invasores, a secreção de citocinas e quimiocinas pelas células epiteliais e estromais possibilita a comunicação entre o epitélio e o estroma endometriais, favorecendo o recrutamento de células de defesa (Hickey et al., 2011; Amjadi et al., 2014).

A capacidade de combater a contaminação uterina depende, inicialmente, da ativação dos mecanismos relacionados com a imunidade inata. Ao reconhecerem seus respectivos MAMPs, receptores presentes na membrana externa ou no citoplasma das células epiteliais e estromais do endométrio, desencadeiam respostas inflamatórias com o objetivo de eliminar os microrganismos invasores (Herath et al., 2009; Chapwanya et al., 2010). Em segundo plano, a defesa uterina depende da atração de células de defesa mais especializadas, tais como neutrófilos e macrófagos. As quimiocinas liberadas pelas células endometriais são responsáveis pela atração de leucócitos da circulação sanguínea. A CXCL8 por exemplo, é uma das quimiocinas mais estudadas, sendo reconhecida como principal fator de atração de neutrófilos

para o ambiente uterino (Sheldon e Bromfield, 2011). No presente estudo, as amostras de endométrio das vacas que receberam infusão uterina de *E. coli* inativada apresentaram diferentes escores de inflamação, variando de 1 (leve) a 3 (grave), de acordo com a presença de infiltrados neutrofílicos (Tabela 44). Em

torno de 90% (8/9) das vacas do presente estudo apresentaram algum grau de inflamação endometrial após a infusão uterina de *E. coli* inativada durante o estro. Desses, dois animais apresentavam inflamação endometrial discreta dez dias depois da realização desse procedimento, na fase de diestro (Tabela 43).

Tabela 44. Achados histopatológicos relacionados com a ocorrência ou não de inflamação endometrial após infusão uterina de *E. coli* inativada em vacas Zebu no estro. HE, 400X.

Escore	Exemplos	Achados histopatológicos
0		<p>Amostra de endométrio sem inflamação:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Epitélio endometrial intacto; - Glândulas endometriais dilatadas; - Epitélio glandular regular; - Ausência de infiltrados neutrofílicos; - Vasos sanguíneos bem definidos.
1		<p>Amostra de endométrio com inflamação discreta:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Presença de poucos infiltrados neutrofílicos multifocais superficiais (seta cheia); - Glândulas endometriais parcialmente deformadas; - Epitélio glandular irregular.
2		<p>Amostra de endométrio com inflamação moderada:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Infiltrados neutrofílicos multifocais mais evidentes (setas cheias); - Infiltrados neutrofílicos periglandulares (setas vazias); - Alterações vasculares.
3		<p>Amostra de endométrio com inflamação grave:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Infiltrados neutrofílicos intensos difusos; - Glândulas endometriais degeneradas; - Hiperemia/Hemorragia grave.

Na presença de microrganismos com potencial patogênico, os neutrófilos são as células de defesa recrutadas mais rapidamente da circulação sanguínea para o ambiente uterino. Posteriormente, macrófagos e linfócitos também auxiliam na remoção dos patógenos. Quanto mais grave o processo inflamatório, maior a quantidade de leucócitos presentes no tecido endometrial (Sheldon e Dobson, 2004; Chapwanya et al., 2009).

Além de promover a remoção dos patógenos, a resposta inflamatória atua na cicatrização dos tecidos. A resposta inflamatória aguda é caracterizada por: liberação de mediadores pró-inflamatórios, vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, extravasamento de líquidos e aumento do metabolismo celular. Quando atua de forma eficiente, a resposta inflamatória é capaz de remover rapidamente os patógenos e manter a integridade do tecido (Sordillo et al., 2009). O estradiol e a progesterona parecem ser os principais responsáveis pela modulação das respostas imunológicas e processos inflamatórios desencadeados pelas células endometriais e células de defesa que atuam no trato reprodutivo dos bovinos (Sheldon e Bromfield, 2011).

Achados semelhantes aos obtidos no presente estudo foram relatados por Del Vecchio et al. (1992). Esses autores não observaram a ocorrência de processos inflamatórios moderados ou graves em exames histopatológicos de amostras de endométrio de vacas Angus submetidas a biópsias uterinas 12 dias após a realização de infusões seriadas de PBS ou suspensões contendo *E. coli* e *T. pyogenes* não inativados (30 mL, concentração final = 1×10^9 UFC/mL). Nesse estudo, as infusões uterinas foram realizadas durante 3 dias consecutivos, entre o 8º e o 14º dia após a primeira manifestação de estro no pós-parto. Todas as vacas inoculadas com *E. coli* tiveram infecção uterina aguda, porém, 12 dias após o término das infusões, as

amostras de endométrio desses animais apresentavam poucos infiltrados neutrofílicos superficiais, indicando que a inflamação já havia sido debelada.

No estudo de Sheldon et al. (2010), no qual foram realizadas infusões uterinas de LPS purificado ou *E. coli* não inativada em camundongos, as análises histológicas revelaram a presença de infiltrados de neutrófilos e macrófagos no endométrio 24 horas após a infusão. A resposta inflamatória endometrial induzida pelo LPS foi mais superficial que a resposta induzida pelas bactérias vivas, as quais colonizaram o endométrio, causaram alterações histológicas mais graves no epitélio e no estroma, e sinais clínicos de endotoxemia nos animais inoculados.

A inoculação de *E. coli* não inativada por meio de infusão uterina em cabras no 25º dia após o parto também causou sinais de inflamação endometrial mais graves (Shao et al., 2012). Doze horas após a inoculação, todas as amostras de endométrio dos animais inoculados apresentaram infiltrados neutrofílicos difusos, hemorragia endometrial grave, desprendimento da camada epitelial do endométrio e sinais sistêmicos de endotoxemia.

Nos estudos citados anteriormente (Del Vecchio et al., 1992; Sheldon et al., 2010; Shao et al., 2012), não foram relatadas ocorrências de infiltrados neutrofílicos nas amostras de endométrio dos animais controle, que foram inoculados com solução estéril de PBS por meio de infusão uterina. No presente estudo, 55,5% (5/9) dos animais inoculados com PBS apresentaram alguns infiltrados neutrofílicos multifocais no estroma endometrial. Portanto, os achados obtidos podem estar relacionados com a ação de hormônios estrogênicos, responsáveis pelo reforço da imunidade inata durante o estro, fase na qual o útero encontra-se mais suscetível à invasão de patógenos (Lewis, 2003; Azawi, 2008).

4. CONCLUSÕES

A infusão de *E. coli* inativada no útero de vacas Zebu durante a fase de estro induziu a ocorrência de quadros inflamatórios endometriais leves, moderados ou severos, em 88,8% dos animais inoculados, confirmando que a capacidade de regular a resposta imunológica pode variar inclusive entre animais da mesma raça, uma vez que todos foram submetidos ao mesmo desafio.

5. PERSPECTIVAS

A compreensão das variações ocorridas na transcrição gênica endometrial e na ativação dos receptores de padrões moleculares microbianos em bases genéticas bovinas suscetíveis ou resistentes a infecções uterinas, será fundamental para estabelecer tratamentos mais eficientes para as doenças uterinas que acometem as vacas, as mulheres e fêmeas de outras espécies, causando subfertilidade e impacto econômico incalculável.

Os achados histopatológicos, obtidos a partir de amostras de endométrio de vacas inoculadas com *E. coli* inativada por meio de infusão uterina na fase de estro, indicam que os procedimentos adotados neste experimento podem ser utilizados em estudos futuros com o objetivo de elucidar os mecanismos relacionados com a modulação da resposta inflamatória uterina em bovinos, particularmente, para explicar diferenças entre vacas taurinas e zebuínas quanto à ocorrência de infecções uterinas.

Nosso grupo de pesquisa pretende dar sequência aos estudos sobre regulação da imunidade inata uterina, comparando as respostas inflamatórias endometriais de vacas de diferentes bases genéticas (no anestro e nas quatro fases do ciclo estral), após submetê-las a desafios com MAMPs sintéticos e/ou obtidos a partir de bactérias inativadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYGUNAWARDENA, H.; DEMATAWEWA, C. M. B. Pre-pubertal and postpartum anestrus in tropical Zebu cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82 e 83, p. 373-387, 2004.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, v. 406, p. 782-787, 2000.

AFLATONIAN, R.; TUCKERMAN E.; ELLIOTT S. L. et al. Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium. *Hum. Reprod.*, v. 22, p. 586-593, 2007.

AGASTI, M. K.; CHOUDHRY, G.; BANERJEE, G.; BANERJEE, T. K. Studies on certain aspects of uterine involution in Jersey x Harijana females following first calving. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 45, n. 4, p. 186-188, 1975.

AKIRA, S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 15, p. 5-11, 2003.

AKIRA, S. Editorial - Toll-like receptors families: structure and function. *Semin. Immunol.*, v. 16, p. 1-2, 2004.

ALBUQUERQUE, F. T. *Efeito do cloprostenol (ICI-80.996) sobre o período de involução uterina em vacas mestiças Holandês-Zebu*. 1985. 32 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ALENCAR, M. M.; BARBOSA, P. F. Melhoramento genético de gado de corte no Brasil. Embrapa, 2009: Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/856665/1/PROCIMMA2010.00010.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2014.

- AMJADI, F.; SALEHI, E.; MEHDIZADEH, M. et al. Role of the innate immunity in female reproductive tract. *Adv. Biomed. Res.*, v. 3, p. 1-37, 2014.
- ARAÚJO, P. G.; PIZELLI, G. N.; CARVALHO, M. R. et al. Involução uterina e atividade ovariana na vaca leiteira após o parto. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 9, p. 1-6, 1974.
- ARCHBALD, L. F.; SCHULTZ, R. H.; FAHNIN, G. M. L. et al. A sequential histological study of the post-partum uterus cows. *J. Reprod. Fert.*, v. 29, p. 133-136, 1972.
- ATHMAN, R.; PHILPOTT, D. Innate immunity via Toll-like receptors and NOD proteins. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 7, p. 25-32, 2004.
- AUSUBEL, F. M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.*, v. 6, p. 973-979, 2005.
- AZAWI, O. I. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 105, p. 187-208, 2008.
- BARÁNSKI, W.; PODHALICZ-DZIEGIELEWSKA, M.; ZDUNCZYK, S. et al. The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. *Theriogenology*, v. 78, p. 1939-1947, 2012.
- BARLUND, C. S.; CARRUTHERS, T. D.; WALDNER, C. L. et al. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 69, p. 714-723, 2008.
- BEEREPOOT, G. M. Y.; DYKHUIZEN, A. A.; NIELEN, Y. et al. The economics of naturally occurring twinning in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 75, p. 1044-1051, 1992.
- BELL, M. J.; ROBERTS, D. J. The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. *Theriogenology*, v. 68, p. 1074-1079, 2007.
- BELLOWS, D. S.; OTT, S. L.; BELLOWS, R. A. Review: Cost of reproductive diseases and conditions in cattle. *Profess. Anim. Sci.*, v. 18, p. 26-32, 2002.
- BENZAQUEN, M. E.; RISCO, C. A.; ARCHBALD, L. F. et al. Rectal temperature, calving-related factors, and the incidence of puerperal metritis in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 90, p. 2804-2814, 2007.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.*, v. 40, p. 845-859, 2004.
- BONDURANT, R. H. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J. Anim. Sci.*, v. 77, p. 101-110, 1999.
- BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; ROCHA JÚNIOR, V. R. et al. Desenvolvimento folicular no pós-parto de vacas da raça Gir tratadas com Acetato de Buserelina (GnRH) ou Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG). *R. Bras. Zootec.*, v. 33, p. 1396-1404, 2004.
- BORGES, Á. M.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation *ex vivo*. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v. 67, p. 526-539, 2012.
- BOWDISH, D. M.; LOFFREDO, M. S.; MUKHOPADHYAY S. et al. Macrophage receptors implicated in the 'adaptive' form of innate immunity. *Microbes Infect.*, v. 9, p. 1680-1687, 2007.
- BRITT, J. H. Reproductive performance as affected by nutrition and environment. In: III FLORIDA RUMINANT NUTRITION

- SYMPOSIUM, 1992, Gainesville. *Anais...* Gainesville, 1992. p. 93-102.
- BRYANT, C. E.; SPRING, D. R.; GANGLOFF, M. et al. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 8, p. 8-14, 2010.
- BUCH, N. C.; TYLER, W. J.; CASIDA, L. E. Postpartum estrus and involution in an experimental herd of Holstein Friesian cows. *J. Dairy Sci.*, v. 38, p. 73-79, 1955.
- BUTLER, W. R. Efeito do balanço energético negativo na fertilidade de vacas leiteiras. In: X CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2006, Uberlândia. *Anais...*Uberlândia, 2006.
- BUWITT-BECKMANN, U.; HEINE, H.; WIESMULLER, K. H. et al. TLR1 and TLR6 independent recognition of bacterial lipopeptides. *J. Biol. Chem.*, v. 281, p. 9049-9057, 2006.
- CAMARGOS, A. S.; GIOSO, M. M.; REIS, L. S. L. S. et al. Ocorrência de distúrbios da gestação, parto e puerpério em vacas leiteiras. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n. 20, Ano XI, Janeiro de 2013.
- CAMERON, N. W.; FOSGATE, O. T. Effects of oxytocin upon the reproductive tract of the lactating bovine. *J. Dairy Sci.*, v. 47, n. 1, p. 79-81, 1964.
- CARAVAJAL, F. D. *Efeito da aplicação de prostaglandina durante o puerpério na vaca*. 1989. 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CARNEIRO, L. C. *Endometrite citológica em vacas leiteiras mestiças e vacas de corte Nelore: incidência e relação com o desempenho reprodutivo*. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- CARRUTHERS, T. D. e HAFS, H. D. Suckling and four times daily-milking: Influences on ovulation, estrus and serum luteinizing hormone, glucocorticoids and prolactin in postpartum Holsteins. *J. Anim. Sci.*, v. 50, p. 919-925, 1980.
- CARVALHO, B. C. *Parâmetros reprodutivos, metabólitos e produção de leite de vacas mestiças Holandês x Zebu submetidas a dois manejos pré-parto*. 2009. 193p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CHAMAILLARD, M.; HASHIMOTO, M.; HORIE, Y. et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.*, v. 4, p. 702-707, 2003.
- CHAPWANYA, A.; MEADE, K. G.; DOHERTY, M. L. et al. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology*, v. 71; p. 1396-1407, 2009.
- CHAPWANYA, A.; MEADE, K. G.; NARCIANDI, F. et al. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research Toll in bovine reproduction. *Theriogenology*, v. 73, p. 988-994, 2010.
- CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, v. 10, p. 826-837, 2010.
- CRONIN, J. G.; TURNER, M. L.; GOETZE, L. Toll-like receptor 4 and MyD88-dependent signaling mechanisms

- of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol. Reprod.*, v. 86, p. 51, 2012.
- CROWE, M. A. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 43 (Suppl. 5), p. 20-28, 2008.
- DALPKE, A.; FRANK, J.; PETER, M. et al. Activation of Toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species. *Infect. Immun.*, v. 74, p. 940-946, 2006.
- DAVIES, D.; MEADE, K. G.; HERATH, S. et al. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v. 6, p. 1-12, 2008.
- DE VRIES, M. J.; VEERKAMP, R. F. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. *J. Dairy Sci.*, v. 83, p. 62-69, 2000.
- DEL VECCHIO, R. P.; MATSAS, D. J.; INZANA, T. J. et al. Effect of intrauterine bacterial infusions and subsequent endometritis on prostaglandin F2a metabolite concentrations in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, v. 70, p. 3158-3162, 1992.
- DELUYKER, H. A.; GAY, J. M.; WEAVER, L. D. et al. Change of milk yield with clinical diseases for a high producing dairy herd. *J. Dairy Sci.*, v. 74, p. 436-445, 1990.
- DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; WOLDEHIWET. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 67, p.135-152, 2001.
- DISKIN, M. G.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F. et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 78, p. 345-370, 2003.
- DOHMEN, M. J. W.; JOOP, K.; STURK, A. et al. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology*, v. 54, p. 1019-1032, 2000.
- DRILLICH, M.; PFUTZNER, A.; SABIN, H. J. et al. Comparison of two protocols of retained fetal membranes in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 59, p. 951-960, 2003.
- DRILLICH, M.; MAHLSTEDT, M.; REICHERT, U. et al. Strategies to improve the therapy of retained fetal membranes in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 89, p. 627-635, 2006a.
- DRILLICH, M.; REICHERT, U.; MAHLSTEDT, M. et al. Comparison of two strategies for systemic antibiotic treatment of dairy cows with retained fetal membranes: preventive vs. selective treatment., *J. Dairy Sci.*, v. 89; p. 1502-1508, 2006b.
- DUBUC, J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; et al. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 93, p. 5225-5233, 2010a.
- DUBUC, J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; et al. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 93, p.5764-5771, 2010b.
- EDMONSON, A. J.; LEAN, I.; WEAVER, L. D. et al. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 72, p. 68-78, 1989.
- EUCLIDES FILHO, K. Evolução do melhoramento genético do gado de corte no Brasil. *Rev. Ceres*, v. 56, p. 620-626, 2009.

