

**Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**PRODUÇÃO DE CITOCINAS IL1 β , IL6 E CXCL8 POR
EXPLANTES ENDOMETRIAIS DE NOVILHAS
AZEBUADAS ESTIMULADOS POR DIFERENTES
PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS A PATÓGENOS**

Philippe Pimenta Nunes

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2017**

Philippe Pimenta Nunes

**PRODUÇÃO DE CITOCINAS IL1 β , IL6 E CXCL8 POR
EXPLANTES ENDOMETRIAIS DE NOVILHAS
AZEBUADAS ESTIMULADOS POR DIFERENTES
PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS A PATÓGENOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Alan Maia Borges

Co-orientador: Prof. Renato de Lima Santos

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2017**

N972p Nunes, Philipe Pimenta, 1989-
Produção de citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8 por explantes endometriais de novilhas azebuadas estimulados por diferentes padrões moleculares associados a patógenos / Philipe Pimenta Nunes. – 2017.
66 p. : il.

Orientador: Alan Maia Borges
Co-orientador: Renato de Lima Santos
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Novilho – Reprodução – Teses. 2. Bovino – Reprodução – Teses. 3. Citocinas – Teses.
4. Endométrio – Teses. 5. Útero – Infecção – Teses. I. Borges, Alan Maia. II. Santos,
Renato de Lima. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
IV. Título.

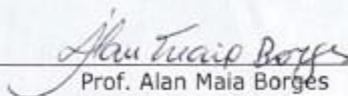
CDD – 636.208 926

FOLHA DE APROVAÇÃO

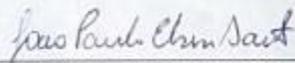
PHILIFE PIMENTA NUNES

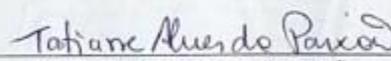
Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração REPRODUÇÃO ANIMAL.

Aprovada em 10 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Alan Maia Borges
Presidente - Orientador


Prof. Andrey Pereira Lage
Escola de Veterinária - UFMG


Prof. João Paulo Elsen Saut
Universidade Federal de Uberlândia - UFU


Profª. Tatiane Alves da Paixão
Instituto de Ciências Biológicas - ICB- UFMG

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Márvilo e Margarete, ao meu irmão
Helton, por serem os pilares
inabaláveis da minha existência, e a
toda minha família, pelo imenso apoio
durante a minha jornada.

AGRADECIMENTOS

À Escola de Veterinária da UFMG, agradeço pela possibilidade e infraestrutura para a realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por ter concedido a minha bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), por ter disponibilizado recursos para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Alan Maia Borges, agradeço pela amizade, ensinamentos, compreensão, confiança e auxílio na execução do experimento.

Ao meu co-orientador, Prof. Renato de Lima Santos, pela contribuição intelectual e auxílio no desenvolvimento do experimento.

Aos professores Andrey Pereira Lage e João Paulo Elsen Saut, agradeço pela participação na banca examinadora e sugestões para melhoria do presente trabalho.

Aos professores Guilherme Pugliesi, Gilcinéa Santana e Rogéria Serakides pelo auxílio e suporte quanto à realização de técnicas laboratoriais.

Aos demais professores, funcionários e técnicos do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, agradeço pelos ensinamentos e contribuições para a minha formação como mestre.

À pós-doutoranda Telma da Mata Martins, pela amizade, imenso companheirismo, ensinamentos, engajamento, descontração, otimismo, suporte, doação e parceria na execução do experimento.

À equipe do Laboratório de Patologia Molecular da Escola de Veterinária, pela imensa disposição em ajudar e esclarecer dúvidas em relação à execução do experimento.

Aos meus amigos de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Ana Carolina, Natália, Luciano, Gustavo, Silvio, Adolfo, Lucas, Isabela, Poliana, Verónica, e a todos os outros, agradeço pela amizade, companheirismo, descontrações, estudos e apoio em todas as fases do mestrado.

Aos alunos de Iniciação Científica, Bárbara Vanelli e Iuri Antunes, pela colaboração na execução do trabalho.

Ao Vitor, Arlindo, Bruno e, em especial, à D. Edivina, funcionários do Frigorífico Santa Vitória Ltda., por abrirem as portas e com muita simpatia, permitirem a colheita de material para o experimento.

Agradeço à minha família, amigos e em especial à minha namorada, Alessandra Rocha Nogueira, pelo incentivo, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos dessa caminhada.

Por fim, agradeço a Deus pela paciência, serenidade, força e sabedoria para concluir mais uma etapa dessa minha longa jornada.

*Em um lugar escuro nos encontramos,
e um pouco mais de conhecimento
ilumina nosso caminho.*

(Mestre Yoda)

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	13
	LISTA DE FIGURAS	13
	LISTA DE ANEXOS	13
	RESUMO	14
	ABSTRACT	15
1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	17
3.	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	Infecções uterinas	18
3.2	Definições das infecções uterinas e seus impactos	19
3.3	Imunidade inata uterina	21
3.3.1	<i>Reconhecimento de microrganismos</i>	22
3.3.2	<i>Receptores tipo-Toll (TLRs)</i>	23
3.3.3	<i>TLR1/2, TLR2/6, TLR4 e vias de sinalização intracelular</i>	23
3.3.4	<i>Receptores tipo-NOD (NLRs)</i>	25
3.3.5	<i>Mediadores pró-inflamatórios associadas às infecções uterinas em bovinos</i>	25
3.3.5.1	<i>Fator de necrose tumoral α (TNFα)</i>	25
3.3.5.2	<i>Interleucina 1β e Interleucina 6</i>	26
3.3.5.3	<i>Quimiocina CXCL8</i>	27
3.3.5.4	<i>Prostaglandinas</i>	28
3.3.5.5	<i>Peptídeos antimicrobianos</i>	29
3.4	Modulação da resposta imune inata pelos hormônios esteroides sexuais	29
3.5	Efeito das infecções uterinas sobre a fisiologia reprodutiva	30
3.6	Estudos <i>in vitro</i> com explantes endometriais inteiros	32
3.7	Fêmeas zebuínas e estudos sobre imunidade inata uterina e fertilidade	33
4.	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Classificação macroscópica dos tratos genitais femininos para caracterização da fase do ciclo estral	36
4.2	Preparo de explantes endometriais inteiros	37
4.3	Delineamentos experimentais	38
4.3.1	<i>Resposta de explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro à estimulação <i>in vitro</i> com diferentes padrões moleculares associados a patógenos puros</i>	38
4.3.2	<i>Dinâmica de produção e acúmulo de citocinas IL1β, IL6 e CXCL8 ao longo do tempo de cultivo por explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro sob estimulação por LPS</i>	39
4.3.3	<i>Caracterização da produção de IL1β, IL6 e CXCL8 por explantes endometriais de novilhas azebuadas em diferentes fases do ciclo estral estimulados por LPS</i>	41
4.4	Análises estatísticas	42
5.	RESULTADOS	43
5.1	Resposta de explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro à estimulação <i>in vitro</i> com diferentes padrões moleculares associados a patógenos puros	44

5.2	Dinâmica de produção e acúmulo de citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8 ao longo do tempo de cultivo por explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro sob estimulação por LPS.....	46
5.3	Caracterização da produção de IL1 β , IL6 e CXCL8 por explantes endometriais de novilhas azebuadas em diferentes fases do ciclo estral estimulados por LPS.....	48
6.	DISCUSSÃO.....	50
7.	CONCLUSÕES.....	53
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
9.	ANEXOS.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Receptores tipo- <i>Toll</i> (TLRs) identificados em bovinos, localização celular, principais padrões moleculares associados a micróbios (MAMP) e origem microbiana.....	23
----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tratos genitais de novilhas azebuadas coletados em abatedouro.....	35
Figura 2	Avaliação macroscópica de tratos genitais coletados de novilhas azebuadas abatidas visando a caracterização das fases do ciclo estral, de acordo com as estruturas observadas na morfologia e transecções dos ovários.....	36
Figura 3	Esquema em placa de cultivo de seis poços, representativa dos tratamentos experimentais para estimulação por diferentes PAMP de explantes endometriais provenientes de trato genital de novilhas azebuadas.....	39
Figura 4	Esquema em placas de seis poços, representativa de uma réplica dos tratamentos experimentais para avaliação da dinâmica de produção de citocinas por explantes endometriais de novilhas azebuadas, estimulados ou não por 1,0 µg/mL de LPS.....	40
Figura 5	Esquema em placa de cultivo de seis poços, representativa dos tratamentos experimentais para avaliação do acúmulo de citocinas ao longo do tempo de cultivo por explantes endometriais provenientes de trato genital de novilhas azebuadas, estimulados ou não por 1,0 µg/mL de LPS.....	41
Figura 6	Esquema em placas de seis poços, representativa de uma réplica dos tratamentos experimentais para avaliação da influência de fases do ciclo estral sobre a produção de citocinas IL1β, IL6 e CXCL8 por explantes endometriais provenientes de trato genital de novilhas azebuadas em diferentes fases do ciclo estral, estimulados ou não por 1,0 µg/mL de LPS.....	42
Figura 7	Aspecto macroscópico dos explantes endometriais não fragmentados de novilhas azebuadas utilizados no estudo.....	43
Figura 8	Explante endometrial de novilha azebuada fixado em solução formol salina tamponada 10% logo após a colheita, submetido a processamento histológico e corado pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H.E.).....	44
Figura 9	Produção de IL1β, IL6 e CXCL8 por explantes endometriais não fragmentados de novilhas azebuadas em resposta à estimulação por diferentes concentrações de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP).....	45
Figura 10	Dinâmica de produção e acúmulo de IL1β, IL6 e CXCL8 ao longo do tempo de cultivo por explantes endometriais não fragmentados de novilhas azebuadas em resposta ao LPS.....	47
Figura 11	Produção de IL1β, IL6 e CXCL8 em resposta ao LPS por explantes endometriais não fragmentados de novilhas azebuadas, em função da fase do ciclo estral.....	49

LISTA DE ANEXOS

Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais.....	66
--	----

RESUMO

Objetivou-se avaliar a produção das citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 β (IL1 β), interleucina 6 (IL6) e quimiocina CXCL8, por explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro estimulados por padrões moleculares associados a patógenos e a influência de diferentes fases do ciclo estral sobre tal produção. As concentrações de citocinas em meio de cultivo foram mensuradas por meio de ELISA. Explantes endometriais foram estimulados por diferentes concentrações de lipopolissacarídeo (LPS), lipoproteína triacetilada sintética (PAM3) e peptidoglicano (PGN). A dinâmica de produção, o acúmulo de citocinas ao longo do tempo e a produção de citocinas por explantes endometriais provenientes de tratos genitais em diferentes fases do ciclo estral foram avaliados sob estimulação por 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de LPS. Explantes endometriais produziram maiores concentrações de IL1 β em resposta a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de LPS ($P<0,05$) após 24 horas de cultivo e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de PGN ($P<0,01$) após 24 e 48 horas de cultivo; maiores concentrações de IL6 em resposta a 0,1 ($P<0,05$) e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de LPS ($P<0,01$) e CXCL8 em resposta a 0,1 ($P<0,01$) e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de LPS ($P<0,01$) após 24 horas de cultivo. Explantes estimulados por LPS apresentaram maior produção de IL1 β de 6 a 12 e 12 a 18 horas ($P<0,05$), com maior acúmulo a partir de 24 horas de cultivo ($P<0,05$); maior produção de IL6 durante as 12 horas iniciais de cultivo ($P<0,05$), acumulando maiores concentrações de IL6 após seis ($P<0,01$) e 24 horas ($P<0,05$) de cultivo; e maior produção de CXCL8 de 6 a 12 e 18 a 24 horas ($P<0,05$), com acúmulo significativo de 6 a 48 horas ($P<0,05$) de cultivo. Explantes endometriais de tratos genitais em fase de metaestro, estimulados por LPS, produziram maiores concentrações de IL6 ($P<0,01$) e CXCL8 ($P<0,05$) após 24 horas de cultivo e IL6 ($P<0,05$) após 48 horas de cultivo. Explantes endometriais de tratos genitais em fase de diestro produziram maiores concentrações de IL1 β ($P<0,05$) e IL6 ($P<0,05$) após 24 horas de cultivo e IL6 ($P<0,05$) após 48 horas de cultivo. Já explantes endometriais de tratos genitais em fase de proestro/estro produziram maiores concentrações de IL1 β ($P<0,05$) após 24 horas de cultivo. Não houve diferença significativa entre as produções de citocinas por explantes endometriais provenientes de tratos genitais em diferentes fases do ciclo estral. Conclui-se que explantes endometriais de novilhas azebuadas em fase de diestro respondem à estimulação por PAMP com produção de IL1 β , IL6 e CXCL8 e que as fases do ciclo estral não influenciam na produção das citocinas pró-inflamatórias por explantes estimulados por LPS.

Palavras-chave: Bovinos, citocinas, endométrio, infecções uterinas, resposta inflamatória, zebu

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the production of proinflammatory cytokines interleukin 1 β (IL1 β), interleukin 6 (IL6) and chemokine CXCL8, by endometrial explants of zebu based heifers at diestrus stimulated by pathogen-associated molecular patterns and the influence of different phases of the estrous cycle on such production. The cytokines concentrations in culture medium were measured by ELISA. Endometrial explants were stimulated by different concentrations of lipopolysaccharide (LPS), synthetic triacetylated lipoprotein (PAM3) and peptidoglycan (PGN). The production dynamics, the cytokines accumulation over time and the cytokines production by endometrial explants from genital tracts at different phases of the estrous cycle were evaluated by stimulation with 1.0 $\mu\text{g/mL}$ of LPS. Endometrial explants produced higher concentrations of IL1 β in response to 1.0 $\mu\text{g/mL}$ of LPS ($P<0.05$) after 24 hours of culture and 10.0 $\mu\text{g/mL}$ of PGN ($P<0.01$) after 24 and 48 hours of cultivation; higher concentrations of IL6 in response to 0.1 ($P<0.05$) and 1.0 $\mu\text{g/mL}$ of LPS ($P<0.01$) and CXCL8 in response to 0.1 ($P<0.01$) and 1.0 $\mu\text{g/mL}$ LPS ($P<0.01$) after 24 hours of culture. LPS-stimulated explants showed higher IL1 β production at 6 to 12 and 12 to 18 hours ($P<0.05$), with higher accumulation after 24 hours of culture ($P<0.05$); increased IL6 production during the first 12 hours of culture ($P<0.05$), accumulating higher concentrations of IL6 after six ($P<0.01$) and 24 hours ($P<0.05$) of culture; greater production of CXCL8 at 6 to 12 and 18 to 24 hours ($P<0.05$), with significant accumulation from 6 to 48 hours ($P<0.05$) of culture. LPS-stimulated endometrial explants from metaestrous phase genital tracts produced higher concentrations of IL6 ($P<0.01$) and CXCL8 ($P<0.05$) after 24 hours of culture and IL6 ($P<0.05$) after 48 hours of cultivation. Endometrial explants of diestrus phase genital tracts produced higher concentrations of IL1 β ($P<0.05$), IL6 ($P<0.05$) after 24 hours of culture and IL6 ($P<0.05$) after 48 hours of cultivation. On the other hand, endometrial explants from proestrous/estrous genital tracts produced higher concentrations of IL1 β ($P<0.05$) after 24 hours of cultivation. There was no significant difference in cytokine production by endometrial explants from genital tracts at different stages of the estrous cycle. In conclusion, endometrial explants of zebu based heifers at diestrus phase respond to stimulation by PAMP with production of IL1 β , IL6 and CXCL8 and phases of the estrous cycle do not influence the production of proinflammatory cytokines by LPS-stimulated explants.

Key-words: Bovine, cytokines, endometrium, uterine infection, inflammatory response, zebu

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta o segundo maior rebanho bovino do mundo com cerca de 215,2 milhões de cabeças, das quais 21,8 milhões são responsáveis pela quinta maior produção mundial de leite (IBGE, 2016; Seapa-MG, 2016). O rebanho leiteiro brasileiro é composto por 6% de animais especializados para a produção de leite, em sua grande maioria por fêmeas da raça Holandesa, 74% de animais mestiços, provenientes de cruzamentos Holandês (*Bos taurus taurus*) x Zebu (*Bos taurus indicus*) (mestiças HZ), e 20% de animais considerados não especializados, ou seja, animais de baixa aptidão leiteira, mestiços, cujo grau de sangue dos cruzamentos não é determinado (Vilela, 2003). Esses dados enfatizam a importância das fêmeas mestiças no cenário produtivo brasileiro, uma vez que são animais mais rústicos, de menor demanda nutricional e elevado potencial produtivo, mesmo em sistemas menos tecnificados e desfavoráveis à criação (Amaral et al., 2006).

