

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE PADRÕES MOLECULARES DE
PATÓGENOS NO ÚTERO BOVINO AO LONGO DA GESTAÇÃO**

ANA PATRÍCIA DE CARVALHO DA SILVA

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2011

Ana Patrícia de Carvalho da Silva

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE PADRÕES MOLECULARES DE
PATÓGENOS NO ÚTERO BOVINO AO LONGO DA GESTAÇÃO**

Dissertação apresentada à UFMG, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Curso: Mestrado em Ciência Animal

Área de concentração: Patologia Animal

Orientador: Renato de Lima Santos

Co-orientadores: Tatiane Alves da Paixão
Érica Azevedo Costa

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2011**

Dissertação defendida em 03 de fevereiro de 2011, com comissão examinadora constituída por:

Prof. Renato de Lima Santos
(Orientador)

Prof. João Bosco Barreto Filho

Prof. Marcos Bryan Heinemann

Dedico ao meu bom Deus que guia meus passos durante essa longa caminhada e à minha família, pelo apoio incondicional em todo e qualquer momento.

“O primeiro passo para a sabedoria é o silêncio; o segundo, a escuta”.

(Prov. 1:5)

“Não temas a pressão. Lembra-te que é ela que transforma um pedaço de carvão em diamante”. (Tiago 1:3,4)

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me ter dado força e coragem para nunca desistir dos meus objetivos, por nas horas difíceis sempre me mostrar o caminho e a decisão certa e pela oportunidade de poder seguir em frente na minha profissão.

Aos meus pais Ana Luisa de Carvalho da Silva e Edilson Patrício Siqueira da Silva pelo amor, amizade, paciência, dedicação, pelo imenso esforço para que eu sempre tivesse boa educação por sempre me apoiarem em todas as decisões da minha vida.

Aos meus queridos familiares por sorriram comigo nos dias felizes e choraram comigo nos meus dias difíceis, pelo amor, pelas orações e por me ensinarem o dom de ser perseverante.

Ao Auricélio Macêdo, pelo companheirismo incondicional, na alegria e nas horas difíceis, pelos conselhos, cuidado, paciência e compreensão nessa etapa única da minha vida.

Ao Prof. Renato de Lima Santos, pela orientação, oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e pela confiança.

À Prof^a. Tatiane Alves da Paixão pela co-orientação maravilhosa, confiança depositada, paciência e pelos conselhos valiosos, que com certeza foram essenciais para o desenvolvimento desse e de todos os outros trabalhos realizados durante o mestrado.

À Érica Azevedo Costa pela ótima co-orientação, pelos momentos de alegria no laboratório, pelo carinho e pela ajuda incondicional.

À Prof^a Ana Lúcia Abreu Silva, Alcina Vieira, Prof. Fábio Henrique Andrade, Ferdinan Melo e Prof. José Gomes Pereira pelo incentivo, exemplo de humildade, dignidade, sabedoria e principalmente por acreditarem e confiarem em mim sempre, mesmo distante.

Aos professores do setor de patologia Prof. Ernane Fagundes do Nascimento, Prof^a Rogéria Serakides, Prof^a Natália Ocarino, Prof^a Roselene Ecco e Prof. Roberto Guedes, pelo carinho, conhecimentos compartilhados, paciência, confiança e sem sombra de dúvidas pelo exemplo profissional.

Ao Prof. Andrey Pereira Lage e à Prof^a Maria Aparecida de Resende pela gentileza, receptividade, imenso carisma e por terem aberto as portas dos seus laboratórios, essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Adriana Amartino pelo imenso carinho, cuidado, simpatia e por fazer muito mais agradáveis ainda as tardes no laboratório de Patologia molecular.

Às minhas grandes amigas Taismara Simas, Marina Rios, Silvia França, Juliana Paniago e Teane Silva por estarem do meu lado em todos os sentidos, nas horas mais difíceis e mais felizes durante esses 2 anos em Belo-Horizonte, pelos conselhos, por acreditarem em mim, por me passarem confiança sempre, por me proporcionarem dias tão felizes na UFMG, trazendo a alegria e afastando toda tristeza que tentava se aproximar. Pessoas especiais, que mesmo um dia distantes, estarão sempre perto de mim, no meu coração.

aprendi a compartilhar alegrias, tristezas, conhecimentos e por estarem sempre presente durante o desenvolvimento do projeto.

Às amigas do Laboratório de Bacteriologia Aplicada da UFMG, Juliana Mol, Telma Alves, Monalisa Souta e Jordânia Almeida, que me proporcionaram tantos conhecimentos, pela alegria plena, preocupação, companheirismo, pelo apoio incondicional nas fases mais críticas do trabalho e por torcerem junto a mim para que desse sempre tudo certo.

Aos amigos do departamento de Patologia da UFMG Juneo Freitas, Janquerle Boeloni, Amanda Reis, Saira Neves, Eliana Paladino e Juliana Saes, pelo imenso carinho, auxílio, companheirismo e com quem aprendi muito durante esta trajetória.

Ao Laboratório de Genética Animal (EV-UFMG) por disponibilizar a máquina de RT-PCR em tempo real para realização da pesquisa.

À FAPEMA, pelo apoio financeiro que muito contribuiu para a realização desse tão desejado mestrado.

À Escola de Veterinária - UFMG, por ter me acolhido e proporcionado uma excelente formação.

Meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	15
REVISÃO DE LITERATURA	16
1 Imunidade inata	16
2 Placentação bovina	17
3 Receptores de padrões moleculares (PRRs)	17
4 TLRs e NLRs	18
3.1 TLRs e NLRs no útero gestante	20
3.2 Expressão de citocinas no útero gestante	20
5 Aborto infeccioso no terço final de gestação e a resposta imune inata	21
OBJETIVOS	23
MATERIAL E MÉTODOS	23
RESULTADOS	17
(i) Expressão de receptores de padrões moleculares no útero bovino ao longo da gestação.	28
(ii) Expressão de quimiocinas no útero bovino durante último trimestre de gestação em resposta à estimulação por microorganismos inativados	29
DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação do período gestacional com base na mensuração céfalo-coccígea.	28
Tabela 2. Lista de genes e iniciadores utilizados no RT-PCR em tempo real.	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Demonstração da colheita de material e disposição dos tecidos em placa de seis poços para estimulação. Regiões selecionadas para estudo do útero gestante de vacas provenientes de abatedouros do Estado de Minas Gerais: placentomo (A), região intercotiledonária (B), endométrio (C). Assepsia do útero gestante (D), abertura do corno uterino gestante (E). Disposição dos tecidos selecionados (endométrio e região intercotiledonária) para estimulação com microorganismos inativados em placa de seis poços contendo meio RPMI enriquecido (F).	30
Figura 2. Expressão de PRRs no útero bovino no primeiro trimestre (PTG), segundo trimestre (STG) e terceiro trimestre de gestação (TTG): (A) Expressão gênica de TLR 1/6-10, NOD1, NOD2 e MD2 em macrófagos (controle positivo). Cada coluna representa a média aritmética de três animais com barras de erro padrão. Expressão gênica de TLR 1/6-10, NOD1, NOD2 e MD2 no (B) placentomo, (C) endométrio e (D) região intercotiledonária. Cada coluna representa a média aritmética de seis animais com barras de erro padrão. Um asterisco (*) indica que a diferença é estatisticamente significativa ($p < 0.05$).	32
Figura 3. Expressão de (A) IL-8 e (B) GCP-2 em tecidos do útero gestante bovino cultivados depois de doze horas de estimulação por <i>B. abortus</i> , <i>S. Dublin</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>A. fumigatus</i> inativados. Cada coluna representa a média aritmética de seis animais com barras de erro padrão. Um asterisco (*) indica que a diferença é estatisticamente significativa ($p < 0.05$), comparando a expressão do gene sob estímulo ao controle não estimulado. Dois asteriscos (**) indicam que a diferença é estatisticamente significativa ($p < 0.05$), comparando-se a expressão do gene sob o estímulo dos diferentes microorganismos inativados em um mesmo tecido. Três asteriscos (***) indicam que a diferença é estatisticamente significativa ($p < 0.05$), comparando-se a expressão do gene sob o estímulo de um mesmo microorganismo inativado nos diferentes tecidos (endométrio e região intercotiledonária).	36

LISTA DE ABREVIACOES

CLR	- Receptor de lectina tipo C
CXCL	- <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
GCP-2	- <i>Granulocyte chemotactic peptide-2</i>
IL	- Interleucina
LPS	- Lipopolissacarídeo
MyD88	- Fator de diferenciação mielóide 88
NLR	- Receptor tipo NOD
NFκ-B	- Fator nuclear de cadeia leve kappa favorecedor de células B ativadas
NOD	- Domínio de oligomerização de nucleotídeo
PAMP	- Moléculas padrões associadas a patógenos
PBS	- <i>Phosphate buffered saline</i>
qRT-PCR	- Quantitativo - Transcriptase reversa – reação da polymerase em cadeia
PRRs	- Receptores de reconhecimento de patógenos
RLR	- Receptor tipo RIG-I
RNA	- cido ribonucléico
RIG I	- cido retinóico gene induzível-I
TLR	- <i>Toll like receptor</i>

RESUMO

Os PRRs (*pattern recognition receptors*) são componentes importantes do sistema imune inato e agem através do reconhecimento específico de PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*). Considerando a escassez de trabalhos a cerca da expressão desses PRRs e da resposta a microorganismos causadores de aborto no útero gestante bovino, aliado a importância do entendimento da patogênese das enfermidades dessa região, esse estudo objetivou caracterizar a expressão de TLR1-10, NOD1, NOD2 e MD2 no útero bovino ao longo da gestação, assim como investigar a resposta de diferentes regiões do útero gestante, verificando a expressão de quimiocinas, após estimulação das regiões por *Brucella abortus*, *Salmonella enterica* sorotipo Dublin (*S. Dublin*), *Listeria monocytogenes* e *Aspergillus fumigatus* inativados pelo calor, no terceiro trimestre de gestação. O RNA extraído do endométrio, placentomo e região intercotiledonária de vacas no primeiro (n=6), segundo (n=6) e terceiro (n=6) trimestres de gestação foi submetido ao RT-PCR em tempo real. O endométrio e a região intercotiledonária foram estimulados por microorganismos inativados pelo calor durante 12 horas e, em seguida, a transcrição gênica foi analisada por RT-PCR em tempo real. Não foi observada variação da expressão dos TLRs, NOD1, NOD2 e MD2 ao longo dos três trimestres de gestação no placentomo. No endométrio, houve variação significativa da expressão de TLR4 e TLR5 durante os três trimestres de gestação: a expressão de TLR4 foi maior no primeiro e terceiro trimestres de gestação, enquanto que a expressão de TLR5 foi maior nos dois últimos trimestres. Na região intercotiledonária, houve significativa variação na expressão de TLR 1/6, TLR7 e TLR8, que são mais intensamente expressos no primeiro trimestre de gestação. A expressão de CXCL6 e CXCL8 foi induzida no endométrio e região intercotiledonária no terceiro trimestre de gestação quando estimulados por *B. abortus* ou *S. Dublin* inativadas pelo calor. Assim, esse estudo demonstra que alguns PRRs são expressos no útero bovino durante a gestação, o que coincide com a habilidade que esse órgão possui de responder à estimulação de microorganismos inativados pelo calor, que sabidamente causam aborto em bovinos.

Palavras-chaves: PRRs, útero bovino gestante, aborto infeccioso, quimiocinas.

ABSTRACT

PRRs (pattern recognition receptors) are important components of the innate immunity. They recognize specific PAMPs (pathogen associated molecular patterns). Considering the scarcity of studies about expression of PRRs in bovine pregnant uterus and the uterine response to microorganisms that cause abortion in cattle, this study aimed to characterize the expression of TLR1-10, NOD1, NOD2 and MD2 in bovine pregnant uterus throughout gestation, and to investigate the responsiveness of different regions of the pregnant uterus at the third trimester of pregnancy, by assessing the expression of chemokines after stimulation with heat-killed *Brucella abortus*, *Salmonella enterica* serotype Dublin (*S. Dublin*), *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus fumigatus*. Total RNA was extracted from endometrium, placentome and intercotyledonary region of cows during the first (n=6), second (n=6) and third trimesters of pregnancy (n=6), and it was subjected to real time RT-PCR. Endometrium and intercotyledonary explants were stimulated with heat-killed microorganisms for 12 hours, followed by RNA extraction and real time RT-PCR. In the placentome, there was no significant variation in TLRs transcription throughout the three trimesters of pregnancy. In the endometrium, there was significant variation in TLR4 and TLR5 transcription during the three stages of gestation; i.e. TLR4 transcription was higher during the first and the third trimester, whereas TLR5 transcription was higher during the last two trimesters. In the intercotyledonary region, there was significant variation in transcription of TLR1/6, TLR7, and TLR8, which were more strongly expressed during the first trimester of pregnancy. At the third trimester of gestation, significant transcription of CXCL6 and CXCL8 was detected mostly in endometrial tissues in response to purified TLR4 and TLR2 ligands. Transcription of these chemokines was induced in the endometrium and intercotyledonary region at the third trimester of pregnancy when stimulated with heat-killed *B. abortus* or *S. Dublin*. Therefore, this study demonstrates that some PRRs are expressed in the uterus during pregnancy, which coincides with its ability to respond to stimulation with TLRs ligands as well as heat-killed organisms known to cause abortion in cattle.