- FACÓ, O.; LÔBO, R. N. B.; MARTINS FILHO, R. et al. Análise do desempenho produtivo de diversos grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. *Rev. Bras. de Zootec.*, v. 3, p.1944-1952, 2002.
- FACÓ, O.; LÔBO, R. N. B.; MARTINS FILHO, R. et al. Idade ao primeiro parto e intervalo de partos de cinco grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 34, p. 1920-1926, 2005.
- FAZELI, A.; BRUCE, C.; ANUMBA, D. O. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. *Hum. Reprod.*, v. 20, p. 1372-1378, 2005.
- FERNANDES, C. A. C.; COSTA, D. S.; VIANA, J. H. M. Impacto da retenção de placenta sobre a performance reprodutiva de vacas leiteiras. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 25, p. 26-30, 2001.
- FERNANDES, C. A. C.; FIGUEIREDO, A. C. S. Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 31, p. 406-414, 2007.
- FERNANDES, C. A. C.; PALHÃO, M. P.; RIBEIRO, J. R. Associação entre oxitetraciclina e cloprostenol no tratamento de vacas leiteiras com retenção de placenta. *R. Bras. Sci. Vet.*, v. 19, p. 178-182, 2012.
- FERREIRA, A. M.; TEIXEIRA, N. M. Estimativas de mudanças na produção de leite com a variação do intervalo de partos em rebanhos bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 24, p. 177-181, 2000.
- FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F. et al. Restrição alimentar e atividade ovariana luteal cíclica pós-parto em vacas Girolanda. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 35, p. 2521-2528, 2000.
- FÖLDI, J.; PÉCSI, A.; SZABÓ, J. et al. The pathogens and cause of uterine diseases. In: 16th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2008, Hungary. *Anais...* Hungary: 2008. p. 5.
- FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *An. Reprod. Sci.*, v. 124, p. 163-169, 2011.
- FREITAS JÚNIOR, J. E.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; RENNÓ, F. P. et al. Efeito da condição corporal ao parto sobre o desempenho produtivo de vacas mestiças Holandês x Zebu. *R. Bras. Zootec.*, v. 37, p. 116-121, 2008.
- FRICKE, P.M; WILTBANK, M.C. Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology*, v. 52, p. 1133-1143, 1999.
- FRICKE, P. M. Review: Twinning in dairy cattle. *Prof. Anim. Sci.*, v. 17, p. 61-67, 2000.
- GARCÍA-ISPIERTO, I.; LOPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P. et al. Factors affecting the fertility of high producing dairy herds in northeastern Spain. *Theriogenology*, v. 67, p. 632-638, 2007.
- GAUTAM, G.; NAKAO, T.; KOIKE, K. et al. Spontaneous recovery or persistence of postpartum endometritis and risk factors for its persistence in Holstein cows. *Theriogenology.*, v. 73, p. 168-179, 2010.
- GEARHART, M. A.; CURTIS, C. R.; ERB, H. N. et al. Relationship of changes in condition score to cow health in Holsteins. *J. Dairy Sci.*, v. 73, p. 3132-3140, 1990.
- GIER, H. T.; MARION, G. B. Uterus of the cow after parturition involuntional changes. *Am. J. Vet. Res.*, v. 29, p. 83-96, 1968.
- GIRARDIN, S. E.; BONECA, I. G.; CARNEIRO, L. A. et al. NOD1 detects a

unique mucopeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, v. 300, p. 1584-1587, 2003a.

GIRARDIN, S. E.; BONECA, I. G.; VIALA, J. et al. PJ: NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 8869-8872, 2003b.

GOLDAMMER, T.; ZERBE, H.; MOLENAAR, A. et al. Mastitis increases mammary mRNA abundance of β -defensin 5, Toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 11, p. 174-185, 2004.

GONZÁLEZ SÁNCHEZ, J. P.; SOBRINHO, E. B.; GONÇALVES, A. A. M. Involução uterina em um rebanho Gir leiteiro segundo o período pós-parto e o número de parições. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 51, n. 4, p. 345-351, 1999a.

GONZÁLEZ SÁNCHEZ, J. P.; SOBRINHO, E. B.; GONÇALVES, A. A. M. et al. Interferências de parâmetros da produção e frequência da amamentação no tempo de involução uterina de vacas Gir. *Ciênc. e Agrotec.*, v. 23, n. 4, p. 973-979, 1999b.

GONZÁLEZ SÁNCHEZ, J. P.; EURIDES, D.; SILVA, L. A. F. et al. Posição do útero e calibre da artéria uterina no puerpério em vacas Gir leiteiras relacionadas com metrites e anestro. *Pubvet*, v. 2, p. 1-9, 2008.

GRIFFITH, M. K.; WILLIAMS, G. L. Roles of maternal vision and olfaction in suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion, expression of maternal selectivity, and lactational performance of beef cows. *Biol. Reprod.*, v. 54, p. 761-768, 1996.

GRIMARD, B.; HUMBLLOT, P.; PONTER, A. A. et al. Influence of postpartum energy

restriction on energy status, plasma LH and estradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *J. Reprod. Fert.*, v. 104, p. 173-179, 1995.

GRIMM, A. M. Meteorologia básica - Medidas de umidade. Universidade Federal do Paraná, 1999. Disponível em: <http://fisica.ufpr.br/grimm/aposmeteo/cap5/tab5-2.html>> Acesso em: 1 out. 2009.

GRUNERT, E. Etiology of retained bovine placenta. In: Morrow, D. A. Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals. Philadelphia: W. B. Saunders, 1980. P. 180-186.

GUILHERMINO, M. M.; FREITAS, M. A. R.; CARDOSO, V. L.; et al. Involução uterina e primeiro cio pós-parto em vacas da raça Gir, selecionadas e manejadas para produção de leite. *Biol. Ind. Anim.*, v. 49, p. 49-54, 1992.

GUIMARÃES, J. D.; ALVES, N. G.; COSTA, E. P. et al. Eficiências reprodutiva e produtiva em vacas das raças Gir, Holandês e cruzadas Holandês x Zebu. *R. Bras. Zootec.*, v. 31, n. 2, p. 641-647, 2002.

HAMMON, D. S.; EVJEN, I. M.; DHIMAN, T. R. et al. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 113, p. 21-29, 2006.

HAN, Y. K.; KIM, I.H. Risk factors for retained placenta and the effect of retained placenta on the occurrence of postpartum diseases and subsequent reproductive performance in dairy cows. *J. Vet. Sci.*, v. 6, p. 53-59, 2005.

HEPPELMANN, M.; BRÖMMLING, A.; WEINERT, M. et al. Effect of postpartum suppression of ovulation on uterine involution in dairy cows. *Theriogenology*, v. 80, p. 519-52, 2013.

- HERATH, S.; FISCHER, D. P.; WERLING, D. et al. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology*, v. 147, p. 562-570, 2006.
- HERATH, S.; LILLY, S. T.; SANTOS, N. R. et al. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v. 7:55, p. 1-13, 2009a.
- HERATH, S.; LILLY, S. T.; FISCHER, D. P. et al. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2 α to prostaglandin E2 in bovine endometrium. *Endocrinology*, v. 150, p. 1912-1920, 2009b.
- HAYASHI, F.; SMITH, K. D.; OZINSKY, A.; HAWN, T. R. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, v. 26, p. 1099-1103, 2001.
- HICKEY, D. K.; PATEL, M. V.; FAHEY, J. V. et al. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J. Reprod Immunol.*, v. 88, p. 185-194, 2011.
- HORNE, A., W.; STOCK, S. J.; KING, A. E. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction*, v. 135, p. 739-749, 2008.
- HORTA, A. E. M. Etiopatogenia e terapêutica da retenção placentária nos bovinos. In: PROC. VII JORNADAS INTERNACIONALES DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 1994, Murcia. *Anais...* Murcia: 1994. P. 181-192.
- HORTA, A. E. M. Fisiologia do puerpério na vaca. In: VIII JORNADAS INTERNACIONALES DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 1995, Santander. *Anais...* Santander: AERA, 1995. p. 73-84.
- HUSSAIN, A. M.; DANIEL, R. C. W. Phagocytosis fluid and blood neutrophils and hematological changes in postpartum cows following normal and abnormal parturition. *Theriogenology*, v. 37, p. 1253-1267, 1992.
- IBEAGHA-AWEMU, E. M.; LEE, J. W.; IBEAGHA, A. E. et al. Bacterial lipopolysaccharide induces increased expression of Toll-like receptor (TLR) 4 and downstream TLR signaling molecules in bovine mammary epithelial cells. *Vet. Res.*, v. 39, p. 1-12, 2007.
- JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition *Annual Rev. Immunol.*, v. 20, p. 197-216, 2002.
- JOHANNES, C. J.; CLARCK, T. L.; HERRICK, J. B. Factors affecting calving interval. *J. Am. Vet. Med.*, v. 151, p. 1692-1704, 1967.
- JONES, G. M. Body condition for evaluation of nutritional status. In: Feeding and Nutrition, 1993, Virginia. *Anais...* Virginia: 1993. p. 1-4.
- KÄHN, W.; LEIDL, W. Ultrasonic characteristics of pathological conditions of the bovine uterus and ovaries. In: *Diagnostic Ultrasound and Animal Reproduction*. Munique: Springer, 1989. p. 53-66.
- KAMIMURA, S.; OHGI, T.; TAKAHASHI, M. et al. Postpartum resumption of ovarian activity and uterine involution monitored by ultrasonography in Holstein cows. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 55, p. 643-647, 1993.
- KANNAKI, T. R.; SHANMUGAN, M.; VERMA, P. C. Toll-like receptors and their

- role in animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 125, p. 1-12, 2011.
- KANEKO, K.; KAWAKAMI, S., MIYOSHI, M. et al. Effect of retained placenta on subsequent bacteriological and cytological intrauterine environment and reproduction in Holstein dairy cows. *Theriogenology*, v. 48, p. 617-624, 1997.
- KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A. et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v. 62, p. 9-23, 2004.
- KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A. et al. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can. Vet. J.*, v. 46, p. 255-259, 2005.
- KASK, K.; KURYKIN, J.; LINDJÄRV, R. et al. Assessment of early postpartum reproductive performance in two high estonian dairy herds. *Acta Vet. Scand.*, v. 44, p. 131-143, 2003.
- KIM, I. H.; KANG, H. G. Risk factors for postpartum endometritis and the effect on reproductive performance in dairy cows in Korea. *J. Reprod. Develop.*, v. 49, p. 485-491, 2003.
- KING, A. E.; CRITCHLEY, H. O. D.; KELLY, R. W. Innate immune defenses in the human endometrium. *Reprod. Biol. Endocrin.*, v. 1, p. 1-8, 2003.
- KINSEL, M. L.; MARSH, W. E.; RUEGG, P. L. et al. Risk factors for twinning in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 989-993, 1998.
- KOCAMUFTUOGLU, M.; VURAL, R. The evaluation of postpartum period in dairy cows with normal and abnormal periparturient problems. *Acta Vet. (Beograd)*, v. 58, p. 75-87, 2008.
- KOIVISTO, M. B.; BRESCIANI, K. D.; ESPER, C. et al. Avaliação da temperatura retal em vacas leiteiras no pós-parto. *Rev. Cienc. Agr.*, v. 22, p. 99-103, 2001.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S.D; JANDA, W. M; SCHREKENBERGER, P. C. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.
- KÖNIGSSON, K.; GUSTAFSSON, H.; GUNNARSSON, A. et al. Clinical and bacteriological aspects on the use of oxytetracycline and flunixinin in primiparous cows with induced retained placenta and post-partum endometritis. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 36, p. 247-256, 2001.
- KOZICKI, L. E. Contribuição ao estudo do puerpério de vacas leiteiras através do acompanhamento clínico reprodutivo e determinação de progesterona pelo radioimunoensaio. *Braz. J. Res. Anim. Sci.*, v. 35, p. 225-228, 1998.
- LANDAETA-HERNÁNDEZ, A. J.; GIANGRECO, M.; MELÉNDEZ, P. et al. Effect of biostimulation on uterine involution, early ovarian activity and first postpartum estrous cycle in beef cows. *Theriogenology*, v. 61, n. 7-8, p. 1521-1532, 2004.
- LARA, J. R. L. *Alguns aspectos reprodutivos de um rebanho leiteiro no período pós-parto*. 1985. 58f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LAVEN, R. A.; PETERS, A. R. Bovine retained placenta; etiology, pathogenesis and economic loss. *Vet. Rec.*, v. 9, p. 465-471, 1996.

- LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. et al. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 2237-2249, 2002a.
- LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 2223-2236, 2002b.
- LEITE, T. E.; MORAES, J. C. F.; PIMENTEL, C. A. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras. *Cienc. Rural*, v. 31, p. 467-472, 2001.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L. et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spa''tzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell*, v. 86, p. 973-983, 1996.
- LEWIS, G. S. Uterine health and disorders. *J. Dairy Sci.*, v. 80, p. 984-994, 1997.
- LEWIS, G. S. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod. Biol. End.*, v.1, p. 1-8, 2003.
- LEWIS, G. S. Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82-83, p. 281-294, 2004.
- LIN, Q.; LI, M; FANG, D. et al. The essential roles of Toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases. *Intern. Immunopharmacol.*, v. 11, p. 1422-1432, 2011.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time qPCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods.*, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOPES, D. T. *Efeitos da utilização de prostaglandina F2 α durante o puerpério precoce sobre a eficiência produtiva de vacas leiteiras.* 2007. 60 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.*, v. 84, p. 1277-1293, 2001.
- MACEDO, A. A.; COSTA, E. A.; SILVA, A. P. C. et al. Monocyte-derived macrophages from Zebu (*Bos taurus indicus*) are more efficient to control *Brucella abortus* intracellular survival than macrophages from European cattle (*Bos taurus taurus*). *Vet Immunol Immunopathol.*, v. 151, p. 294-302, 2013.
- MADALENA, F. H.; MATOS, L. L.; HOLANDA JÚNIOR, E. V. *Produção de leite e sociedade.* 1. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 333-363.
- MADEJ, A.; KINDAHL, H.; WOYNO, W. et al. Blood levels of 15-ceto-13,14-dihydro-prostaglandin F2 α during the postpartum period in primiparous cows. *Theriogenology*, v. 21, p. 279-287, 1984.
- MAGATA, F.; HORUCHI, M.; ECHIZENYA, R. et al. Lipopolysaccharide in follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 144, p. 6-13, 2014.
- MARKUSFELD, O. Periparturient traits in seven dairy herds. Incidence rates association with parity, and interrelationship among traits. *J. Dairy Sci.*, v. 70, 158-166, 1987.
- MARQUES JÚNIOR, A. P. *Leucocyte chemotaxis activity by cotiledons of dairy cows with normal delivery and retained placenta.* 1988. 182f. Thesis (PhD) -

University of Illinois, Urbana-Champaign, Illinois.

MARQUES JÚNIOR, A. P. Fisiologia do puerpério na vaca. *Rev. Bras. Reprod. Anim. Supl.*, p. 58-69, 1993.

MARTINS, T. M.; PAIXÃO, T. A.; COSTA, E. A.; et al. Postpartum Toll-like receptors and β -defensin 5 mRNA levels in the endometrium of Holstein cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 139, p. 277-281, 2011.

MARTINS, T. M.; SANTOS, R. L.; PAIXÃO, T. A. et al. Aspectos reprodutivos e produtivos de vacas da raça Holandesa com puerpério normal ou patológico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 65, p. 1348-1356, 2013.

MATEUS, L.; COSTA, L. L.; BERNARDO, F. et al. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 37, p. 31-35, 2002.

McDOUGALL, A. S.; HUSSEINA, H.; ABERDEIN, D. et al. Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 76, p. 229-240, 2011.

McENTEE, K. *Reproductive pathology of domestic mammals*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990. p. 125-131.

McGUIRE, K.; JONES, M.; WERLING, D. et al. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Anim. Genet.*, v. 37, p. 47-50, 2005.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 9, p. 4-9, 1997.

MENGE, A. C.; MARES, S. E.; TYLER, W. J. et al. Variation and association among postpartum reproduction in production characteristics in Holstein-Friesian cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 45, p. 233-241, 1962.

MILLER, A. N. A.; WILLIAMS, E. J.; SIBLEY, K. et al. The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. *Theriogenology*, v. 68, p. 972-980, 2007.

MIYAKE, K. Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *J. Endot. Res.*, v. 12, p. 195-204, 2006.

MONTEIRO, C. M. R.; FARIAS, E. C.; PERRI, S. H. V. et al. Estudo das características histológicas do útero e tubas uterinas de f da raça Nelore. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 40, p. 45-54, 2003.

MORROW, D. A.; ROBERTS, S. J.; McENTEE, K. A review of postpartum ovarian activity and involution of the uterus and cervix in cattle. *Cornell Vet.*, v. 59, p. 134-154, 1969.

MORROW, D. A. *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals*. Philadelphia: Saunders Company W.B., 1980. 1287p.

NAKAO, T.; MORIYOSHI, M.; KAWATA, K. The effect of postpartum ovarian dysfunction and endometritis on subsequent reproductive performance in high and medium producing dairy cows. *Theriogenology*, v. 37, p. 341-349, 1992.