A busca pelo aumento da eficiência produtiva visa aumentar a rentabilidade do sistema como também, permanecer na atividade leiteira, que a cada dia se torna ainda mais competitiva. Entretanto, o aumento da eficiência produtiva em rebanhos leiteiros veio acompanhado nas últimas décadas pela progressiva redução da eficiência reprodutiva, principalmente em rebanhos especializados (Butler, 2000; Lucy, 2001; Spencer, 2013). Diversos fatores estão associados à queda da eficiência reprodutiva em rebanhos de alta produção, tendo como destaque afecções decorrentes de desordens hormonais, metabólicas e imunológicas durante o período de transição e puerpério (Lucy, 2001; Kask et al., 2003; Butler, 2006; Sheldon et al., 2006; Sordillo et al., 2009; Esposito et al., 2014; LeBlanc, 2014). Dentre essas afecções, as infecções uterinas possuem papel importante sobre a fertilidade de fêmeas bovinas, pois impactam diretamente sobre o trato genital, alterando a fisiologia reprodutiva de tais animais (LeBlanc, 2002; Kasimanickam et al., 2004; Gilbert et al., 2005; Sheldon et al., 2008). Além das perdas reprodutivas, perdas econômicas relacionadas com tratamento das enfermidades, descarte de leite, custos com doses de sêmen e descarte involuntário de animais inférteis, constituem os maiores impactos de tais afecções em um sistema produtivo (Sheldon e Dobson, 2004; Sheldon et al., 2009b; Martins et al., 2013).

Diversos estudos foram conduzidos ao longo dos anos visando classificar as infecções uterinas e entender os mecanismos patofisiológicos envolvidos no seu estabelecimento, persistência e resolução (Lewis et al., 1997; Sheldon et al., 2002, 2006, 2008, 2009a; Kasimanickam et al., 2004; Sheldon e Dobson, 2004; Gilbert et al., 2005; Williams et al., 2005, 2007; Herath et al., 2006a, 2009ab; Chapwanya et al., 2010; Dubuc et al., 2010; Turner et al., 2014). Neste contexto, a descoberta de receptores de reconhecimento de padrões (PRR) em células endometriais, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas do útero, que são capazes de reconhecer ampla variedade de microrganismos e de estimular resposta inflamatória uterina, despertou a importância de se conhecer mais a fundo os mecanismos envolvidos na resposta imune inata do útero (Janeway e Medzhitov, 2002; McGuire et al., 2005; Akira et al., 2006; Wira et al., 2005; Horne et al., 2008).

Após o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) por PRR, uma série de vias de sinalização intracelulares são acionadas. Como resultado, ocorre a transcrição de genes e produção de diversas moléculas pró-inflamatórias como citocinas, quimiocinas, moléculas vasoativas, defensinas, lisozimas, proteínas de fase aguda e proteínas do complemento, responsáveis por atrair células de defesa, evitar a invasão do organismo, controlar e debelar a infecção, além de promover reparo de lesões teciduais (Herath et al., 2009b; Galvão et al., 2011; Swangchan-Uthai et al., 2012). Acredita-se que a ocorrência de quadros de subfertilidade ou

infertilidade possam estar associados a respostas inflamatórias insuficientes ou exacerbadas, e que alterações no perfil de expressão endometrial de citocinas e outros mediadores inflamatórios são consequências de desequilíbrios nos mecanismos imunológicos que regulam o processo inflamatório (Horne, 2008; Herath et al., 2009; Pothmann et al., 2015).

O perfil de expressão endometrial de PRR e de citocinas tem sido amplamente estudado em fêmeas bovinas. Esse perfil pode ser influenciado pela gestação e pelo período pós-parto (Petzl, 2007, Martins et al., 2011), pelo tipo de contaminação uterina no pós-parto (Borges et al., 2012), pela variação genética entre os animais (Pinedo et al., 2013), além de estímulos hormonais variáveis durante o ciclo estral (Lewis, 2003; Herath et al., 2006; Davies et al., 2008; Borges et al., 2012; Saut et al., 2014). Estudos do nosso grupo de pesquisa caracterizaram e expressão de PRR no útero de fêmeas taurinas (*Bos taurus taurus*) durante o pós-parto normal e patológico (Martins et al., 2011, 2016), além da produção de citocinas pró-inflamatórias por explantes endometriais de novilhas e vacas taurinas não gestantes, em diferentes fases do ciclo estral, frente a diferentes estímulos inflamatórios (Borges et al., 2012). Entretanto, poucos estudos foram realizados até o presente momento, para caracterizar a resposta inflamatória e os mecanismos da resposta imune inata existentes no endométrio de fêmeas azebuadas. Fêmeas azebuadas são animais mestiços resultante de cruzamentos entre taurinos e zebuínos, cujo maior grau de sangue e fenótipo são provenientes da subespécie Zebu. Tais animais são considerados mais resistentes a diversos desafios infecciosos, inclusive do útero, e constituem parcela importante do rebanho produtor de leite no Brasil. Diante disso, as hipóteses do presente estudo são a menor produção de citocinas pró-inflamatórias pelo endométrio de novilhas azebuadas frente à estimulação por PAMP confere maior resistência aos processos infecciosos uterinos e as variações dos hormônios esteroides sexuais durante o ciclo estral determinam períodos de maior ou menor susceptibilidade às infecções bacterianas do útero.

2. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivos avaliar a produção das citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 β (IL1 β), interleucina 6 (IL6) e quimiocina CXCL8 por explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro, estimulados por diferentes padrões moleculares associados a patógenos; e avaliar a produção das mesmas citocinas por explantes endometriais de novilhas azebuadas em diferentes fases do ciclo estral, estimulados por lipopolissacarídeo (LPS).

3. REVISÃO DE LITERATURA

O aumento da produtividade leiteira nas últimas décadas é resultado de investimentos e estudos em diversas áreas do conhecimento como nutrição, sanidade, bem-estar animal, reprodução e principalmente, melhoramento genético. A constante seleção de animais geneticamente superiores para a produção de leite, mantidos em sistemas de produção cada vez mais tecnificados e bem manejados, além do crescente uso de biotécnicas reprodutivas, promoveram rápida melhoria genética dos rebanhos leiteiros, com consequente aumento da produtividade. Entretanto, para uma vaca produzir leite, essa deve apresentar partos em intervalos de 12 a 14 meses, caracterizando assim boa taxa de fertilidade e, conseqüentemente, boa eficiência reprodutiva. Porém o aumento da taxa de fertilidade não acompanhou o aumento da produção leiteira nas últimas décadas (Marques Junior, 1993; Kask et al., 2003; Spencer, 2013).

O aumento da produtividade impacta diretamente sobre as vacas consideradas de alta produção. No período de transição, toda vaca sofre diversas alterações hormonais e metabólicas que visam

prepará-la para a transição de vaca não lactante para vaca em lactação (Lucy, 2001; Butler, 2006). Dentre essas adaptações homeorréticas, observa-se alterações nas concentrações hormonais de estrógeno, progesterona, insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), hormônio do crescimento (GH), cortisol, prolactina, ocitocina, prostaglandinas, dentre outros. Além disso, ocorrem alterações metabólicas como redução da concentração circulante de glicose, mobilização de reservas corporais como tecido adiposo e tecido muscular, com consequente aumento das concentrações circulantes de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) e corpos cetônicos (Bell, 1995; Butler, 2003; Diskin et al., 2003; Leroy et al., 2005,2008). Tais alterações visam desencadear o evento do parto e suprir a demanda energética crescente da vaca, como consequência da redução da ingestão de alimentos no pré e pós-parto e início da lactação. Entretanto, dependendo da condição corporal, condição nutricional e produção leiteira dessa vaca, o organismo animal pode promover alterações homeorréticas mais acentuadas, aumentando o déficit energético, reduzindo a capacidade imunológica e predispondo-o a ocorrências de doenças metabólicas e puerperais. A ocorrência de tais enfermidades impacta negativamente na eficiência produtiva e reprodutiva das fêmeas bovinas (Dobson et al., 2007; Wathes et al., 2009).

3.1 – Infecções uterinas

As infecções uterinas merecem destaque entre as principais doenças puerperais em vacas leiteiras de alta produção. Associado à queda da imunidade no período de transição e puerpério, as barreiras físicas do trato genital feminino são rompidas durante o parto (Sheldon e Dobson, 2004). Neste período em que a vaca se torna imunologicamente suprimida, microrganismos comensais ao trato genital, à pele do animal e bactérias ambientais conseguem migrar e contaminar o útero. A contaminação uterina é um processo dinâmico e não específico, no qual uma ampla variedade de bactérias colonizadoras são eliminadas e novas bactérias tornam a colonizar o útero durante as primeiras semanas após o parto (Griffin et al., 1974; Sheldon et al., 2002). Aproximadamente 80 a 100% das vacas apresentam colonização bacteriana uterina em até duas semanas pós-parto e cerca de 40% ainda apresentam colonização em até três semanas (Sheldon et al., 2008).

Devido à característica do conteúdo uterino no pós-parto, algumas bactérias colonizadoras conseguem se multiplicar, produzir toxinas, aderir à mucosa uterina e invadir o epitélio, dando início ao processo infeccioso e inflamatório do útero (Janeway et al., 2001; Sheldon e Roberts, 2010). As principais bactérias patogênicas normalmente isoladas por meio de culturas aeróbicas e anaeróbicas de swabs uterinos são *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella* spp. (Griffin et al., 1974; Sheldon et al., 2002; Williams et al., 2005; Lopes, 2007; McDougall et al., 2011).

A *E. coli* é a principal bactéria Gram-negativo presente no útero de vacas na primeira semana pós-parto, com prevalência em torno de 37% das bactérias isoladas. Essa por sua vez, parece preparar o ambiente uterino para a colonização da *T. pyogenes*, com prevalência de 49% das bactérias isoladas (Williams et al., 2005, 2007). As infecções uterinas causadas por *E. coli*, além de propiciar infecções por outras bactérias e vírus, promovem a liberação de lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular bacteriana após a sua morte. A dispersão do LPS pelo organismo do animal, quadro denominado de endotoxemia, atingindo locais como hipotálamo, hipófise e ovários, é responsável por alterar a fisiologia reprodutiva dos animais afetados (Williams et al., 2007; Sheldon et al., 2009a; Bromfield et al., 2015). Infecções mais severas são causadas pela *T. pyogenes*, devido à grande maioria das cepas expressarem o gene *plp*. Esse fator de virulência codifica a produção de pyolisina, uma citotoxina colesterol-dependente que atua sobre sítios ricos em colesterol da membrana plasmática celular. A pyolisina promove mobilização e agregação de

colesterol, formação de poros nanométricos na membrana plasmática, resultando em morte celular por efeito osmótico (Jost e Billington, 2005; Amos et al., 2014). Além disso, *T. pyogenes*, *F. necrophorum* e *Prevotella* spp. parecem atuar em sinergismo, aumentando a severidade da infecção. Além da pyolisina, a *T. pyogenes* produz fatores de crescimento para *F. necrophorum*, que por sua vez produz uma leucotoxina responsável por lisar leucócitos. A *Prevotella* spp. é responsável pela produção de substâncias que reduzem a ação dos neutrófilos e macrófagos inibindo sua capacidade fagocítica (Sheldon et al., 2009a).

As manifestações clínicas das infecções uterinas irão depender da espécie e carga bacteriana colonizadora do útero, do ambiente uterino, da composição genética do animal e seu sistema imunológico. Quanto maior a carga bacteriana e mais patogênica for a bactéria colonizadora, maiores são as chances de os mecanismos de defesa uterina serem subjugados, permitindo a invasão bacteriana do epitélio uterino, resultando em infecção e inflamação (Sheldon e Dobson, 2004). Além disso, a variação dos hormônios esteroides após a primeira ovulação pós-parto, influencia na susceptibilidade às infecções uterinas. Após a primeira ovulação pós-parto, o ambiente endócrino uterino é regido predominantemente pela ação da progesterona produzida pelo corpo lúteo. A progesterona é conhecida por suprimir o sistema imune, diminuindo a produção de eicosanoides (prostaglandinas e leucotrienos) e reduzindo a capacidade fagocítica dos neutrófilos (Lewis, 2003; Borges et al., 2012; Turner et al., 2012). Entretanto, na fase de crescimento folicular, a maior concentração circulante de estrógeno resulta em maior fluxo sanguíneo ao útero, maior produção de fluido cervico-vaginal, secreção de moléculas antimicrobianos e aporte de células de defesa (Wira et al., 2010).

A composição genética dos animais também parece influenciar na incidência das infecções uterinas, uma vez que as vacas zebuínas e azebuadas são mais resistentes aos processos infecciosos que as vacas taurinas (González Sánchez et al., 1999; Camargos et al., 2013). A colonização uterina por bactérias é comum a todas as fêmeas no pós-parto. Entretanto, a resposta imune inata e o processo inflamatório endometrial são fundamentais para conter e debelar as infecções, eliminar os agentes patogênicos e promover reparações teciduais necessárias para o estabelecimento de uma nova gestação. Dependendo da capacidade de resposta do sistema imune inato, alguns animais se tornam mais resistentes à contaminação e infecção uterina do que outros (Sheldon et al., 2009a; Takeuchi e Akira, 2010; Turner *et al.*, 2012).

3.2 – Definições das infecções uterinas e seus impactos

Diversos estudos foram realizados tentando definir características e classificar as infecções uterinas (LeBlanc et al., 2002, 2014; Kasimanickam et al., 2004, 2005; Gilbert et al., 2005; Sheldon et al., 2006, 2009; Galvão et al., 2009; Dubuc et al., 2010; McDougall et al., 2011, 2013; Sannmann et al., 2012). Entretanto, as características e definições são variáveis, não havendo consenso entre os autores, e na maioria das vezes, são baseadas nos sinais clínicos, no período de manifestação após o parto e em características citológicas e/ou histológicas.

Metrite é definida como doença sistêmica que ocorre nas três primeiras semanas pós-parto, predominantemente entre os 10 primeiros dias, caracterizada por descarga vaginal viscosa a purulenta, vermelho acastanhada, fétida, associada à febre, com debilidade, inapetência e queda na produção de leite (Sheldon et al., 2006, 2009a; Sannmann et al., 2012). Macro e microscopicamente é caracterizada por inflamação de todas as camadas uterinas, apresentando distensão do útero, sinais de edema, congestão da mucosa uterina, infiltrado leucocitário e degeneração miometrial (Sheldon et al., 2006, 2009a).

Endometrite clínica era definida apenas como inflamação do trato reprodutivo associada à infecção bacteriana, caracterizada por dilatação de cérvix ($\geq 7,5$ cm), secreção cervico-vaginal purulenta ou mucopurulenta a partir de três semanas pós-parto, sem manifestações sistêmicas de doença (LeBlanc et al., 2002; Sheldon et al., 2006). Embora a avaliação clínica de secreção cervico-vaginal purulenta a mucopurulenta após três semanas pós-parto seja utilizada para caracterização de endometrite clínica, nem todos os animais que apresentam tal característica clínica possuem inflamação endometrial. A avaliação apenas da descarga vaginal é incapaz de diferenciar quadros de endometrite, cervicite e vaginite (Dubuc et al., 2010). Cervicite é definida como inflamação da cérvix, caracterizada por acúmulo de secreção purulenta na porção cranial da vagina ou corrimento purulento externo à vulva, contendo mais de 5% de PMN em citologia endocervical por meio da técnica de *cytobrush*, a partir de 30 dia pós-parto (Deguillaume et al., 2012; LeBlanc, 2014). Já vaginite é definida como um processo inflamatório da vagina, caracterizado pelo aumento do infiltrado de polimorfonucleares no tecido, associado ao acúmulo de secreção purulenta na vagina ou corrimento purulento externo à vulva (Dubuc et al., 2010; De Boer e al., 2014). Isso demonstra que a terminologia de endometrite clínica não é a mais adequada para definição de quadros que apresentam secreções cervico-vaginais purulentas ou mucopurulentas, sendo o termo descarga vaginal purulenta (DVP) mais apropriado (Dubuc et al., 2010; LeBlanc, 2014). Dessa forma, endometrite clínica é melhor definida a partir da associação entre avaliação clínica e citologia endometrial. Logo, é definida como inflamação do endométrio ainda associada à infecção bacteriana, caracterizada por descarga vaginal purulenta após 21 dias pós-parto, sem manifestações sistêmicas de doença, aliada à citologia endometrial contendo proporção de polimorfonucleares superior a 6% (LeBlanc et al., 2002; Dubuc et al., 2010; McDougall et al., 2013).