Key words: PRRs, bovine pregnant uterus, infectious abortion, chemokines.

INTRODUÇÃO

A imunidade inata envolve o reconhecimento de moléculas associadas a microorganismos pelo hospedeiro que desencadeia uma resposta inflamatória ou imunológica contra patógenos. Estas moléculas, genericamente descritas como PAMPs (do inglês: *pathogen associated molecular patterns*), incluem lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, peptidoglicanos, flagelina e outros. PAMPs são reconhecidos por TLRs (*Toll-like receptors*) e CLR (C-type lectin receptors) ou por receptores citoplasmáticos chamados NLRs (*NOD-like receptors*) (Akira e Takeuchi, 2010).

O envolvimento de TLRs na imunidade inata foi descrito pela primeira vez em *Drosophila* sp. O receptor *Toll* nessa espécie é essencial para a defesa contra infecções fúngicas, uma vez que esta espécie possui apenas imunidade inata (Lemaitre *et al.*, 1996). Nos anos 90, foi descoberto um receptor em mamíferos ortólogo ao receptor *Toll* da *Drosophila* (Medzhitov *et al.*, 1997). Em seguida, foi identificada uma família de proteínas estruturalmente relacionadas ao receptor *Toll* desta espécie, coletivamente denominadas TLRs. A família dos TLRs possui 14 membros distintos identificados até agora, 10 membros em humanos (Takeuchi e Akira, 2010), bovinos, ovinos (Menzies e Ingham, 2006), caprinos (Tirumurugan *et al.*, 2010), aves (Brownlie e Allan, 2010) e suínos (Jann *et al.*, 2009), 12 em camundongos (Takeuchi e Akira, 2010) e 14 em peixes (Bhide *et al.*, 2009). Os TLRs são expressos por células epiteliais, endoteliais e leucócitos (Bhide *et al.*, 2009). Nos últimos anos houve considerável progresso na identificação da expressão destes receptores em bovinos, assim como da sua função na interação com patógenos causadores de várias doenças (Franchini *et al.*, 2005; Goldammer *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006).

Estes receptores agem como sensores para reconhecimento de determinadas estruturas. Por exemplo, TLR1, TLR2 e TLR6 reconhecem lipídios bacterianos como

ácido lipotecóico (LTA), enquanto que TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 reconhecem ácido nucléico, frequentemente de origem viral, apesar do TLR9 também reconhecer DNA bacteriano. TLR4 reconhece lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas como *Brucella* spp. e *Escherichia coli*, TLR5 se liga à flagelina, no entanto, o ligante do TLR10 ainda não é conhecido (Davies *et al.*, 2008).

A estrutura similar dos TLRs reflete na função comum de reconhecer estruturas de patógenos (Kaisho *et al.*, 2003). A ativação de TLR4, por exemplo, que se liga a LPS, induz a expressão de citocinas inflamatórias e moléculas co-estimulatórias (Medzhitov *et al.*, 1997). O reconhecimento de LPS requer outras moléculas além do TLR4. A proteína MD2 se associa à porção extracelular do TLR4 e reforça sua resposta ao LPS. O MD2 associa-se ao TLR4 no retículo endoplasmático/complexo de Golgi, formando o complexo TLR4/MD2, que se move para a superfície celular, onde MD-2 é secretado em excesso (Visintin *et al.*, 2001). Normalmente, o TLR4 reside na superfície celular, no entanto, em células deficientes para MD2, este é encontrado no complexo de Golgi, indicando que o MD2 é essencial para o tráfego intracelular de TLR4 (Nagai *et al.*, 2002). Estudos recentes identificaram *NOD-like receptors* (NLRs) e RIG – I (*retinoid acid-inducible gene 1*) - *like receptors* como duas famílias adicionais de receptores de resposta imune inata que reconhecem PAMPs no citoplasma (Inohara *et al.*, 2005; Meylan e Tschopp, 2006). A família dos NLRs proporciona complementaridade à família dos TLRs, porém há menos estudos e os mecanismos de detecção intracelular de PAMPs e a regulação da resposta imune inata são pouco entendidos. Vinte e dois genes que codificam proteínas do tipo NLRs são encontrados no genoma humano, dentre eles estão o NOD1 e o NOD2 (Istomin e Godzik, 2009).

O NOD1 foi originalmente identificado como uma molécula que, estruturalmente, está relacionada à regulação de apoptose.

Está envolvida na ativação de NF- κ B em resposta ao LPS e invasão celular por *Shigella flexneri*, indicando ser um receptor citoplasmático para LPS (Inohara *et al.*, 2001; Girardin *et al.*, 2001). O NOD2, da mesma família do NOD1, geralmente induz ativação do NF- κ B pelo LPS, sendo bastante estudada no mecanismo de sepsis (Brenmoehl *et al.*, 2007). Esses achados sugerem que a família dos NLRs está envolvida em respostas inflamatórias, possivelmente através do reconhecimento de LPS no citoplasma (Kaisho *et al.*, 2003). A descoberta dessas proteínas citosólicas sugere que quando microorganismos escapam da vigilância extracelular, existe outra linha de reconhecimento no citosol do hospedeiro (Kanneganti *et al.*, 2007).

Infecções do trato genital por agentes microbianos são importante causa de enfermidades, infertilidade e mortalidade em mamíferos, particularmente em bovinos e em humanos (Davies *et al.*, 2008). A manifestação clínica da infecção uterina depende do equilíbrio entre fatores como imunidade do animal, do número e da patogenicidade dos microrganismos e do ambiente uterino. No quesito imunidade, a defesa inicial uterina frente aos micróbios depende do sistema imune inato, incluindo os TLRs e os NLRs (Sheldon *et al.*, 2008). Os mecanismos de resposta imune inata têm sido bastante estudados na espécie bovina, entretanto, pouco se sabe a respeito da interação de TLRs e NODs com alguns microrganismos que sabidamente causam aborto no terço final de gestação como *B. abortus*, *S. Dublin*, *L. monocytogenes* e *A. fumigatus* (Nascimento e Santos, 2003).

Considerando a hipótese de que ocorre expressão de TLRs 1-10, NOD1, NOD2 e MD2 em diferentes regiões do útero gestante bovino e que a expressão dos mesmos varia ao longo da gestação, este trabalho teve como objetivos caracterizar a expressão de tais genes no útero gestante bovino ao longo da gestação, bem como investigar a sensibilidade de diferentes regiões do útero gestante, verificando a expressão de quimiocinas durante o terceiro trimestre de gestação após estimulação dos mesmos com *B. abortus*, *S. Dublin*, *L. monocytogenes* e *A. fumigatus*.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Imunidade inata

O sistema imune inato consiste na primeira linha de defesa contra patógenos e injúrias teciduais (Akira *et al.*, 2006; Beutler *et al.*, 2006). É representado por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independente de contato prévio com imunógenos ou agentes lesivos (Medzhitov e Janeway, 2000).

Macrófagos e células dendríticas têm papéis importantes durante a resposta imune inata, sendo classificados como células efetoras do processo, além dos neutrófilos e células *natural killers*. Além destas, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, consideradas “não profissionais” neste processo, contribuem também com a imunidade inata (Akira e Takeuchi, 2010). Mecanismos como liberação de mediadores inflamatórios, fagocitose, ativação de proteínas do sistema complemento, assim como a síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas compreendem os principais mecanismos envolvidos neste processo e estes são ativados por estímulos específicos, representados por estruturas moleculares presentes em microorganismos (Medzhitov *et al.*, 1997).

Até década de 1990, a imunologia foi marcada pelos avanços no conhecimento da imunidade adaptativa, um sistema restrito ao subfilo dos vertebrados. Estes avanços proporcionaram o desenvolvimento de vacinas aliado a melhores entendimentos na patogênese de doenças autoimunes. Ao contrário, a imunidade inata, o sistema imunológico filogeneticamente mais antigo permanecia pobremente caracterizado (Hopkins e Sriskandan, 2005). Em 1991, foi descoberto um gene em larvas de *Drosophila* sp., denominado de gene *Toll*. O termo *Toll*, originalmente referia-se a um receptor de superfície celular, responsável pela orientação dorso-ventral durante o

desenvolvimento da larva (Stein *et al.*, 1991). Posteriormente, atribuiu-se a este a função crucial na defesa contra fungos na *Drosophila* adulta, junto a outros peptídeos antimicrobianos (Lemaitre *et al.*, 1996). Nesse mesmo ano, o sequenciamento do genoma da *Drosophila* revelou similaridades entre o gene *Toll* e o receptor de Interleucina-1 humano, proporcionando assim inúmeras pesquisas a cerca destes receptores (Gay e Keith, 1991). Então, as primeiras proteínas estruturalmente relacionada ao gene *Toll* da *Drosophila* em humanos foram identificadas e designadas receptores tipo *Toll* (TLRs) 1 e 2 (Medzhitov *et al.*, 1997; Nomura *et al.*, 1994).

A identificação dos receptores tipo *Toll* em humanos e sua função no reconhecimento de patógenos pelo sistema imune inato proporcionaram a descoberta de outros PRRs e suas funções na regulação do sistema imunológico (Kumagai e Akira, 2010).

2. Placentação bovina

A interação entre o embrião e o útero é iniciada após a fertilização, com notável remodelamento endometrial e implantação. A sincronização do desenvolvimento embrionário e remodelamento do endométrio é um fator crucial para uma receptividade embrionária e uma gestação bem sucedida (Hashizume, 2007).

A placenta da vaca é classificada como cotiledonária, vilosa, adecídua e epiteliocorial, sendo formada quando o tecido fetal entra em contato com o tecido materno, para permitir a interação fisiológica entre a mãe e o feto (revisado por Santos e Marques Junior, 1996).

Na vaca, o alanto-cório se junta à porção superficial do endométrio em aproximadamente quatro semanas de gestação. Essa junção se torna mais íntima em áreas especializadas do endométrio, distribuídas uniformemente, denominadas de carúnculas. Como as membranas embrionárias extra fetais crescem e se expandem dentro do lúmen uterino, a superfície do alanto-cório se torna irregular ao longo das carúnculas. O remodelamento dessas áreas, agora denominadas de

cotilédones, progride para formação de vilosidades que se interdigitam com reentrâncias na superfície caruncular, aumentando assim a área da superfície de contato. A combinação desses dois tecidos, carúncula e cotilédone, é denominada de placentomo (Schlafer *et al.*, 2000). Os placentomos se desenvolvem em uma área limitada do endométrio, apenas na carúncula, e não na região inter-caruncular (Hashizume, 2007). Na vaca, 70 a 120 placentomos se desenvolvem e aumentam de tamanho durante a gestação. Os maiores estão localizados no terço médio do corno gestante e a estabilização do crescimento se dá entre 180 e 210 dias de gestação.

A implantação do embrião, na vaca, é superficial, uma vez que o blastocisto permanece no lúmen uterino, diferindo da implantação intersticial, em que o embrião se adentra a parede uterina. O estágio de justaposição (embrião-útero) inicia-se em 18 a 20 dias após a fertilização. A migração de células binucleadas fetais e projeções citoplasmáticas de células trofoblásticas junto às aberturas das glândulas endometriais são importantes para a fixação do concepto. A aderência das membranas fetais ao endométrio completa-se em torno do terceiro mês de gestação (revisado por Santos e Marques Junior, 1996).

3. Receptores de padrões moleculares (PRRs)

A habilidade de distinguir moléculas próprias de moléculas não próprias é um mecanismo essencial da imunidade inata, e esta envolve receptores que reconhecem estruturas microbianas altamente conservadas (Janeway, 1992). Os PRRs são responsáveis por detectar microorganismos, pelo reconhecimento de estruturas conservadas entre espécies microbianas denominadas PAMPs (Takeuchi e Akira, 2010). Recentemente, evidências demonstraram que PRRs também são responsáveis pelo reconhecimento de moléculas endógenas liberadas por células ativadas ou necróticas, denominadas de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Piccinini e Midwood, 2010).

O reconhecimento dos padrões moleculares pode ocorrer de forma direta, mediada por PRRs, presentes no citoplasma ou na superfície da membrana de células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais (Willment e Brown, 2007), ativando vias de sinalização intracelular, que culminam com rápida indução de citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias (Paixão *et al.*, 2009). O reconhecimento pode também ocorrer de forma indireta, em que PRRs solúveis opsonizam o patógeno, possibilitando a identificação dos mesmos através de receptores de opsonização, permitindo então que células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos possam mediar a captação e a morte de microorganismos, induzindo, assim, a resposta inflamatória. Este evento resulta em uma resposta imune adaptativa, demonstrando que a imunidade inata é extremamente importante para a ativação da imunidade adquirida (Takeuchi e Akira, 2010).

Atualmente, quatro diferentes famílias de PRRs foram identificadas. Estas famílias incluem as proteínas trans-membranas como receptores tipo Toll e os receptores de lectina tipo C, assim como as proteínas citoplasmáticas tipo NOD e os receptores tipo Ácido retinóico gene induzível-1 (Kumagai e Akira, 2010).

A lista de PRRs e de seus ligantes continua em expansão, sendo utilizadas técnicas de biologia molecular e observação *in vivo* da regulação do sistema imunológico, além de novas abordagens em biologia celular para elucidar complexas interações patógeno-hospedeiro (Takeuchi e Akira, 2010).