NAKAO, T.; GAMAL, A.; OSAWA, T. et al. Postpartum plasma PGF metabolite profile in cows with dystocia and/or retained placenta, and effect of fenprostalene on uterine involution and

- reproductive performance. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 51, p. 791-794, 1997.
- NETEA, M. G.; QUINTIN, J.; VAN DER MEER, J. W. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe*, v. 9, p. 355-361, 2011.
- NOAKES, D. E.; WALLACE, L.; SMITH, G. R. Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *Vet Rec.*, v. 128, p. 440-442, 1991.
- OHTANIL, S., OKUDA, K.; NISHIMURA, K. *et al.* Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology*, v. 39, p. 1033-1042, 1993.
- OLSON, J. D.; BRETZALAFF, K. N.; MORTIMER, R. G. *et al.* The metritis-pyometra complex. In: Morrow, D. A. *Current Therapy in Theriogenology*, Philadelphia: Saunders, 1986. p. 227-236.
- OLTENACU, P. A.; ALGERS, B. Selection for increased production and the welfare of dairy cows. *Ambio.*, v. 34, p. 311-315, 2005.
- OPSOMER, G.; GROHN, Y. T.; HERTL, J. *et al.* Risk factors for post-partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology*, v. 53, p. 841-857, 2000.
- OVERTON, M.; FETROW, J. Economics of postpartum uterine health. Dairy Cattle Reproduction Council Convention Omaha, Nebraska, 2008, p. 39-44.
- PAISLEY, L. G.; MICKELSEN, W. D.; ANDERSON, P. B. Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infection of cows. *Theriogenology*, v. 25, p. 353-381, 1986.
- PAIXÃO, T. A.; FERREIRA, C.; BORGES, Á. M. *et al.* Frequency of bovine *Nrampl* (Slc1 1a1) alleles in Holstein and Zebu breeds. *Vet. Immunol. Immunophatol.*, v. 109, p. 37-42, 2006.
- PARK, B. S.; SONG, D. H.; KIM, H. M. *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, v. 458, p. 1191-1195, 2009.
- PETER, A. T.; BOSU, W. T. K.; GILBERT, R.O. Absorption of *Escherichia coli* endotoxin (lipopolysaccharide) from the uteri of postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v. 33, p. 1011-1014.
- PETERS, A. R. Reproductive activity of the cow in the post-partum period. I. Factors affecting the length of the post-partum acyclic period. *Bras. Vet. J.*, v. 140, p. 76-84, 1984.
- PHILPOTT, D. J.; GIRARDIN, S. E. NOD-like receptors: sentinels at host membranes. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 22, p. 428-434, 2010.
- PINEDO, P. J.; GALVÃO, K. N.; SEABURY, C. M. Innate immune gene variation and differential susceptibility to uterine diseases in Holstein cows. *Theriogenology*, v. 80, p. 384-390, 2013.
- PIRES, M. A.; FERREIRA, A. M.; COELHO, S. G. Estresse calórico em bovinos de leite. *Cad. Tec. Vet. Zootec.*, n. 29, p. 23-37, 1999.
- POTTER, T. J.; GUITIAN, J.; FISHWICK, J. *et al.* Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology*, v. 74, p. 127-134, 2010.
- QUAYLE, A. J. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and pivotal role of

- epithelial cells. *J. Reprod. Immunol.*, v. 57, p. 61-79, 2002.
- RABY, A. C.; HOLST, B.; BOUDER, E. L. Targeting the TLR Co-Receptor CD14 with TLR2-Derived Peptides Modulates Immune Responses to Pathogens. *Sci Transl. Med.*, v. 5, p. 155-164, 2013.
- RAJAMAHENDRAN, R.; AMBROSE, D. J., BURTON, B. Clinical and research applications of real-time ultrasonography in bovine reproduction. *Can. Vet. J.*, v. 35, p. 563-572, 1994.
- RANOVA, D. R.; KELLEY, S. L.; TAPPING, R. I. Signaling complex enhance formation of the ternary Toll-like receptor 1 (tlr1) and tlr2 and deliver triacylated lipoproteins to protein (lbp) and cd14 independently human lipopolysaccharide-binding. *J. Biol. Chem.*, v. 288, p. 9729-9741, 2013.
- RASBECK, N. O. The normal involution of the uterus in the cow. *Nord. Vet. Med.*, v. 2, p. 655-687, 1950.
- REKWOT, P. I.; OGWU, D.; OYEDIPE, E. O. Influence of bull biostimulation, season and parity on resumption of ovarian activity of zebu *Bos indicus* cattle following parturition. *An. Reprod. Sci.*, v. 63, p. 1-11, 2000.
- RICHARDS, M. W.; SPITZER, J.C.; WARNER, M.B. Effect of varying levels of postpartum nutrition and body condition at calving on subsequent reproductive performance in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, v. 62, p. 300-306, 1986.
- RIETDIJK, S. T.; BURWELL, T.; BERTIN, J. et al. Sensing intracellular pathogens-NOD-like receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v. 8, p. 261-266, 2008.
- RITTER, N. *Peripartal expression of endometrial Toll-like receptors and β -defensins in cattle (Abstract)*. 2007. 168p. Thesis (Doctor of Veterinary Medicine) - Hannover School of Veterinary Medicine, Hannover.
- ROCHA, A. A.; GAMBARINI, M. L.; ANDRADE, M. A. et al. Microbiota cervicovaginal durante o final de gestação e puerpério em vacas Girolando. *Cienc. Anim. Bras.*, v. 5, p. 215-220, 2004.
- ROBERTS, S. J. Veterinary obstetrics and genital diseases (Therigenology). Michigan: ed. Na Arbor Edwards Brothers, 1986. 981 p.
- ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 28, p. 371-378, 1992.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. *Primer3* on the www for general users and for biologist programmers. *Methods*, v. 132, p. 365-386, 2000.
- ROYAL, M.; MANN, G. E.; FLINT, A. P. F. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *Vet. J.*, v. 160, p. 53-60, 2000.
- RUAS, J. R. M.; TORRES, C. A. A.; BORGES, L. E. et al. Concentrações plasmáticas de colesterol, glicose e uréia em vacas zebuínas em relação à condição corporal e ao status reprodutivo. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 29, (supl. 1), p. 2036-2042, 2000.
- RUAS, J. R. M.; BRANDÃO, F. Z.; BORGES, L. E. et al. Influência da presença do bezerro no momento da ordenha sobre o desempenho reprodutivo de vacas mestiças Holandês-Zebu. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, p. 530-536, 2006.
- RUAS, J. R. M.; SILVA, M. A.; FERREIRA, J. J. et al. Desempenho

produtivo e reprodutivo de vacas F1 Holandês x Zebu em rebanhos da EPAMIG. In: 6º ENCONTRO DE PRODUTORES DE GADO LEITEIRO F1, 2008, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: PUC, 2008. p. 146-183.

SANTIAGO, A. A. raças zebuínas no Brasil. In: *Epopéia do zebu: a seleção das raças Gir, Guzará, Nelore, Indubrasil e Sindi*. 1 ed. São Paulo, 1960. p. 133-137.

SANTOS, R. L. Condição corporal ao parto e tempo requerido para liberação da placenta em vacas leiteiras. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 48, p. 235-238, 1996.

SANTOS, R. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; SOUZA, A. H. et al. Efeito da aplicação de prostaglandina (PGF2alfa) no pós-parto imediato sobre a incidência de retenção de placenta em vacas de leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 54, p. 29-34, 2002.

SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. *Reprod. Anim.*, v. 31, p. 153-159, 2007.

SCHAEFER, T. M.; SOUZA, K.; FAHEY, J. V. et al. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology*, v. 112, p. 428-436, 2004.

SHAO, C. Y.; WANG, H.; MENG, J. Q. Characterization of the innate immune response in goats after intrauterine infusion of *E. coli* using histopathological, cytologic and molecular analyses. *Theriogenology*, v. 78, p. 593-604, 2012.

SCHRÖDER, N. W.; MORATH, S.; ALEXANDER, C. et al. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP),

and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 15.587-15.594, 2003.

SEALS, R. C.; MATAMOROS, I.; LEWIS, G. S. Relationship between postpartum changes in 13, 14-dihydro-15-keto-PGF2 concentrations in Holstein cows and their susceptibility to endometritis. *J. Anim. Sci.*, v. 80, p. 1068-1073, 2002.

SENOSY, W. S.; UCHIZA, M.; TAMEOKA, N. et al. Association between evaluation of the reproductive tract by various diagnostic tests and restoration of ovarian cyclicity in high-producing dairy cows. *Theriogenology*, v. 72, p. 1153-1162, 2009.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A. N. et al. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*, v. 123, p. 837-845, 2002a.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A. N. et al. Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Vet. Rec.*, v. 151, p. 531-534, 2002b.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A. N. et al. The effect of intrauterine administration of estradiol on postpartum uterine involution in cattle. *Theriogenology*, v. 59, p. 1357-1371, 2003.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A. N. et al. The effect of intrauterine administration of estradiol on postpartum uterine bacterial infection in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 81, p. 13-23, 2004a.

SHELDON, I. M.; RYCROFT, A. N.; ZHOU, C. Association between postpartum pyrexia and uterine infection in dairy cattle. *Vet. Rec.*, v. 154, p. 289-293, 2004b.

- SHELDON, I. M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82-83, p. 295-306, 2004.
- SHELDON, I. M.; LEWIS, G.; LEBLANC, S. et al. Defining postpartum uterine disease in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 65, p. 1516-1530, 2006.
- SHELDON, M. Endometritis in cattle: pathogenesis, consequences for fertility, diagnosis and therapeutic recommendations. *Part. Reprod.*, v. 2, p. 1-5; 2007.
- SHELDON, I. M.; WILLIAMS, E. J.; MILLER, A. N. A. et al. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet. J.*, v. 176, p. 115-121, 2008.
- SHELDON, I. M.; CRONIN, J.; GOETZE, L. et al. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.*, v. 81, p. 1025-1032, 2009.
- SHELDON, I. M.; RYCROFT, A. N.; DOGAN, B. et al. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS One*, v. 5, p. 1-13, 2010.
- SHELDON, I. M.; ROBERTS, M. H. Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium. *PloS One*, v. 5, p. 1-10, 2010.
- SHELDON, I. M.; BROMFIELD, J. J. Innate immunity in the human endometrium and ovary. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v. 66 (Suppl. 1), p. 63-71, 2011.
- SHORT, R. E.; BELLOWS, R. A.; STAIGMILLER, R. B. et al. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J. Anim. Sci.*, v. 68, p. 799-816, 1990.
- SILVA, A. P. C.; COSTA, E. A.; MACÊDO, A. A. et al. Transcription of pattern recognition receptors and abortive agents induced chemokines in the bovine pregnant uterus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 145, p. 248-256, 2012a.
- SILVA, E.; LEITÃO, S.; HENRIQUES, S.; et al. Gene transcription of TLR2, TLR4, LPS ligands and prostaglandin synthesis enzymes are up-regulated in canine uteri with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex. *J. Reprod. Immunol.*, v. 84, p. 66-74, 2010.
- SILVA, E.; HENRIQUES, S.; BRITO, G. et al. Oestrous cycle-related changes in production of Toll-like receptors and prostaglandins in the canine endometrium. *J. Reprod. Immunol.*, v. 96, p. 45-57, 2012b.
- SILVEIRA, P. A.; SPOON, R. A.; RYAN, D. P. et al. Evidence for maternal behavior as a requisite link in suckling-mediated anovulation in cows. *Biol. Reprod.*, v. 49, p. 1338-1346, 1993.
- SILVESTRE, F.T.; BARTOLOME, J. A.; KAMIMURA, S. et al. Postpartum suppression of ovarian activity with a Deslorelin implant enhanced uterine involution in lactating dairy cows. *An. Reprod. Sci.*, v. 110, p. 79-95, 2009a.
- SILVESTRE, F.T.; RISCO, C. A.; LOPEZ, M. et al. Use of increasing doses of a degradable Deslorelin implant to enhance uterine involution in postpartum lactating dairy cows. *An. Reprod. Sci.*, v. 116, p. 196-212, 2009b.
- SMITH, B. I.; RISCO, C. A. Management of periparturient disorders in dairy cattle. *Vet. Clin. Food. Anim.*, v. 21, p. 503-521, 2005.

- SMITH, K. D.; NISSEN, E. A.; HAYASHI, F. et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature Immunol.*, v. 4, p. 1247-1253, 2003.
- SOBOLL, G.; SCHAEFER, T. M.; WIRA, C. R. Effect of Toll-like receptor (TLR) agonists on TLR and microbicide expression in uterine and vaginal tissues of the mouse. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v. 55, p. 434-446, 2006a.
- SOBOLL, G.; SHEN, L.; WIRA, C. R. Expression of Toll-Like receptors (TLR) and responsiveness to TLR agonists by polarized mouse uterine epithelial cells in culture. *Biol. Reprod.*, v. 75, p. 131-139, 2006b.
- SORDILLO, L. M.; CONTRERAS, G. A.; AITKEN, S. L. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim. Health Res. Rev.*, v. 10, p. 53-63, 2009.
- STEVENSON, J. S. Relationships among luteinizing hormone, estradiol, progesterone, glucocorticoids, milk yield, body weight and postpartum ovarian activity in Holstein cows. *J. Anim. Sci.*, v. 48, p. 570-577, 2006.
- SWANGCHAN-UTHAI T.; LAVENDER, C. R.; CHENG, Z. et al. Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide. *Biol. Reprod.*, v. 87, p. 135, 2012.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. *Sem. Immunol.*, v. 16, p. 3-9, 2004.
- TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; AKIRA, S. "Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection." *J Immunol.*, v. 165, p. 5392-5396, 2000.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, v. 140, p. 805-820, 2010.
- TAN, X.; LI, W.; GUO, J. et al. Down-regulation of NOD1 in neutrophils of periparturient dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 150, p. 133-139, 2012.
- TRANTAFILOU, M.; TRIANTAFILOU, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.*, v. 23, p. 301-304, 2002.
- TURNER, M. L.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Immunity and inflammation in the uterus. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 47 (Suppl. 4), p. 402-409, 2012.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. Washington, Dairy: World Markets and Trade, 2013. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2014.
- VAN SAUN, R. J. Transition cow nutrition and management: the key to herd reproductive performance. Penn State University, 2000: Disponível em: <http://vbs.psu.edu/ext/resources/pdf/transition-cow-health-and-nutrition>> Acesso em: 28 dez. 2009.
- VAN WERVEN, T.; SCHUKKEN, Y. H.; LLOYD, J. et al. The effects of duration of retained placenta on reproduction, milk production, postpartum disease and culling rate. *Theriogenology*, v. 37, 1191-1203, 1992.
- VILELA, D. Cruzamento errado pode deteriorar a genética. *Noticiário Tortuga*, São Paulo, ano 49, n.432, Jul-Ago, 2003.

- WALTNER, S. S.; McNAMARA, J. P.; HILLERS, J. K. Relationships of body condition score to production variables in high producing Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, p. 76, p. 3410-3419, 1993.
- WERLING, D.; JUNGI, T. W. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 91, p. 1-12, 2003.
- WERLING, D.; COFFEY, T. J. Pattern recognition receptors in companion and farm animals - The key to unlocking the door to animal disease? *Vet. J.*, v. 174, p. 240-251, 2007.
- WILLIAMS, G. L.; KOZIOROWSKI, M.; OSBORN, R. G. et al. The post-weaning rise of tonic luteinizing hormone secretion in anestrus cows is not prevented by chronic milking or the physical presence of the calf. *Biol. Reprod.*, v. 36, p. 1079-1084, 1987.
- WILLIAMS, E. L.; FISHER, D. P.; PFEIFFER, D. U. et al. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, v. 63, p. 102-117, 2005.
- WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; NOAKES, D. E. et al. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, v. 68, p. 549-559, 2007.
- WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; SANGSRITAVONG, S. et al. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 83, p. 2998-3007, 2000.
- WILTBANK, M. W. Prevenção e tratamento da retenção de placenta. In: XI CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2008, Uberlândia. *Anais...Uberlândia*: 2008. p. 61-70.
- YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology*, v. 54, p. 25-55, 2000.
- YOSHIMURA, A.; LIEN, E.; INGALLS, R. R. et al. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol.*, v. 163, p. 1-5, 1999.
- YOUNG, S. L.; LYDON, T. D.; JORGENSEN, R. L. et al. Expression of Toll-like receptors in human epithelial cells and cell lines. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v. 52, p. 67-73, 2004.
- YUNHE, F.; BO, L.; XIAOSHENG, F. et al. Lipopolysaccharide increases Toll-like receptor 4 and downstream Toll-like receptor signaling molecules expression in bovine endometrial epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 151, p. 20-27, 2013.
- ZAIN, A. E.; NAKAO, T; RAOUF, M. A.; et al. Factors in the resumption of ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 38, p. 203-214, 1995.
- ZHRINGER, U.; LINDNER, B.; INAMURA, S. et al. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*, v. 213, p. 205-224, 2008.
- ZERBE, H.; OÛADNIK, C.; LEIBOLD, W. et al. Influence of *Escherichia coli* and *Arcanobacterium pyogenes* isolated from bovine puerperal uteri on phenotypic and functional properties of neutrophils. *Vet. Microbiol.*, v. 79, p. 351-365, 2001.

ANEXOS

Protocolo 1. Certificado de aprovação dos procedimentos adotados nos capítulos II e III.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 49/2011**, relativo ao projeto intitulado "*Expressão endometrial de receptores tipo "TOLL" após o parto, ocorrências puerperais, aspectos reprodutivos e produtivos de vacas das raças Holandês, Gir e Mestiças F1 Holandês X Gir*", que tem como responsável(is) **Álan Maia Borges**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **27/04/2011**.