Endometrite citológica é definida como inflamação superficial do endométrio, não ultrapassando o extrato esponjoso, e normalmente não está associada à infecção uterina (Sheldon et al., 2006). É diagnosticada por citologia endometrial através da técnica de *cytobrush* (Kasimanickam et al., 2004) ou lavado uterino (Gilbert et al., 2005), no qual a proporção de polimorfonucleares (PMN) varia entre 5 a 8% entre quatro a nove semanas pós-parto, sem sinais clínicos de doença (Gilbert et al., 2005; Dubuc et al., 2010; Madoz et al., 2013; LeBlanc et al., 2014).

Piometra é caracterizada pela distensão do útero por acúmulo de material purulento ou mucopurulento em seu interior, com cérvix fechada ou parcialmente fechada, associado à presença de um corpo lúteo funcional e persistente (Sheldon et al., 2006).

Em até uma semana pós-parto, cerca de 40% das vacas em lactação apresentam algum quadro de metrite, sendo que este valor pode variar de 36% a 50% das fêmeas (Markusfeld, 1987; Sheldon et al., 2008). Destes animais, aproximadamente 20% persistem além de três semanas pós-parto com DVP e 30% permanecem com quadros de endometrite citológica, podendo chegar a 74% dependendo do valor de corte para a porcentagem de PMN (Gilbert et al., 2005; Sheldon et al., 2009a). Quadros de cervicite atingem cerca de 15 a 40% das vacas e podem estar associados ou não a quadros de infertilidade ou subfertilidade. Cerca de 50% das vacas com DVP possuem cervicite e cerca de 50 a 75% das fêmeas com endometrite também são acometidas por cervicite (Deguillaume et al., 2012). Já a piometra é uma patologia não muito frequente, abrangendo menos de 5% dos casos de infecções uterinas (Sheldon et al., 2008).

As afecções uterinas estão diretamente relacionadas com quadros de subfertilidade e infertilidade em rebanhos leiteiros. Como consequência direta, observa-se aumento dos custos com tratamentos, prolongamento do intervalo do parto a concepção, maior número de serviços por

concepção, e aumento do descarte involuntário de animais inférteis (Sheldon et al., 2008). Em análise de diversos estudos acerca dos impactos das infecções uterinas na fertilidade de vacas leiteiras, observa-se que vacas possuindo endometrite citológica, em comparação com vacas sadias, apresentaram em média, taxa de concepção 20% menor ao primeiro serviço, intervalo do parto à concepção 30 dias mais longo e aumento de 3% no número de animais abatidos por não conceberem (Borsbery e Dobson, 1989, Fourichon *et al.*, 2000; LeBlanc *et al.*, 2002). Segundo Kasimanickam *et al.* (2004) e Gilbert *et al.* (2005), a endometrite citológica resulta em queda de 30% na taxa de concepção ao primeiro serviço, redução de 20 a 26% do número de vacas gestantes aos 300 dias pós-parto, aumento de 30 a 88 dias no período de serviço, aumento médio de três serviços por concepção e aumento de 30% na taxa de descarte involuntário de animais. Além disso, a endometrite citológica é um dos principais fatores relacionados à ocorrência de quadros de vacas repetidoras de estro, outra afecção importante relacionada com a queda de fertilidade de vacas leiteiras (Salasel *et al.*, 2010). Da mesma forma, McDougall et al. (2001) observaram que vacas possuindo DVP apresentaram menores taxas de serviço e gestação, além de maior taxa de abate de animais não gestantes.

De acordo com Sheldon et al. (2009a), os custos com infecção uterina em relação a tratamento, descarte de leite, queda da produção e infertilidade chegam a 131,00 libras/vaca ou a 1,4 bilhões de euros anualmente na União Europeia. Nos Estados Unidos, os custos com infecções uterinas até 10 dias após o parto gira em torno de 358,00 dólares (Overton e Fetrow, 2008), atingindo valores anuais em torno de 650 milhões de dólares (Sheldon *et al.*, 2009a). No Brasil, Martins *et al.* (2013) encontraram custo equivalente a 598 litros de leite por vaca que apresentam infecção uterina durante 42 dias após o parto referentes a tratamento, descarte e queda da produção de leite.

3.3 – Imunidade inata uterina

O sistema imune inato possui papel extremamente importante na resistência do organismo animal às infecções uterinas, pois constitui a primeira linha de defesa do organismo contra agentes potencialmente patogênicos (Sheldon e Dobson, 2004; Herath et al., 2006b). Em relação ao trato genital da fêmea bovina, o sistema imune inato combate as infecções através de diversos mecanismos físicos, fisiológicos, celulares, moleculares e inflamatórios, que se sobrepõem na tentativa de evitar o estabelecimento de infecções no útero (Sheldon e Dobson, 2004).

O primeiro mecanismo de defesa do trato genital na vaca são barreiras físicas compostas por vulva, vestíbulo, vagina e cérvix. Antes do parto, as barreiras físicas encontram-se íntegras e fechadas. Com o advento do parto, tais barreiras são quebradas, perdendo sua integridade funcional e predispondo o útero à contaminação bacteriana, tornando a involução uterina um processo séptico (Sheldon e Dobson, 2004). O segundo mecanismo é composto por barreiras fisiológicas como contrações miométrias e muco produzido pelas glândulas endometriais durante o estro. O terceiro é constituído por leucócitos presentes no útero, que promovem a fagocitose e destruição de agentes estranhos ao organismo animal (Sheldon e Dobson, 2004; Azawi, 2008). O quarto e mais importante mecanismo de defesa do sistema imune inato uterino é composto por células constituintes do endométrio, sendo elas células epiteliais, estromais, endoteliais e células imunes como macrófagos, mastócitos e células dendríticas. Estas células são extremamente importantes para o reconhecimento dos microrganismos patogênicos invasores do útero e por guiar e regular o processo inflamatório endometrial, visando eliminar, de forma eficiente as bactérias colonizadoras, além de promover a reparação e a saúde do ambiente uterino (Sheldon e Dobson, 2004; Herath et al., 2009a). A resposta inflamatória endometrial constitui mecanismo de defesa não específico constituído por citocinas, quimiocinas, peptídeos vasoativos, peptídeos

antimicrobianos, proteínas de fase aguda e proteínas do sistema complemento (Quayle, 2002; Sheldon e Dobson, 2004; Herath et al., 2006ab, 2009a; Tizard, 2013).

3.3.1 – Reconhecimento de microrganismos

A colonização uterina é realizada por uma grande variedade de bactérias, capazes de sofrerem diversas mutações genéticas como método de evasão do sistema imune do hospedeiro, além de uma imensa heterogeneidade molecular entre elas (Medzhitov e Janeway, 1997). O organismo animal deve ser capaz de reconhecer essa imensa variedade de microrganismos e direcionar a melhor resposta para combater qualquer tipo de agente infeccioso. Apesar da heterogeneidade molecular e do elevado potencial mutagênico dos microrganismos, o reconhecimento desses é realizado através da identificação de estruturas extremamente conservadas ao longo do processo evolutivo de cada agente, denominados padrões moleculares associados à microrganismos (MAMP) (Medzhitov e Janeway, 1997; Ausubel, 2005). Tais componentes são utilizados pelo sistema imune do hospedeiro para distinguir o que é próprio ou não-próprio ao organismo em processos infecciosos. A maioria desses componentes são essenciais à sobrevivência dos microrganismos, compartilhados por classes inteiras, e não estão presentes em organismos multicelulares. Quando se tratam de agentes patogênicos, capazes de estimular resposta imune no hospedeiro, tais estruturas recebem a denominação de padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) (Medzhitov e Janeway, 1997, Janeway e Medzhitov, 2002; Takeuchi e Akira, 2010). São exemplos de PAMP o LPS, o peptidoglicano (PGN), flagelina, lipopeptídeos acetilados, ácidos lipoteicóicos (LTA), glicolipídeos, ácidos nucleicos bacterianos e virais, dentre outros (Janeway e Medzhitov, 2002; Ausubel et al., 2005; Akira et al., 2006; Horne et al., 2008; Turner et al., 2012).

O reconhecimento dos MAMP pelas células do sistema imune inato é realizado através receptores de reconhecimento padrão (PRR). Tais receptores são proteínas situadas na superfície da membrana celular, no interior da célula e de compartimentos celulares e secretadas na corrente circulatória ou meio extracelular. Os PRR são codificados por um número limitado de genes, porém são específicos para a detecção de microrganismos (Medzhitov e Janeway, 1997; Janeway e Medzhitov, 2002; Quayle, 2002; Akira et al., 2006). Dentre os PRR, os mais estudados são os receptores do tipo-Toll (*Toll-like receptors* – TLRs), receptores tipo-NOD (*Nucleotide-Binding Oligomerization Domain like receptors* – NLRs), receptores tipo-RIG-I (*Retinoic Acid-Inducible Gene 1 like receptors* – RLRs) e receptores lecitina tipo C (*C-type Lecitin receptors* – CLR) (Medzhitov e Janeway, 1997; Akira et al., 2006; Takeuchi e Akira, 2010; Turner et al., 2012). Os TLRs e os NLRs são os PRR de maior importância na ativação da resposta imune pelas células endometriais frente às infecções uterinas por bactérias (Herath et al., 2006a, 2009a; Sheldon et al., 2009a, 2014; Borges et al., 2012; Cronin et al., 2012; Turner et al., 2012; Bromfield et al., 2015).

Os PRR foram descritos pela primeira vez por Hashimoto et al. (1988) ao identificar, em moscas da espécie *Drosophila melanogaster*, o gene *Toll*. Esse gene está associado à produção de proteínas envolvidas na orientação do eixo dorsoventral durante a embriogênese inicial dessa espécie, e na resistência a infecções através da rápida produção de peptídeos antimicrobianos frente a estímulos microbiológicos (Hashimoto et al., 1988; Lemaitre et al., 1996; Muzio e Mantovani, 2000; Takeuchi e Akira, 2001). O receptor *Toll* é uma proteína transmembrânica que age como receptor, possui uma porção extracelular com sítios de repetição ricos em leucina e um domínio citoplasmático homólogo ao da família de receptores de interleucina 1 (IL-1R) de mamíferos, denominado TIR (Muzio e Mantovani, 2000; Takeuchi e Akira, 2001). Receptores

homólogos ao *Toll* foram descritos em humanos por Medzhitov et al. (1997) e em bovinos por Werling e Jungi (2003) e McGuire et al. (2005), sendo atualmente identificados como família de receptores tipo-*Toll*, ou simplesmente TLRs. Esses receptores são normalmente expressos por células de defesa como macrófagos, mastócitos, células dendríticas e células *natural killer*, e por células epiteliais de diferentes tecidos (Aderem e Ulevitch, 2000; Takeda e Akira, 2004).

3.3.2 – Receptores tipo-*Toll* (TLRs)

Em bovinos já foram identificados 10 receptores distintos pertencentes à família dos TLRs, isolados em diversos tecidos, estando eles listados na Tabela 1 (McGuire et al., 2005; Petzl et al., 2007; Davies et al., 2008; Martins et al., 2011). Cada um destes receptores reconhece PAMP específicos dos microrganismos e sua localização na célula depende da natureza do padrão molecular ao qual se ligam (Bromfield et al., 2015). Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 se localizam na superfície da membrana plasmática das células e são responsáveis por identificar componentes da parede celular das bactérias. Já os TLRs 3, 7, 8 e 9 se localizam no interior de endossomos e são responsáveis por identificar principalmente ácidos nucleicos bacterianos e virais (Takeuchi e Akira, 2010). Os TLRs podem atuar individualmente ou em conjunto, formando dímeros que ampliam a capacidade de reconhecimento dos diversos PAMP. Como exemplo podemos citar a interação TLR 1/2 e TLR 2/6 que reconhecem lipoproteínas triacetilada e diacetiladas, respectivamente, além de outros PAMP (Takeuchi e Akira, 2010).

Tabela 1. Receptores tipo-*Toll* (TLRs) identificados em bovinos, localização celular, principais padrões moleculares associados a micróbios (MAMP) e origem microbiana.

TLR	Localização	MAMP	Origem do ligante
TLR1	Membrana plasmática	Lipoproteína triacetilada	Bactéria
TLR2	Membrana plasmática	Lipoproteínas	Bactéria/Vírus/Parasita
TLR3	Endolisossomo	dsRNA	Vírus
TLR4	Membrana plasmática	LPS	Bactéria/Vírus
TLR5	Membrana plasmática	Flagelina	Bactéria
TLR6	Membrana plasmática	Lipoproteína diacetilada	Bactéria
TLR7	Endolisossomo	ssRNA	Vírus/Bactéria
TLR8	Endolisossomo	ssRNA	Vírus/Bactéria
TLR9	Endolisossomo	CpG DNA, dsDNA	Vírus/Bactéria/Protozoário
TLR10	Endolisossomo	Desconhecido	Desconhecido

dsRNA, *dual-strand* RNA; ssRNA, *single-strand* RNA; CpG DNA, DNA não-metilado contendo sítios de citosina-guanosina.

Diversos estudos demonstram que o tecido endometrial bovino é capaz de expressar os dez TLRs já identificados nessa espécie. Porém, a expressão de tais receptores irá depender do tipo celular, da região uterina e da condição reprodutiva em que a fêmea bovina se encontra. As células epiteliais expressam os TLRs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 9, enquanto as células estromais expressam os TLRs 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 e 10 (Davies et al., 2008). Antes e após o parto, o endométrio expressa os TLRs 2, 3, 4, 6 e 9 nas áreas carunculares e intercarunculares, sendo a expressão de tais receptores maior nas áreas carunculares de 4 a 6 horas pós-parto (Sheldon et al., 2009a). Vacas com puerpério normal não diferiram a expressão de TLRs 1/6, 2, 3, 4 e 5 em relação a vacas com puerpério patológico (Martins et al., 2011).

3.3.3 – TLR1/2, TLR2/6, TLR4 e vias de sinalização intracelular

Dentre os TLRs até hoje identificados em bovinos e em outros mamíferos, o TLR4 e os dímeros TLR1/2 e TLR2/6 são os mais estudados em quadros associados às infecções bacterianas do útero

(Herath et al., 2005, 2006a, 2009a; Cronin et al., 2012; Sheldon et al., 2014; Turner et al., 2014). O TLR4 é responsável pelo reconhecimento de LPS proveniente da parede celular de bactérias Gram-negativo. Entretanto, tal reconhecimento não é realizado de forma isolada. As células endometriais expressam em sua superfície um complexo molecular que envolve o TLR4 e outras duas proteínas co-receptoras, o complexo de diferenciação 14 (CD14) e o fator de diferenciação mielóide 2 (MD2) (Herath et al., 2009b). Antes de se ligar ao complexo TLR4-CD14-MD2, o LPS deve ser capturado por uma proteína ligadora de LPS (LBP) e, mediante a ligação dessa proteína ao complexo molecular, as células endometriais se tornam capazes de reconhecer o LPS (Aderem e Ulevitch, 2000; Herath et al., 2006a, 2009b; Sheldon et al., 2009a; Takeuchi e Akira, 2010; Turner et al., 2012; Bromfield et al., 2015).