4. TLRS e NLRs

Dentre os PRRs já identificados, a família dos TLRs é a mais bem estudada e caracterizada, sendo seus membros responsáveis pelo reconhecimento de patógenos seja no meio extracelular ou em endossomos e lisossomos (Kawai e Akira, 2006).

Os TLRs caracterizam-se por possuírem um domínio amino-terminal extracelular composto por regiões repetidas contendo

alto teor de leucina (LRRs), seguido por um domínio transmembrânico único e um domínio citoplasmático globular denominado domínio receptor Toll/interleucina - 1 (TIR) (Akira, 2006).

Existem algumas particularidades entre os TLRs, por exemplo, o TLR2 parece ser o receptor mais promiscuo dentre eles e parece ser capaz de reconhecer o conjunto mais diversificado de PAMPs, incluindo vários componentes de bactérias gram-positivas como peptidoglicano (Yoshimura *et al.*, 1999), ácido lipotecóico (LTA) (Schwandner *et al.*, 1999), lipoarabinomano (Means *et al.*, 1999), lipoproteínas (Takeuchi *et al.*, 2002), assim como diferentes LPS de algumas bactérias gram-negativas (Werts *et al.*, 2001) e glucans em fungos (Gantner *et al.*, 2003). Essa promiscuidade vem sendo atribuída a sua capacidade exclusiva de formar heterodímeros com TLR1 e TLR6 (Ozinsky *et al.*, 2000). Estudos em que foram utilizadas lipoproteínas diaciladas e triaciladas demonstraram que as lipoproteínas diaciladas exigem formação do heterodímero TLR2/TLR6 para ativação, enquanto que as lipoproteínas triaciladas induzem ativação do sistema imune inato independentemente de TLR6, mas sim, principalmente através da formação do heterodímero TLR2/TLR1 (Alexopoulou *et al.*, 2002; Buwitt-Beckmann *et al.*, 2005; Takeuchi *et al.*, 2002). Estudos recentes, conduzidos por Hoebe *et al.* (2005), utilizando-se de mutagênese, demonstraram que o reconhecimento de lipoproteínas diaciladas requer, além do heterodímero TLR2/TLR6, o CD36 (Triantafidou *et al.*, 2006).

Em uma célula em repouso, o TLR9 está localizado no retículo endoplasmático, entretanto é translocado para o endossoma quando a célula é estimulada, em que é clivado por várias proteases (Kumagai e Akira, 2010). Esta translocação pode impedir sua exposição acidental ao próprio DNA da célula que culminaria com sua ativação. Porém o mecanismo que proporciona o recrutamento do TLR9 para o

endossoma permanece desconhecido (Barton *et al.*, 2006).

O reconhecimento de LPS requer, por exemplo, além do TLR4, duas moléculas: CD14 e MD2. O CD14 é uma molécula de glicosilfosfatidilinositol, expressa preferencialmente em monócitos, macrófagos e neutrófilos. A estimulação via LPS é seguida do aumento da proximidade entre CD14 e TLR4, sugerindo que CD14 e TLR4 podem interagir na sinalização perante reconhecimento de LPS (Jiang *et al.*, 2000; Da Silva, 2001). O MD2 é uma molécula constituída de uma estrutura côncava β , composta de dois ninhos antiparalelos que formam um bolso hidrofóbico (Carpenter e O'Neill, 2009). Este bolso se associa à porção extracelular do TLR4, aumentando assim sua reposta ao LPS (Takeda *et al.*, 2003). O MD2 associa-se ao TLR4 no retículo endoplasmático/complexo de Golgi, formando o complexo TLR4/MD2, que se move para a superfície celular, onde o MD2 é secretado em excesso (Visintin *et al.*, 2001). Normalmente, o TLR4 reside na superfície celular, no entanto, em células deficientes de MD2, é encontrado no complexo de Golgi, indicando que o este é essencial para distribuição intracelular de TLR4 (Nagai *et al.*, 2002). Assim, alguns componentes são necessários para o reconhecimento do LPS, indicando que o receptor funcional de LPS (TLR4) juntamente a estes componentes formam um grande complexo de reconhecimento (Takeda *et al.*, 2003).

Nos mamíferos, a defesa do hospedeiro contra microorganismos consiste principalmente nas vias de sinalização que se originam no domínio comum TIR dos TLRs (Takeda *et al.*, 2003), sendo o reconhecimento de PAMPs apenas o início do processo. A ligação do PAMP ao seu TLR específico leva à ativação do fator de transcrição NF κ -B, com o auxílio de moléculas adaptadoras como o MyD88, IRAQ, TRAF6 e outras, proporcionando a indução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6 (Carpenter e O'Neill, 2009).

Desde a descoberta dos TLRs como receptores participantes da imunidade inata, inúmeros estudos vêm revelando características estruturais, celulares, bioquímicas e genéticas destes receptores. Em contraste, pouco se sabe sobre o papel e o mecanismo dos NLRs na imunidade inata. Pesquisas relacionadas a estes receptores têm se concentrado principalmente nos componentes denominados NOD1 e NOD2 (Fukata *et al.*, 2009).

A família dos NLRs consiste em um grupo de PRRs citoplasmáticos que inclui NODs, NALPs, *IL-converting enzyme 1 (ICE, caspase 1)*, *protease activating factor (IPAF)*, fatores inibidores da apoptose neuronal (NAIPs) e transativador de MHC de classe II (CIITA). Ao contrário dos TLRs, os NLRs são proteínas solúveis que permanecem apenas no citoplasma para o reconhecimento de PAMPs intracelulares. Existem 23 genes de NLRs em humanos e 34 no genoma do camundongo (Kanneganti *et al.*, 2007; Harton *et al.*, 2002; Inohara *et al.*, 2003).

Os NLRs são caracterizados por possuírem três domínios distintos: o domínio C-terminal, o domínio Nacht – responsável pela capacidade que os NLRs têm de oligomerizar - e um domínio efetor, que inclui o domínio Pyrin (PYD), domínio de recrutamento de caspases (CARD), domínio do baculavirus inibidor de apoptose (BIR) e um domínio ainda não caracterizado (Zhang *et al.*, 2008).

Após quase uma década da sua descoberta, a informação a cerca dos ligantes específicos das proteínas da família NLR permanece limitada (Istomin e Godzik, 2009). NOD1 e NOD2 foram os membros da família NLR relatados pela primeira vez, caracterizados por reconhecerem peptídeo-glicanos da parede celular de bactérias – peptídeo-glicans- γ -D-glutamyl-ácido mesodiaminopimelico (iE-DAP) (Girardin *et al.*, 2003) e o dipeptídeo muramil (MDP), respectivamente (Girardin *et al.*, 2003; Inohara *et al.*, 2003). Os NODs conduzem a ativação da proteína quinase ativadora de mitose (MAPK) e NF- κ B via

serina-treonina kinase (RICK) e ativação da kinase TAK1 (Fukata *et al.*, 2009).

Estudos recentes apontam que os NLRs complementam e interagem com os TLRs na indução da resposta imune inata, sendo vários níveis de interação já descritos. Exemplos dessa interação são a ativação do NF- κ B pelos TLRs para produção de pró-IL-1, sendo a clivagem desta para transformação em sua forma biologicamente ativa, dependente dos NLRs mediados pela ativação da caspase 1 (Kanneganti *et al.*, 2007).

A descoberta da interação dos TLRs e NLRs proporcionou uma extraordinária contribuição para a compreensão do funcionamento do sistema imune inato. Auxiliando, assim, a resolver incógnitas sobre doenças comuns e incomuns que acometem os diversos sistemas. Em uma fase posterior, esperam-se descobertas através de manipulações das vias de sinalização de ambas as famílias, tentando desvendar o tratamento de inúmeras enfermidades (Fukata *et al.*, 2009).

4.1. TLRs e NLRs no útero gestante

O útero é um local imunologicamente privilegiado durante a gestação, uma vez que precisa tolerar estruturas como a placenta e o feto, enquanto mantém a defesa do hospedeiro contra uma variedade de microorganismos (Moffet-King, 2002). Assim como outras superfícies mucosas, o endométrio é a primeira barreira de defesa contra patógenos, e a habilidade deste tecido em realizar essa função é dependente de TLRs. Em humanos, os TLRs expressos no endométrio são o 2, 4, 5 e 9, desempenhando papéis importantes no reconhecimento e eliminação de infecções bacterianas (Beutler, 2004; Young *et al.*, 2004). Em bovinos, estudos recentes descrevem a expressão de TLR-1/6, TLR-2, TLR-4, TLR-5 e β -defensinas (Martins *et al.*, 2010; Davies *et al.*, 2008; Chapwanya *et al.*, 2009; Herath *et al.*, 2009), assim como em camundongos (Soboll *et al.*, 2006). Além do endométrio, no útero gestante, a placenta é outro componente do sistema imune inato, constituindo uma barreira contra agentes infecciosos que

possam vir causar danos ao feto, sendo a atividade dos TLRs um suporte para esta função (Koga e Mor, 2010).

Estudos recentes demonstraram a expressão de TLR1–10 na placenta humana a termo, bem como a expressão de TLR2 e TLR4 no trofoblasto e vilos coriônicos (Houmlund *et al.*, 2002; Mitsunari *et al.*, 2006), sendo a expressão de TLR4 relatada principalmente na membrana plasmática do trofoblasto em contato com o sangue materno nos espaços intervilosos (Beijar *et al.*, 2006). Da mesma forma, no coriocarcinoma há expressão de TLR2 e TLR4 na superfície celular e TLR9 na membrana de vesículas como lisossomo e fagolisossomo. A atividade funcional de TLR2 e TLR4 também já foi relatada durante o primeiro e o terceiro trimestre de gestação no trofoblasto humano (Abrahams *et al.*, 2004; Houmlund *et al.*, 2002; Mitsunari *et al.*, 2006; Abrahams e Mor, 2005) e o coriocarcinoma demonstrou ser sensível a agonistas de TLR2, TLR4 e TLR9 (Klaffenbach *et al.*, 2005). Estudos revelam a expressão de TLR1-10, NOD1 e NOD2 no endométrio de vacas que desenvolveram endometrite persistente e de vacas inférteis, além da avaliação da expressão de citocinas pro-inflamatórias durante o processo (Herath *et al.*, 2009).

Muitos trabalhos sugerem que os TLRs possuem importante função na defesa do hospedeiro dentro do ciclo normal do trato reprodutor feminino, o que sugere que estes também desempenham alguma função na resposta imune inata durante a gestação (Abrahams *et al.*, 2004).

4.2. Expressão de citocinas no útero gestante

A resposta inflamatória gerada por um microorganismo após sua ligação com a célula hospedeira envolve a liberação de fatores quimiotáticos que atuam em conjunto sobre as células inflamatórias para produzir o efeito desejado em cada momento da infecção. Tais fatores, denominados quimiocinas, são produzidos por inúmeras células. Reações inflamatórias

agudas causadas por bactéria e fungos normalmente induzem uma resposta celular com predominância de neutrófilos, enquanto reações crônicas caracterizam-se pela presença de linfócitos e macrófagos. A predominância de determinados tipos celulares em diferentes momentos da infecção se deve a especificidade de cada membro da família das quimiocinas em atrair subpopulações distintas de células do sistema imune (Kunkel *et al.*, 1997).

Quimiocinas são citocinas quimiotáticas, que direcionam a movimentação das células pelo organismo, do sangue para os tecidos, dando início à resposta inflamatória, definindo o tipo de infiltrado inflamatório. As quimiocinas constituem um grupo de 30 pequenas proteínas produzidas por uma ampla variedade de células em resposta a estímulos externos (microrganismos invasores, lesões, etc.). Elas são classificadas em dois grupos principais baseados na localização de resíduos de cisteína em sua cadeia de aminoácidos. Quimiocinas do grupo CXC incluem: CXCL8 (IL-8), CXCL6 (GCP2), CXCL1 (GRO α), CXCL2 (GRO β), CXCL3 (GRO γ), CXCL5 (ENA-78), CXCL7 (NAP-2) dentre outras. O grupo CC inclui: CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL3 (MIP-1 β) e CCL5 (RANTES) (Proudfoot, 2002; Biber *et al.*, 2002).

Apesar de haver expressão de IL-8 no útero gestante humano, pouco se sabe a respeito dos efeitos da gestação na liberação desta quimiocina pelos tecidos envolvidos durante esta fase. Estudos demonstram aumento na concentração de IL-8 no líquido amniótico associado a corioamionites (Romero *et al.*, 1991; Laham *et al.*, 1993). Embora a função da IL-8 durante a gestação em humanos ainda não esteja totalmente estabelecida, esta quimiocina pode contribuir para a ruptura das membranas fetais, uma vez que ela proporciona a ativação de colagenase e elastase (Rath *et al.*, 1998). Este mecanismo tem sido sugerido como uma possível causa de rompimento prematuro das membranas, podendo causar aborto (Kanayama *et al.*, 1988; Schoonmaker *et al.*, 1989).

O estudo da expressão de quimiocinas por células após a infecção fornece informações

importantes sobre os mecanismos iniciais da resposta imune contra o patógeno (Roitt *et al.*, 2005). Carvalho-Neta *et al.* (2008), estudando a expressão de quimiocinas CXC com atividade quimiotática para neutrófilos (IL-8, GRO α , GRO γ , e GCP-2) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-18) em células do tecido placentário infectadas com *B. abortus*, demonstraram que, das quimiocinas estudadas, GCP-2 e IL-8 apresentaram elevação significativa na expressão às 12 horas após a infecção em relação ao grupo submetido às 6 horas de infecção. O aumento na expressão de GCP-2 e IL-8 indica provável papel dessas quimiocinas no recrutamento de neutrófilos para o tecido placentário bovino durante os estágios iniciais de infecção por *B. abortus*. Estes dados contribuem para esclarecer que células trofoblásticas contribuem para o desencadeamento da patogênese da placentite supurativa típica observada *in vivo* como resultado da infecção por *B. abortus* em vacas gestantes.