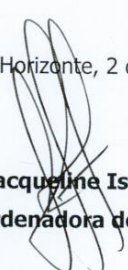
Este certificado expira-se em **27/04/2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 49/2011**, related to the project entitled "*Postpartum toll-like receptors MRNA levels in the endometrium, puerperium occurrences, reproductive and productive aspects of Holstein, Gir and Holstein XGir F1 crossbred cows*", under the supervisors of **Álan Maia Borges**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 27, 2011**.

This certificate expires in **April 27, 2016**.

Belo Horizonte, 2 de Maio de 2011.


Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Protocolo 2. Certificado de aprovação dos procedimentos adotados no capítulo IV.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 335 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Transcrição endometrial de receptores de padrões moleculares de patógenos em vacas Zebu após infusão uterina de E. coli inativada no estro", que tem como responsável Álan Maia Borges, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 10/12/2013. Este certificado espira-se em 10/12/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 335 / 2013, related to the Project entitled "Endometrial transcription of pattern recognition receptors in Zebu cows after uterine infusion of inactivated E. coli during estrus", under the supervision of Álan Maia Borges, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 10/12/2013. This certificate expires in 10/12/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 10/12/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Quadros 1 e 2. Composição da dieta das vacas em lactação na Fazenda Bom Jardim: composição média dos alimentos retirada da tabela CQBAL e composição da dieta fornecida para o lote pós-parto.

Alimento	% MS	PB*	EE*	MM*	CHOT*	NDT*	DMS*	FDN*	FDA*	LIG*	Ca*	P*
Silagem de milho	30,7	6,7	2,8	5,4	83,8	63,0	56,6	58,0	32,4	6,1	0,3	0,2
Polpa cítrica	85,2	8,1	3,2	6,9	81,9	0,0	0,0	23,7	28,0	1,3	2,4	1,2
Fubá de milho	87,5	9,2	4,0	1,5	84,9	85,1	86,3	15,3	3,8	1,7	0,0	0,3
Caroço de algodão	90,4	23,6	19,5	3,7	5,6	77,6	72,3	47,4	38,6	0,0	0,0	0,0
Farelo de soja	88,6	47,9	1,6	6,3	44,9	81,0	85,1	14,1	9,9	2,6	0,3	0,6
Cevada	20,2	34,8	7,9	3,3	57,1	76,0	0,0	0,0	24,8	0,0	0,0	0,0
Tifton	24,3	13,0	1,5	8,7	79,6	0,0	60,0	76,4	42,4	0,0	0,2	0,2
Nutron Milk	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1

* % MS

Alimento	Kg	%MS	MS *	PB*	EE*	MM*	CHOT*	NDT*	DMS*	FDN*	FDA*	LIG*	Ca*	P*
Silagem de milho	13,000	46,061	3,987	0,268	0,110	0,213	3,339	2,513	2,257	2,314	1,293	0,244	0,013	0,007
Polpa cítrica	0,500	4,920	0,426	0,034	0,014	0,029	0,349	0,000	0,000	0,101	0,119	0,005	0,010	0,005
Fubá de milho	1,125	11,377	0,985	0,090	0,039	0,015	0,836	0,838	0,850	0,150	0,037	0,016	0,000	0,003
Caroço de algodão	0,500	5,219	0,452	0,106	0,088	0,017	0,025	0,351	0,327	0,214	0,174	0,000	0,000	0,000
Farelo de soja	1,575	16,125	1,396	0,669	0,023	0,088	0,626	1,131	1,187	0,196	0,138	0,036	0,005	0,008
Cevada	2,500	5,820	0,504	0,175	0,040	0,017	0,288	0,383	0,000	0,000	0,125	0,000	0,000	0,000
Tifton	2,500	7,012	0,607	0,079	0,009	0,053	0,483	0,000	0,364	0,464	0,258	0,000	0,001	0,001
Nutron Milk	0,300	3,466	0,300	0,000	0,000	0,300	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
Total	22,000	100,000	8,656	1,422	0,322	0,732	5,946	5,216	4,985	3,439	2,144	0,302	0,030	0,024
% Dieta		39,346		6,463	1,465	3,326	27,028	23,707	22,657	15,633	9,747	1,372	0,137	0,110
% MS				16,427	3,723	8,453	68,695	60,253	57,585	39,732	24,772	3,487	0,349	0,279

* Kg

Lista de abreviaturas:

MS - Matéria seca

PB - Proteína bruta

EE - Extrato etéreo

MM - Matéria mineral

CHOT - Carboidratos totais

NDT - Nutrientes digestíveis totais

DMS - Digestibilidade da matéria seca

FDN - Fibra insolúvel em detergente neutro

FDA - Fibra insolúvel em detergente ácido

LIG - Lignina

Ca - Cálcio

P - Fósforo

Quadro 3. Temperaturas de bulbo seco (BS) e bulbo úmido (BU) utilizadas para cálculo da umidade relativa do ar.

		DEPRESSÃO DE BULBO ÚMIDO ($T_{BS} - T_{BU}$)																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TEMPERATURA DE BULBO SECO (°C)	-20	28																			
	-18	40																			
	-16	48	0																		
	-14	55	11																		
	-12	61	23																		
	-10	66	33	0																	
	-8	71	41	13																	
	-6	73	48	20	0																
	-4	77	54	32	11																
	-2	79	58	37	20	1															
	0	81	63	45	28	11															
	2	83	67	51	36	20	6														
	4	85	70	56	42	27	14														
	6	86	72	59	46	35	22	10	0												
	8	87	74	62	51	39	28	17	6												
	10	88	76	65	54	43	33	24	13	4											
	12	88	78	67	57	48	38	28	19	10	2										
	14	89	79	69	60	50	41	33	25	16	8	1									
	16	90	80	71	62	54	45	37	29	21	14	7	1								
	18	91	81	72	64	56	48	40	33	26	19	12	6	0							
	20	91	82	74	66	58	51	44	36	30	23	17	11	5	0						
22	92	83	75	68	60	53	46	40	33	27	21	15	10	4	0						
24	92	84	76	69	62	55	49	42	36	30	25	20	14	9	4	0					
26	92	85	77	70	64	57	51	45	39	34	28	23	18	13	9	5					
28	93	86	78	71	65	59	53	47	42	36	31	26	21	17	12	8	4				
30	93	86	79	72	66	61	55	49	44	39	34	29	25	20	16	12	8	4			
32	93	86	80	73	68	62	56	55	46	41	36	32	27	22	19	14	11	8	4		
34	93	86	81	74	69	63	58	52	48	43	38	34	30	26	22	18	14	11	8	5	
36	94	87	81	75	69	64	59	54	50	44	40	36	32	28	24	21	17	13	10	7	
38	94	87	82	76	70	66	60	55	51	46	42	38	34	30	26	23	20	16	13	10	
40	94	89	82	76	71	67	61	57	52	48	44	40	36	33	29	25	22	19	16	13	

(Fonte: Adaptação de Grimm, 1999)

Quadro 4. Índice de Temperatura e Umidade (ITU) para gado de leite. Em branco, ausência de estresse; em verde, estresse leve; em amarelo, estresse moderado; em rosa, estresse grave; em cinza, morte dos animais.

T (°C)	Umidade relativa do ar (%)										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
22,2											72
22,8										72	73
23x3									72	73	74
23,9								72	73	74	75
24,4							72	73	74	75	76
25,0						72	73	74	75	76	77
25,6					72	73	74	75	76	77	78
26,1					73	74	75	76	77	78	79
26,7				72	73	74	75	76	77	78	80
27,2				72	73	75	76	77	78	79	81
28,3			72	73	74	75	77	78	78	80	82
28,9			73	73	75	76	78	79	80	82	83
29,4		72	73	74	75	77	78	80	81	83	84
30,0		72	74	75	76	78	79	81	82	84	85
30,6	72	73	74	75	77	78	80	81	83	84	86
31,1	72	73	75	76	77	79	81	82	84	85	87
31,7	72	74	75	76	78	80	81	83	85	86	88
32,2	73	75	76	77	79	80	82	84	86	87	89
32,8	73	75	76	78	79	81	83	85	86	88	90
33,3	74	75	77	78	80	82	84	85	87	89	91
33,9	74	76	78	79	81	83	85	86	88	90	92
34,4	75	76	78	80	81	83	85	87	89	91	93
35,0	75	77	79	80	82	84	86	88	90	92	94
35,6	76	77	79	81	83	85	87	88	91	93	95
36,1	76	78	80	81	83	85	88	89	92	94	96
36,7	76	78	80	82	84	86	88	90	93	95	97
37,2	77	79	80	83	85	87	89	91	94	96	98
37,8	77	79	82	83	85	88	90	92	94	97	
38,3	78	80	82	84	86	88	91	92	95	98	
38,9	78	80	83	84	87	89	92	93	96		
39,4	79	81	83	85	87	90	92	94	96		
40,0	79	81	84	86	88	91	93	94	97		
40,6	80	82	84	86	89	91	94	95			
41,1	80	82	85	87	89	92	94	96			
41,7	81	83	85	88	90	93	95	97			
42,2	81	83	86	88	91	94	96				
42,8	81	84	87	89	92	94	97				
43,3	82	84	87	89	92	95					
43,9	82	85	88	90	93	96					
44,4	83	85	88	91	94	96					
45,0	83	86	89	91	94	97					
45,6	84	86	89	92	95						
46,1	84	87	90	92	96						
46,7	85	87	90	93	98						
47,2	85	88	91	94							
47,8	85	88	92	94							
48,3	86	89	92	96							

(Fonte: Adaptação de Armstong, 1994)

Quadro 5. Composição do concentrado fornecido às vacas em lactação na Fazenda Experimental da EPAMIG de Felixlândia.

Ração Guabi Lactage	PB	EE	MF	MM	NDT (MS)	Ca	P
Níveis de garantia por Kg do produto	Mín.	Mín.	Máx.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.
	22,00	3,00	7,00	10,00	86,00	1,80	0,55

Lista de abreviaturas:

PB - Proteína bruta
 EE - Extrato etéreo
 MF - Matéria fibrosa
 MM - Matéria mineral
 NDT - Nutrientes digestíveis totais
 MS - Matéria seca
 Ca - Cálcio
 P - Fósforo

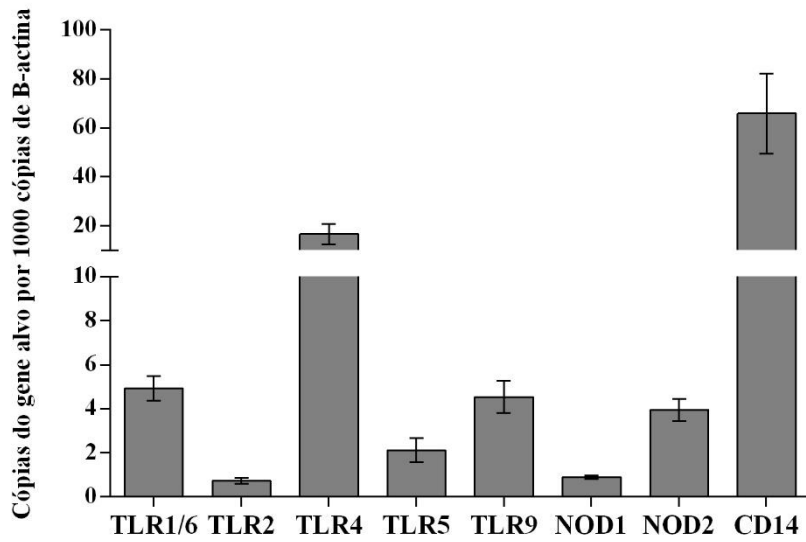


Gráfico A1. Transcrição gênica de TLR1/6, TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, NOD1, NOD2 e CD14 em amostras de macrófagos derivados de monócitos isolados do sangue de bovinos (médias \pm erros padrão).

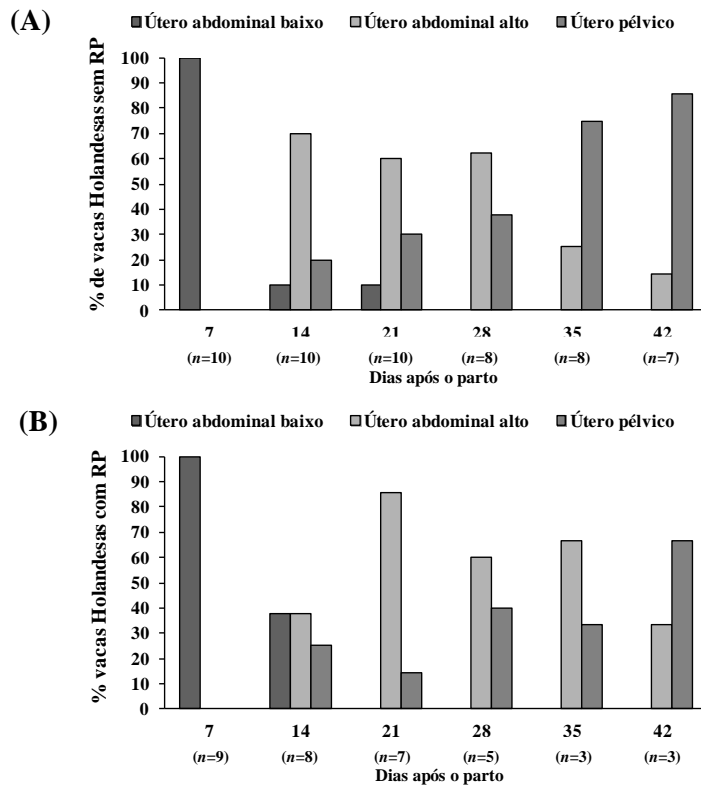


Gráfico A2. Evolução da posição do útero durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B).

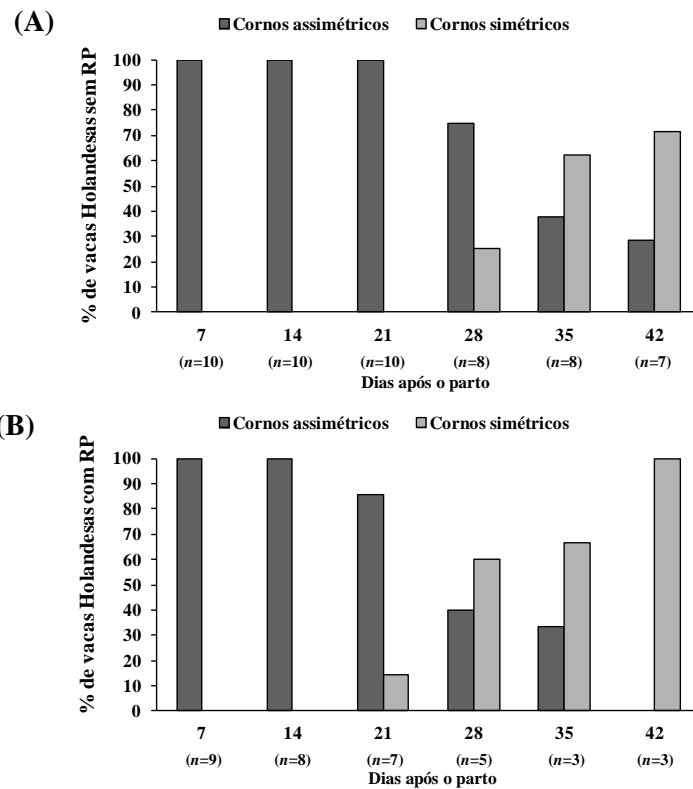


Gráfico A3. Evolução da simetria dos cornos uterinos durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B).

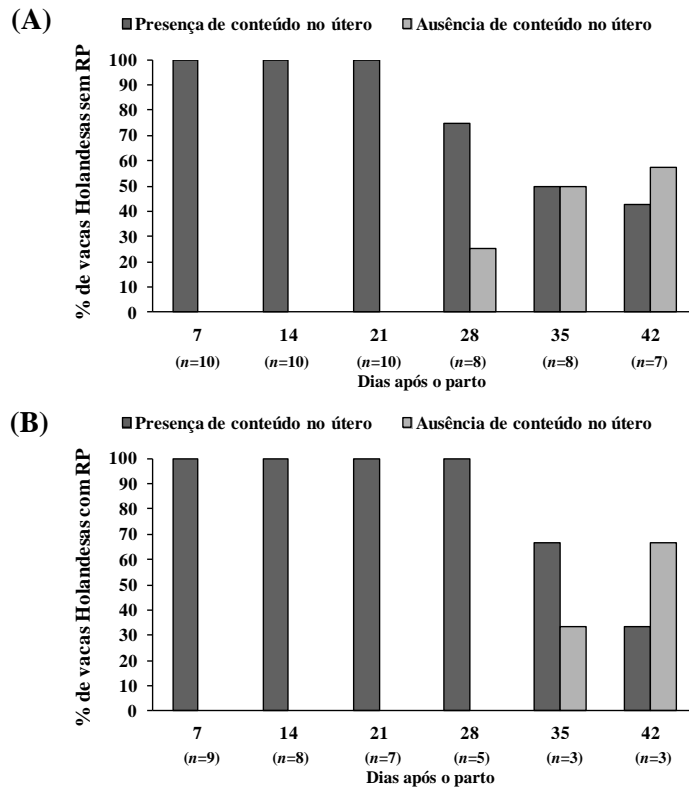


Gráfico A4. Presença ou ausência de conteúdo uterino durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B).