A estimulação do TLR4 pelo LPS induz o domínio citoplasmático TIR do receptor a atrair e ativar a molécula adaptadora denominada fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) (Janeway e Medzhitov, 2002; Takeuchi e Akira, 2001, 2010; Akira, 2004; Cronin et al., 2012; Sheldon et al., 2014). Essa molécula possui dois domínios, um N-terminal que interage com o domínio TIR do TLR4 e outro domínio TIR C-terminal que interage com proteínas quinases associadas a receptores IL-1 (IRAKs), ativando-as (Muzio e Mantovani, 2000; Janeway e Medzhitov, 2002; Takeuchi e Akira, 2001, 2010). Essas por sua vez, promovem a fosforilação e ativação do fator 6 associado a receptores TNF (TRAF6), responsável por ativar um complexo molecular composto por proteína kinase 1 ativada por TGF β (TAK1) e proteínas ligadoras de TAK1 (TAB). Esse complexo molecular ativa outras duas vias de sinalização intracelulares importantes no processo inflamatório, a via das proteínas quinases associadas a mitógenos (MAP quinase ou MAPK) e a via do fator de transcrição nuclear gene aprimorador de lipopeptídeo leve κ em células B (NF κ B) (Muzio e Mantovani, 2000; Janeway e Medzhitov, 2002; Takeuchi e Akira, 2001, 2010; Sheldon et al., 2014). A cascata de sinalização das MAPK é composta por uma sequência de ativações de proteínas quinase, como MAPK 3/1 (ERK1/2), MEK, JNK e MPK14 (p38), que resultarão na ativação do fator de transcrição nuclear proteína ativadora 1 (AP1) (Akira et al., 2006; Cronin et al., 2012; Sheldon et al., 2014). A cascata de sinalização celular do NF κ B é composta pela liberação do NF κ B através da fosforilação da proteína inibidora de κ B (I κ B) pela I κ B proteína quinase (IKKs), regulada pela proteína quinase induzida por NF κ B (NIKs) e proteína quinase 1 ativada por TGF β (TAK1) (Muzio e Mantovani, 2000; Janeway e Medzhitov, 2002; Takeuchi e Akira, 2001, 2010). Os fatores de transcrição nuclear AP-1 e NF κ B se translocam para o interior do núcleo, onde se ligam respectivamente aos sítios AP-1 e κ B das regiões promotoras dos genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL1 β , IL6, quimiocinas como CXCL8 e CCL5, peptídeos antimicrobianos como mucina-1 (MUC1), peptídeo antimicrobiano lingual (LAP) e peptídeo antimicrobiano traqueal (TAP), além de enzimas como óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandina endoperóxido E sintase (PGES) (Janeway e Medzhitov, 2002; Davies et al., 2008; Herath et al., 2009a, Takeuchi e Akira, 2001, 2010; Sheldon et al., 2014).

Os TLRs 1, 2, 6 e seus dímeros TLR1/2 e TLR2/6 são responsáveis pelo reconhecimento de inúmeros PAMP. São por eles reconhecidos lipopeptídeos diacetilada e triacetilada, peptideoglicano de bactérias Gram-positivo, LPS de *Leptospira interrogans*, fator fenólico solúvel de *Staphylococcus epidermidis*, lipídio glicosilfosfatidilinosol de *Trypanosoma cruzi*, zimosano e componentes da parede celular de leveduras (Janeway e Medzhitov, 2002; Sheldon et al., 2014). Diferentemente do TLR4, os TLRs 1, 2, 6 e seus dímeros não necessitam de cofatores para realizar a identificação de tais PAMP. Porém, as vias de sinalização intracelular estimuladas por tais TLRs se assemelham às estimuladas pela ativação do TLR4, todas dependentes da molécula adaptadora MyD88 (Takeuchi e Akira, 2001, 2010).

3.3.4 – Receptores tipo-NOD (NLRs)

A família dos NLRs é composta por 23 receptores citosólicos, sendo os mais estudados os NOD1 e NOD2. Quando estimulados por PAMP, assim como os TLRs, os NLRs acionam vias de sinalização intracelulares que levam a produção de citocinas (Davies et al., 2011). Os NLRs são caracterizados por possuírem um domínio ligante de nucleotídeos rico em repetições de leucina e um domínio ligante a proteínas chamado de domínio efetor. Existem 4 tipos diferentes de domínios efetores para NLRs, dos quais o domínio de recrutamento e ativação de caspase (CARD) é considerado o mais importante. Por esta razão, tais receptores também são denominados de receptores tipo-CARD ou NLRCs (Philpott e Girardin, 2010; Davies et al., 2011; Turner et al., 2012).

Os receptores NOD1 (ou CARD4) e NOD2 (ou CARD15) reconhecem componentes da molécula de PGN. Especificamente, o NOD1 reconhece dipeptídeos D- γ -glutamil-DAP de bactérias Gram-negativo e algumas Gram-positivo, enquanto o NOD2 reconhece dipeptídeos muramil de todos os PGNs (Girardin et al., 2003b). Além disso, NOD2 é capaz de reconhecer ssRNA virais e dipeptídeos N-glicosilmuramil micobacterianos (Strober et al., 2006; Shaw et al., 2008). A estimulação NLRs, em especial NOD1 e NOD2, resulta na ativação de cascatas de sinalização que irão liberar o NF κ B para translocação intranuclear e transcrição de genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias e peptídeos antimicrobianos, além de ativar um complexo proteico ativador de caspase-1, denominado inflamossomo (Turner et al., 2012). A ativação da enzima caspase-1 por tal complexo é importante para transformação de precursores inativos, como pró-TNF α , pró-IL1 β e pró-IL6, em citocinas pró-inflamatórias ativas (Turner et al., 2012; Tizard, 2013).

3.3.5 – Mediadores pró-inflamatórios associados às infecções uterinas em bovinos

A contaminação bacteriana uterina, com consequente estabelecimento de infecção, resulta em ativação do sistema imune inato através da sinalização de PRRs presentes na superfície e interior das células endometriais por meio de PAMP (Janeway e Medzhitov, 1997, 2002; Takeuchi e Akira, 2001; Sheldon et al., 2009, 2014). Como consequência, as células endometriais respondem à infecção gerando um processo inflamatório endometrial (Turner et al., 2012; Sheldon et al., 2014). A inflamação endometrial é mediada por diversas moléculas pró-inflamatórias, como citocinas (TNF α , IL1, IL6), quimiocinas (CXCL8), peptídeos antimicrobianos (β -defensinas, MUC1, LAP, TAP), moléculas vasoativas (histamina, cinina, prostaglandinas, leucotrienos), proteínas de fase aguda e proteínas do complemento (Sheldon et al., 2001, 2009b, 2014; Herath et al., 2006ab, 2009ab; Davies et al., 2008; Borges et al., 2012; Cronin et al., 2012; Turner et al., 2012; Bromfield et al., 2015). Em resumo, as funções e objetivos do sistema imune inato com a produção de tais mediadores é conter e debelar a infecção, estimular a resposta imune adquirida e restaurar a funcionalidade e higidez do ambiente uterino (Herath et al., 2006a, 2009; Sheldon et al., 2014).

3.3.5.1 – Fator de necrose tumoral α (TNF α)

O TNF α é uma proteína produzida por diversas células do organismo, incluindo macrófagos, mastócitos, células dendríticas, células endoteliais, linfócitos T, linfócitos B e fibroblastos, em resposta à estimulação de PRRs, principalmente os TLRs. TNF α é responsável por estimular, de forma parácrina, a produção de citocinas e quimiocinas por células adjacentes e por promover atração, adesão, migração, e ativação de leucócitos. TNF α é um importante mediador inflamatório

pois, juntamente com a IL1, promove alterações em células endoteliais de pequenos vasos sanguíneos, resultando na formação de microtrombos e extravasamento de fluido pela parede capilar. Tais alterações resultam na formação dos sinais da inflamação caracterizados por edema, hiperemia, calor e dor. TNF α atua também sobre mastócitos, neutrófilos e macrófagos. Os neutrófilos são atraídos para locais de lesão tecidual, aumentando sua capacidade de adesão ao endotélio vascular e destruição de microrganismos. Os macrófagos são estimulados a aumentar a própria síntese de TNF α , juntamente com IL1, além de prolongar o processo inflamatório através da produção de imunomediadores como as NADPH oxidase 2 (NOX2) e COX-2 (Tizard, 2013).

Diversos estudos mais antigos associam a expressão de RNA mensageiro (RNAm) e secreção de TNF α pelo endométrio bovino em processos infecciosos do útero no pós-parto (Baumann e Glaudie, 1994; Skarzynski et al., 2000; Herath et al., 2006a). Entretanto, estudos recentes demonstram que, apesar da expressão de RNAm para TNF α após estimulação por LPS, o endométrio bovino, principalmente as células epiteliais e estromais, não produz concentrações detectáveis de TNF α tanto em sobrenadantes de cultivo celular (Herath et al., 2006a; Chapwanya et al., 2009, 2012; Sheldon e Roberts, 2010), quanto na corrente circulatória de animais com infecção uterina (Williams et al., 2007).

3.3.5.2 – Interleucina 1 β e Interleucina 6

A estimulação de PRR em macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células epiteliais e endoteliais por PAMP resulta na produção de uma proteína precursora que, quando clivada pela enzima caspase-1 ativada, dá origem a forma ativa da IL1 β . A transcrição de RNA mensageiro para a produção da pró-IL1 β ocorre dentro de 15 minutos após a estimulação dos PRR e o pico de transcrição ocorre de três a quatro horas depois da estimulação (Tizard, 2013). Assim como o TNF α , a IL1 β atua sobre células adjacentes iniciando e amplificando o processo inflamatório, sobre células endoteliais tornando-as mais aderentes aos neutrófilos e induzindo a produção de enzimas iNOS e COX-2 por macrófagos. Atua também sobre os hepatócitos induzindo a produção de proteínas de fase aguda, que ajudarão na defesa do organismo contra infecções (Dinarello, 1994, 1998). Em quadros mais severos de infecção, IL1 β em associação com TNF α são liberados na corrente sanguínea e atuam sobre o sistema nervoso central promovendo sintomatologia clínica de febre como hipertermia, mal-estar, letargia, inapetência, dor muscular e fadiga. A IL1 β também atua sobre a medula óssea, estimulando a síntese de neutrófilos e plaquetas, e sobre as células endometriais, modulando a produção de prostaglandinas, citocinas (IL6) e quimiocinas (CXCL8) (Sica et al., 1990; Dinarello et al., 1998; Leung et al., 2001; Tizard, 2013).

IL6 é uma glicoproteína secretada por macrófagos, mastócitos, linfócitos T, células endoteliais e fibroblastos, após estimulação por PAMP, TNF α e IL1 β . Sua produção está associada a quadros de lesão tecidual e a infecções mais severas. Elevadas concentrações de IL6 no plasma estimula a produção de neutrófilos pela medula óssea, atração e ativação de neutrófilos e monócitos da corrente sanguínea, e a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado, como haptoglobina, α 1 glicoproteína ácida, ceruloplasmina e amiloide sérica A. Tais proteínas auxiliam na reparação tecidual após lesão ou infecção (Baumann e Gauldie, 1994; Davies et al., 2008; Turner et al., 2014). A IL6 apresenta papel anti-inflamatório através da inibição da produção de TNF α e IL1 β , além de induzir a produção de moléculas anti-inflamatórias como a interleucina 10 e o antagonista de receptores de IL1. Além de sua ação na imunidade inata e processo inflamatório, a IL6 atua na transição da imunidade inata para a adquirida, alterando um processo mediado por neutrófilos para um processo mediado por macrófagos, linfócitos T e B, e secreção de anticorpos por plasmócitos (Romano et al., 1997; Schaefer et al., 2004).

A expressão de RNAm e produção de IL1 β e IL6 por células endometriais bovinas já foram demonstradas em diversos estudos envolvendo vacas acometidas por infecção uterina, ou pela estimulação *in vitro* de tais células por PAMP. Tais estudos mostraram que células epiteliais e estromais do endométrio estimuladas por PAMP, assim como biópsias endometriais de vacas com infecção uterina, expressaram mais transcritos de IL1 β e IL6 e acumularam maiores concentrações dessas citocinas em sobrenadantes de cultivo celular (Herath et al., 2009b; Fischer et al., 2010; Gabler et al., 2010; Borges et al., 2012; Swangchan-Uthai et al. 2012; Amos et al., 2014).

Herath et al. (2009), avaliando a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória de animais saudáveis e inférteis acometidos por endometrite persistente (citológica), observaram maior expressão de RNAm para IL1 α , IL1 β e IL6 em vacas inférteis dentro de sete dias pós-parto. Gabler et al. (2010) observaram que a expressão de transcritos para IL1 β e IL6, como também para outros mediadores, foi máxima aos 17 dias pós-parto, mostrando que a transcrição de tais mediadores altera com o período pós-parto. Fischer et al. (2010), avaliando o perfil de expressão de mediadores inflamatórios pelo endométrio de vacas apresentando DVP ou endometrite citológica em comparação com vacas saudáveis, observaram maior expressão de RNAm para IL1 β em vacas com endométrio inflamado, porém não observaram alterações na expressão para IL6. Swangchan-Uthai et al. (2012) avaliaram o perfil de expressão gênica das células endometriais *in vitro* após estimulação por LPS e observaram pico de expressão de RNAm para IL1 β em seis horas, com declínio até 12 horas após a estimulação.

Avaliando a produção e secreção das citocinas, Borges et al. (2012) observaram que explantes endometriais de novilhas taurinas acumularam maiores concentrações de IL6 poucas horas após o estímulo por PAMP, demonstrando a importância dessa interleucina em processos agudos de infecção. Os mesmos autores observaram também que a produção de IL1 β e IL6 podem estar aumentados em processos inflamatórios estéreis do útero, já que explantes endometriais mecanicamente fragmentados acumularam mais citocinas que os explantes não fragmentados. Esse resultado mostra a importância de injúrias teciduais no desencadear de respostas inflamatórias endometriais. Lesões teciduais liberam no meio extracelular componentes celulares conhecidos como padrões moleculares associados a dano tecidual (DAMP), capazes de ativar TLRs e induzir resposta inflamatória (Chen e Nunez, 2010). Saut et al. (2014) avaliaram a influência do ciclo estral sobre a produção de citocinas por explantes endometriais de fêmeas com aptidão para produção de carne, estimulados por LPS. Os autores observaram respostas inflamatórias com expressão de RNAm e produção de IL1 β , IL6 e CXCL8 em resposta aos estímulos por *E. coli* e LPS, porém não foram influenciados pela fase do ciclo estral no qual os explantes foram coletados.

3.3.5.3 – Quimiocina CXCL8

A quimiocina CXCL8 é produzida por monócitos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, e sua principal função é atrair neutrófilos da corrente circulatória para os sítios de infecção e promover sua ativação (Schaefer et al., 2004; Turner et al., 2014). Neutrófilos ativados pela CXCL8 aumentam sua capacidade de adesão ao endotélio vascular, liberam o conteúdo dos grânulos citoplasmáticos e aumentam a explosão oxidativa, elevando assim o seu potencial de destruição de microrganismos.

Assim como a IL1 β e IL6, o aumento da expressão de transcritos e síntese de CXCL8 por células endometriais já foram demonstrados em diversos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Chapwanya et al. (2009) e Ficher et al. (2010) observaram aumento na expressão de RNAm para CXCL8 no endométrio de vacas no período pós-parto recente e em vacas apresentando endometrite citológica, respectivamente. Gabler et al. (2010) observaram maior expressão de RNAm para CXCL8 em fêmeas primíparas aos 17 dias pós-parto, decaindo a expressão de transcritos até o 31º dia pós-parto. Em estudo *in vitro* com estimulação de explantes endometriais bovinos com bactérias inativadas e diferentes PAMP, Borges et al. (2012) observaram maior produção de CXCL8 em resposta ao estímulo bacteriano por *E. coli* e *T. pyogenes* durante 48 horas de cultivo, maior produção em função da concentração de PAM3 entre 24 e 48 horas e à maior concentração de flagelina durante 48 horas de cultivo. Em resposta ao LPS, houve maior acúmulo de CXCL8 em 24 horas de cultivo, porém sem diferenças na dinâmica de produção entre os grupos tratado e controle. No mesmo trabalho, os autores não observaram diferenças na produção de CXCL8 entre diferentes fases do ciclo estral, porém todas as fases apresentaram maior produção da citocina em resposta ao LPS. Saut et al. (2014) observaram que explantes endometriais de diferentes fases do ciclo estral apresentaram resposta inflamatória com expressão de RNAm e produção de CXCL8 em resposta ao LPS, porém tal resposta não foi influenciada pela fase do ciclo estral.

3.3.5.4 – Prostaglandinas

As prostaglandinas são lipídeos vasoativos provenientes da transformação de fosfolipídios da membrana celular em ácido araquidônico (AA) por fosfolipases, e posterior cicloxigenação em prostaglandina H₂ (PGH₂) pela enzima prostaglandina endoperóxido H sintase (PGHS ou COX-2). A PGH₂ é então convertida em prostaglandinas E₂ (PGE₂) e prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}) pelas enzimas PGES e prostaglandina endoperóxido F sintase (PGFS), respectivamente (Herath et al., 2009a). Além de atuar sobre a musculatura lisa de artérias, provocando constrição de vasos sanguíneos, a PGF_{2 α} promove luteólise, contrações miométriais e estimula a produção de citocinas que ativam a produção de leucotrieno B₄ (LB₄). O LB₄ é um lipídeo vasoativo que possui função quimiotática, atraindo neutrófilos e estimulando a fagocitose (Petroff et al., 2001; Sheldon et al., 2002; Lewis et al., 2003; Williams et al., 2007). A PGE₂ possui ação luteotrófica e importante ação imunomoduladora, pois atua reduzindo a capacidade fagocítica dos neutrófilos (Lewis, 2003; Borges et al., 2012; Turner et al., 2012; Sheldon et al., 2014).