Embora ocorra intensa resposta inflamatória nos tecidos que compõem o útero gestante bovino, muito pouco se sabe a respeito da interação de citocinas com os microorganismos causadores do processo (Carvalho-Neta *et al.*, 2008), tornando-se necessária a busca por maiores investigações a cerca do processo inflamatório e o envolvimento de citocinas neste durante a gestação em bovinos.

5. Aborto infeccioso no terço final de gestação em vacas e a resposta imune inata

O conceito de aborto refere-se à expulsão de um feto vivo ou morto do útero entre 42 dias até aproximadamente 280 dias de gestação, quando este é incapaz de exercer uma vida independente em um ambiente extra-uterino (Hubbert *et al.*, 1971). O aborto bovino pode ser atribuído a causas infecciosas, tóxicas, endócrinas, físicas ou nutricionais. A proporção exata de abortos causados por agentes infecciosos ainda não foi determinada, entretanto em 90% dos casos em que se consegue chegar a um

diagnóstico, a causa é infecciosa (Nascimento e Santos, 2003).

A interface materno-fetal comporta-se como uma região imunologicamente única que deve promover a tolerância ao feto, mantendo a defesa do hospedeiro contra possíveis agentes patogênicos. Estudos clínicos demonstram uma forte associação entre infecções bacterianas ou fúngicas e desordens durante a gestação, como por exemplo, o aborto. Por esse motivo, a resposta imune imediata contra microorganismos nessa região tem um impacto significativo no sucesso da gestação (Aldo *et al.*, 2007).

Agentes infecciosos relacionados ao aborto em bovinos incluem vírus, bactérias, fungos e protozoários, entretanto apenas 40% dos fetos bovinos abortados apresentam diagnóstico etiológico definitivo (Kirkbride, 1992; Anderson, 2007). Estudos demonstraram a detecção de ácidos nucleicos de diversos agentes infecciosos causadores de aborto em endométrio e placenta de bovinos como, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Neospora caninum*, revelando a identificação do agente etiológico em 19 % das amostras (Silva *et al.*, 2009).

Dentre inúmeros agentes, *B. abortus*, *S. Dublin*, *L. monocytogenes* e *A. fumigatus* são considerados importantes agentes causadores de aborto em bovinos no terço final da gestação (Nascimento e Santos, 2003).

A resposta imune desempenha um papel importante durante a infecção por *B. abortus*, uma vez que ela proporciona a diminuição do número inicial de bactérias e pode influenciar no desenvolvimento da imunidade adaptativa (Carvalho–Neta *et al.*, 2010). O reconhecimento inicial de *B. abortus* por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas envolve os TLRs (Campos *et al.*, 2004; Dueñas *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2005). O LPS de *B. abortus* é reconhecido pelo CD14 que se conecta ao TLR4. O TLR2 e o TLR9 também reconhecem componente de *B. abortus* e estimula a resposta imune (Huang *et al.*,

2003; Macêdo *et al.*, 2008). Uma molécula adaptadora denominada de fator 88 da diferenciação mielóide (MyD88) também participa da ativação de macrófagos através do reconhecimento de PAMPs por TLRs. MyD88 é necessário para indução de citocinas pró-inflamatórias via NF- κ B, além de possuir uma função crítica na resposta imune contra vários patógenos (Weiss *et al.*, 2005).

B. abortus causa aborto em função do seu tropismo pela placenta (Xavier *et al.*, 2009), afinidade esta descrita em ruminantes e que está relacionada com elevadas concentrações de eritról e hormônios esteróides neste período gestacional. O eritról atua como agente facilitador da sobrevivência bacteriana servindo de fonte de carbono e energia para *B. abortus* (Samartino e Enright, 1996). As células trofoblásticas eritrofagocíticas, localizadas na base das vilosidades coriônicas (Santos *et al.*, 1996), atuam como porta de entrada de *B. abortus* para placenta, com posterior extensão da infecção para os trofoblastos intercotiledonários (Anderson *et al.*, 1986).

A maioria dos abortos em bovinos devido a infecção por *Salmonella* sp. está associado à *Salmonella enterica* sorotipo Dublin, entretanto outros sorotipos podem estar envolvidos. Presume-se que a infecção é originada do trato intestinal e episódios de bacteremia podem proporcionar a localização e proliferação do microorganismo no placentomo, causando destruição das vilosidades coriônicas, causando aborto sem invasão bacteriana no feto (Anderson, 2007).

Experimentos em camundongos-fêmea, vacas, coelhas e ovelhas, em gestação naturalmente susceptível, demonstraram que *L. monocytogenes* ganha acesso ao feto por via hematogênica, gerando inflamação e necrose nos vilos coriônicos, ocorrendo aborto (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). As infecções micóticas são oportunistas e provavelmente estejam relacionados com fatores imunodepressores (Zook e Migaki, 1985; Knudtson e Kirkbride, 1992). A fonte de infecção normalmente ocorre através da

ingestão de silagem ou grãos mofados (Hugh-Jones e Austwick, 1967; Neilan *et al.*, 1982), sendo *A. fumigatus* o principal fungo causador de aborto em bovinos durante o último terço de gestação (Ainsworth e Austwick, 1973).

A multiplicação dos microorganismos na placenta induz a infiltração de células inflamatórias através da estimulação de citocinas via ativação de receptores, causando necrose do epitélio trofoblástico, vasculite e ulceração da membrana córion-alantóidea. Além da disseminação dos mesmos para as vilosidades coriônicas e tecidos fetais, a placentite necrótica altera as trocas metabólicas materno-fetais devido à separação dos componentes materno e fetal da placenta, resultando em aborto (Anderson *et al.*, 1986).

O reconhecimento de fungos pelos TLRs ocorre primariamente através de TLR2, TLR4 e TLR9, o de bactérias gram-positivas como *L. monocytogenes* ocorre através do TLR2 e de bactérias gram-negativas como *Salmonella* se dá através do TLR4 e TLR5. Apesar de já estarem bem definidos os PAMPs reconhecidos pelos TLRs, pouco se sabe a respeito do papel destes receptores no útero gestante durante um processo infeccioso (Netea *et al.*, 2006).

Uma vez que *B. abortus*, *S. Dublin*, *L. monocytogenes* e *A. fumigatus* são importantes agentes causadores de mortalidade fetal e infertilidade em bovinos, acarretando grandes perdas econômicas aliado à carência de informações sobre os mecanismos de interação de receptores de imunidade inata, estes microorganismos e o útero gestante bovino, esse trabalho tem como objetivo a elucidação do mecanismo de resposta imune inata, caracterizando a expressão destes receptores ao longo da gestação normal e durante o desafio com organismos associados com aborto em bovinos, para melhor entendimento da patogênese de doenças infecciosas do útero gestante bovino.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Verificar a expressão de TLRs, NOD1, NOD2 e MD2 em diferentes regiões do útero gestante bovino e em diferentes estágios de gestação.
- Verificar se há expressão de IL-8 e GCP-2 após estimulação de diferentes regiões do útero gestante bovino no terceiro trimestre de gestação com organismos inativados incluindo *B. abortus*, *S. Dublin*, *L. monocytogenes* e *A. fumigatus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita de amostras

Foram utilizados 18 úteros de vacas mestiças em diferentes períodos gestacionais (seis vacas no primeiro, 6 vacas no segundo e 6 vacas no terceiro trimestre de gestação), provenientes de abatedouros do Estado de Minas Gerais. Foram retirados três fragmentos, em duplicata, do corno gestante de cada vaca: placentomo (Figura 1A), região intercotiledonária (Figura 1B) e endométrio (Figura 1C), imediatamente após o abate. Após a colheita, as amostras foram acondicionadas em criotubos estéreis, congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até a extração de RNA.

Para o estímulo do endométrio e da região intercotiledonária com microorganismos inativados, foram utilizados seis úteros intactos, no terceiro trimestre de gestação, também provenientes de abatedouros do Estado de Minas Gerais.

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG, protocolo nº 170/2009).

Determinação do período gestacional

Os fetos foram divididos em três grupos, de acordo com o estágio de gestação (Grupo I- primeiro trimestre; Grupo II- segundo

trimestre; Grupo III- terceiro trimestre). Para tanto, foram feitas mensurações céfalo-coccígeas dos fetos (da nuca até a base da cauda) e estas foram interpretadas segundo a fórmula $x = 2,5(y + 21)$ (Richardson, 1989), em que x é a variável “idade da gestação” e y representa o comprimento ápico-caudal, estimando-se assim o período gestacional (Tabela 1).

Para estimar a idade gestacional correspondente ao 3º trimestre de gestação, dos úteros destinados ao estímulo de tecidos já mencionados, foi feita mensuração céfalo-coccígea de cada feto em útero intacto, seguida de interpretação com auxílio da mesma fórmula adotada acima.

Cultivo de tecidos

Foi feita a anti-sepsia do útero (Figura 1D), com álcool iodado, seguida da abertura do mesmo (Figura 1E), com exposição e retirada do endométrio e da região intercotiledonária. Estes foram mantidos por 10 minutos em meio de cultura RPMI (Gibco, Invitrogen, CA, USA) contendo antibiótico (10.000 U de penicilina e 10.000 µg/ml de estreptomicina) a 37°C. Os tecidos foram lavados com solução de PBS estéril para remoção completa do antibiótico e transferidos para um recipiente contendo RPMI (Gibco, Invitrogen, CA, USA). Foram obtidos fragmentos menores de endométrio e região intercotiledonária, com auxílio de tesoura estéril, medindo 1,5 cm de diâmetro e pesando $\pm 2,92$ g e $\pm 4,24$ g (média aritmética de 10 fragmentos de cada tecido), respectivamente. Em seguida, estes foram colocados em uma placa de cultivo de 6 poços, contendo RPMI enriquecido com glutamina 4 mM (Gibco; Invitrogen, CA, USA), piruvato 1 mM, aminoácidos não-essenciais 1 mM e 10% de soro fetal bovino (Invitrogen; CA, USA) (Figura 1F). De cada útero gestante foram obtidos cinco fragmentos de endométrio e cinco fragmentos de região intercotiledonária, sendo quatro destes diferentemente estimulados por quatro diferentes microorganismos inativados, *B. abortus*, *S. Dublin*, *L. monocytogenes* e *A. fumigatus*, e um destinado ao controle negativo.

Posteriormente, os tecidos foram incubados em atmosfera úmida e com 5% de CO₂.

Estímulo dos tecidos

Diferentes fragmentos de endométrio e da região intercotiledonária foram estimulados durante 12 horas, por uma suspensão contendo 1×10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) do microorganismo inativado: cepa 2308 de *B. abortus*, cepa UCD24 de *S. Dublin*, cepa ATCC 191/5 de *L. monocytogenes* (cedida pelo Prof. Andrey Pereira Lage - EV-UFGM/ Depto. Medicina Veterinária Preventiva), e cepa ATCC 169/3 de *A. fumigatus* (cedida pela Profª Maria Aparecida de Resende - ICB-UFGM/Depto. Microbiologia). Para o estímulo dos tecidos, todos os microorganismos foram inativados a 80° C durante 60 minutos.

Extração de RNA

A extração do RNA dos tecidos coletados foi realizada com Trizol (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA), adicionando-se 1 mL de Trizol à amostra de tecido e homogeneizando-o, em microtubos livres de RNase. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio, homogeneização em vórtex, seguido de centrifugação das amostras a 12.000 x g, durante 15 minutos, a 4°C. A fase superior das amostras centrifugadas foi transferida para novos microtubos e, em seguida, adicionado 500 µl de isopropanol, para a precipitação do RNA, incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g, durante 15 minutos, a 4°C e os *pellets* obtidos foram secos à temperatura ambiente e, posteriormente, dissolvidos em 30 µl de água livre de RNase. A pureza e a quantidade de RNA foram avaliadas por espectrofotometria e por eletroforese em gel de agarose/formaldeído a 1%. Monócitos foram obtidos do sangue de bovinos através de uma coluna de Percoll, sendo diferenciados por 10 dias em cultura em frascos de teflon. Os macrófagos foram utilizados como células de referência, uma vez que expressam todos os TLRs. Estas células foram submetidas ao mesmo

processo de extração de RNA descrito acima.

Síntese de cDNA

O RNA (2,5 µg) foi retrotranscrito em cDNA utilizando-se o kit comercial *SuperScript First-Strand Synthesis System* para RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), em uma reação de volume final de 50 µL. Para a síntese foram utilizados 2,5 µL de dNTP mix, 2,5 µL de hexâmeros aleatórios, 2 µL de tampão RT (10x), 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de DTT (dithiothreitol) a 0,1 M, 2,5 µL de *RNase OUTTM Recombinante Ribonuclease Inhibitor*, 2,5 µL de Super ScriptTM II RT e 2,5 µL de RNase H. Os parâmetros utilizados para a síntese do cDNA foram: 65° C por 5 minutos, 25° C por 2 minutos, 25° C por 10 minutos, 42° C por 50 minutos, 70° C por 15 minutos e 37° C por 20 minutos. Posteriormente o cDNA foi armazenado a -20°C.