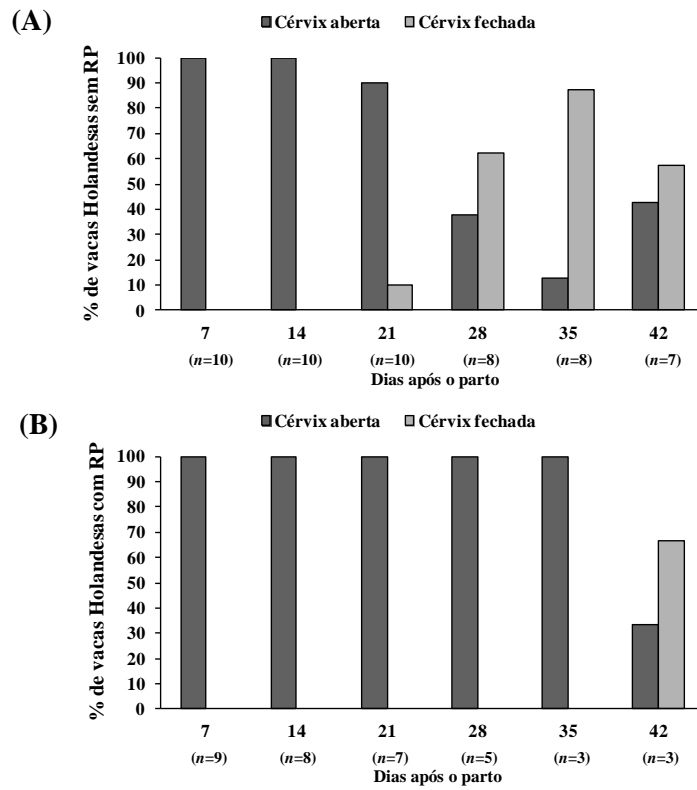
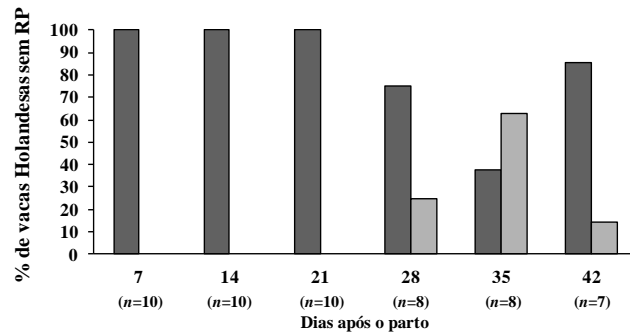


Gráfico A5. Evolução da condição da cérvix durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B).

(A) ■ Presença de secreção cervicovaginal □ Ausência de secreção cervicovaginal



(B) ■ Presença de secreção cervicovaginal □ Ausência de secreção cervicovaginal

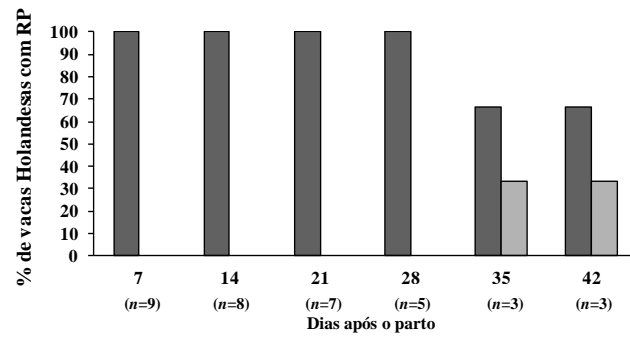


Gráfico A6. Presença de secreção cervicovaginal durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B).

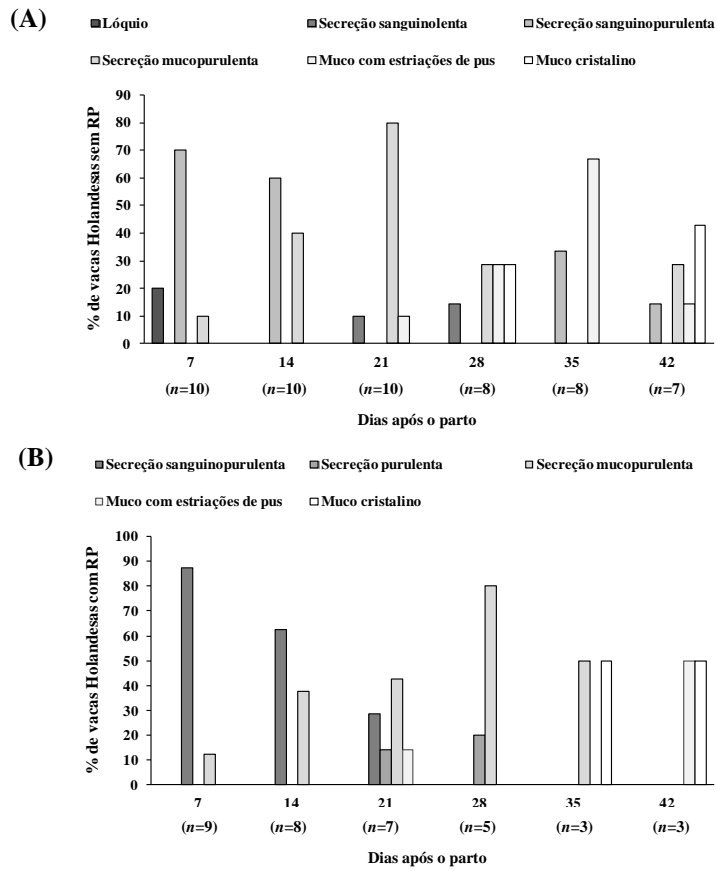


Gráfico A7. Evolução do aspecto da secreção cervicovaginal durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B).



Gráfico A8. Evolução do odor da secreção cervicovaginal durante o puerpério de vacas Holandesas sem retenção de placenta (A) e Holandesas com retenção de placenta (B).

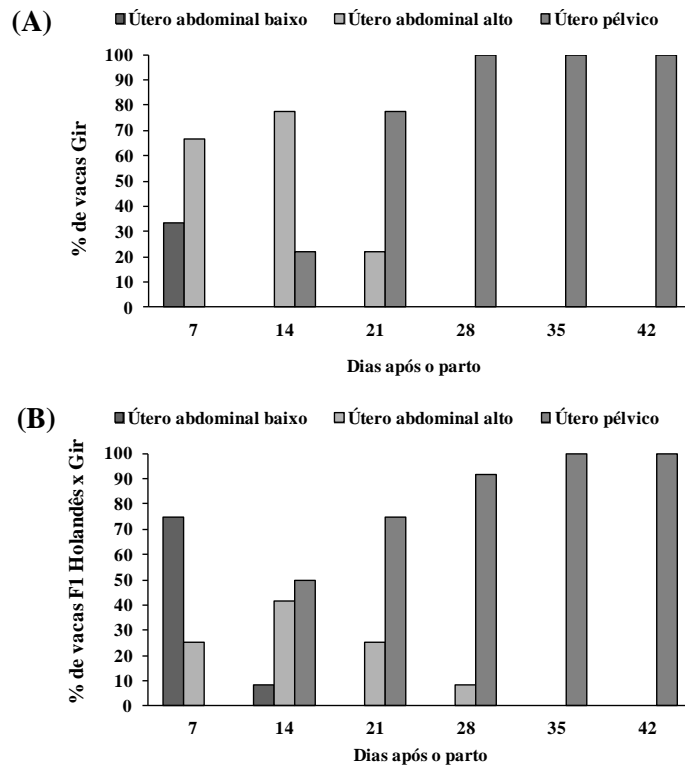


Gráfico A9. Evolução da posição do útero durante o puerpério de vacas Gir ($n = 9$; A) e F1 Holandês x Gir ($n = 12$; B).

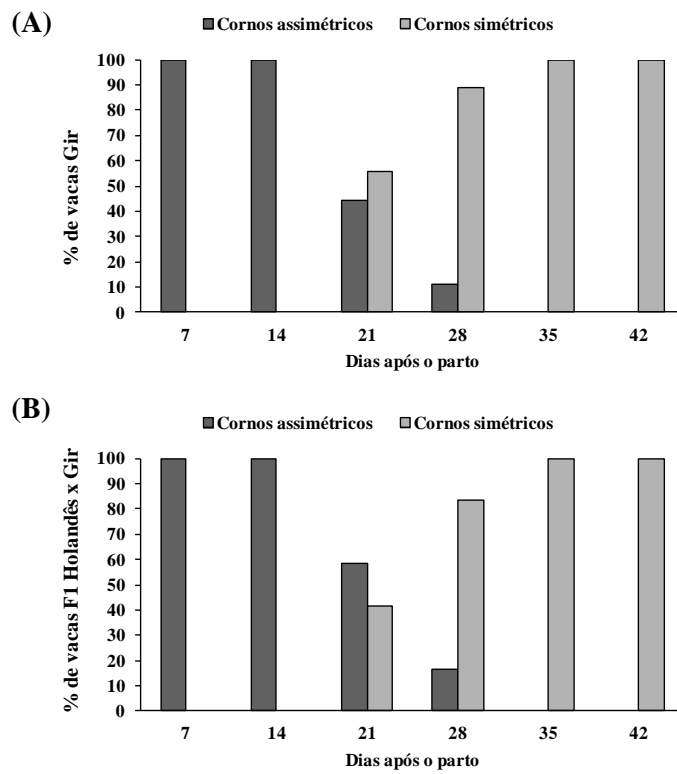


Gráfico A10. Evolução da simetria dos cornos uterinos durante o puerpério de vacas Gir ($n = 9$; A) e F1 Holandês x Gir ($n = 12$; B).

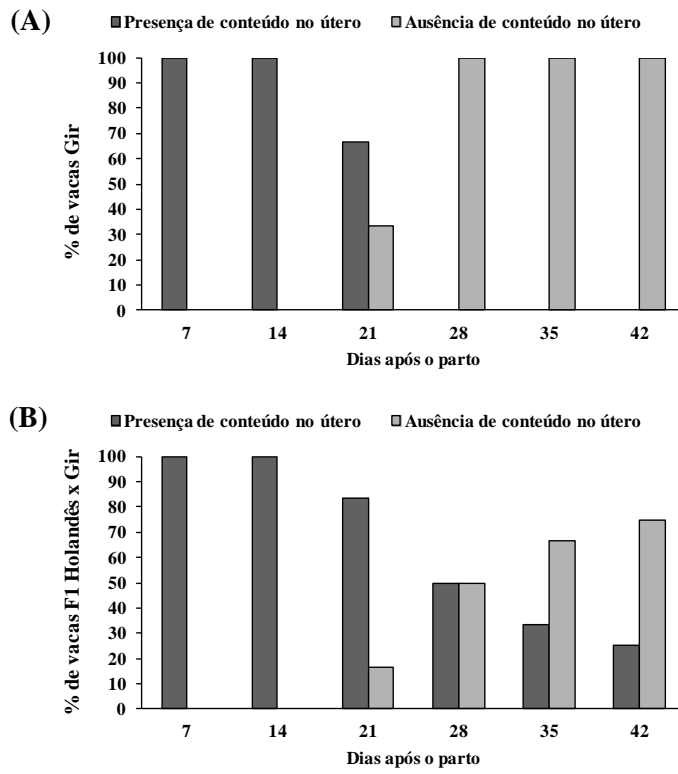


Gráfico A11. Presença ou ausência de conteúdo uterino durante o puerpério de vacas Gir ($n = 9$; A) e F1 Holandês x Gir ($n = 12$; B).

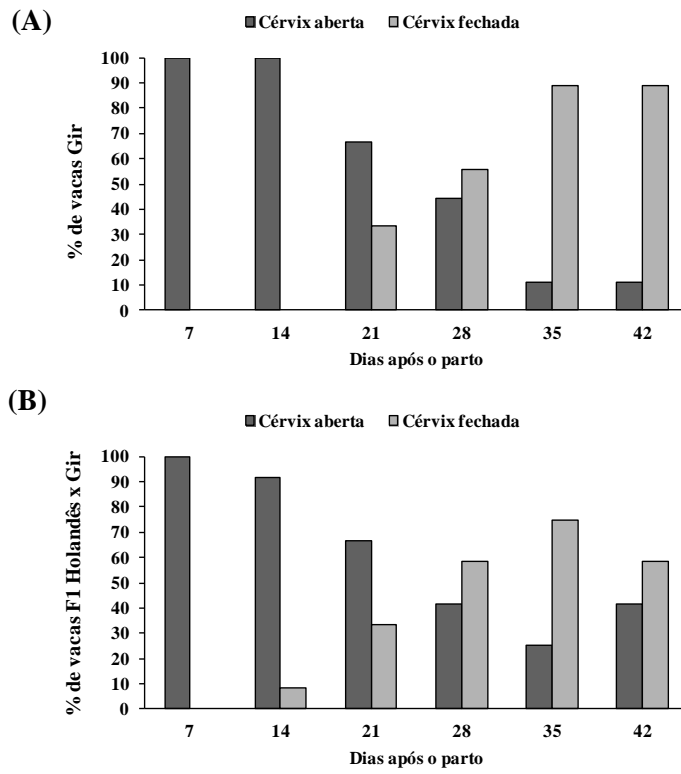
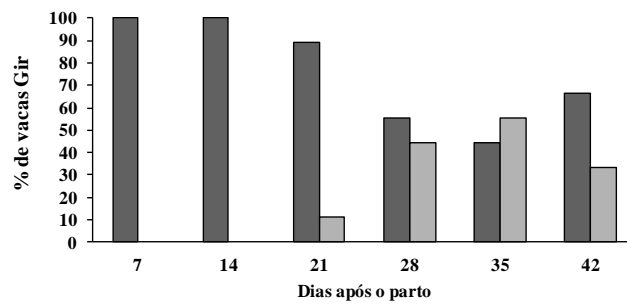


Gráfico A12. Evolução da condição da cérvix durante o puerpério de vacas Gir ($n = 9$; A) e F1 Holandês x Gir ($n = 12$; B).

(A) ■ Presença de secreção cérvicovaginal □ Ausência de secreção cérvicovaginal



(B) ■ Presença de secreção cérvicovaginal □ Ausência de secreção cérvicovaginal

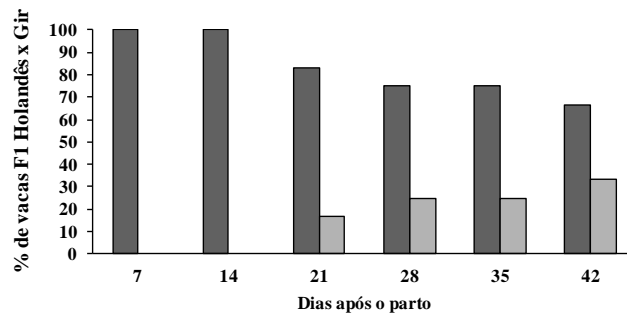


Gráfico A13. Presença de secreção cervicovaginal durante o puerpério de vacas Gir ($n = 9$; A) e F1 Holandês x Gir ($n = 12$; B).

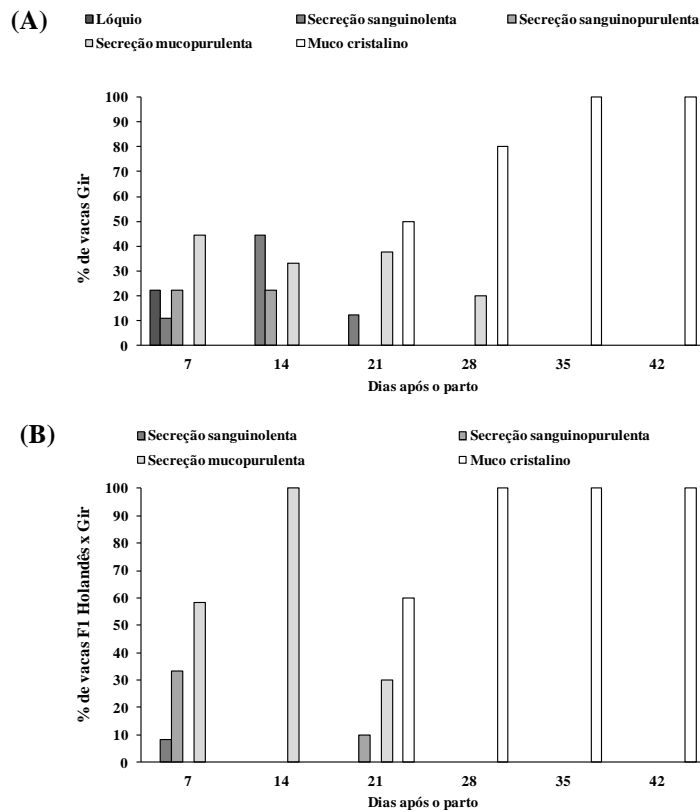


Gráfico A14. Evolução do aspecto da secreção cervicovaginal durante o puerpério de vacas Gir ($n = 9$; A) e F1 Holandês x Gir ($n = 12$; B).