A concentração de PGF_{2 α} se encontra elevada durante os sete primeiros dias pós-parto e decresce até o 15º dia, associado à elevação plasmática de progesterona. (Kozicki, 1998). Vacas que apresentam afecções puerperais no pós-parto possuem maiores concentrações séricas de metabólito da PGF_{2 α} , indicando sua maior produção pelo endométrio (Kask et al., 2003). Entretanto, a partir de estudos *in vivo* e *in vitro*, Herath et al. (2006a, 2009ab) observaram que animais que apresentam infecções uterinas pós-parto por *E. coli* possuem maiores concentrações de PGE₂ na corrente circulatória e que as células epiteliais respondem ao estímulo por LPS com maior produção de PGE₂ em relação a PGF_{2 α} . Somado a isso, os autores observaram maior concentração de enzimas fosfolipases em células epiteliais tratadas com LPS, não observando maiores concentrações de enzimas PGES e PGFS. Em estudo avaliando a expressão de RNAm de mediadores pró-inflamatórios pelo endométrio de primíparas bovinas em função do período pós-parto, Gabler et al. (2010) observaram aumento da expressão de transcritos para COX-2, com pico máximo de expressão aos 17 dias pós-parto.

3.3.5.5 – Peptídeos antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas que possuem em sua estrutura múltiplos resíduos de arginina e lisina, tornando-os em moléculas catiônicas de estrutura anfipática. A região hidrofóbica de sua molécula é capaz de se inserir na estrutura lipídica da membrana plasmática enquanto a região hidrofílica é capaz de formar poros do tipo canal ou simplesmente cobrir a membrana plasmática bacteriana. O resultado da ação dos peptídeos antimicrobianos é a morte bacteriana devido à ruptura da membrana celular (Tizard, 2013).

As células do organismo do hospedeiro não são destruídas pelos peptídeos antimicrobianos, pois estes interagem diretamente com fosfolipídeos microbianos, lipopolissacarídeo, ácidos teicóicos, entre outros MAMP. São normalmente sintetizados e secretados por células epiteliais de sistemas que possuem contato com o meio externo ao organismo, como pele, trato respiratório, digestivo e gênito-urinário, por células imunes presentes em órgãos linfóides secundários, e no interior de lisossomos dos neutrófilos e macrófagos (Tizard, 2013).

Dentre os peptídeos antimicrobianos produzidos pelo epitélio do trato reprodutivo da fêmea bovina, destacam-se as β -defensinas bovinas (BBD19, BBD123 e BBD124), β -defensinas neutrofílica bovinas (BNBD4 e BNBD5), LAP, TAP e MUC1. A estimulação de células epiteliais do endométrio bovino por PAMP, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, acionam a resposta imune inata com aumento da expressão de RNAm e produção de tais peptídeos antimicrobianos (Davies et al., 2008; Swangchan-Uthai et al., 2012).

3.4 – Modulação da resposta imune inata pelos hormônios esteroides sexuais

O endométrio é considerado um tecido único dentro do organismo animal, pois desempenha funções tanto na fisiologia reprodutiva quanto na resposta imune uterina. A capacidade de resposta a mediadores inflamatórios e aos hormônios esteroides conferem ao endométrio a característica de reconhecer e combater microrganismos patogênicos, além de identificar componentes alogênicos, como espermatozoides e embriões, sem promover sua destruição (Wira et al., 2010). Diante disso, acredita-se que os hormônios esteroides desempenham importante papel na imunomodulação do ambiente uterino (Lewis et al., 2003; Herath et al., 2006b; Sheldon et al., 2009b; Turner et al., 2012).

Diversos estudos foram realizados mostrando que os hormônios esteroides influenciam na resposta uterina às infecções. A indução de infecções uterinas através da infusão intrauterina de bactérias patogênicas foi limitada durante o estro ou após a aplicação exógena de estradiol (Seals et al., 2003). Entretanto, a infusão de patógenos durante a fase luteal ou após administração exógena de progesterona aumentou a predisposição uterina ao estabelecimento de infecções (Rowson et al., 1953; Lewis et al., 2003). A maior propensão às infecções durante a fase luteal provavelmente se deve ao efeito imunossupressor da progesterona sobre as células do sistema imune. A progesterona reduz a capacidade fagocítica dos neutrófilos e a proliferação de linfócitos (Herath et al., 2006a). Além disso, a progesterona reduz a síntese de eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos) envolvidos no processo inflamatório (Lewies et al., 2003). Um dos tratamentos mais efetivos contra infecções uterinas durante o diestro é a aplicação exógena de $\text{PGF}_{2\alpha}$, induzindo a luteólise e transição do trato genital para a fase estrogênica (LeBlanc et al., 2002).

Avaliando a possível regulação da resposta imune inata por hormônios esteroides em células epiteliais e estromais do endométrio bovino, estimuladas por *E. coli* inativada ou LPS purificado, Herath et al., (2006a) observaram redução acentuada da produção de prostaglandinas pelas células endometriais na presença de progesterona, quando comparada à produção total na presença de estrógeno. Challis et al. (2009), estudando a relação entre gestação e resposta inflamatória em diversas espécies, demonstraram o aumento da secreção de mediadores inflamatórios como IL1 β , IL6, TNF α , CXCL8 e aumento do influxo de leucócitos para o útero com a queda da progesterona. Fischer et al. (2010) observaram maior expressão de RNAm para IL1 β e CXCL8 em células endometriais bovinas no estro, quando comparada à fase luteal.

Em estudo *in vitro* avaliando o epitélio endometrial e do trato genital inferior em mulheres e ratas, Wira et al. (2010) observaram que o estradiol reduz a resistência da barreira transepitelial, permitindo maior aporte de moléculas antimicrobianas, fluidos, imunoglobulinas e células de defesa para o lúmen uterino além de reduzir a secreção de citocinas. Entretanto, o enfraquecimento das junções celulares pode facilitar a penetração de patógenos no organismo, predispondo às infecções e quadros de infertilidade.

Os hormônios esteroides, em especial os glicocorticoides, são capazes de regular o sistema imune inato principalmente através da via de sinalização de TLRs, MAPK e NF κ B (Ogawa et al., 2005; Herath et al., 2006a; King et al., 2010). Logo, acredita-se que os hormônios esteroides ovarianos sejam capazes de regular a imunidade inata e a inflamação uterina, uma vez que os mesmos são responsáveis controlar a fisiologia endometrial, a secreção de peptídeos antimicrobianos e as células imunes que se encontram nesse tecido (Turner et al., 2014). Entretanto, Turner et al. (2014) observaram pequena influência dos hormônios esteroides sobre a produção de citocinas pelas células endometriais estimuladas por lipopeptídeos. Porém, os mesmos autores observaram menor acúmulo de IL-6 em sobrenadantes de cultivo de células epiteliais estimuladas por lipopeptídeos, quando estas foram previamente sensibilizadas com dexametasona. Resultado semelhante foi observado por Saut et al. (2014), onde explantes endometriais bovinos, de diferentes fases do ciclo estral responderam com expressão de RNAm e produção de IL1 β , IL6 e CXCL8 em resposta ao LPS, porém não houve diferença na resposta inflamatória entre as fases do ciclo estral. Além disso, células epiteliais e estromais de endométrio bovino pré-estimuladas com estrógeno ou progesterona, apresentaram maior expressão de transcritos e maior produção de citocinas em resposta ao LPS ou *E. coli*, porém sem diferença entre os grupos pré-sensibilizados. Entretanto, células tratadas previamente com dexametasona apresentaram menor expressão e produção de citocinas quando desafiadas por *E. coli*.

3.5 – Efeito das infecções uterinas sobre a fisiologia reprodutiva

As infecções uterinas, além de lesarem o epitélio endometrial e alterarem o ambiente uterino, promovem alterações na fisiologia reprodutiva das fêmeas bovinas, principalmente infecções por bactérias Gram-negativo como a *E.coli* (Sheldon e Dobson, 2004, 2008). Após a morte de bactérias Gram-negativo, o LPS é carregado para o interior da corrente circulatória, atingindo diversas áreas do organismo animal, provocando alterações como: aumento da expressão e síntese de TLR4 no hipotálamo anterior, na área pré-óptica, nos núcleos arcuado, ventromedial e na eminência média; aumento da expressão e produção de IL1 β pelo plexo coroide no sistema ventricular, suprimindo a expressão de RNAm para receptores de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e subunidade β do hormônio luteinizante (LH) na adenohipófise (Herman et al., 2012, 2013); reduz a ativação de neurônios produtores GnRH por dinorfinas e kisspeptina no núcleo arcuado e aumenta a inibição dos neurônios produtores de GnRH através da

somatostatina no núcleo ventromedial (Fergani et al., 2013); aumento da expressão de RNAm para o fator liberador de corticotrofinas, que possivelmente atua diretamente sobre os receptores celulares de GnRH ou regulando a produção de kisspeptina, neuroquinina B e dinorfinas por neurônios no núcleo arcuado e na eminência média, inibindo a secreção de GnRH no sistema porta hipotalâmico-hipofisário (Fergani et al., 2013); e supressão da frequência e amplitude dos pulsos de secreção de GnRH pelos neurônios hipotalâmicos e de LH pelos neurônios da adenohipófise (Sheldon et al., 2014). Dessa forma, o LPS e citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo endométrio inflamado e pelo plexo coroide (TNF α e IL1 β), inibem a secreção de GnRH e LH e reduzem a sensibilidade da adenohipófise ao hormônio GnRH (Sheldon et al., 2014). Entretanto, a secreção de hormônio folículo estimulante (FSH) não é alterada pelo LPS. Dessa maneira a concentração periférica de FSH e o recrutamento de ondas foliculares não diferem entre vacas com infecção uterina e vacas saudáveis (Sheldon et al., 2002).

Em experimentos *in vitro*, múltiplas infecções bacterianas com liberação de LPS parecem induzir, nos ovários, maior ativação de folículos primordiais estimulando-os ao desenvolvimento em folículos primários, reduzindo assim as reservas oocitárias ovarianas. Tal ativação é consequência da redução dos fatores inibidores de meiose oocitária PTEN e FOXO3a, permitindo que o oócito saia do estado quiescente em dictióteno e continue o processo de meiose (Bromfield e Sheldon et al., 2013). Em folículos terciários, as células da granulosa expressam TLRs que, quando estimulados por PAMP, principalmente ligantes de TLR2 e TLR4, aumentam a expressão de RNAm para TNF α , IL1 β , IL6 e CXCL8 (Bromfield e Sheldon, 2011; Price e Sheldon, 2013; Price et al., 2013). Os folículos pré-antrais parecem não ser afetados pelos efeitos do LPS, já que nestes a esteroidogênese e o desenvolvimento oocitário e folicular não são afetados (Bromfield e Sheldon, 2013). Muitos eventos fisiológicos ovarianos são influenciados por mediadores inflamatórios, e o consequente aumento desses mediadores em resposta às infecções uterinas, parecem influenciar na biologia reprodutiva dos animais acometidos. Como consequência de elevadas concentrações de LPS, ocorrem falhas no processo de expansão do complexo cumulus-oócito e redução da competência meiótica oocitária, resultando em oócitos de pior qualidade (Bromfield e Sheldon, 2011, 2013; Sheldon et al., 2014). Dessa forma, a ação do LPS sobre o desenvolvimento folicular parece impactar sobre a fertilidade a curto e longo prazo. A ativação antecipada de folículos primordiais diminui a fertilidade a longo prazo, enquanto a baixa qualidade dos oócitos a diminui a curto prazo (Bromfield et al., 2015).

A estimulação por PAMP não exerce nenhum efeito sobre as células da teca ou sobre a produção de androstenediona, porém, reduz a transcrição de RNAm e a produção da enzima aromatase nas células da granulosa, alterando o processo de esteroidogênese folicular em folículos terciários (Herath et al., 2007; Price et al., 2013). Com isso, o efeito *feedback* positivo à liberação de LH para crescimento folicular e a elevação da concentração sérica de estradiol, necessária para indução do pico pré-ovulatório de LH, não ocorrem em vacas acometidas por infecções uterinas. Isso contribui para a existência de folículos menores, com crescimento retardado, folículos anovulatórios, doenças ovarianas císticas e anestro (Opsomer et al., 2000; Sheldon et al., 2002, 2008, 2009a; Herath et al., 2007).

O processo inflamatório uterino após o parto, com produção endometrial de prostaglandinas, é de extrema importância para a involução uterina normal (Kindahl et al., 1999). A PGF $_{2\alpha}$ estimula a contratilidade do miométrio para a expulsão das membranas fetais, lóquios e carúnculas degradadas, enquanto a PGE $_2$ é responsável pela modulação da resposta inflamatória endometrial (Kindahl et al., 1999; Sheldon et al., 2009a). Em quadros de infecção, o LPS induz reação inflamatória, além do processo normal de involução uterina, estimulando maior produção por

parte do epitélio endometrial de PGE₂, em detrimento de PGF_{2α}. Com maior produção de PGE₂ e predomínio de sua função sobre a PGF_{2α}, vacas que retomam a atividade ovariana precocemente após o parto, retardam o processo de luteólise. Além disso, a baixa concentração PGF_{2α}, junto com TNFα produzida pelo endométrio, atua sobre as células luteais em mecanismo similar à luteólise, reduzindo a produção de progesterona pelo corpo lúteo. Dessa maneira, o corpo lúteo persiste por um tempo maior que o característico da espécie bovina, produzindo concentrações subluteais de progesterona (Petroff et al., 2001; Sheldon et al., 2002, 2009; Williams et al., 2007). Assim, vacas com infecção uterina e que retomam a atividade ovariana precocemente, podem agravar ainda mais o quadro infeccioso no pós-parto. A supressão da produção de PGF_{2α} e leucotrienos pela progesterona e a redução da capacidade fagocítica dos neutrófilos uterinos pelo mesmo hormônio e PGE₂, tornam o animal mais susceptível às infecções uterinas no pós-parto (Lewis, 2003; Borges et al., 2012; Turner et al., 2012; Sheldon et al., 2014).

3.6 – Estudos *in vitro* com explantes endometriais inteiros

A maioria dos estudos acerca de infecções uterinas em bovinos realizados nos últimos anos, basearam-se na observação clínica de casos espontâneos das afecções no período pós-parto. Entretanto, a dificuldade em se padronizar metodologicamente os estudos e a grande variedade de definições acerca das infecções uterinas, estimularam o desenvolvimento de diversos estudos *in vitro* na tentativa de elucidar os mecanismos patofisiológicos de tais doenças e a resposta imune uterina (Herath et al., 2006a, 2009a; Davies et al., 2008; Sheldon et al., 2010; Sheldon e Roberts, 2010; Borges et al., 2012; Cronin et al., 2012; Swangchan-Uthai et al., 2012; Turner et al., 2014). Para avaliar os mecanismos envolvidos na patogenia das infecções e da resposta imune uterina, grande parte desses estudos utilizaram abordagens reducionistas, baseadas em cultivo de explantes e de células endometriais purificadas (Herath et al., 2006a, 2009ab; Davies et al., 2008; Sheldon et al., 2010; Cronin et al., 2012; Swangchan-Uthai et al., 2012; Turner et al., 2014).

As células epiteliais ou estromais purificadas são obtidas por meio da destruição da arquitetura endometrial, com digestão e perda dos componentes da matriz extracelular, importantes para a diferenciação e desempenho das funções de tais células. A destruição da arquitetura normalmente se faz necessária para aumentar a perfusão de nutrientes e oxigênio do meio de cultura por entre as células, aumentando sua viabilidade de cultivo, já que o estabelecimento desse tipo de cultura é demorado (Borges et al., 2012). Entretanto, a destruição do arranjo tecidual, juntamente com danos celulares, resultam na liberação de DAMP que estimulam a resposta imune inata nas células adjacentes, desencadeando o processo de inflamação estéril (Chen e Nunez, 2010). Essa liberação de DAMP pode interferir na execução de estudos relacionados à ativação por PAMP da resposta imune inata em células endometriais, uma vez que ambos os padrões estimulam os mesmos PRRs celulares, mesclando ou sobrepondo seus efeitos sobre a resposta imune (Borges et al., 2012).