RT-PCR em tempo real

RT-PCR em tempo real foi utilizado para avaliar a expressão de TLRs, NOD1, NOD2 e MD2, além de IL-8 e GCP-2 após o estímulo dos tecidos pelos microorganismos. Realizou-se o RT-PCR em tempo real, utilizando-se 2,5 µL de cDNA, 10 µM do par de primers específico para cada gene e 12,5 µL de *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix – UDG with ROX, Invitrogen)* em um volume final de 25 µL por reação. Os parâmetros utilizados para o PCR em tempo real foram: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, utilizando um termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems). Os dados foram analisados utilizando o método Ct comparativo (Livak e Schmittgen, 2001). Os valores de Ct foram normalizados com base na expressão de β-actina. Os primers que foram utilizados nesse estudo estão listados na Tabela 2.

Análise estatística

O delineamento utilizado para o experimento foi o inteiramente casualizado (DIC). Os valores de Ct obtidos com RT-PCR em tempo real foram analisados de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Os dados de Ct normalizados foram comparados entre os grupos pelo teste t de Student, sendo consideradas significativas as diferenças para $p < 0,05$.

1: Determinação do período gestacional com base na mensuração céfalo-coccígea

Grupo	Período gestacional	Tamanho (cm)	Dias
I	primeiro 1/3	até 18	0 a 98
II	segundo 1/3	27 – 47	120 a 170
III	terceiro 1/3	a partir de 59	200 a 270

Tabela 2. Lista de genes e iniciadores utilizados no RT-PCR em tempo real

Gene *	Iniciadores	Produto (pb)
TLR-1/6	5'-TGATCTTGCTGGATCCCATT -3' 5'- ACTCTTCTCCTGGGCCATT -3'	107
TLR-2	5'-TGCGTTGGTTTGGATAGTGA -3' 5'-AGGATGATGACAGCCCAGAC-3'	129
TLR-3	5'-CAGCATCAGAAGGAGCAGAA -3' 5'-TAGCTTGCTGAACTGCATGG-3'	104
TLR-4	5'-GACCCTTGCGTACAGGTTGT-3' 5'-GGTCCAGCATCTTGGTTGAT-3'	103
TLR-5	5'-TCAATGGGAGCCAGATTTTC -3' 5'-CCCAGCAAAGGTGTGGTAGT-3'	104
TLR 7	5'-AAAGACAACGTGTGCACCAA -3' 5'-GCTGGTTTCCATCCAGGTAA-3'	94
TLR8	5'-GCTGGTTTGACAACATGCAC -3' 5'-AGGGCATTTTCGTCCATTA-3'	72
TLR9	5'-GCATCTCACAGGCGGTTAAT-3' 5'-CCATGGTACAGGTCCAGCTT-3'	94
TLR10	5'-TCTGGTCCTGTGCATGAATC-3' 5'-CCTCACATGGATGAGGAAGA-3'	93
NOD 1	5'-CAGTGGGGTGAAGGTGCTAT-3' 5'-ATGTACCTGGCTCCGACATC-3'	102
NOD 2	5'-GGCCCTTGAAAAGAATGACA-3' 5'-TGGTATCCTGGTGGCTGAGT-3'	95
MD2	5'-TGCAATTCCTCTGATGCAAG-3' 5'-TCCCCTTGTTCCCTTTATT-3'	106
*IL-8	5'- ACACATCCACACCTTTCCACC -3' 5'- GCAGACCTCGTTTCCATTGGTAAG -3'	117
*GCP-2	5'- ATTCATCCCAAACGGTCAGTG -3' 5'- CAGACTTCCCTTCCATTCTCAAG -3'	101
β -actina	5'-TCAAGGAGAAGCTCTGCTACGTG -3' 5'-TTGCCGATGGTGATGACCT-3'	121

* Citocinas quimiotáxica para neutrófilos - números de acesso: IL-8: AF232704; GCP-2: AF149249.

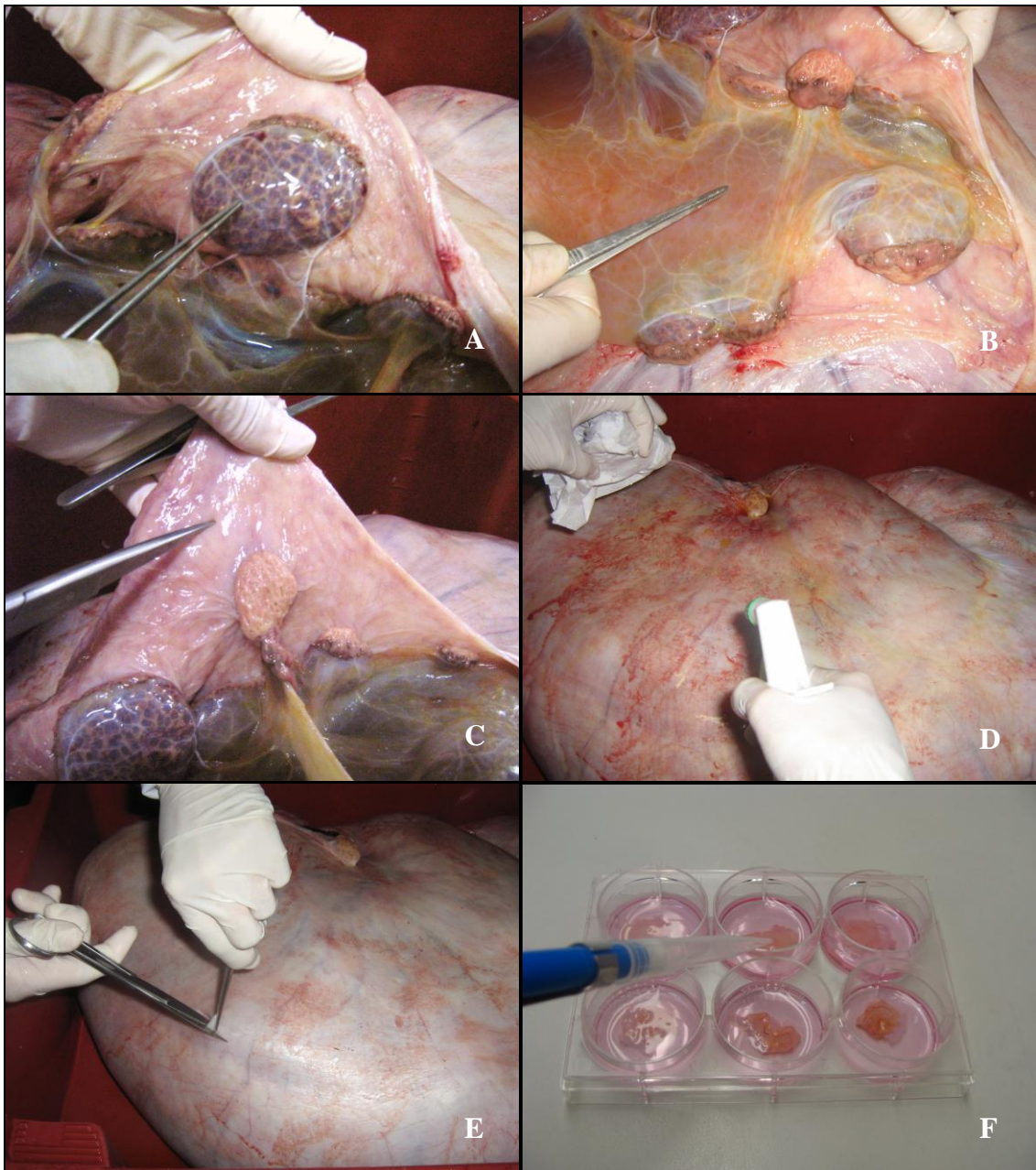


Figura 1. Demonstração da colheita de material e disposição dos tecidos em placa de seis poços para estimulação. Regiões selecionadas para estudo do útero gestante de vacas provenientes de abatedouros do Estado de Minas Gerais: placentomo (A), região intercotiledonária (B), endométrio (C). Assepsia do útero gestante (D), abertura do corno uterino gestante (E). Disposição dos tecidos selecionados (endométrio e região intercotiledonária) para estimulação com microorganismos inativados em placa de seis poços contendo meio RPMI enriquecido (F).

RESULTADOS

(i) Expressão de receptores de padrões moleculares no útero bovino ao longo da gestação.

Com o objetivo de caracterizar a expressão de PRRs no útero bovino durante a gestação, utilizou-se o RT-PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR) com o RNA total extraído do placentomo, endométrio e região intercotiledonária para amplificação dos genes TLR 1-10, NOD1, NOD2 e MD2. Os dados da análise do qRT-PCR em tempo real demonstraram que há expressão de alguns TLRs em diferentes regiões do útero gestante bovino e que a expressão de alguns deles variam ao longo gestação.

Quando se compara a expressão desses genes no placentomo à expressão dos mesmos em células de referência (Fig. 2A) – macrófagos, células que sabidamente os expressam - e nos demais tecidos em estudo, observa-se baixa expressão de TLR1/6, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, NOD1 e NOD2. Os demais genes não são expressos (Fig. 2B). Embora não exista variação significativa na expressão destes genes ao longo da gestação no placentomo, é observada uma tendência crescente na expressão do TLR4, com maior expressão no último trimestre de gestação.

Ao contrário do TLR4, o TLR1/6 apresenta uma tendência decrescente de expressão, sendo observada maior expressão do gene no primeiro terço da gestação.

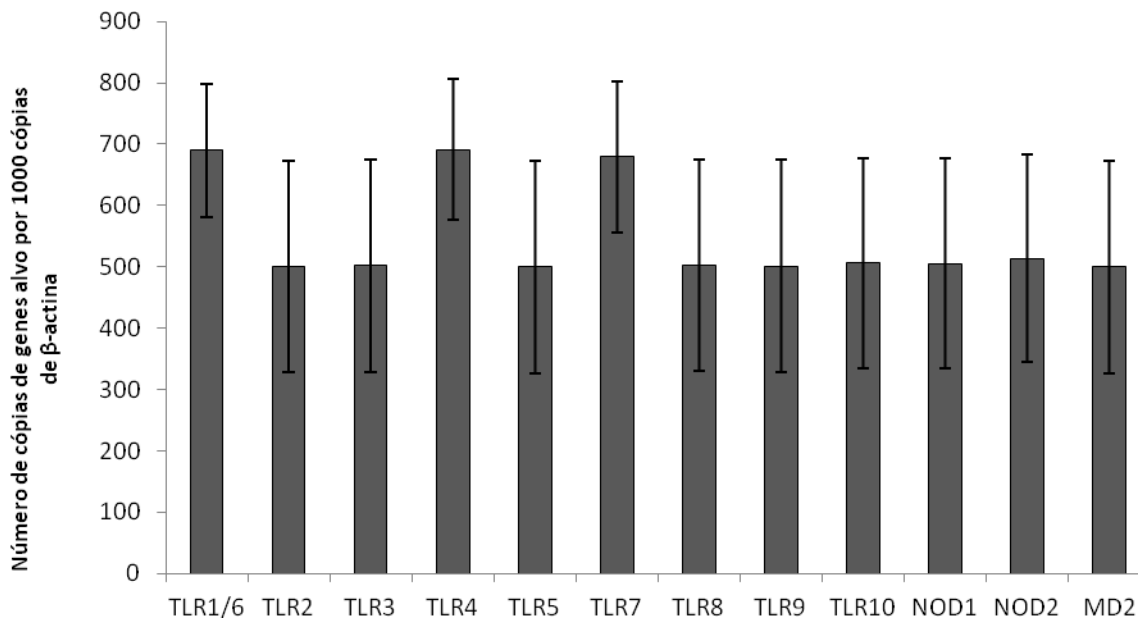
No endométrio, nota-se variação significativa na expressão do TLR4 e do TLR5 ao longo dos três trimestres de gestação. A expressão do TLR4 varia entre o segundo e o terceiro trimestre, sendo mais intensamente expresso no primeiro e terceiro trimestres, e quando sua expressão é comparada nos diferentes tecidos do útero gestante, observa-se que o endométrio é o tecido com maior expressão de TLR4.

O TLR5 demonstra ser mais intensamente expresso nos últimos dois trimestres (Fig. 2C).