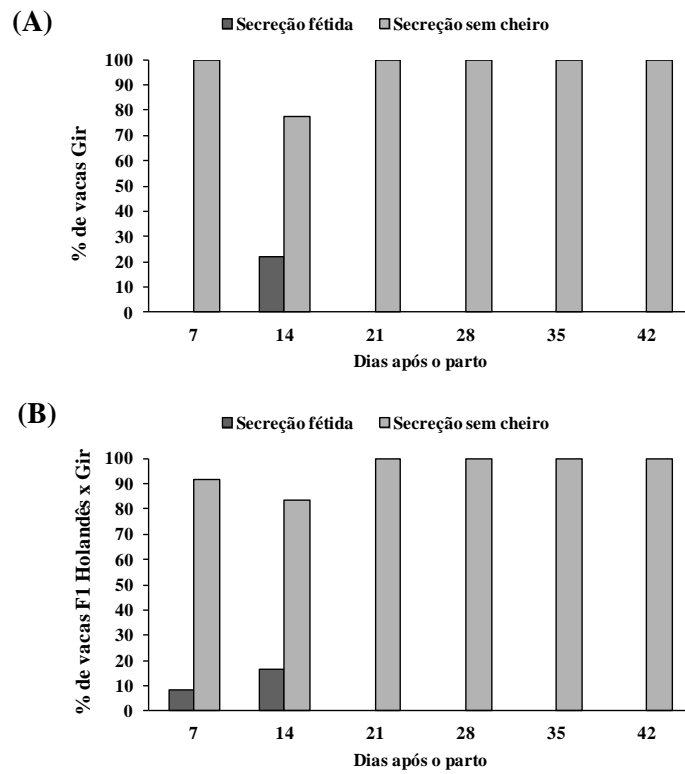


Gráfico A15. Evolução do odor da secreção cervicovaginal durante o puerpério de vacas Gir ($n = 9$; A) e F1 Holandês x Gir ($n = 12$; B).

TABELAS ESTATÍSTICAS

As tabelas seguem a ordem das análises estatísticas apresentadas na tese. Os valores de $P \leq 0,05$ foram destacados em negrito, e os valores de P entre 0,05 e 0,10 foram sublinhados.

CAPÍTULO II

Tabela 9

Score de condição corporal ao parto de acordo com o grupo experimental.

Teste de Mann-Whitney		
Tratamento	<i>n</i>	<i>P</i>
Holandesas sem retenção de placenta	11	0,0025
Holandesas com retenção de placenta	9	

Score de condição corporal aos 42 dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Teste de Mann-Whitney		
Tratamento	<i>n</i>	<i>P</i>
Holandesas sem retenção de placenta	7	0,9026
Holandesas com retenção de placenta	3	

Score de condição corporal (ECC) de vacas Holandesas sem retenção de placenta ao parto e aos 42 dias após o parto.

Teste de Wilcoxon		
Tratamento	<i>n</i>	<i>P</i>
ECC ao parto	11	0,0313
ECC aos 42 dias após o parto	7	

Score de condição corporal (ECC) de vacas Holandesas com retenção de placenta ao parto e aos 42 dias após o parto.

Teste de Wilcoxon		
Tratamento	<i>n</i>	<i>P</i>
ECC ao parto	9	0,5000
ECC aos 42 dias após o parto	3	

Tabela 10

Temperatura retal média de vacas Holandesas sem e com retenção de placenta no momento da biópsia no primeiro dia após o parto, de acordo com o grupo experimental.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	0,6928	0,4973
Resíduo	18		

Temperatura retal média de vacas Holandesas sem e com retenção de placenta no momento da biópsia no sétimo dia após o parto, de acordo com o grupo experimental.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	0,4375	0,6672
Resíduo	17		

Temperatura retal de vacas Holandesas sem retenção de placenta no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	0,4975	0,6308
Resíduo	9		

Temperatura retal de vacas Holandesas com retenção de placenta no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	0,3507	0,7349
Resíduo	8		

Item 3.3

Temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ no momento da biópsia em vacas Holandesas sem retenção de placenta.

Exato de Fisher			
Comparação	Temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	Temperatura retal $< 39,5^{\circ}\text{C}$	<i>P</i>
1 dia após o parto	5	6	1,0000
7 dias após o parto	4	6	

Temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ no momento da biópsia em vacas Holandesas com retenção de placenta.

Exato de Fisher			
Comparação	Temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	Temperatura retal $< 39,5^{\circ}\text{C}$	<i>P</i>
1 dia após o parto	5	4	1,0000
7 dias após o parto	6	3	

Tabela 11

Ocorrências de metrite puerperal aguda aos sete dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Exato de Fisher			
Comparação	MPA presente	MPA ausente	<i>P</i>
Holandesas sem retenção de placenta	6	4	0,3034
Holandesas com retenção de placenta	8	1	

Ocorrências de metrite clínica aos 14 dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Exato de Fisher			
Comparação	MC presente	MC ausente	<i>P</i>
Holandesas sem retenção de placenta	6	4	0,6380
Holandesas com retenção de placenta	6	2	

Ocorrências de endometrite clínica aos 21 dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Exato de Fisher			
Comparação	EC presente	EC ausente	<i>P</i>
Holandesas sem retenção de placenta	3	7	0,1534
Holandesas com retenção de placenta	5	2	

Ocorrências de endometrite clínica aos 28 dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Exato de Fisher			
Comparação	EC presente	EC ausente	<i>P</i>
Holandesas sem retenção de placenta	3	5	<u>0,0754</u>
Holandesas com retenção de placenta	5	0	

Tabela 12

Ocorrências de endometrite subclínica aos 21 dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Comparação	Exato de Fisher		P
	ES presente	ES ausente	
Holandesas sem retenção de placenta	1	9	0,0037
Holandesas com retenção de placenta	6	1	

Ocorrências de endometrite subclínica aos 28 dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Comparação	Exato de Fisher		P
	ES presente	ES ausente	
Holandesas sem retenção de placenta	3	5	0,2657
Holandesas com retenção de placenta	4	1	

Gráfico 1

Isolados uterinos com presença de *Escherichia coli* (*E. coli*) em vacas Holandesas sem e com retenção de placenta, no 1º dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		P
	<i>E. coli</i> presente	<i>E. coli</i> ausente	
Holandesas sem retenção de placenta	6	5	0,3156
Holandesas com retenção de placenta	6	1	

Isolados uterinos com presença de *Escherichia coli* (*E. coli*) em vacas Holandesas sem e com retenção de placenta, no 7º dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		P
	<i>E. coli</i> presente	<i>E. coli</i> ausente	
Holandesas sem retenção de placenta	5	5	0,6329
Holandesas com retenção de placenta	4	2	

Isolados uterinos com presença de *Escherichia coli* (*E. coli*) em vacas Holandesas sem e com retenção de placenta, no 14º dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		P
	<i>E. coli</i> presente	<i>E. coli</i> ausente	
Holandesas sem retenção de placenta	3	5	1,0000
Holandesas com retenção de placenta	3	4	

Isolados uterinos com presença de *Escherichia coli* (*E. coli*) em vacas Holandesas sem e com retenção de placenta, no 21º dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		P
	<i>E. coli</i> presente	<i>E. coli</i> ausente	
Holandesas sem retenção de placenta	1	5	1,0000
Holandesas com retenção de placenta	1	3	

Gráfico 2

Ocorrências de febre em vacas Holandesas sem e com retenção de placenta, no 1º dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		P
	Temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	Temperatura retal $< 39,5^{\circ}\text{C}$	
Holandesas sem retenção de placenta	5	6	1,0000
Holandesas com retenção de placenta	4	7	

Ocorrências de febre em vacas Holandesas sem e com retenção de placenta, no 7º dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		P
	Temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	Temperatura retal $< 39,5^{\circ}\text{C}$	
Holandesas sem retenção de placenta	4	6	1,0000
Holandesas com retenção de placenta	3	3	

Ocorrências de febre em vacas Holandesas sem e com retenção de placenta, no 14º dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		P
	Temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	Temperatura retal $< 39,5^{\circ}\text{C}$	
Holandesas sem retenção de placenta	3	5	1,0000
Holandesas com retenção de placenta	2	5	

Ocorrências de febre em vacas Holandesas sem e com retenção de placenta, no 21º dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		P
	Temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	Temperatura retal $< 39,5^{\circ}\text{C}$	
Holandesas sem retenção de placenta	0	6	0,4000
Holandesas com retenção de placenta	1	3	

Gráfico 3

Amostras de conteúdo uterino de vacas Holandesas sem e com retenção de placenta com odor fétido, no 7º dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		P
	Odor fétido	Sem cheiro	
Holandesas sem retenção de placenta	6	4	0,5879
Holandesas com retenção de placenta	5	1	

Amostras de conteúdo uterino de vacas Holandesas sem e com retenção de placenta com odor fétido, no 14º dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		P
	Odor fétido	Sem cheiro	
Holandesas sem retenção de placenta	7	1	1,0000
Holandesas com retenção de placenta	6	1	

Amostras de conteúdo uterino de vacas Holandesas sem e com retenção de placenta com odor fétido, no 21º dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		P
	Odor fétido	Sem cheiro	
Holandesas sem retenção de placenta	3	3	0,5714
Holandesas com retenção de placenta	3	1	

Tabela 14

Período de involução uterina de acordo com o grupo experimental.

Fonte de variação	GL	t	P
Tratamento	1	1,2650	0,2415
Resíduo	8		

Retorno da atividade ovariana luteal de acordo com o grupo experimental.

Fonte de variação	GL	t	P
Tratamento	1	0,3367	0,7422
Resíduo	12		

Gráficos 4 e 5

Transcrição gênica endometrial dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e dos coreceptores CD14 e MD2 em vacas Holandesas sem retenção de placenta e Holandesas com retenção de placenta no primeiro dia após o parto.

Teste de Mann-Whitney		
Comparações	<i>n</i>	<i>P</i>
Comparações 1		
TLR1/6 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,9591
TLR1/6 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparações 2		
TLR2 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,6454
TLR2 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparações 3		
TLR4 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,4418
TLR4 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparações 4		
TLR5 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,1605
TLR5 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparações 5		
TLR9 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,1949
TLR9 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparações 6		
CD14 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,2786
CD14 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparações 7		
MD2 no primeiro dia após o parto	8	0,7104
MD2 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparações 8		
NOD1 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,6454
NOD1 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparações 9		
NOD2 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,5054
NOD2 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	

Transcrição gênica endometrial dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e dos coreceptores CD14 e MD2 em vacas Holandesas sem retenção de placenta e Holandesas com retenção de placenta no sétimo dia após o parto.

Teste de Mann-Whitney		
Comparações	<i>n</i>	<i>P</i>
Comparações 1		
TLR1/6 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,6454
TLR1/6 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparações 2		
TLR2 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,3282
TLR2 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparações 3		
TLR4 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,7984
TLR4 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparações 4		
TLR5 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,7984
TLR5 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	

<i>Cont.</i> Comparação 5	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR9 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,6454
TLR9 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparação 6	<i>n</i>	<i>P</i>
CD14 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,1949
CD14 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparação 7	<i>n</i>	<i>P</i>
MD2 no primeiro dia após o parto	8	0,5350
MD2 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparação 8	<i>n</i>	<i>P</i>
NOD1 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,3282
NOD1 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	
Comparação 9	<i>n</i>	<i>P</i>
NOD2 vacas Holandesas sem retenção de placenta	8	0,9591
NOD2 vacas Holandesas com retenção de placenta	8	

Gráfico 4

Transcrição gênica endometrial dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e dos coreceptores CD14 e MD2 em vacas Holandesas sem RP, de acordo com o momento da biópsia.

Teste de Wilcoxon		
Comparação 1	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR1/6 no primeiro dia após o parto	8	0,7422
TLR1/6 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 2	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR2 no primeiro dia após o parto	8	0,8438
TLR2 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 3	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR4 no primeiro dia após o parto	8	0,6406
TLR4 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 4	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR5 no primeiro dia após o parto	8	0,8438
TLR5 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 5	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR9 no primeiro dia após o parto	8	0,6406
TLR9 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 6	<i>n</i>	<i>P</i>
NOD1 no primeiro dia após o parto	8	0,5781
NOD1 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 7	<i>n</i>	<i>P</i>
NOD2 no primeiro dia após o parto	8	0,0781
NOD2 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 8	<i>n</i>	<i>P</i>
CD14 no primeiro dia após o parto	8	0,0781
CD14 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 9	<i>n</i>	<i>P</i>
MD2 no primeiro dia após o parto	7	0,2188
MD2 no sétimo dia após o parto	7	

Gráfico 5

Transcrição gênica endometrial dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e dos coreceptores CD14 e MD2 em vacas Holandesas com RP, de acordo com o momento da biópsia.

Teste de Wilcoxon		
Comparação	<i>n</i>	<i>P</i>
Comparação 1		
TLR1/6 no primeiro dia após o parto	8	0,2500
TLR1/6 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 2		
TLR2 no primeiro dia após o parto	8	0,0156
TLR2 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 3		
TLR4 no primeiro dia após o parto	8	<u>0,0547</u>
TLR4 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 4		
TLR5 no primeiro dia após o parto	8	0,9453
TLR5 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 5		
TLR9 no primeiro dia após o parto	8	0,3828
TLR9 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 6		
NOD1 no primeiro dia após o parto	8	0,3125
NOD1 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 7		
NOD2 no primeiro dia após o parto	8	0,9453
NOD2 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 8		
CD14 no primeiro dia após o parto	8	0,0078
CD14 no sétimo dia após o parto	8	
Comparação 9		
MD2 no primeiro dia após o parto	7	0,5781
MD2 no sétimo dia após o parto	7	

Tabela 15

Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em vacas Holandesas sem retenção de placenta (RP), no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Correlação de Spearman (Valores do nível de significância <i>P</i>)								
Transcrição gênica endometrial em vacas Holandesas sem RP no primeiro dia após o parto								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,1511	0,8401	0,2162	0,8401	0,4618	<u>0,0962</u>	0,1150	0,9063
TLR2		0,7930	<u>0,0962</u>	0,4618	0,4279	0,3268	0,6646	0,1389
TLR4			0,6191	0,8401	0,5364	0,3268	<u>0,0962</u>	0,3536
TLR5				0,8820	<u>0,0694</u>	<u>0,0694</u>	0,2162	0,3536
TLR9					0,8401	0,1150	0,3268	0,6615
NOD1						0,4279	0,5364	0,3024
NOD2							0,0218	0,3536
CD14								0,6615

Cont. Transcrição gênica endometrial em vacas Holandesas sem RP no sétimo dia após o parto								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,5008	0,8820	0,0218	0,2992	0,2992	0,3268	0,0368	0,3536
TLR2		0,6191	<u>0,0694</u>	0,1966	0,6646	0,0458	0,0218	0,4444
TLR4			0,9768	0,7520	0,1966	0,7520	0,5364	0,5948
TLR5				0,1150	0,1511	0,0218	0,0022	<u>0,0663</u>
TLR9					0,7520	0,2162	0,1511	0,0480
NOD1						0,1710	0,4279	0,0480
NOD2							0,0458	0,0341
CD14								0,2357

Tabela 16

Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais de receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em vacas Holandesas com retenção de placenta (RP), no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Correlação de Spearman (Valores do nível de significância <i>P</i>)								
Transcrição gênica endometrial em vacas Holandesas com RP no primeiro dia após o parto								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,1150	0,8401	0,0154	0,0368	0,1150	0,0004	0,7930	0,1389
TLR2		0,6191	0,2162	0,1710	0,5008	0,1710	0,7033	0,7825
TLR4			0,5008	0,6646	0,6191	0,6646	0,4279	0,9063
TLR5				<u>0,0694</u>	0,0279	0,0046	0,7520	<u>0,0881</u>
TLR9					0,4279	0,0218	0,7520	0,8397
NOD1						<u>0,0694</u>	0,8820	0,0067
NOD2							0,9349	0,1389
CD14								0,9635
Transcrição gênica endometrial em vacas Holandesas com RP no sétimo dia após o parto								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,3268	0,7520	0,1150	0,5821	<u>0,0962</u>	<u>0,0576</u>	0,7033	0,9063
TLR2		0,7930	0,7033	0,4279	0,2162	0,0458	0,3894	0,3956
TLR4			0,4279	0,9768	0,7520	0,5821	0,4279	0,5560
TLR5				0,9768	0,2992	0,1150	0,8401	0,4444
TLR9					0,6191	0,4618	0,7033	0,1389
NOD1						0,3599	0,5821	0,3956
NOD2							0,2431	0,9063
CD14								0,5560

Tabela 17

Correlações (*r*) entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores CD14 e MD2, e a temperatura retal (TR) das vacas Holandesas sem retenção de placenta e Holandesas com retenção de placenta, no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).

Cont. Correlação de Spearman (Valores do nível de significância <i>P</i>)										
Grupo	TR	TLR1/6	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
Holandesas	1 dpp	0,2992	<u>0,0694</u>	0,4618	0,7930	0,2992	0,4279	0,9768	0,9349	0,3956
sem RP	7 dpp	0,8820	0,9768	0,3599	0,5821	0,8401	0,7033	0,6191	0,7033	0,5560
Holandesas	1 dpp	0,9349	0,8401	0,1710	>0,9999	0,9349	0,7930	0,9768	0,3599	0,5948
com RP	7 dpp	0,9349	0,8401	0,1710	>0,9999	0,9349	0,7930	0,9768	0,3599	0,5948

Tabela 18

Correlações (*r*) entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores CD14 e MD2, e o período de involução uterina (IU) das vacas Holandesas, no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).

Correlação de Spearman (Valores do nível de significância <i>P</i>)										
Grupo	IU	TLR1/6	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
Holandesas	1 dpp	<u>0,0883</u>	0,0047	0,5603	0,0105	0,1334	0,2325	0,0390	0,0544	0,3599
s/ e c/ RP	7 dpp	0,0072	0,3869	0,5603	0,0058	0,8651	0,1440	0,0490	0,6321	0,5821

CAPÍTULO III

Tabela 20

Score de condição corporal ao parto de acordo com o grupo experimental.