O endométrio é composto por diversos tipos celulares e regulado pela ação de hormônios sexuais, fatores de crescimento e citocinas, que atuam de forma endócrina, parácrina e autócrina sobre as células. Para que essas substâncias exerçam o efeito esperado sobre as funções reprodutivas e imunológicas do endométrio, é fundamental que as junções e interações intercelulares estejam preservadas, assim como a arquitetura tecidual como um todo (Lewis et al., 2003; Schafer et al., 2011). Na tentativa de contornar os problemas relacionados à obtenção e uso de células endometriais purificadas para cultivo celular primário, culturas de explantes endometriais foram desenvolvidas em diversas espécies, inclusive em bovinos (Trowell, 1959; Siegmund et al., 2001; Herath et al., 2006a, 2009a; Borges et al., 2012).

Nesse âmbito de pesquisa, Borges et al. (2012) estabeleceram um modelo de cultivo de explante endometrial não fragmentado para avaliação da imunidade inata em endométrio de novilhas taurinas. Em tal estudo, os autores observaram que explantes endometriais não fragmentados foram capazes de responder à estimulação por diversos PAMP. Além disso, tais explantes acumularam menores concentrações basais de citocinas pró-inflamatórias quando comparados ao explantes endometriais mecanicamente fragmentados. Isso demonstra que a ocorrência de inflamação estéril por DAMP em cultivo de explantes endometriais não fragmentados é menos evidente do que em cultivo de explantes mecanicamente fragmentados. Dessa forma, estudos *in vitro* com explantes endometriais não fragmentados são mais representativos dos mecanismos patofisiológicos da resposta inflamatória uterina em quadros de infecção bacteriana, permitindo melhores associações com estudos observacionais acerca de infecções uterinas em bovinos (Borges et al., 2012).

3.7 – Fêmeas zebuínas e estudos sobre imunidade inata uterina e fertilidade

Animais zebuínos são reconhecidos por serem mais resistentes a diversos desafios quando comparados aos animais taurinos. Acredita-se que tal resistência seja consequência das variações genéticas, morfológicas e fisiológicas resultantes da adaptação desses animais em diferentes ambientes, ao longo do processo evolutivo da subespécie (Abeygunawardena e Dematawewa, 2004). Animais zebuínos são considerados animais mais rústicos, que apresentam maior adaptabilidade aos climas tropical e subtropical, aos diversos sistemas de produção, resistem a períodos prolongados de seca e escassez de pastagens, maior resistência às parasitoses e algumas doenças infecciosas. Entretanto, tais animais sofreram menor pressão de seleção para características produtivas e reprodutivas em relação ao gado taurino, possuindo menor potencial genético para tais características (Euclides Filho, 2009; Alencar e Barbosa, 2009). O gado taurino, apesar do maior potencial genético para a produção e reprodução, é menos resistente aos desafios ambientais e às condições dos sistemas de criação nas regiões tropicais e subtropicais (Abeygunawardena e Dematawewa, 2004; Alencar e Barbosa, 2009). Tais sistemas costumam ser menos tecnificados e, muitas vezes, apresentando falhas no manejo nutricional, sanitário e reprodutivo (Facó et al., 2002; Ruas et al., 2014).

Com o objetivo de associar as características positivas de ambas as subespécies, gerando um produto de maior potencial genético para produção, reprodução e resistência aos desafios ambientais, cruzamentos entre taurinos e zebuínos são realizados, obtendo-se animais mestiços HZ, com diferentes graus de sangue. Animais mestiços F1 HZ são considerados geneticamente superiores em relação aos seus progenitores, pois desfrutam do efeito aditivo direto das características de ambas as subespécies, a chamada heterose. À medida que o grau de sangue predominante no cruzamento se aproxima ao de uma das subespécies, esses animais apresentam as características positivas e negativas de tal subespécie (Abeygunawardena e Dematawewa, 2004; Alencar e Barbosa, 2009).

As fêmeas azebuadas, cujo grau de sangue predominante no cruzamento provém da subespécie zebuína, possuem menor potencial genético para a produção de leite quando comparadas às fêmeas taurinas ou mestiças F1 HZ. Porém, o potencial genético para a produção de leite das atuais fêmeas azebuadas, são compatíveis com a maioria dos sistemas produtivos brasileiros, constituindo parcela importante no rebanho nacional de vacas leiteiras. Além disso, são animais mais resistentes aos desafios ambientais e às doenças, incluindo as afecções puerperais como retenção de placenta e infecções uterinas (González-Sánchez et al., 1999; Camargos et al., 2013). Fêmeas mestiças HZ apresentam menores incidências de infecções uterinas quando comparadas

às fêmeas taurinas. Durante o acompanhamento do período puerperal, González-Sanchez et al. (1999) e Camargos et al. (2013) observaram incidências em torno de 6,3% e 3,95% de infecções uterinas em vacas zebuínas e mestiças HZ, respectivamente. LeBlanc et al. (2002) e Williams et al. (2005) encontraram incidências de DVP variando em torno de 16,9 a 31,0% no acompanhamento do período puerperal de vacas holandesas, entre 20 e 33 dias pós-parto.

Poucos trabalhos na literatura buscaram esclarecer os mecanismos envolvidos na patogênese das infecções bacterianas do útero, principalmente em fêmeas zebuínas. Além da interação precoce entre patógenos e o tecido endometrial, variações genéticas podem explicar diferenças nas respostas individuais do hospedeiro frente aos microrganismos associados às infecções uterinas (Horne et al., 2008; Sordillo et al., 2009; Pinedo et al., 2013, Martins, 2014). Diante disso, estudos sobre os mecanismos da imunidade inata, incluindo os mecanismos de atuação dos TLR, são importantes para compreender o envolvimento de bases genéticas na resposta do hospedeiro frente ao processo infeccioso, principalmente em vacas zebuínas reconhecidamente mais resistentes às infecções uterinas.

Em quadros de subfertilidade ou infertilidade associados às infecções uterinas, na maioria das vezes, o processo infeccioso encontra-se resolvido, não se detectando mais agentes patogênicos no útero. Entretanto, o processo inflamatório endometrial persiste, tornando-se um processo crônico (Sheldon et al., 2009a). Isso indica que a resposta imunológica desempenha papel mais importante na persistência de inflamação crônica do endométrio, do que a própria infecção bacteriana (LeBlanc et al., 2011). Acredita-se que desequilíbrios nos mecanismos que ajustam a resposta inflamatória endometrial, tornando-a insuficiente ou exacerbada, alteram a fisiologia reprodutiva das fêmeas bovinas, reduzindo a qualidade oocitária e do ambiente uterino, prejudicando, assim, o estabelecimento de nova gestação (Pothmann et al., 2015). Com isso, a compreensão dos mecanismos moleculares que interligam a inflamação, a resposta imune inata e a fisiologia reprodutiva podem fornecer subsídios para futuras intervenções e manipulações dos processos inflamatórios uterinos, visando melhorar a fertilidade das fêmeas bovinas (Fischer et al., 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto e procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, CEUA-UFMG.

Para a realização do experimento, foram coletados tratos genitais de novilhas azebuadas, pós-púberes, não gestantes, abatidas em frigorífico. Os tratos genitais eram recolhidos das carcaças por meio de secção transversal na porção cranial da vagina (Figura 1a), acondicionados individualmente em sacos plásticos e transportados em caixa térmica contendo gelo, para processamento em até duas horas após coleta, no Laboratório de Células Embrionárias e Animais Transgênicos da EV-UFMG.

No laboratório, os tratos genitais foram avaliados macroscopicamente em relação à ausência de doença genital inflamatória. Tratos genitais apresentando hiperemia, edema, hemorragias, hematomas, fibrose ou coleção de pus em sua serosa, parede ou lúmen do órgão, foram descartados (Figura 1b). Úteros de novilhas em anestro, cujos ovários não apresentassem estruturas luteais, ou apresentando conteúdo e estruturas compatíveis com gestação em estágio inicial também foram descartados (Figura 1c, d).

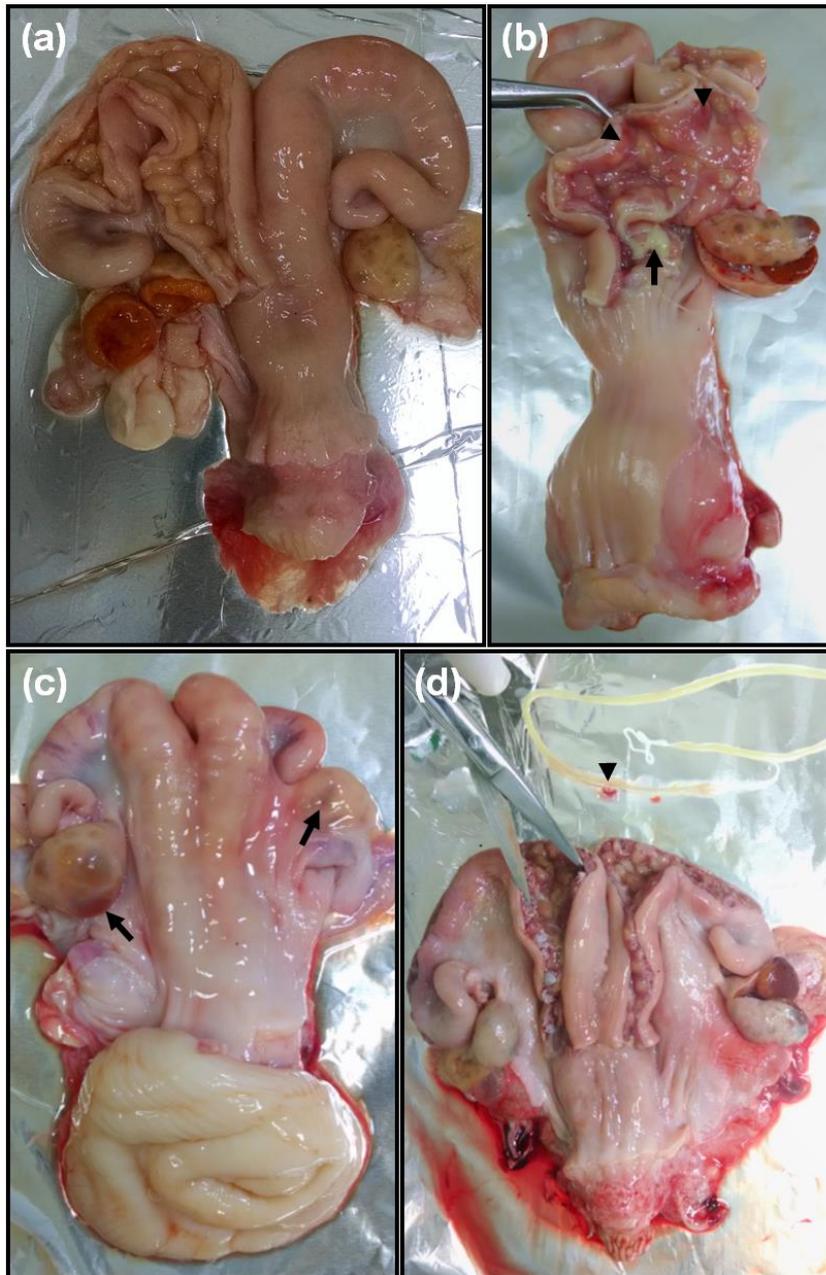


Figura 1. Tratos genitais de novilhas azebuadas coletados em abatedouro. a) trato genital de novilha não gestante e com corpo lúteo funcional, de acordo com a premissa experimental, adequado à utilização no experimento; b) trato genital de novilha contendo processo inflamatório, caracterizado pela presença de pus (seta) e hiperemia do endométrio (cabeça de seta), não utilizado no experimento; c) trato genital de novilha em anestrose, caracterizado por ovários contendo apenas folículos (seta), não utilizado no experimento; d) trato genital de novilha gestante, onde se verifica presença de embrião em fase inicial de desenvolvimento (cabeça de seta), não utilizado no experimento.

4.1– Classificação macroscópica dos tratos genitais femininos para caracterização da fase do ciclo estral

Os tratos genitais foram classificados com base na provável fase do ciclo estral na qual se encontravam. A classificação foi realizada por meio da observação da morfologia e transecções das estruturas ovarianas presentes, em especial o corpo lúteo (CL), utilizando metodologia adaptada de Ireland et al. (1980). As características macroscópicas das fases do ciclo estral utilizadas para classificação dos tratos genitais no presente estudo são descritas a seguir e visualizadas na figura 2.

- Fase I (Metaestro) – primeiro ao quarto dia do ciclo estral, apresentando corpo lúteo pequeno, de 0,5 a 1,0 cm de diâmetro, coloração avermelhada, sem vascularização visível na superfície e ponto de ruptura do folículo recentemente ovulado não coberto por epitélio (Figura 2a, b).
- Fase II (Diestro) – quinto ao décimo sétimo dia do ciclo estral, apresentando corpo lúteo de 1,6 a 2,0 cm de diâmetro, coloração variando do castanho escuro ao laranja, vascularização evidente na periferia da estrutura e ponto de ruptura folicular coberto por epitélio (Figura 2c-f).
- Fase III (Proestro/estro) – décimo oitavo ao vigésimo primeiro dia do ciclo estral, corpo lúteo caracterizado por coloração variando do amarelo claro ao branco, diâmetro inferior a 1,0 cm, sem vascularização aparente, e presença de folículo terciário, dominante, pré-ovulatório em um dos ovários (Figura 2g, h).

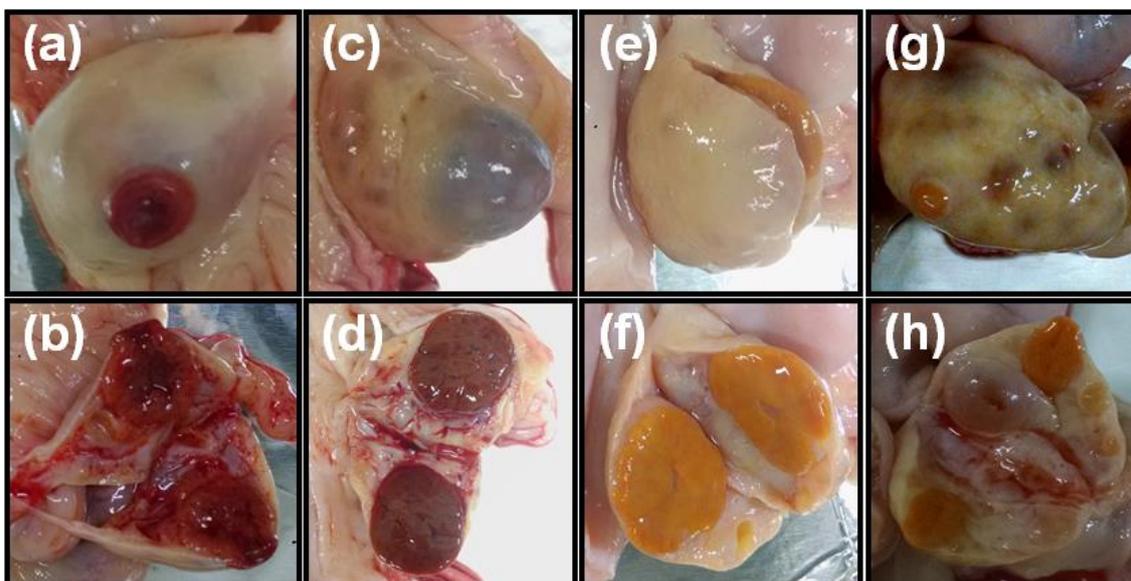


Figura 2. Avaliação macroscópica de tratos genitais coletados de novilhas azebuadas abatidas visando a caracterização das fases do ciclo estral, de acordo com a morfologia das estruturas observadas nos ovários. a e b) ovário de trato genital na fase I (metaestro); c-f) ovários de tratos genitais na fase II (diestro); g e h) ovário de trato genital na fase III (proestro/estro).

Foram selecionados tratos genitais na fase II do ciclo estral para avaliação da produção de citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8 frente à estimulação por diferentes PAMP. Esta fase é

fisiologicamente caracterizada por maiores concentrações circulantes de progesterona e menores concentrações de estrógeno. Esse perfil hormonal é associado à maior predisposição às infecções bacterianas do útero. Para estudar o efeito de diferentes fases do ciclo estral sobre a produção de IL1 β , IL6 e CXCL8 por explantes endometriais bovino estimulados por LPS, foram utilizados tratos genitais de todas as fases anteriormente descritas (I, II e III).