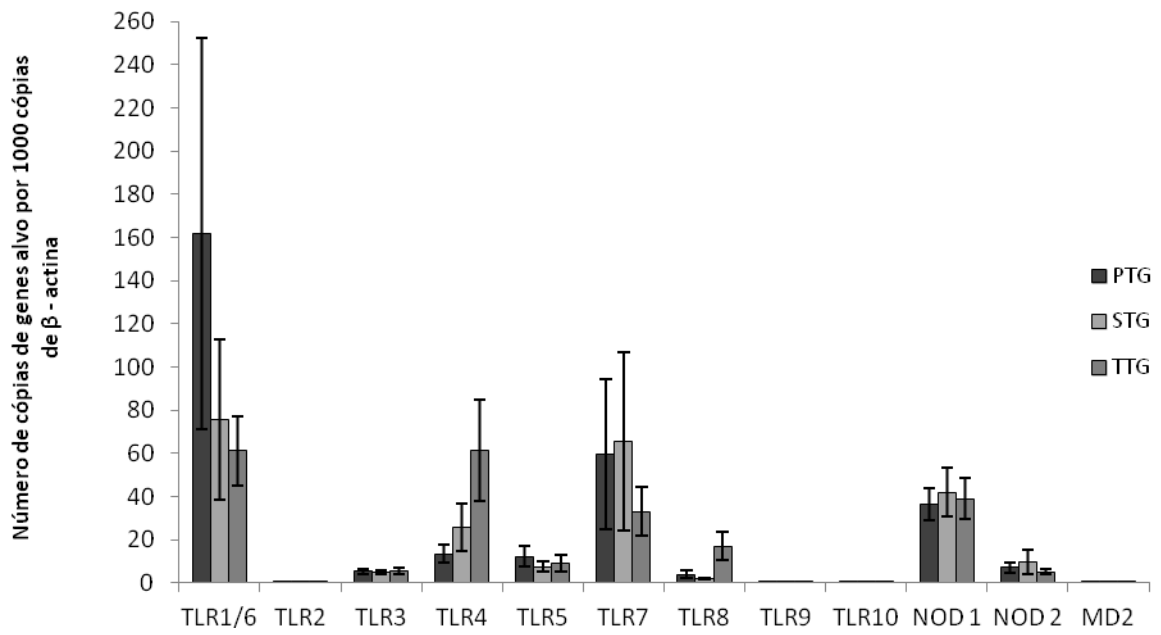
Embora não tenha sido detectada variação na expressão dos demais genes ao longo da gestação, observa-se que o endométrio possui alta expressão de TLR7 e TLR1/6 no segundo trimestre quando comparada à expressão dos mesmos nas células de referência e aos demais genes estudados.

Na região intercotiledonária, é observada variação significativa na expressão de TLR1/6, assim como de TLR7 e TLR8 (Fig. 2D). Esses genes são fortemente expressos no primeiro trimestre de gestação em relação aos demais trimestres. Os demais genes não são expressos. Além disso, nota-se que TLR1/6 e TLR5 são expressos em grande quantidade, no primeiro trimestre de gestação, na região intercotiledonária, comparando-se ao placentomo, endométrio e às células de referência.

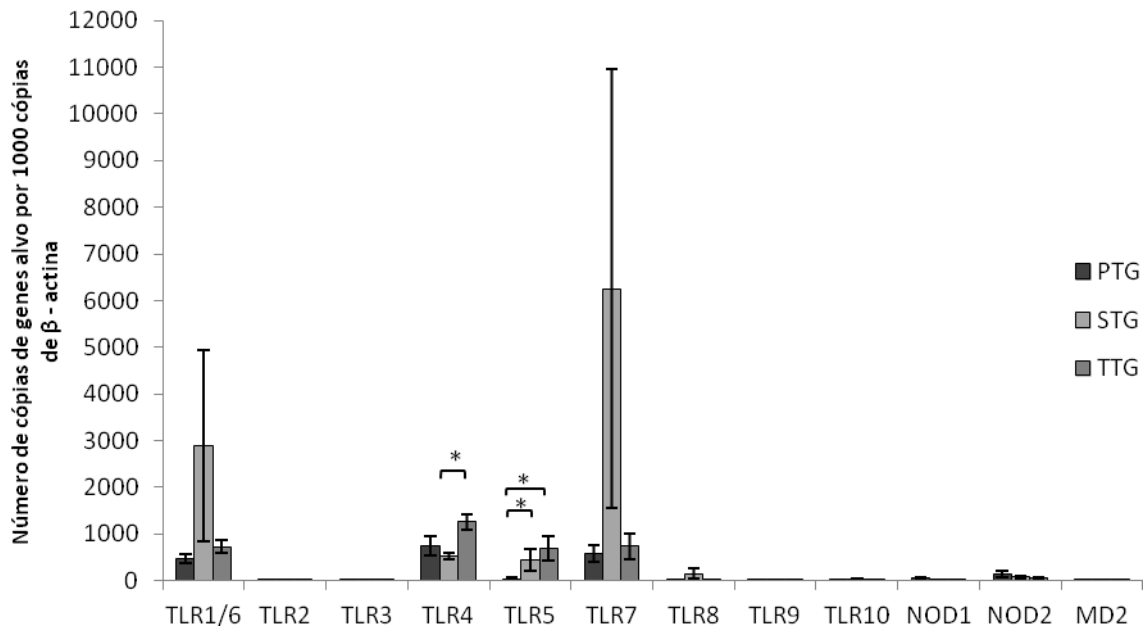
A



B



C



D

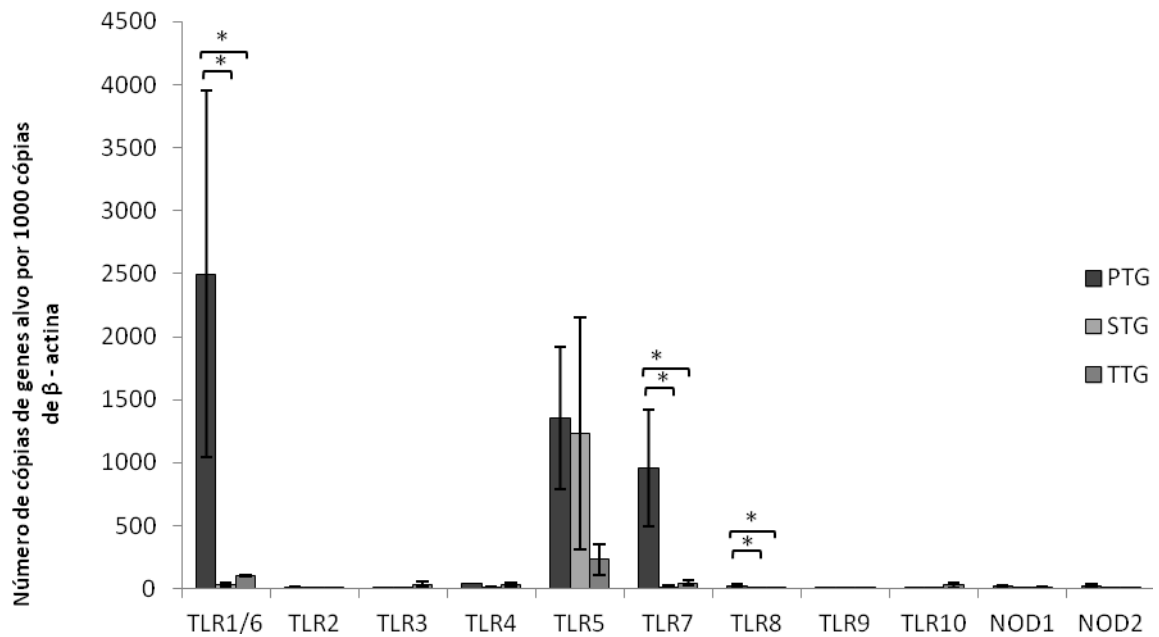


Figura 2 – Expressão de receptores de reconhecimento padrão no útero bovino no primeiro trimestre (PTG), segundo trimestre (STG) e terceiro trimestre de gestação (TTG): (A) Expressão gênica de TLR 1/6-10, NOD1, NOD2 e MD2 em macrófagos (controle positivo). Cada coluna representa a média aritmética de três animais com barras de erro padrão. Expressão gênica de TLR 1/6-10, NOD1, NOD2 e MD2 no (B) placentomo, (C) endométrio e (D) região intercotiledonária. Cada coluna representa a média aritmética de seis animais com barras de erro padrão. Um asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0.05$).

(ii) Expressão de quimiocinas no útero bovino durante último trimestre de gestação em resposta à estimulação por microorganismos inativados

A resposta neutrofílica aguda observada na placenta bovina quando da infecção por *B. abortus*, *S. Dublin*, *L. monocytogenes* e *A. fumigatus* aliada a resultados prévios a cerca da expressão de citocinas e quimiocinas em células trofoblásticas bovinas durante infecção por *B. abortus* (Carvalho-Neta *et al.*, 2008), motivou a realização do estudo da expressão de IL-8 e GCP-2 (citocinas quimiotáticas para neutrófilos) em tecidos do útero bovino gestante (endométrio e região intercotiledonária), após 12 horas de estimulação por agentes causadores de aborto no terço final da gestação.

Os resultados de qRT-PCR demonstram que o endométrio possui expressão significativa de IL-8 quando estimulado por *B. abortus* e *S. Dublin* inativadas, se comparada ao controle não estimulado, da mesma forma, é observada alta expressão dessa quimiocina na região intercotiledonária, quando estimulada por *B. abortus* e *S. Dublin*.

Quando a expressão de IL-8 é comparada entre os microorganismos, observa-se que *S. Dublin* tem maior potencial de estímulo da expressão de IL-8 em relação aos demais patógenos. Comparando-se a expressão de IL-8 entre ambos os tecidos estimulados, observa-se grande expressão da quimiocina na região intercotiledonária em relação ao endométrio, quando estimulados por *S. Dublin* ($p = 0,0032$) (Fig. 3A). Não foi observada diferença significativa na expressão de IL-8 entre os tecidos em resposta à estimulação pelos outros microorganismos inativados.

A análise de expressão de GCP-2 demonstrou que quando o endométrio foi estimulado por *B. abortus* e *S. Dublin*, houve alta expressão, comparado ao controle não estimulado e *B. abortus* foi o agente que demonstrou maior potencial de estimulação desse gene.

Na região intercotiledonária, há um aumento significativo da expressão de GCP-2, quando estimulada por *S. Dublin* e *L. monocytogenes*, comparado ao controle não estimulado. e esse tecido foi mais intensamente estimulado por *S. Dublin*. *A. fumigatus* estimulou quatro vezes menos a expressão de GCP-2 que *S. Dublin* e *L. monocytogenes* na região intercotiledonária. Além disso, há alta expressão de GCP-2 na região intercotiledonária que no endométrio, quando estimulados por *S. Dublin* e *L. monocytogenes* ($P = 0.0398$ e $P = 0.0416$, respectivamente). Os demais microorganismos não estimularam significativamente a expressão de GCP-2 na região intercotiledonária (Fig. 3B).

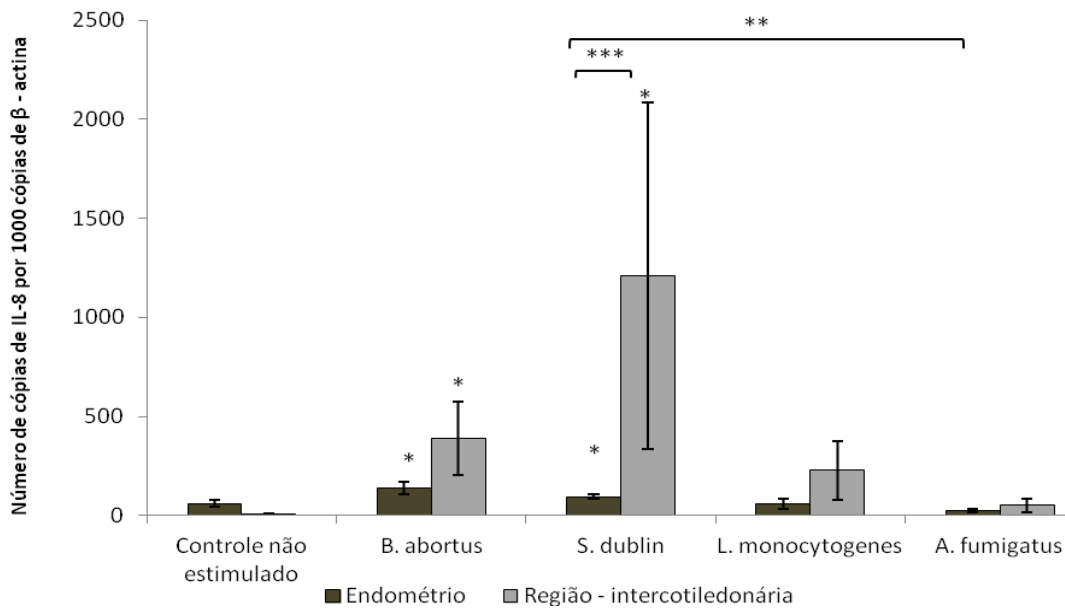
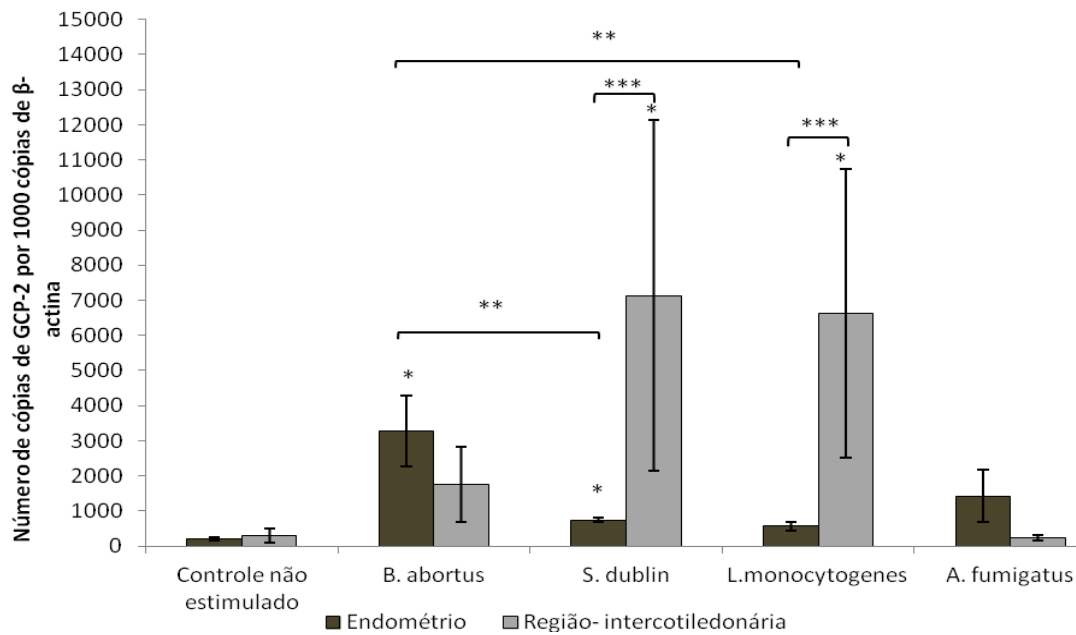
A**B**

Figura 3 – Expressão de (A) IL-8 e (B) GCP-2 em tecidos do útero gestante bovino cultivados depois de doze horas de estimulação por *B. abortus*, *S. Dublin*, *L. monocytogenes* e *A. fumigatus* inativados pelo calor. Cada coluna representa a média aritmética de seis animais com barras de erro padrão. Um asterisco (*) indica que a diferença é estatisticamente significativa ($p < 0.05$), comparando a expressão do gene sob estímulo ao controle não estimulado. Dois asteriscos (**) indicam que a diferença é estatisticamente significativa ($p < 0.05$), comparando-se a expressão do gene sob o estímulo dos diferentes microorganismos inativados em um mesmo tecido. Três asteriscos (***) indicam que a diferença é estatisticamente significativa ($p < 0.05$), comparando-se a expressão do gene sob o estímulo de um mesmo microorganismo inativado nos diferentes tecidos (endométrio e região intercotiledonária).