Teste de Mann-Whitney		
Tratamento	<i>n</i>	<i>P</i>
Gir sem retenção de placenta	9	0,3532
F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	12	

Score de condição corporal aos 42 dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Teste de Mann-Whitney		
Tratamento	<i>n</i>	<i>P</i>
Gir sem retenção de placenta	9	0,1484
F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	12	

Score de condição corporal (ECC) de vacas Gir ao parto e aos 42 dias após o parto.

Teste de Wilcoxon		
Tratamento	<i>n</i>	<i>P</i>
ECC ao parto	9	0,4375
ECC aos 42 dias após o parto	9	

Score de condição corporal (ECC) de vacas F1 Holandês x Gir ao parto e aos 42 dias após o parto.

Teste de Wilcoxon		
Tratamento	<i>n</i>	<i>P</i>
ECC ao parto	12	<u>0,0625</u>
ECC aos 42 dias após o parto	12	

Tabela 21

Temperatura retal média de vacas Gir e F1 Holandês x Gir no momento da biópsia no primeiro dia após o parto, de acordo com o grupo experimental.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	0,4210	0,6787
Resíduo	17		

Temperatura retal média de vacas Gir e F1 Holandês x Gir no momento da biópsia no sétimo dia após o parto, de acordo com o grupo experimental.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	0,3816	0,7070
Resíduo	19		

Temperatura retal média de vacas Gir no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	1,614	0,1506
Resíduo	7		

Temperatura retal média de vacas F1 Holandês x Gir no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	0,1085	0,9155
Resíduo	11		

Item 3.2

Temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ no momento da biópsia em vacas Gir, no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		<i>P</i>
	$\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	$< 39,5^{\circ}\text{C}$	
1 dia após o parto	2	6	1,0000
7 dias após o parto	1	7	

Temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$ no momento da biópsia em vacas F1 Holandês x Gir, no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Comparação	Exato de Fisher		<i>P</i>
	$\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	$< 39,5^{\circ}\text{C}$	
1 dia após o parto	3	9	1,0000
7 dias após o parto	3	9	

Tabela 22

Ocorrências de metrite puerperal aguda aos sete dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Comparação	Exato de Fisher		<i>P</i>
	MPA presente	MPA ausente	
Gir sem retenção de placenta	0	9	1,0000
F1 sem retenção de placenta	1	11	

Ocorrências de metrite clínica aos 14 dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Comparação	Exato de Fisher		<i>P</i>
	MC presente	MC ausente	
Gir sem retenção de placenta	2	7	1,0000
F1 sem retenção de placenta	2	10	

Tabela 23

Ocorrências de endometrite clínica aos 21 dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Exato de Fisher			
Comparação	EC presente	EC ausente	<i>P</i>
Gir sem retenção de placenta	1	8	1,0000
F1 sem retenção de placenta	1	11	

Ocorrências de endometrite clínica aos 28 dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Exato de Fisher			
Comparação	EC presente	EC ausente	<i>P</i>
Gir sem retenção de placenta	1	8	0,4286
F1 sem retenção de placenta	0	12	

Ocorrências de endometrite clínica aos 35 dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Exato de Fisher			
Comparação	EC presente	EC ausente	<i>P</i>
Gir sem retenção de placenta	0	9	0,4857
F1 sem retenção de placenta	2	10	

Ocorrências de endometrite clínica aos 42 dias após o parto de acordo com o grupo experimental.

Exato de Fisher			
Comparação	EC presente	EC ausente	<i>P</i>
Gir sem retenção de placenta	0	9	-
F1 sem retenção de placenta	0	12	

Tabela 24

Ocorrências de endometrite subclínica aos 21 dias após o parto de acordo com os grupos experimentais.

Exato de Fisher			
Comparação	ES presente	ES ausente	<i>P</i>
Gir sem retenção de placenta	0	9	0,2286
F1 sem retenção de placenta	3	9	

Ocorrências de endometrite subclínica aos 28 dias após o parto de acordo com os grupos experimentais.

Exato de Fisher			
Comparação	ES presente	ES ausente	<i>P</i>
Gir sem retenção de placenta	2	7	0,5534
F1 sem retenção de placenta	1	11	

Ocorrências de endometrite subclínica aos 35 dias após o parto de acordo com os grupos experimentais.

Exato de Fisher			
Comparação	ES presente	ES ausente	<i>P</i>
Gir sem retenção de placenta	1	8	1,0000
F1 sem retenção de placenta	1	11	

Ocorrências de endometrite subclínica aos 42 dias após o parto de acordo com os grupos experimentais.

Exato de Fisher			
Comparação	ES presente	ES ausente	<i>P</i>
Gir sem retenção de placenta	0	9	-
F1 sem retenção de placenta	0	12	

Tabela 25

Período de involução uterina de acordo com o grupo experimental.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	0,2759	0,7856
Resíduo	19		

Gráficos 6 e 7

Transcrição gênica endometrial dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e dos coreceptores CD14 e MD2 em vacas Gir e F1 Holandês x Gir no primeiro dia após o parto.

Teste de Mann-Whitney		
Comparações	<i>n</i>	<i>P</i>
Comparações 1		
TLR1/6 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,2991
TLR1/6 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparações 2		
TLR2 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,2105
TLR2 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparações 3		
TLR4 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,1738
TLR4 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparações 4		
TLR5 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,1142
TLR5 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparações 5		
TLR9 vacas Gir sem retenção de placenta	7	>0,9999
TLR9 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparações 6		
CD14 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,7577
CD14 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparações 7		
MD2 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,2523
MD2 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparações 8		
NOD1 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,1738
NOD1 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparações 9		
NOD2 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,9182
NOD2 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	

Transcrição gênica endometrial dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e dos coreceptores CD14 e MD2 em vacas Gir e F1 Holandês x Gir no sétimo dia após o parto.

Teste de Mann-Whitney		
Comparações	<i>n</i>	<i>P</i>
Comparações 1		
TLR1/6 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,5360
TLR1/6 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparações 2		
TLR2 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,8665
TLR2 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
	<i>n</i>	<i>P</i>

<i>Cont.</i> Comparação 3		
TLR4 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,1246
TLR4 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparação 4	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR5 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,8371
TLR5 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparação 5	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR9 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,2991
TLR9 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparação 6	<i>n</i>	<i>P</i>
CD14 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,9497
CD14 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparação 7	<i>n</i>	<i>P</i>
MD2 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,4009
MD2 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparação 8	<i>n</i>	<i>P</i>
NOD1 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,7577
NOD1 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	
Comparação 9	<i>n</i>	<i>P</i>
NOD2 vacas Gir sem retenção de placenta	7	0,6806
NOD2 vacas F1 Holandês x Gir sem retenção de placenta	9	

Gráfico 6

Transcrição gênica endometrial dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e dos coreceptores MD2 e CD14 em vacas Gir, de acordo com o momento da biópsia.

Teste de Wilcoxon		
Comparação	<i>n</i>	<i>P</i>
Comparação 1	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR1/6 no primeiro dia após o parto	7	0,2188
TLR1/6 no sétimo dia após o parto	7	
Comparação 2	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR2 no primeiro dia após o parto	7	> 0,9999
TLR2 no sétimo dia após o parto	7	
Comparação 3	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR4 no primeiro dia após o parto	7	0,5781
TLR4 no sétimo dia após o parto	7	
Comparação 4	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR5 no primeiro dia após o parto	7	0,0156
TLR5 no sétimo dia após o parto	7	
Comparação 5	<i>n</i>	<i>P</i>
TLR9 no primeiro dia após o parto	7	0,9375
TLR9 no sétimo dia após o parto	7	
Comparação 6	<i>n</i>	<i>P</i>
NOD1 no primeiro dia após o parto	7	0,2188
NOD1 no sétimo dia após o parto	7	
Comparação 7	<i>n</i>	<i>P</i>
NOD2 no primeiro dia após o parto	7	0,6875
NOD2 no sétimo dia após o parto	7	
Comparação 8	<i>n</i>	<i>P</i>
CD14 no primeiro dia após o parto	7	<u>0,0781</u>
CD14 no sétimo dia após o parto	7	
	<i>n</i>	<i>P</i>

Cont. Comparação 9

MD2 no primeiro dia após o parto	7	0,4375
MD2 no sétimo dia após o parto	7	

Gráfico 7

Transcrição gênica endometrial dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e dos coreceptores CD14 e MD2 em vacas F1 Holandês x Gir, de acordo com o momento da biópsia.

Teste de Wilcoxon		
Comparação	<i>n</i>	<i>P</i>
Comparação 1		
TLR1/6 no primeiro dia após o parto	9	0,5703
TLR1/6 no sétimo dia após o parto	9	
Comparação 2		
TLR2 no primeiro dia após o parto	9	0,2031
TLR2 no sétimo dia após o parto	9	
Comparação 3		
TLR4 no primeiro dia após o parto	9	0,4258
TLR4 no sétimo dia após o parto	9	
Comparação 4		
TLR5 no primeiro dia após o parto	9	0,5703
TLR5 no sétimo dia após o parto	9	
Comparação 5		
TLR9 no primeiro dia após o parto	9	0,0391
TLR9 no sétimo dia após o parto	9	
Comparação 6		
NOD1 no primeiro dia após o parto	9	0,9102
NOD1 no sétimo dia após o parto	9	
Comparação 7		
NOD2 no primeiro dia após o parto	9	0,9102
NOD2 no sétimo dia após o parto	9	
Comparação 8		
CD14 no primeiro dia após o parto	9	0,9102
CD14 no sétimo dia após o parto	9	
Comparação 9		
MD2 no primeiro dia após o parto	7	0,8438
MD2 no sétimo dia após o parto	7	

Tabela 26

Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em vacas Gir, no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Correlação de Spearman (Valores do nível de significância <i>P</i>)								
Transcrição gênica endometrial em vacas Gir no primeiro dia após o parto								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,3536	0,5560	0,0341	0,1667	0,3956	0,7825	0,0067	0,2417
TLR2		<u>0,0663</u>	0,5948	0,3024	0,5948	0,3536	0,2000	0,4972
TLR4			0,2667	0,2357	0,5560	0,2000	0,3956	0,9194
TLR5				0,2000	0,3536	0,7825	0,0480	<u>0,0583</u>
TLR9					0,7131	<u>0,0663</u>	0,3536	0,9194
NOD1						0,6615	0,3956	0,2417

Cont.								
NOD2							0,9635	0,5639
CD14								0,1750

Transcrição gênica endometrial em vacas Gir no sétimo dia após o parto								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,0238	0,2000	0,0480	0,2357	0,1095	0,1389	0,1389	0,7139
TLR2		0,3536	0,2000	0,3024	0,2357	0,4444	<u>0,0881</u>	0,8028
TLR4			0,3536	0,9635	0,9635	0,0480	0,0238	0,8028
TLR5				0,0238	0,2000	<u>0,0881</u>	0,4976	0,1750
TLR9					0,3536	0,5560	0,9635	0,3556
NOD1						0,5948	0,6615	0,9194
NOD2							0,2667	0,1028
CD14								0,4972

Tabela 27

Correlações entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, e coreceptores CD14 e MD2 em vacas F1 Holandês x Gir, no primeiro e no sétimo dia após o parto.

Correlação de Spearman (Valores do nível de significância <i>P</i>)								
Transcrição gênica endometrial em vacas F1 Holandês x Gir no primeiro dia após o parto								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,5809	0,8432	0,0172	<u>0,0503</u>	0,3363	0,0369	0,1328	0,2675
TLR2		0,2912	0,5517	>0,9999	0,6436	0,5517	0,6777	0,6191
TLR4			0,4101	0,7435	0,2125	0,4933	0,4933	0,1966
TLR5				<u>0,0503</u>	0,0433	<u>0,0968</u>	0,8100	0,1511
TLR9					0,2125	0,6777	0,2125	0,8401
NOD1						0,2499	0,8100	0,3894
NOD2							0,6134	<u>0,0962</u>
CD14								0,7520
Transcrição gênica endometrial em vacas F1 Holandês x Gir no sétimo dia após o parto								
	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
TLR1/6	0,5008	0,7756	0,0083	0,8100	0,0045	<u>0,0589</u>	0,0433	0,1511
TLR2		>0,9999	0,2675	0,0368	0,1710	0,6191	<u>0,0962</u>	0,6646
TLR4			0,7435	0,3853	0,9816	0,8432	0,8432	0,9768
TLR5				0,9816	0,0004	0,3363	0,1618	0,1710
TLR9					0,6134	0,5517	0,1777	0,2431
NOD1						0,1938	0,0311	0,2675
NOD2							<u>0,0666</u>	0,9768
CD14								0,5821

Tabela 28

Correlações (r) entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores CD14 e MD2, e a temperatura retal (TR) das vacas Gir e F1 Holandês x Gir, no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).

Correlação de Spearman (Valores do nível de significância <i>P</i>)										
Grupo	TR	TLR1/6	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
Gir	1 dpp	0,3536	0,3536	0,8397	0,9063	0,7131	0,8397	0,5948	0,3024	>0,9999
sem RP	7 dpp	0,6615	0,9635	0,2357	0,1389	0,2000	0,9063	0,2357	0,5948	0,3556
F1	1 dpp	0,2499	0,9816	0,4366	0,8801	0,2499	0,9816	0,3363	0,2499	0,7930
sem RP	7 dpp	0,4933	0,7033	0,3853	0,8801	0,4933	0,9816	0,8801	0,8100	0,4933

Tabela 29

Correlações (r) entre os níveis de transcrição gênica endometriais dos receptores tipo *Toll* (TLRs) 1/6, 2, 4, 5 e 9, NODs 1 e 2, coreceptores CD14 e MD2, e o período de involução uterina (IU) das vacas Gir e F1 Holandês x Gir, no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).

Correlação de Spearman (Valores do nível de significância <i>P</i>)										
Grupo	IU	TLR1/6	TLR2	TLR4	TLR5	TLR9	NOD1	NOD2	CD14	MD2
Gir	1 dpp	0,6615	0,7825	0,5948	0,3024	0,3024	0,4444	0,9635	0,9063	0,9999
sem RP	7 dpp	0,0480	0,3024	0,7131	<u>0,0663</u>	<u>0,0881</u>	0,0341	0,5560	0,5948	0,9194
F1	1 dpp	0,3853	0,0255	0,3853	0,3853	0,3853	0,2298	0,9484	0,3853	0,3599
sem RP	7 dpp	0,0214	0,4101	0,9484	0,3363	0,8432	0,1938	0,0061	<u>0,0857</u>	0,5364

Análises de regressão múltipla (Tabelas que não foram anexadas ao texto)

Análises de regressão múltipla: efeitos da ordem de parto (OP), do escore de condição corporal (ECC) e da ocorrência de retenção de placenta (RP) sobre os níveis de transcrição gênica endometriais dos imunomediadores no sétimo dia pós-parto (dpp).

Imunomediador	R ² (%)	Parâmetro	Coefficiente	Intervalo de confiança (95%)	<i>P</i>
TLR1/6 7dpp	10,35	OP > 2	38,719	-12,872 a 90,309	0,1355
		ECC 7dpp > 3,5	-23,922	-79,512 a 31,668	0,3857
		RP	5,805	-51,952 a 63,562	0,8384
TLR2 7dpp	6,10	OP > 2	-0,3235	-1,134 a 0,4872	0,4200
		ECC 7dpp > 3,5	-0,1967	-1,071 a 0,6780	0,6482
		RP	-0,4510	-1,358 a 0,4563	0,3168
TLR4 7dpp	3,09	OP > 2	-24,824	-81,644 a 31,997	0,3786
		ECC 7dpp > 3,5	-4,509	-65,735 a 56,718	0,8812
		RP	5,864	-57,749 a 69,477	0,8516
TLR5 7dpp	11,22	OP > 2	39,468	-14,147 a 93,082	0,1429
		ECC 7dpp > 3,5	-14,978	-72,749 a 42,793	0,5996
		RP	-30,068	-90,091 a 29,955	0,3137

Cont.

TLR9 7dpp	12,28	OP > 2	2,278	-0,9863 a 5,543	0,1640
		ECC 7dpp > 3,5	-1,847	-5,365 a 1,671	0,2915
		RP	-1,794	-5,449 a 1,861	0,3234
CD14 7dpp	9,35	OP > 2	35,039	-68,377 a 138,45	0,4935
		ECC 7dpp > 3,5	-65,669	177,10 a 45,765	0,2376
		RP	-66,438	-182,22 a 49,340	0,2498
MD2 7dpp	1,83	OP > 2	9,778	-74,721 a 94,276	0,8144
		ECC 7dpp > 3,5	-23,534	-114,58 a 67,516	0,6007
		RP	-24,071	-118,67 a 70,528	0,6064
NOD1 7dpp	23,15	OP > 2	11,197	-1,497 a 23,891	<u>0,0816</u>
		ECC 7dpp > 3,5	-11,56	-25,247 a 2,110	<u>0,0943</u>
		RP	-12,039	-26,251 a 2,172	<u>0,0937</u>
NOD2 7dpp	5,38	OP > 2	-12,775	-39,647 a 14,098	0,3386
		ECC 7dpp > 3,5	-11,197	-40,154 a 17,759	0,4350
		RP	-1,753	-31,837 a 28,332	0,9059

Análises de regressão múltipla: efeito dos níveis de transcrição gênica endometriais de imunomediadores sobre a temperatura retal (TR) no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).