4.2– Preparo de explantes endometriais

Os tratos genitais foram higienizados externamente por meio de aspersão sobre toda a superfície, com solução de etanol 70% a temperatura ambiente, deixando a solução agir por 2 minutos. Os cornos uterinos foram abertos longitudinalmente por meio de tesoura e pinça estéreis. O endométrio foi rinsado suavemente do ápice até a base dos cornos uterinos com solução tampão salina fosfatada de Dulbecco (D-PBS)¹, suplementada com 50 UI/mL de penicilina², 50 μ g/mL de estreptomicina² e 2,5 μ g/mL de anfotericina B². Explantes endometriais foram coletados de áreas intercarunculares do endométrio utilizando punch para biópsia estéril, de 8 mm de diâmetro³. O punch foi pressionado contra o endométrio e levemente girado para seccionar as bordas laterais do explante. Por meio de tesoura e pinça odontológica estéreis, o explante endometrial foi divulsionado do miométrio, atendo-se à remoção de um tecido endometrial fino que contemplasse apenas a mucosa e submucosa. Os explantes coletados foram higienizados por cinco minutos em solução salina balanceada de Hanks (HBSS)¹ a 37°C, suplementada com 50 UI/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina e 2,5 μ g/mL de anfotericina B e, posteriormente, por mais duas lavagens de cinco minutos em solução HBSS a 37°C, sem antibióticos. Dentro de capela de segurança biológica classe II, os explantes foram transferidos para placas de cultura de tecidos de seis poços⁴, de forma que cada poço continha um explante imerso em 3,0 ml de meio de cultivo base a 37°C. O meio de cultivo base era constituído por meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)², suplementado com 50 UI de penicilina, 50 μ g de estreptomicina e 2,5 μ g de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino (SFB)² inativado pelo calor e livre de endotoxinas. As placas de cultivo foram encubadas em estufa com atmosfera úmida controlada a 37°C e 5% de gás carbônico (CO₂). Os PAMP foram adicionados ao meio de cultivo de acordo com o delineamento experimental de cada ensaio realizado. Ao final de cada ensaio os sobrenadantes foram coletados em duplicata para cada poço, armazenados em microtubos de 1,5 mL, e acondicionados em freezer a -20°C até o momento da análise. Os explantes foram pesados ao final de cada ensaio.

Para a estimulação da resposta inflamatória em explantes endometriais foram utilizados os PAMP lipopolissacarídeo ultrapuro de *Escherichia coli* (LPS *E. coli* 0111:B4)⁵, ligante de TLR4; lipoproteína triacetilada sintética (PAM3CSK4)⁵, ligante de TLR1/2; e peptidoglicano de *Staphylococcus aureus* (PGN-SA)⁵, ligante de TLR2, NOD1 e NOD2.

A concentração das citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8 foi mensurada em sobrenadante de cultura de explantes endometriais por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções dos fabricantes dos kits. Foram utilizados os kits Bovine IL1 β ELISA Reagent Kit⁶,

¹ Sigma-Aldrich, EUA.

² Life Technologies, EUA.

³ Kruuse, Dinamarca.

⁴ Jet-biofil, China.

⁵ Invivogen, EUA.

⁶ ESS0027, ThermoScientific, EUA.

Bovine IL6 ELISA Reagent Kit⁷ e Human CXCL8/IL8 DuoSet ELISA⁸. O kit Human CXCL8/IL8 DuoSet ELISA foi previamente testado e validado para a mensuração de CXCL8 bovino (Rinaldi et al., 2008). Para normalização das concentrações, a produção de citocinas foi dividida pelos pesos dos respectivos explantes endometriais, obtendo-se assim a produção de citocinas em pg/mg de tecido endometrial.

4.3– Delineamentos experimentais

4.3.1 – Resposta de explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro à estimulação *in vitro* com diferentes padrões moleculares associados a patógenos puros

Para a condução desse ensaio, foram utilizados 216 explantes endometriais provenientes de seis tratos genitais de novilhas azebuadas, classificados em fase de diestro (fase II), dos quais eram coletados 36 explantes por trato genital. Para a estimulação dos explantes com LPS ou PAM3, dois explantes por trato genital (duplicata) foram submetidos aos seguintes tratamentos: T1) Controle – meio de cultivo base (RPMI 1640+10%SFB+antibióticos); T2) 0,0001 µg/mL de LPS ou PAM3 em meio de cultivo base; T3) 0,001 µg/mL de LPS ou PAM3 em meio de cultivo base; T4) 0,01 µg/mL de LPS ou PAM3 em meio de cultivo base; T5) 0,1 µg/mL de LPS ou PAM3 em meio de cultivo base e T6) 1,0 µg/mL de LPS ou PAM3 em meio de cultivo base. Para estimulação dos explantes com PGN, dois explantes por trato genital (duplicatas) foram submetidos aos seguintes tratamentos: T1) Controle – meio de cultivo base; T2) 0,001 µg/mL PGN em meio de cultivo base; T3) 0,01 µg/mL de PGN em meio de cultivo base; T4) 0,1 µg/mL de PGN em meio de cultivo base; T5) 1,0 µg/mL de PGN em meio de cultivo base e T6) 10,0 µg/mL de PGN em meio de cultivo base. Após 24 horas de cultivo, os sobrenadantes dos tratamentos foram coletados para posterior mensuração da concentração de citocinas IL1β, IL6 e CXCL8 e o meio de cultivo substituído por meio de cultivo novo, apresentando os mesmos constituintes de acordo com cada tratamento realizado. Após 24 horas da substituição do meio de cultivo, os sobrenadantes de todos os tratamentos foram coletados para posterior mensuração da concentração de citocinas, sem haver substituição por meio de cultivo novo. Dessa forma, o ensaio teve duração total de 48 horas, no qual a produção das citocinas por explantes endometriais foi avaliada nos períodos de 0 a 24 horas e 24 a 48 horas de incubação sob estimulação de diferentes PAMP. A produção de citocinas em resposta a cada tratamento foi obtida pela média entre as produções das duplicatas, no qual a concentração média obtida representa a produção de citocinas de um trato genital em resposta àquele tratamento. O delineamento experimental proposto para cada PAMP testado foi de blocos ao acaso com parcelas subdivididas, 6 blocos (tratados genitais/animais) x 6 tratamentos x 2 períodos de avaliação (0 a 24 e 24 a 48 horas).

⁷ ESS0029, ThermoScientific, EUA.

⁸ DY208, R&D Systems, EUA.

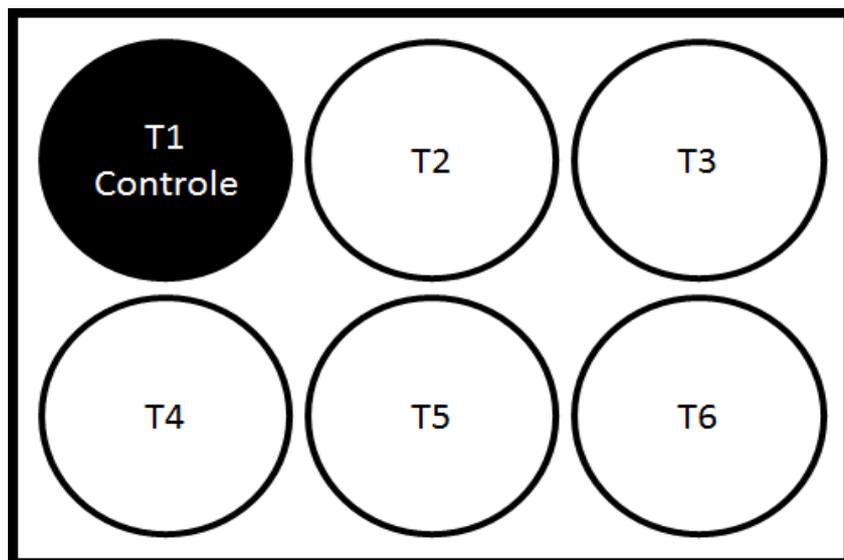


Figura 3. Esquema em placa de cultivo de seis poços, representativa dos tratamentos experimentais para estimulação por diferentes PAMP de explantes endometriais provenientes de trato genital de novilhas azebuadas. Foram utilizados 216 explantes provenientes de tratos genitais de seis novilhas azebuadas em fase de diestro (fase II). Cada trato genital forneceu 36 explantes que foram estimulados por LPS, PAM3 e PGN, 12 explantes para cada PAMP (duplicatas), de acordo com os tratamentos a seguir: T1) Controle – meio de cultivo base (RPMI 1640+10%SFB+antibióticos); T2) 0,0001 $\mu\text{g/mL}$ de LPS ou PAM3 ou 0,001 $\mu\text{g/mL}$ de PGN em meio de cultivo base; T3) 0,001 $\mu\text{g/mL}$ de LPS ou PAM3 ou 0,01 $\mu\text{g/mL}$ de PGN em meio de cultivo base; T4) 0,01 $\mu\text{g/mL}$ de LPS ou PAM3 ou 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de PGN em meio de cultivo base; T5) 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS ou PAM3 ou 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de PGN em meio de cultivo base e T6) 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de LPS ou PAM3 ou 0,001 $\mu\text{g/mL}$ de PGN em meio de cultivo base. Após 24 e 48 horas de cultivo, os sobrenadantes dos meios de cultivo de cada tratamento foram coletados para dosagem das citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8, sendo o meio substituído por meio novo, de acordo com o tratamento, após as primeiras 24 horas de cultivo.

4.3.2 – Dinâmica de produção e acúmulo de citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8 ao longo do tempo de cultivo por explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro sob estimulação por LPS

Foram utilizados tratos genitais de seis novilhas azebuadas, classificadas em fase de diestro (fase II) para a condução de ambos os ensaios. Destes, 24 explantes endometriais foram coletados para a realização do ensaio de avaliação da dinâmica de produção de citocinas, sendo 4 explantes por trato genital. Dos mesmos seis tratos genitais, foram coletados mais 72 explantes endometriais para a realização do ensaio de avaliação do acúmulo de citocinas ao longo do tempo de cultivo, sendo 12 explantes por trato genital.

No ensaio de dinâmica da produção de citocinas, dois explantes por trato genital (duplicatas) foram cultivados em meio controle (Tratamento 1 - T1: meio de cultivo base composto por RPMI 1640+10%SFB+antibióticos) e dois explantes em meio de cultivo base contendo 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de LPS (Tratamento 2 - T2). O ensaio teve duração de 24 horas e a cada seis horas de cultivo, os sobrenadantes eram coletados para posterior mensuração da concentração das citocinas IL1 β , IL6

e CXCL8, e o meio de cultivo substituído por meio novo, contendo a mesma constituição do meio de cultivo inicial. Dessa forma foram obtidos sobrenadantes para avaliação da dinâmica de produção das citocinas em quatro períodos distintos, sendo eles de 0 a 6 horas, 6 a 12 horas, 12 a 18 horas e 18 a 24 horas de cultivo. A produção de citocinas em resposta a cada tratamento foi obtida pela média entre as produções das duplicatas, no qual a concentração média obtida representa a produção de citocinas de um trato genital em resposta àquele tratamento. O delineamento experimental proposto para este ensaio foi de blocos ao acaso com parcelas subdivididas, 6 blocos (tratos genitais/animais) x 2 tratamentos x 4 períodos de avaliação.

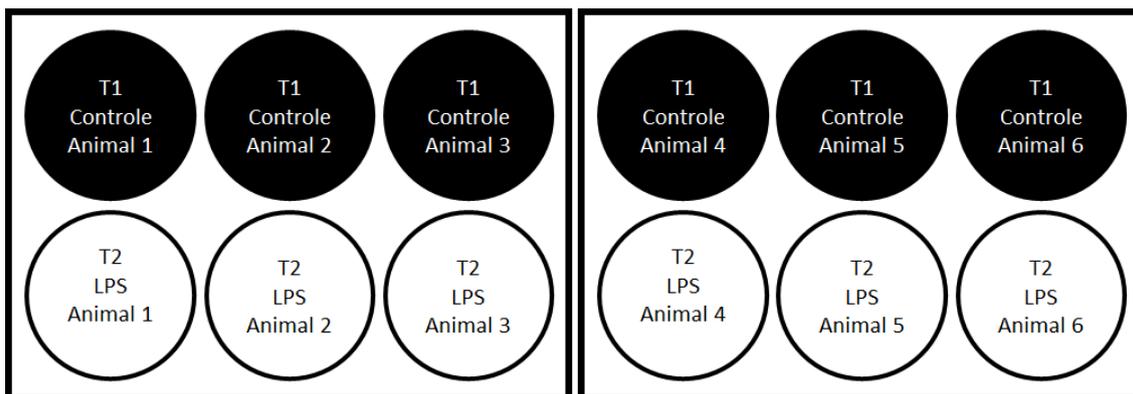


Figura 4. Esquema em placas de seis poços, representativa de uma réplica dos tratamentos experimentais para avaliação da dinâmica de produção de citocinas por explantes endometriais de novilhas azebuadas, estimulados ou não por 1,0 µg/mL de LPS. Foram utilizados 24 explantes provenientes de tratos genitais de seis novilhas azebuadas em fase de diestro (fase II). Cada trato genital forneceu quatro explantes, dos quais dois (duplicatas) foram cultivados em meio controle (T1 – meio de cultivo base composto por RPMI 1640+10%SFB+antibióticos) e dois (duplicatas) em meio de cultivo base contendo 1,0 µg/mL de LPS (T2), por um período total de 24 horas de cultivo. A cada seis horas, os sobrenadantes foram coletados para mensuração da concentração das citocinas IL1β, IL6 e CXCL8, e o meio de cultivo substituído por meio novo contendo a mesma composição do inicial. Portanto a dinâmica de produção de citocinas foi avaliada nos períodos de 0 a 6, 6 a 12, 12 a 18 e 18 a 24 horas de cultivo.

No ensaio de acúmulo de citocinas ao longo do tempo, seis explantes por trato genital foram cultivados em meio controle (Tratamento 1 - T1: meio de cultivo base - RPMI 1640+ 10%SFB+antibióticos) e seis em meio de cultivo base contendo 1,0 µg/mL de LPS (Tratamento 2 - T2). O ensaio teve duração de 48 horas e após 6, 24 e 48 horas de cultivo direto, sem substituição do meio de cultivo, sobrenadantes de dois explantes (duplicatas) cultivados em meio controle e dois explantes cultivados em meio contendo LPS foram coletados para mensuração da concentração das citocinas IL1β, IL6 e CXCL8 acumuladas, representativa do período de cultivo após o qual foi coletado. A produção de citocinas em resposta a cada tratamento foi obtida pela média entre as produções das duplicatas, no qual a concentração média obtida representa a produção de citocinas de um trato genital em resposta àquele tratamento. O delineamento experimental proposto foi em blocos ao acaso em arranjo fatorial completo, 6 blocos (tratos genitais/animal) x 2 tratamentos x 3 períodos de avaliação.

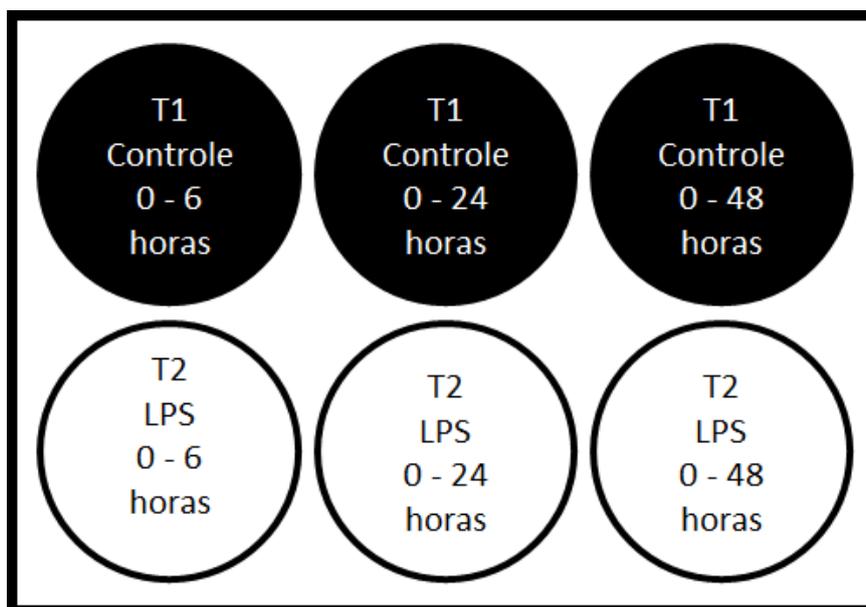


Figura 5 – Esquema em placa de cultivo de seis poços, representativa dos tratamentos experimentais para avaliação do acúmulo de citocinas ao longo do tempo de cultivo por explantes endometriais provenientes de trato genital de novilhas azebuadas, estimulados ou não por 1,0 µg/mL de LPS. Foram utilizados 72 explantes provenientes de tratos genitais de 6 novilhas azebuadas em fase de diestro (fase II). Cada trato genital forneceu 12 explantes, dos quais seis foram cultivados em meio controle (T1: meio de cultivo base - RPMI 1640+10%SFB+antibióticos) e seis em meio de cultivo base contendo 1,0 µg/mL de LPS (Tratamento 2), por um período total de 48 horas de cultivo. Após 6, 24 e 48 horas de cultivo direto, sem substituição do meio de cultivo por meio novo, os sobrenadantes de dois explantes (duplicatas) foram coletados para mensuração da concentração das citocinas IL1β, IL6 e CXCL8. Portanto o acúmulo de citocinas foi avaliado nos períodos de 0 a 6, 0 a 24 e 0 a 48 horas de cultivo.