DISCUSSÃO

A expressão de TLRs foi avaliada no endométrio bovino de útero normal e pós-parto (Davies *et al.*, 2008, Herath *et al.*, 2009, Martins *et al.*, 2010). Entretanto, este estudo é o primeiro a caracterizar a expressão de TLR1-10, NOD1, NOD 2 e MD2 em diferentes regiões do útero bovino durante a gestação.

Neste estudo demonstrou-se que o TLR4 e o TLR5 foram intensamente expressos no endométrio no último trimestre de gestação. Considerando que bactérias gram-negativas estão geralmente associadas a infecções uterinas em vacas e que TLR4 e TLR5 reconhecem PAMPs específicos dessas bactérias, por exemplo, LPS e flagelina, respectivamente (Davies *et al.*, 2008), o aumento da expressão de tais genes no último trimestre de gestação pode estar relacionado a um mecanismo de defesa contra infecção causada por aqueles microorganismos (King *et al.*, 2003). Os mecanismos de controle da expressão diferencial desses genes durante a gestação ainda precisam ser esclarecidos (Koga e Mor, 2010).

A expressão dos TLRs na placenta bovina, da mesma forma que na humana (Koga e Mor, 2010), não é constante, entretanto parece ser regulada tanto temporal quanto regionalmente. Por exemplo, na região intercotiledonária, TLR1/6, TLR7 e TLR8 são expressos em níveis maiores no primeiro trimestre de gestação, porém essa variação não é observada no placentomo ou no endométrio.

No placentomo foi observada mínima expressão de TLRs, NODs e MD2, sendo demonstrado assim, do ponto de vista da imunidade inata, que esta região é imunossuprimida ao longo de toda gestação.

Nós mostramos que o estímulo com microorganismos inativados no endométrio e na região intercotiledonária induziu forte expressão de citocinas pró-inflamatórias quimiotáticas para neutrófilos. De acordo com Holmlund *et al.* (2002), o estímulo de TLR2 e TLR4 com LPS e zymosan induz expressão de IL-6 e IL-8 na placenta humana, no terceiro trimestre de gestação. Estes resultados sugerem que as regiões em estudo são capazes de reconhecer microorganismos e iniciar a

resposta inflamatória no útero gestante. Modelos experimentais de animais que proporcionam melhor avaliação de complicações durante a gestação vêm sendo desenvolvidos pela administração de LPS de bactérias gram-negativas (Kaga *et al.*, 1996; Ogando *et al.*, 2003). Através do TLR4, o LPS promove a expressão de altos níveis de citocinas pelas células trofoblásticas, indicando que tais células são muito sensíveis a estímulos de PAMPs microbianos (Yiu *et al.*, 1994, Crocker *et al.*, 2001).

Nossos resultados demonstram que há forte expressão de IL-8 e GCP-2 no endométrio e na região intercotiledonária quando estimulados por *S. Dublin* inativada, comparada aos demais microorganismos. O LPS de *S. enterica* tem uma potente atividade imunoestimuladora, cem vezes mais que a de *B. abortus* (Ritting *et al.*, 2003; Dueñas *et al.*, 2004), de forma que a *Salmonella* tem capacidade de induzir uma resposta inflamatória severa e aguda (Santos *et al.*, 2003). Este dado sustenta o resultado de alta expressão de quimiocinas pró-inflamatórias nesses tecidos após estímulo com *S. Dublin*.

Assim como *B. abortus*, *S. Dublin*, *L. monocytogenes* e *A. fumigatus* são importantes agentes causadores de aborto no último terço de gestação por causarem placentite necrótica neutrofílica severa e difusa. Apoiados por Carvalho-Neta *et al.* (2008) que propõe que a expressão aumentada de GCP-2 e IL-8 indica um provável papel das mesmas no recrutamento de neutrófilos para o tecido placentário bovino durante os primeiros estágios de infecção por *B. abortus*, nossos dados podem acrescentar *S. Dublin* e *L. monocytogenes* como fortes indutores de expressão dessas quimiocinas no útero gestante contribuindo também para o aborto.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que alguns TLRs são expressos em diferentes tecidos e em diferentes períodos de gestação no útero bovino. A expressão desses genes varia ao longo da gestação, com intensa expressão de TLR4 e TLR5 no endométrio no primeiro e terceiro trimestre de gestação e terceiro trimestre de gestação, respectivamente. TLR1/6, TLR7 e TLR8 são fortemente

expressos no primeiro trimestre de gestação. Além disso, o endométrio e a região intercotiledonária demonstram ser componentes do útero gestante bovino sensíveis ao estímulo de *B. abortus*, *S. Dublin* e *L. monocytogenes*, induzindo expressão de quimiocinas como IL-8 e GCP-2. Sendo assim, estes dados dão suporte à hipótese de que as células endometriais e da região intercotiledonária contribuem para o desencadeamento da patogênese da placentite neutrofílica aguda observada durante infecção por tais agentes no útero bovino gestante, culminando com aborto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMS, V. M.; VISINTIN, I.; ALDO, P. B.; GULLER, S.; ROMERO, R.; MOR, G. A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. *J Immunol*, v. 175, p. 8096-8104, 2005.
- ABRAHAMS, V. M.; MOR, G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. *Placenta*, v. 26, p. 540-574, 2005.
- ABRAHAMS, V. M.; BOLE-ALDO, P.; KIM, Y. M.; STRASZEWSKI-CHAVEZ, S. L.; CHAIWORAPONGSA T.; ROMERO, R.; MOR, G. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J Immunol*, v. 173, p. 4286-4296, 2004.
- AINSWORTH, G.C.; AUSTWICK, P.K.C. Mycotic abortion, *Fungal Diseases of Animals*, 2. ed. England: Commonwealth Agriculture Bureaux, p. 74, 1973.
- AKIRA, S.; TAKEUCHI, Y. Identification and functions of pattern-recognition. *J Allergy Clin Immunol*, v. 125, p. 985-992, 2010.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, v. 124, p. 783-801, 2006.
- ALDO, P. B.; KRIKUN, G.; VISINTIN, I.; LOCKWOOD, C.; ROMERO, R.; MOR, G. A. Novel three-dimensional *in vitro* system to study trophoblast-endothelium cell interactions. *Am J Reprod Immunol*, v. 58, p. 98-110, 2007.
- ALEXOPOULOU, L.; THOMAS, V.; SCHNARE, M.; LOBET, Y.; ANGUITA, J.; SCHOEN, R. T.; MEDZHITOV, R.; FIKRIG, E.; FLAVELL, R. A. Hyporesponsiveness to Vaccination with *borrelia burgdorferi* ospa in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Immunol*, v. 8, p. 878-884, 2002.
- ANDERSON, M.L. Infectious causes of bovine abortion during mid-to late-gestation. *Theriogenology*, v. 68, p.474-486, 2007.
- ANDERSON, T. D., MEADOR, V. P., CHEVILLE, N. F. Pathogenesis of Placentitis in the Goat Inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and Histologic Lesions. *Vet Pathol*, v. 23, p. 219-226, 1986.
- BARTON, G. M.; KAGAN, J. C.; MEDZHITOV, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*, v. 7, p. 49-56, 2006.
- BEIJAR, E. C; MALLARD, C.; POWELL, T. L: Expression and subcellular localization of TLR-4 in term and first trimester human placenta. *Placenta*, v.27, p. 322-326, 2006.
- BEUTLER, B.; JIANG, Z.; GEORGEL, P.; CROZAT, K.; CROKER, B.; RUTSCHMANN, S.; DU, X.; HOEBE, K. Genetic analysis of host resistance: toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol*, v. 24, p. 353-389, 2006.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*, v. 40, p. 845-851, 2004.
- BHIDE, R.; MUCHA, R.; MIKULA, I.; KISOVA, L.; SKRABANA, R.; NOVAK, M.; MIKULA, I. Novel mutations in tlr genes causes hyporesponsiveness to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *BMC Genetics*, v. 1, p. 21-26, 2009.
- BIBER, K.; ZUURMAN, M. W.; DIJKSTRA, I. M.; BODDKE, H. Chemokines in the brain: neuroimmunology and beyond. *Curr Opin Pharmacol*, v. 2, p. 63-68, 2002.
- BRENMOEHL, J.; HERFARTH, H.; GLÜCK, T.; AUDEBERT, F.; BARLAGE, S.; SCHMITZ, G.; FROEHLICH, D.; SCHREIBER, S.; HAMPE, J.; SCHÖLMERICH, J.; HOLLER, E.; ROGLER, G. Genetic variants in the NOD2/CARD15 gene are associated with early mortality in sepsis patients. *Intensive Care Med* v. 33, p. 1541-1548, 2007.
- BROWNLIE, R.; ALLAN, B. Avian Toll-like receptors. *Cell Tissue Res*, v.10, p. 2016-2022, 2010.
- BUWITT-BECKMANN, U.; HEINE, H.; WIESMULLER, K. H.; JUNG, G.; BROCK, R.; AKIRA, S.; ULMER, A. Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. *Eur J Immunol*, v. 35, p. 282-289, 2005.

- CAMPOS, M. A.; ROSINHA, G. M. S.; ALMEIDA, I. C.; SALGUEIRO, X. S.; JARVIS, B. W.; SPLITTER, G. A.; QURESHI, N.; BRUNA-ROMERO, O.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C. Role of toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun*, v. 72, n. 1, p. 176-186, 2004.
- CARPENTER, S.; O'NEILL, L. A. J. Recent Insights into the Structure of Toll-like Receptors and post-translational modifications of their associated signalling proteins. *Bioche. J*, v. 422, p. 1-10, 2009.
- CARVALHO - NETA, A. V.; MOL, J. P. S.; XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathogenesis of bovine brucellosis. *Vet J*, v. 184, p. 146-155, 2010.
- CARVALHO - NETA, A. V.; STYNEN, A. P. R.; PAIXÃO, T. A.; MIRANDA, K. L.; SILVA, F. L.; ROUX, C. M.; TSOLIS, R. M.; EVERTS, R. E.; LEWIN, H. A.; ADAMS, L. G.; CARVALHO, A. F., LAGE, A. P., SANTOS, R. L. Modulation of the bovine trophoblastic innate immune response by *Brucella abortus*. *Infect Immun*, v. 76, n. 5, p. 1897-1907, 2008.
- CHAPWANYA, A.; MEADE, K. G.; DOHERTY, M. L.; CALLANAN, J. J.; MEE, J. F.; O'FARRELLY, C. 2009. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology*, v. 71, p. 1396-1407, 2009.
- CROCKER, I. P.; BARRATT, S.; KAUR M.; BAKER, P. N. The in-vitro characterization of induced apoptosis in placental cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. *Placenta*, v. 22, p. 822-830, 2001.
- DA SILVA, C. J.; SOLDAU, K.; CHRISTEN, U.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, J. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the protein in its membrane receptor complex. *J Biol Chem*, v. 276, p. 21129-21135, 2001.
- DAVIES, D.; MEADE, G.; HERATH, S.; ECKERSALL, P.; GONZALEZ, D.; WHITE, O.; CONLAN, S.; O'FARRELLY, C.; SHELDON, M. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Repr Biol Endocrinol*, v. 6, p. 53-65, 2008.
- DUEÑAS, A. I.; ORDUNA, A.; CRESPO, M. S.; GARCIA-RODRIGUEZ, C. Interaction of endotoxins with Toll-like receptor 4 correlates with their endotoxic potential and may explain the proinflammatory effect of *Brucella sp* LPS. *Int Immunol*, v. 10, p. 1467-1475, 2004.
- FRANCHINI, M.; SCHWEIZER, M.; MATZENER, P.; MAGKOURAS, I.; SAUTER, S.; MIRKOVITCH, J.; PETERHANS, E.; JUNGI, W. Evidence for dissociation of TLR mRNA expression and TLR agonist-mediated functions in bovine macrophages. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 15, p. 177-189, 2005.
- FUKATA, M.; VAMADEVA, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol*, v. 21, p. 242-253, 2009.
- GANTNER, B. N.; SIMMONS, R.M.; CANAVERA, S. J.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D.M. *J Exp Med*, v. 197, p. 1107-1117, 2003.
- GAY, N.J.; KEITH, F.J. *Drosophila* toll and IL-1 receptor. *Nature*, v. 351, p. 355-356, 1991.
- GIRARDIN, S. E.; BONECA, I. G.; CARNEIRO, L. A.; ANTIGNAC, A.; JÉHANNON, M.; VIALA, J.; TEDIN, K.; TAHA, M. K.; LABIGNE, A.; ZAEHRINGER, U. Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, v. 300, p. 1584-1587, 2003.
- GIRARDIN, E.; TOURNEBIZE, R.; MAVRIS, M.; PAGE, L.; LI, X. CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep.*, v. 2, p. 736-742, 2001.
- GOLDAMMER, T.; ZERBE, H.; MOLENAAR, A.; SCHUBERTH, J.; BRUNNER, M.; KATA, R.; SEYFERT, M. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in