Temperatura retal	R ² (%)	Imunomediador	Coefficiente	Intervalo de confiança (95%)	P
TR 1dpp	26,58	TLR1/6 1dpp	-0,001397	-0,003927 a 0,001132	0,2609
		TLR2 1dpp	0,002628	-0,007712 a 0,01297	0,5999
		TLR4 1dpp	0,0003411	-0,001079 a 0,001762	0,6200
		TLR5 1dpp	0,0004274	-0,001927 a 0,002782	0,7074
		TLR9 1dpp	-0,003933	-0,02006 a 0,01220	0,6147
		CD14 1dpp	0,0002425	-0,001071 a 0,001556	0,7027
		MD2 1dpp	0,001284	-0,002755 a 0,005324	0,5126
		NOD1 1dpp	0,0006149	-0,001305 a 0,002535	0,5096
		NOD2 1dpp	-0,0006236	-0,004798 a 0,003550	0,7572
TR 7dpp	26,27	TLR1/6 7dpp	0,0002378	-0,006121 a 0,006596	0,9380
		TLR2 7dpp	-0,002379	-0,3284 a 0,3236	0,9879
		TLR4 7dpp	-0,0001132	-0,004781 a 0,004555	0,9598
		TLR5 7dpp	0,001280	-0,009535 a 0,01210	0,8058
		TLR9 7dpp	-0,02349	-0,1451 a 0,09810	0,6886
		CD14 7dpp	0,0008639	-0,002810 a 0,004538	0,6262
		MD2 7pp	0,002321	-0,001498 a 0,006141	0,2170
		NOD1 7dpp	-0,002641	-0,05417 a 0,04888	0,9151
		NOD2 7dpp	-0,001856	-0,01053 a 0,006813	0,4517

Análises de regressão múltipla: efeito dos níveis de transcrição gênica endometriais de imunomediadores sobre a ocorrência de febre (temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$) no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp).

TR $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	R ² (%)	Imunomediador	Coefficiente	Intervalo de confiança (95%)	P
Febre 1dpp	24,31	TLR1/6 1dpp	-0,001128	-0,004187 a 0,001931	0,4485
		TLR2 1dpp	-0,001939	-0,01444 a 0,01057	0,7483
		TLR4 1dpp	0,0004141	-0,001304 a 0,002132	0,6186
		TLR5 1dpp	0,001080	-0,001767 a 0,003928	0,4358
		TLR9 1dpp	-0,003230	-0,02274 a 0,01628	0,7320
		CD14 1dpp	0,0004039	-0,001184 a 0,001992	0,5997

<i>Cont.</i>		MD2 1dpp	-0,001299	-0,006185 a 0,003586	0,5832
		NOD1 1dpp	0,0003633	-0,001959 a 0,002685	0,7462
		NOD2 1dpp	0,001120	-0,003928 a 0,006168	0,6466
Febre 7dpp	19,40	TLR1/6 7dpp	0,0005712	-0,004126 a 0,005269	0,8006
		TLR2 7dpp	-0,06270	-0,3035 a 0,1781	0,5899
		TLR4 7dpp	0,0001080	-0,003341 a 0,003557	0,9481
		TLR5 7dpp	0,0007602	-0,007229 a 0,008750	0,8433
		TLR9 7dpp	-0,02102	-0,1108 a 0,06880	0,6278
		CD14 7dpp	0,0004020	-0,002312 a 0,003116	0,7585
		MD2 7pp	0,001031	-0,001791 a 0,003853	0,4514
		NOD1 7dpp	0,004376	-0,03369 a 0,04244	0,8112
		NOD2 7dpp	-0,0002920	-0,006696 a 0,006112	0,9245

Análise de regressão múltipla: efeito dos níveis de transcrição gênica endometriais de imunomediadores no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp) sobre as ocorrências de metrite clínica (MC).

Inf. uterina	R ² (%)	Imunomediador	Coefficiente	Intervalo de confiança (95%)	P
MC (14dpp)	28,02	TLR2 1dpp	0,0006605	-0,004846 a 0,006167	0,8045
		TLR2 7dpp	0,1409	-0,1244 a 0,4063	0,2801
		TLR4 1dpp	-0,0001065	-0,002984 a 0,002771	0,9391
		TLR4 7dpp	-0,001658	-0,007247 a 0,003931	0,5420
		TLR5 1dpp	-0,0001864	-0,002516 a 0,002144	0,8688
		TLR5 7dpp	-0,002151	0,002254 a -0,006869	0,3520
		TLR9 1dpp	0,0008119	0,009863 a -0,01983	0,9353
		TLR9 7dpp	-7,558E-05	0,03454 a -0,07236	0,9983
		CD14 1dpp	0,0005142	0,0007577 a -0,001072	0,5055
		CD14 7dpp	-0,0007444	0,0009587 a -0,002751	0,4471

Análise de regressão múltipla: efeito dos níveis de transcrição gênica endometriais de imunomediadores no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp) sobre as ocorrências de endometrite clínica (EC).

Inf. uterina	R ² (%)	Imunomediador	Coefficiente	Intervalo de confiança (95%)	P
EC (21dpp)	29,97	TLR2 1dpp	-0,002852	-0,007586 a 0,001882	0,2218
		TLR2 7dpp	0,05437	-0,1811 a 0,2899	0,6335
		TLR4 1dpp	0,0008386	-0,001862 a 0,003540	0,5224
		TLR4 7dpp	-0,002369	-0,007573 a 0,002835	0,3515
		TLR5 1dpp	-0,001605	-0,003608 a 0,0003972	0,1094
		TLR5 7dpp	0,001181	-0,002893 a 0,005255	<u>0,5502</u>
		TLR9 1dpp	0,005289	-0,01261 a 0,02319	0,5426
		TLR9 7dpp	0,01707	-0,04840 a 0,08254	0,5905
		CD14 1dpp	0,0003955	-0,001197 a 0,001988	0,6081
		CD14 7dpp	-0,0001023	-0,001825 a 0,001621	0,9021

Análise de regressão múltipla: efeito dos níveis de transcrição gênica endometriais de imunomediadores no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp) sobre as ocorrências de endometrite subclínica (ES).

Inf. uterina	R ² (%)	Imunomediador	Coefficiente	Intervalo de confiança (95%)	P
ES 21dpp	39,09	TLR2 1dpp	-0,003916	-0,008689 a 0,0008573	0,1019
		TLR2 7dpp	0,008186	-0,2293 a 0,2456	0,9431
		TLR4 1dpp	0,001455	-0,001268 a 0,004178	0,2763
		TLR4 7dpp	-0,002183	-0,007430 a 0,003064	0,3937
		TLR5 1dpp	-0,0008604	-0,002879 a 0,001159	0,3824
		TLR5 7dpp	-0,0006625	-0,004770 a 0,003445	0,7387
		TLR9 1dpp	0,00107	-0,01698 a 0,01912	0,9021

<i>Cont.</i>	TLR9 7dpp	0,04561	-0,02040 a 0,1116	0,1638
	CD14 1dpp	0,0005135	-0,001092 a 0,002119	0,5100
	CD14 7dpp	-0,001309	-0,003046 a 0,0004281	0,1308

Análise de regressão múltipla: efeito dos níveis de transcrição gênica endometriais de imunomediadores no primeiro e no sétimo dia pós-parto (dpp) sobre as ocorrências de endometrite subclínica (ES).

Inf. uterina	R ² (%)	Imunomediador	Coefficiente	Intervalo de confiança (95%)	<i>P</i>
ES 28dpp	44,29	TLR2 1dpp	-0,004594	-0,01013 a 0,0009437	<u>0,0974</u>
		TLR2 7dpp	0,08728	-0,1735 a 0,3481	0,4867
		TLR4 1dpp	0,002179	-0,0009535 a 0,005311	0,1589
		TLR4 7dpp	-0,005409	-0,01132 a 0,0005068	<u>0,0703</u>
		TLR5 1dpp	-0,001055	-0,003457 a 0,001346	0,3640
		TLR5 7dpp	-0,0001811	-0,004909 a 0,004547	0,9360
		TLR9 1dpp	-0,002798	-0,02767 a 0,02207	0,8138
		TLR9 7dpp	0,06935	-0,005761 a 0,1445	<u>0,0679</u>
		CD14 1dpp	0,0003284	-0,001385 a 0,002041	0,6886
		CD14 7dpp	-0,001065	-0,002905 a 0,0007752	0,2365

CAPÍTULO IV

Item 3.1.

Tamanho médio do corpo lúteo de vacas Zebu dez dias após receberem infusão uterina de PBS ou *E. coli* inativada.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	0,8793	0,3965
Resíduo	13		

Tabela 35

Animais que manifestaram estro ou não ao final do protocolo hormonal, de acordo com o grupo experimental.

Parâmetro	Exato de Fisher		
	PBS	<i>E. coli</i> inativada	<i>P</i>
Animais que manifestaram estro	6	8	0,6285
Animais que não manifestaram estro	3	2	

Animais que ovularam ou não dez dias após receberem infusão uterina de PBS ou *E. coli* inativada.

Parâmetro	Exato de Fisher		
	PBS	<i>E. coli</i> inativada	<i>P</i>
Animais que ovularam	7	7	1,0000
Animais que não ovularam	2	3	

Tabela 36

Temperatura retal média de vacas Zebu antes da infusão uterina de PBS ou *E. coli* inativada.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	0,8967	0,3824
Resíduo	17		

Temperatura retal média de vacas Zebu depois da infusão uterina de PBS ou *E. coli* inativada.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	0,1258	0,9013
Resíduo	17		

Temperatura retal média de vacas Zebu dez dias após receberem infusão uterina de PBS ou *E. coli* inativada.

Fonte de variação	GL	<i>t</i>	<i>P</i>
Tratamento	1	1,156	0,2636
Resíduo	17		

Temperatura retal média de vacas Zebu de acordo com o momento de avaliação (antes da infusão uterina de PBS na fase de estro, após a infusão e no diestro).

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	<i>P</i>
Tratamento	2	0,1474	0,0737	0,6458	0,5374
Individual	8	1,2560	0,1570	1,3760	
Residual	16	1,8260	0,1141		
Coefficiente de Variação	3,230				

Temperatura retal média de vacas Zebu de acordo com o momento de avaliação (antes da infusão uterina de *E. coli* inativada na fase de estro, após a infusão e no diestro).

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	<i>P</i>
Tratamento	2	0,9740	0,4870	1,706	0,2097
Individual	9	2,4990	0,2776	0,9724	
Residual	18	5,1390	0,2855		
Coefficiente de Variação	8,612				

Tabela 37

Hipertermia (temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$) antes e após a infusão uterina de PBS na fase de estro.

Comparação	Exato de Fisher		<i>P</i>
	$\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	$< 39,5^{\circ}\text{C}$	
Antes da inoculação com PBS	2	7	1,0000
Após a inoculação com PBS	3	6	

Hipertermia (temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$) após a infusão uterina de PBS na fase de estro e dez dias depois, na fase de diestro.

Comparação	Exato de Fisher		<i>P</i>
	$\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	$< 39,5^{\circ}\text{C}$	
Após a inoculação com PBS	3	6	1,0000
Dez dias depois da inoculação	2	7	

Hipertermia (temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$) antes e após a infusão uterina de *E. coli* inativada na fase de estro.

Comparação	Exato de Fisher		<i>P</i>
	$\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	$< 39,5^{\circ}\text{C}$	
Antes da inoculação com <i>E. coli</i> inativada	3	6	0,6372
Após a inoculação com <i>E. coli</i> inativada	5	4	

Hipertermia (temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$) após a infusão uterina de *E. coli* inativada na fase de estro e dez dias depois, na fase de diestro.

Comparação	Exato de Fisher		P
	$\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	$< 39,5^{\circ}\text{C}$	
Após a inoculação com <i>E. coli</i> inativada	5	4	0,0294
Dez dias depois da inoculação	0	9	

Hipertermia (temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$) antes da infusão uterina na fase de estro.

Comparação	Exato de Fisher		P
	$\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	$< 39,5^{\circ}\text{C}$	
Vacas inoculadas com PBS	2	7	1,0000
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	3	6	

Hipertermia (temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$) depois da infusão uterina na fase de estro.

Comparação	Exato de Fisher		P
	$\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	$< 39,5^{\circ}\text{C}$	
Vacas inoculadas com PBS	3	6	0,6372
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	5	4	

Hipertermia (temperatura retal $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$) na fase de diestro

Comparação	Exato de Fisher		P
	$\geq 39,5^{\circ}\text{C}$	$< 39,5^{\circ}\text{C}$	
Vacas inoculadas com PBS	2	7	0,4706
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	0	9	

Tabela 38

Escore de hiperemia/hemorragia antes da infusão uterina de acordo com o grupo experimental.

Tratamento	Teste de Mann-Whitney	
	n	P
Vacas inoculadas com PBS	9	<u>0,0632</u>
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	9	

Escore de hiperemia/hemorragia depois da infusão uterina de acordo com o grupo experimental.

Tratamento	Teste de Mann-Whitney	
	n	P
Vacas inoculadas com PBS	9	0,8454
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	9	

Escore de hiperemia/hemorragia dez dias depois da infusão uterina, de acordo com o grupo experimental.

Tratamento	Teste de Mann-Whitney	
	n	P
Vacas inoculadas com PBS	9	0,4057
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	9	

Escore de hiperemia/hemorragia endometrial em vacas inoculadas com PBS, de acordo com o momento de avaliação.

Tratamento	Teste de Friedman	
	Fr	P
Antes da infusão uterina no estro	2,074	0,3545
Após a infusão uterina no estro		
No diestro		

Cont.

Escore de hiperemia/hemorragia endometrial em vacas inoculadas com *E. coli* inativada, de acordo com o momento de avaliação.

Teste de Friedman		
Tratamento	Fr	P
Antes da infusão uterina no estro	6,083	<u>0,0578</u>
Após a infusão uterina no estro		
No diestro		

Tabela 39

Escore de edema endometrial antes da infusão uterina de acordo com o grupo experimental.

Teste de Mann-Whitney		
Tratamento	n	P
Vacas inoculadas com PBS	9	0,3523
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	9	

Escore de edema endometrial depois da infusão uterina de acordo com o grupo experimental.

Teste de Mann-Whitney		
Tratamento	n	P
Vacas inoculadas com PBS	9	0,6342
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	9	

Escore de edema endometrial dez dias depois da infusão uterina, de acordo com o grupo experimental.

Teste de Mann-Whitney		
Tratamento	n	P
Vacas inoculadas com PBS	9	<u>0,0958</u>
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	9	

Escore de edema endometrial em vacas inoculadas com PBS, de acordo com o momento de avaliação.

Teste de Friedman		
Tratamento	Fr	P
Antes da infusão uterina no estro	1,615	0,4459
Após a infusão uterina no estro		
No diestro		

Escore de edema endometrial em vacas inoculadas com *E. coli* inativada, de acordo com o momento de avaliação.

Teste de Friedman		
Tratamento	Fr	P
Antes da infusão uterina no estro	3,308	0,1913
Após a infusão uterina no estro		
No diestro		

Tabela 40

Escore de inflamação endometrial antes da infusão uterina de acordo com o grupo experimental.

Teste de Mann-Whitney		
Tratamento	n	P
Vacas inoculadas com PBS	9	Não se aplica
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	9	

Escore de inflamação endometrial depois da infusão uterina de acordo com o grupo experimental.

Teste de Mann-Whitney		
Tratamento	<i>n</i>	<i>P</i>
Vacas inoculadas com PBS	9	0,0052
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	9	

Escore de inflamação endometrial dez dias depois da infusão uterina, de acordo com o grupo experimental.

Teste de Mann-Whitney		
Tratamento	<i>n</i>	<i>P</i>
Vacas inoculadas com PBS	9	0,9515
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	9	

Escore de inflamação endometrial em vacas inoculadas com PBS, de acordo com o momento de avaliação.

Teste de Friedman		
Tratamento	Fr	<i>P</i>
Antes da infusão uterina no estro	6,333	<u>0,0621</u>
Após a infusão uterina no estro		
No diestro		

Escore de inflamação endometrial em vacas inoculadas com *E. coli* inativada, de acordo com o momento de avaliação.

Teste de Friedman		
Comparação	Fr	<i>P</i>
Antes/Depois da infusão uterina no estro	15,077	< 0,01
Antes da infusão uterina no estro/Diestro		> 0,05
Depois da infusão uterina no estro/Diestro		< 0,05

Tabela 41

Ocorrência de hiperemia/hemorragia endometrial moderada ou grave após a infusão uterina de PBS ou *E. coli* inativada

Exato de Fisher			
Hiperemia/Hemorragia	Escores 0 e 1	Escores 2 e 3	<i>P</i>
Vacas inoculadas com PBS	7	2	1,0000
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	6	3	

Tabela 42

Ocorrência de edema endometrial moderado ou grave após a infusão uterina de PBS ou *E. coli* inativada

Exato de Fisher			
Edema	Escores 0 e 1	Escores 2 e 3	<i>P</i>
Vacas inoculadas com PBS	7	2	1,0000
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	6	3	

Tabela 43

Ocorrência de inflamação endometrial moderada ou grave após a infusão uterina de PBS ou *E. coli* inativada

Exato de Fisher			
Inflamação	Escores 0 e 1	Escores 2 e 3	<i>P</i>
Vacas inoculadas com PBS	9	0	0,0023
Vacas inoculadas com <i>E. coli</i> inativada	2	7	