- parturition and for assessment of the therapeutic ability of drugs against preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol*, v. 174, p. 754-759, 1996.
- KAISHO, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-Like receptors. *Immunology*, v. 21, p. 335-376, 2003.
- KANAYAMA, N.; TERAOKA, T.; HORIUCHI, K. The role of human neutrophil elastase in the premature rupture of membranes. *Asia-Oceania J Obstet Gynaecol*, v. 14, p. 389-396, 1988.
- KANNEGANTI, T.; LAMKANFI, M.; NÚÑEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease *Annu Rev Pathol Mechan Dis*, v. 4, p. 365-398, 2007.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*, v. 7, n. 2, p. 131-137, 2006.
- KING, A. E.; CRITCHLE, Y. H. O. D.; KELLY, R. W. Innate immune defenses in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol*, v. 1, p. 1-8, 2003.
- KIRKBRIDE, C.A. Viral agents and associated lesions detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *J Vet Diagn Invest*, v. 4, p. 374-379, 1992.
- KLAFFENBACH, D.; RASCHER, W.; ROLLINGHOFF, M.; DOTSCH, J.; MEISSNER, U.; SCHNARE, M. Regulation and signal transduction of toll-like receptors in human chorioncarcinoma cell lines. *Am J Reprod Immunol*, v. 53, p.77-84, 2005.
- KOGA, K.; MOR, G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am J Reprod Immunol*, v. 63, p. 587-600, 2010.
- KUMAGAI, Y.; AKIRA, S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol*, v. 125, n. 5, p. 985-992, 2010.
- KUNKEL, S. L.; LUKACS, N. W.; CHENSUE, S. W. Chemokines and the inflammatory response. p. 121-131. In: REMICK, D. G.; FRIEDLAND, J.S. Cytokines in health and disease. New York: M. Dekker, 1997.
- LAHAM, N.; RICE, G. E.; BISHOP, G. J.; RANSOME, C.; BRENNECKE, S. P. Interleukin 8 concentrations in amniotic fluid and peripheral venous plasma during human pregnancy and parturition. *Acta Endocrinol*, v. 129, p. 220-224, 1993.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; REICHHART, J.M.; HOFFMANN, J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, v. 86, p. 973-983, 1996.
- LIVAK, J.; SCHMITTGEN, D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*, v. 25, p. 402-408, 2001
- MACEDO, G. C.; MAGNANI, D. M.; CARVALHO, N. B.; BRUNA-ROMERO, O.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C. Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *J Immunol*, v. 180, p. 1080-1087, 2008.
- MARTINS, T. M; PAIXÃO, T. A.; COSTA, E. A.; PIRES A. C.; SANTOS, R. L.; BORGES, A M. Postpartum toll-like receptors and β -defensin 5 mRNA levels in the endometrium of Holstein cows. *Vet Immunol Immunopathol*, in press, 2010.
- MEANS, T. K.; LIEN, E.; YOSHIMURA, A.; WANG, Y.; GOLENBOCK, D. T.; FENTON, M. J. *J Immunol*, v. 163, p. 6748-6755, 1999.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. JR.; Innate immunity. *N Engl J Med*, v 343, p. 338-344, 2000.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A.JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, v. 338, p. 394-397, 1997.
- MENZIES, M.; INGHAM, A. Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Vet*

- Immunol Immunopathol*, v.109, p. 23-30, 2006.
- MEYLAN, E.; TSCHOPP, J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol. Cell.*, v. 22, p. 561-569, 2006.
- MITSUNARI, M.; YOSHIDA, S.; SHOJI, T.; TSUKIHARA, S.; IWABE, T.; HARADA, T.; TERAKAWA, N: Macrophage-activating lipopeptide-2 induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E (2) via toll-like receptor 2 in human placental trophoblast cells. *J Reprod Immunol*, v. 72, p. 46-59, 2006.
- MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*, v. 2, p. 656-670. 2002.
- NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologia da reprodução dos animais domésticos. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 137.
- NAGAI, Y.; AKASHI, S.; NAGAFUKU, M.; OGATA, M.; IWAKURA, Y. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*, v. 3, p. 667-672, 2002.
- NEILAN, M.C.; MCCAUSLAND, I. P.; MASLEN, M. Mycotic pneumonia, placentitis and neonatal encephalitis in dairy cattle caused by *Mortierella wolfii*. *Aust Vet J*, v. 59, p. 48-49, 1982.
- NETEA, M. G.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULLBERG, B. J. Role of the dual interaction of fungal pathogenesis with pattern recognition receptors in the activation and modulation of host defense. *Clin Microbiol Infect*, v. 12, p. 404-409, 2006.
- NOMURA, N.; MIYAJIMA, N.; SAZUKA, T.; TANAKA, A.; KAWARABAYASI, Y.; SATO, S.; NAGASE, T.; SEKI, N.; ISHIKAWA, K.; TABATA, S. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001– KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res*, v. 1, p. 27-35, 1994.
- OGANDO, D. G.; PAZ, D.; CELLA, M.; FRANCHI, A. M. The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. *Reprod*, v. 125, p. 95-110, 2003.
- OZINSKY, A.; UNDERHILL, D. M.; FONTENOT, J. D.; HAJJAR, A. M.; SMITH, K. D.; WILSON, C. B., SCHROEDER, L., ADEREM, A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 13766-13771, 2000.
- PAIXÃO, T. A.; COSTA, E. A.; XAVIER, M. N.; SILVA, T. M. A.; SANTOS, R. L. Innate immunity in brucellosis. *Res Adv Infect Immun Kerala (Índia): Global Research Network*, v.1, p. 21-37, 2009.
- PICCININI, M.; MIDWOOD, K. S. Dampening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators Inflamm*, v. 2010, p. 1-21, 2010.
- PROUDFOOT, A. E. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*, v. 2, p. 106-115, 2002.
- RATH, W.; WINKLER, M.; KEMP, B. The importance of extracellular matrix in the induction of preterm delivery. *J Perinat Med*, v. 26, p. 437-441, 1998.
- RICHARDSON, C. personal communication in: ARTHUR, G.H.; NOAKES, D.E.; PEARSON, H. *Vet. Reprod obstet*, v. 6, p. 49-59, 1989.
- RITTIG, M. G.; KAUFMANN, A.; ROBINS, A.; SHAW, B.; SPRENGER, H.; GEMSA, D.; FOULONGNE, V.; ROUOT, B.; DORNAND, J. Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *J Leuk Biol*, v. 74, p. 1045-1055, 2003.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia* 6.ed. São Paulo: Manole, p. 481, 2005.
- ROMERO, R.; CESKA, M.; AVILA, C.; MAZOR, M; BEHNKE, E; LINDLEY, I. Neutrophil attractant/activating peptide-1/interleukin-8 in term and preterm

- parturition. *Am J Obstet Gynecol*, v.165, p. 813-820, 1991.
- SAMARTINO, L. E.; ENRIGHT, F. M. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 19, p. 55-63, 1996.
- SANTOS, R. L.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J.; ADAMS, L. G. Pathogenesis of Salmonella-induced enteritis: a review. *Braz J Med Bio Res*, v. 36, p. 3-12, 2003.
- SANTOS, R. L.; MARQUES JUNIOR, A. P. Morfofisiologia da Placenta Bovina. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG*, n. 15, p.27, 1996.
- SCHLAFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placenta development and function in health and disease. *Anim Reprod Sci*, v. 60, p. 145-160, 2000.
- SCHOONMAKER, J. N.; LAWELLIN, D. W.; LUNT, B.; MCGREGOR, J. A. Bacteria and inflammatory cells reduce chorioamniotic membrane integrity and tensile strength. *Obstet Gynecol*, v. 74, p. 590-596, 1989.
- SCHWANDNER, R.; DZIARSKI, R.; WESCHE, H.; ROTHE, M.; KIRSCHNING, C. J. *J. Biol Chem*, v. 274, p. 17406-17409, 1999.
- SHELDON, M.; WILLIAMS, J.; MILLER, N.; NASH, M.; HERATH, S. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J*, v. 176, p. 115-121, 2008.
- SILVA, T. M. A.; OLIVEIRA, R. G.; MOL, J. P. S.; XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L. J.; ANDREY P. L.; SANTOS, R. L. Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. *Cienc Rur*, v.39, No.9, p. 2563-2570, 2009.
- 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, 2006.
- STEIN, D.; ROTH, S.; VOGELSANG, E.; NUSSLEIN-VOLHARD, C. The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell*, v. 65, p. 725-735, 1991.
- TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, v. 21, p. 335-376, 2003.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, v. 140, p. 805-820, 2010.
- TAKEUCHI, O.; SATO, S.; HORIUCHI, T.; HOSHINO, K.; TAKEDA, K.; DONG, Z.; MODLIN, R. L.; AKIRA, S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*, v. 169, p. 10-14, 2002.
- TIRUMURUGAAN, K. G.; DHANASEKARAN, S.; DHINAKAR, R. A. J. G.; RAJA, A.; KUMANAN, K.; RAMASWAMY, V. Differential expression of toll-like receptor mRNA in selected tissues of goat (*Capra hircus*). *Vet Immunol Immunopathol*, v. 133, p. 296-301, 2010.
- TRIANTAFILOU, M.; GAMPER, F. G. J.; HASTON, R. M.; MOURATIS, M. A.; SIEGFRIED, M.; HARTUNG, T.; TRIANTAFILOU, K. Membrane Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting. *J Bio Chem.*, v. 281, p. 31002-31010, 2006.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* Pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.
- VISINTIN, A.; MAZZONI, A.; SPITZER, A.; SEGAL, M. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 98, p. 12156-12161, 2001.

- XAVIER, M. N.; PAIXÃO, T. A.; POESTER, F. P.; LAGE, A. P.; SANTOS, R. L. Pathology, immunohistochemistry, and bacteriology of tissues and milk of cows and fetuses experimentally infected with *Brucella abortus*. *J Comp Pathol*, v.140, n.3-4, p.147-157, 2009.
- WEISS, D. S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; ZYCHLINSKY, A.; MORENO, E. MyD88, but not Toll like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect Immun*, v. 73, p. 5137-5143, 2005.
- WERTS, C.; TAPPING, R. I.; MATHISON, J. C.; CHUANG, T. H.; KRAVCHENKO, V.; SAINT GIRONS, I.; HAAKE, D. A.; GODOWSKI, P. J.; HAYASHI, F.; OZINSKY, A.; UNDERHILL, D. M.; KIRSCHNING, C. J.; WAGNER, H.; ADEREM, A.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*, v. 2, p. 346-352, 2001.
- WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol*, v.16, n. 1, p. 27-32, 2007.
- YANG, W.; MOLENAAR, A.; KURTS-EBERT, B.; SEYFERT, M. NFkappaB factors are essential, but not the switch, for pathogen related induction of the bovine beta-defensin 5-encoding gene in mammary epithelial cells. *Mol Immunol*, v. 43, p. 210-225, 2006.
- YOSHIMURA, A.; LIEN, E.; INGALLS, R. R.; TUOMANEN, E.; DZIARSKI, R.; GOLENBOCK, D. 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.; LYDDON, T. D.; JORGENSON, R. L.; MISFELDT, M. L. Expression of Toll-like Receptors in Human Endometrial Epithelial Cells and Cell Lines. *Am J Reprod Immunol*, v. 52, p. 67-73, 2004.
- YUI, J.; GARCIA-LLORET, M.; WEGMANN, T. G.; GUILBERT, L. J. Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta*, v. 15, p. 819-835, 1994.
- ZHANG, M.; BOTËR, M.; LI, K.; KADOTA, Y.; PANARETOU, B.; PRODROMOU, C.; SHIRASU, K.; PEARL, L. H. Structural and functional coupling of Hsp90- and Sgt1-centred multi-protein complexes. *EMBO J*, v. 27, n. 20, p. 2789-2798, 2008.
- ZOOK, B. C; MIGAKI, G. Aspergillosis in animals, Springfield: Charles C. Thomas Publisher, 1. ed., 1985, 207 p.