4.3.3– Caracterização da produção de IL1β, IL6 e CXCL8 por explantes endometriais de novilhas azebuadas em diferentes fases do ciclo estral estimulados por LPS

Para a realização deste ensaio, 18 tratos genitais de novilhas azebuadas foram utilizados, dos quais seis foram classificados em fase de metaestro (fase I), seis em diestro (fase II) e seis em proestro/estro (fase III). De cada trato genital foram coletados 4 explantes endometriais, com um total de 72 explantes utilizados para a condução do ensaio. Dois explantes (duplicatas) de cada trato genital, de cada fase do ciclo estral, foram cultivados em meio controle (Tratamento 1 - T1: meio de cultivo base - RPMI 1640+10%SFB+antibióticos) e os outros dois cultivados em meio de cultivo base contendo 1,0 µg/mL de LPS (T2). Após 24 horas de cultivo, os sobrenadantes dos tratamentos foram coletados para posterior mensuração da concentração de citocinas e o meio de cultivo substituído por meio de cultivo novo, apresentando os mesmos constituintes de acordo com cada tratamento realizado. Após 24 horas da substituição do meio de cultivo, os sobrenadantes de todos os tratamentos foram coletados para posterior mensuração da concentração de citocinas, sem haver substituição por meio de cultivo novo. Dessa forma, o ensaio teve duração total de 48 horas, no qual a produção das citocinas IL1β, IL6 e CXCL8 por explantes

endometriais foi avaliada nos períodos de 0 a 24 horas e 24 a 48 horas de cultivo. A produção de citocinas em resposta a cada tratamento foi obtida pela média entre as produções das duplicatas, no qual a concentração média obtida representa a produção de citocinas de um trato genital em resposta àquele tratamento. O delineamento experimental proposto foi em blocos ao acaso em arranjo fatorial com parcelas subdivididas, com fatorial 2 tratamentos x 3 fases do ciclo estral na parcela e 2 períodos de avaliação compondo a subparcela.

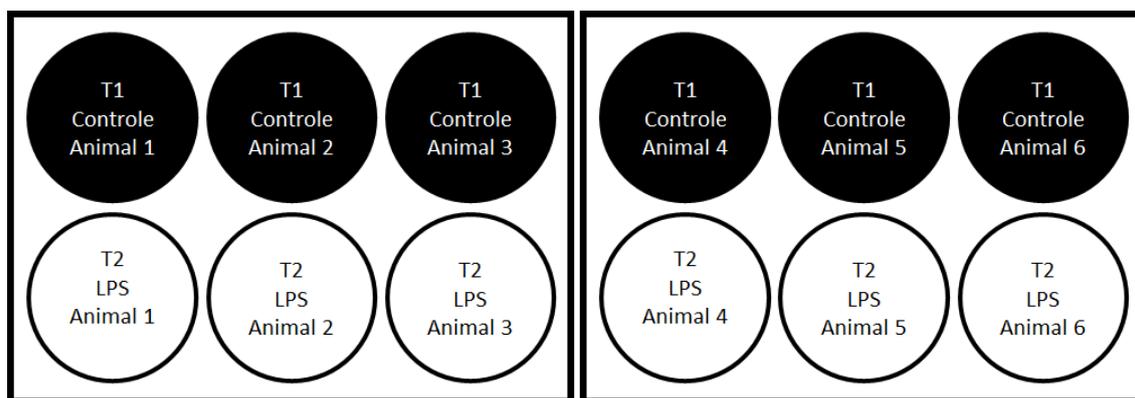


Figura 6 - Esquema em placas de seis poços, representativa de uma réplica dos tratamentos experimentais para avaliação da influência de fases do ciclo estral sobre a produção de citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8 por explantes endometriais provenientes de trato genital de novilhas azebuadas em diferentes fases do ciclo estral, estimulados ou não por 1,0 μ g/mL de LPS. Foram utilizados 72 explantes provenientes de tratos genitais de seis novilhas azebuadas em fase de metaestro (fase I), seis em fase de diestro (fase II) e seis em fase de proestro/estro (fase III). Cada trato genital forneceu quatro explantes, dos quais dois (duplicatas) foram cultivados em meio controle (T1 – meio de cultivo base composto por RPMI 1640+10%SFB+antibióticos) e dois em meio de cultivo base contendo 1,0 μ g/mL de LPS (T2), por um período total de 48 horas de cultivo. Após 24 e 48 horas de cultivo, os sobrenadantes dos meios de cultivo de cada tratamento foram coletados para dosagem das citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8, sendo o meio substituído por meio novo, de acordo com o tratamento, após as primeiras 24 horas de cultivo. Portanto a produção de citocinas foi avaliada nos períodos de 0 a 24 e 24 a 48 horas de cultivo.

4.4 – Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando os programas estatísticos *SAEG*, versão 9.1⁹ e *GraphPad Instat*, versão 3.06¹⁰, tendo o trato genital de cada animal como unidade experimental.

Todas as variáveis analisadas foram submetidas a teste de normalidade pelo método de Lilliefors e teste de homogeneidade de variância pelos métodos de Cochran e Bartlett. Variáveis que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade foram submetidas a testes estatísticos paramétricos. Já as variáveis que não apresentaram normalidade e/ou homocedasticidade, foram submetidas a testes estatísticos não paramétricos.

Para a análise das variáveis paramétricas, foi realizada análise de variância (ANOVA) e, em seguida, teste de comparações múltiplas de Dunnett para comparação de médias de tratamentos com o grupo controle, teste de comparações múltiplas de Bonferroni para comparação de médias

⁹ Fundação Arthur Bernardes, Viçosa, Brasil.

¹⁰ Graphpad Software, San Diego, EUA.

entre tratamentos, teste t pareado para comparação entre duas médias pareadas e teste t não pareado entre médias de dois tratamentos, não pareados. Para variáveis não paramétricas, foram procedidos testes de Friedman seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn para comparação de mais de dois tratamentos com amostras pareadas, teste de Wilcoxon para comparação entre duas médias pareadas e teste de Kruskal-Wallis para comparação entre mais de duas médias provenientes de amostras não-pareadas. Os dados estão apresentados na forma de média e erro padrão da média ($Média \pm E.P.M.$), para variáveis com distribuição normal de probabilidade, ou mediana para variáveis que não apresentam distribuição normal de probabilidade, considerando 5% como nível de significância para todos os testes.

5. RESULTADOS

No estudo foram utilizados 456 explantes não fragmentados de tecido endometrial de novilhas azebuadas, com peso médio de $21,387 \pm 0,265$ mg. A aparência macroscópica dos explantes inteiros foi semelhante à do endométrio bovino normal (Figura 7), anterior à separação do tecido uterino. A avaliação histopatológica de secções de explantes inteiros endometriais confirmou espessura variando entre 1.000 a 1.500 μm , preservação da arquitetura tecidual logo após a coleta e obtenção de explantes, que compreendem apenas as porções de mucosa (epitélio colunar simples superficial) e submucosa (estroma) endometrial, sem associação do miométrio (Figura 8).

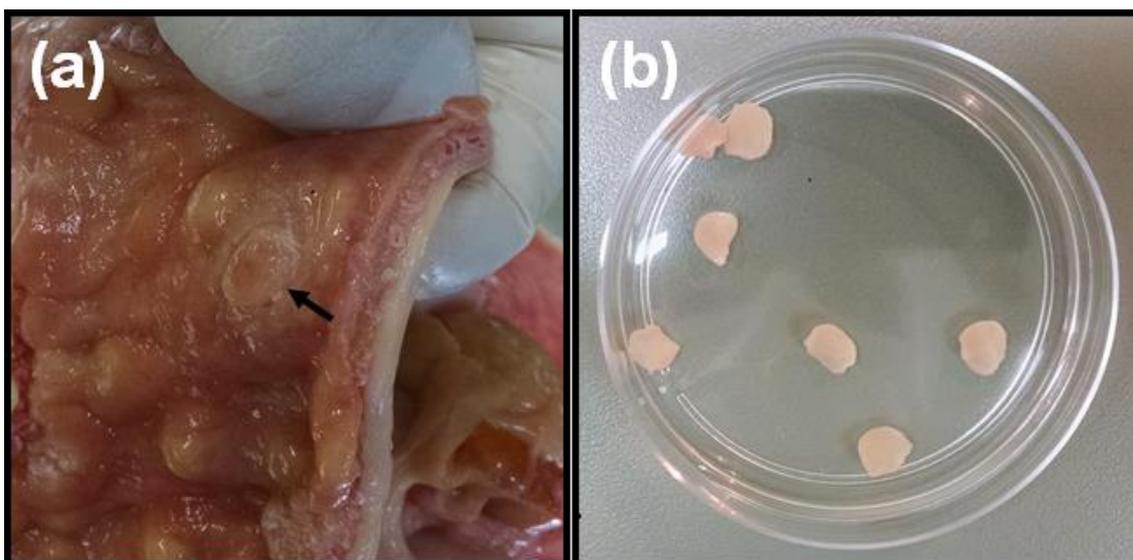


Figura 7. Aspecto macroscópico dos explantes endometriais não fragmentados de novilhas azebuadas utilizados no estudo. a) explante destacado por punch de biópsia de 8mm ainda ligado ao tecido uterino; b) explantes endometriais não fragmentados de novilha azebuada em solução de lavagem HBSS, antes de transferi-los ao meio de cultivo.

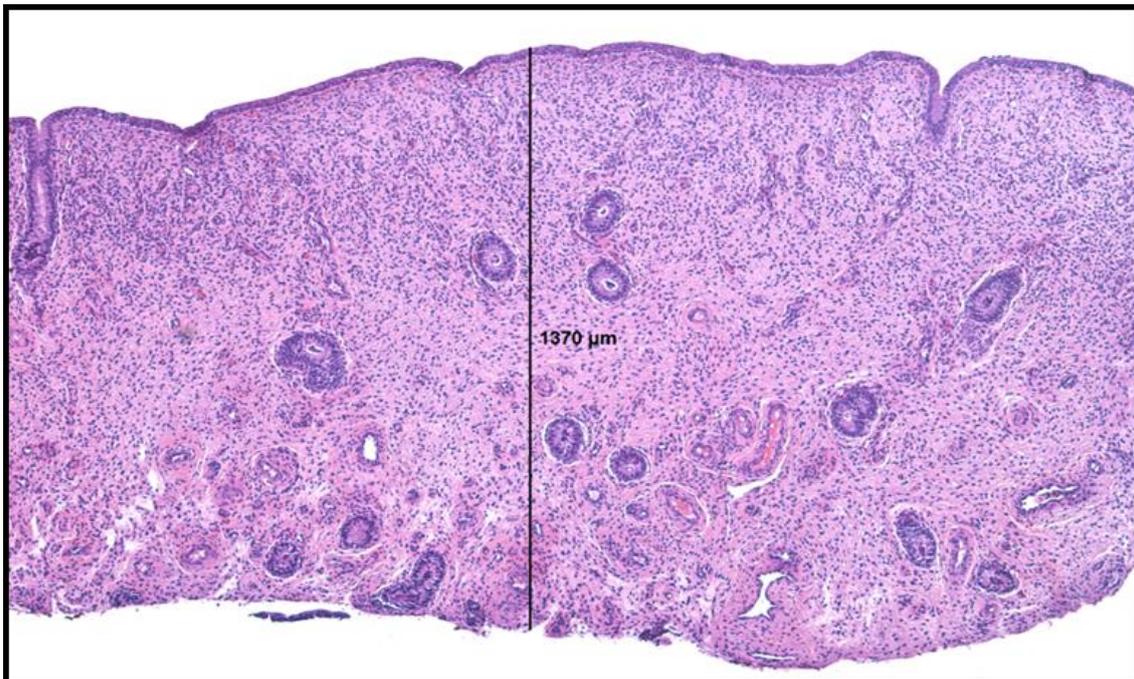


Figura 8. Explante endometrial de novilha azebuada fixado em solução formol salina tamponada 10% logo após a colheita, submetido a processamento histológico e corado pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H.E.). Aspecto da espessura total e arquitetura do explante endometrial, destacando a mucosa (epitélio colunar simples superficial), submucosa endometrial (estroma) e o não envolvimento do miométrio na composição dos explantes (50x).

5.1 – Resposta de explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro à estimulação *in vitro* com diferentes padrões moleculares associados a patógenos puros

A produção das citocinas pró-inflamatórias IL1 β , IL6 e CXCL8 por explantes endometriais de novilhas azebuadas em fase de diestro, estimuladas por diferentes concentrações de LPS, PAM3 e PGN, está demonstrada na Figura 9.

Explantes endometriais de novilhas azebuadas, estimulados por 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de LPS durante as primeiras 24 horas de cultivo, apresentam produção significativa ($P < 0,05$) de IL1 β (Fig. 9a) e produções altamente significativas ($P < 0,01$) de IL6 (Fig. 9b) e CXCL8 (Fig. 9c) quando comparados com o grupo controle. Explantes estimulados com 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS durante as 24 horas iniciais do cultivo apresentam produção significativa ($P < 0,05$) de IL6 (Fig. 9b) e altamente significativa ($P < 0,01$) de CXCL8 (Fig. 9c) em relação ao grupo controle. Para as demais concentrações de LPS avaliadas e após 48 horas de cultivo, não foram observadas produções significativas ($P > 0,05$) de citocinas quando comparado com o grupo controle (Fig. 9a, b, c).

A produção de IL6 a partir da estimulação por 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de LPS é significativamente maior ($P < 0,05$) que a produção a partir da estimulação por 0,0001 $\mu\text{g/mL}$ de LPS durante as 24 horas iniciais de cultivo (Fig. 9b). Já a estimulação de explantes com concentrações de 0,1 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de LPS resultam em produções significativamente maiores ($P < 0,05$) de IL6 durante as primeiras 24 horas de cultivo quando comparada às 24 horas subsequentes (Fig. 9b).

LPS quando comparada à estimulação por 0,0001 µg/mL de LPS dentro das 24 horas iniciais de cultivo (Fig. 9c). Após 48 horas de cultivo, elevação altamente significativa ($P<0,01$) da produção de CXCL8 é observada apenas dentro da estimulação de explantes endometriais com 0,001 µg/mL de LPS, quando comparado ao período de 24 horas do início do cultivo (Fig. 9c).

Explantes endometriais de novilhas azebuadas estimulados por 10,0 µg/mL de PGN, apresentam produções altamente significativas ($P<0,01$) de IL1 β , tanto em 24 como em 48 horas após o início do cultivo, quando comparado com o grupo controle (Fig. 9g). Dentro das primeiras 24 horas de cultivo, a estimulação de explantes endometriais com 10,0 µg/mL de PGN apresentam aumento significativo ($P<0,05$) na produção de IL1 β em relação à estimulação por 0,001 µg/mL de PGN (Fig. 9g). Já após 48 horas de cultivo, a produção de IL1 β por explantes endometriais estimulados por 10,0 µg/mL de PGN é altamente significativa ($P<0,01$) quando comparada à produção da mesma citocina por explantes estimulados por 0,001, 0,01 e 0,1 µg/mL de PGN (Fig. 9g).

Não há aumento da produção de qualquer citocina em resposta às diferentes concentrações de PAM3 utilizadas para estimulação dos explantes endometriais de novilhas azebuadas, em nenhum dos períodos avaliados em relação ao grupo controle (Fig. 9d-f). Porém a produção de CXCL8 durante as primeiras 24 horas de cultivo em resposta à estimulação por 1,0 µg/mL de PAM3 é significativamente maior ($P<0,05$) que a produção em resposta à estimulação por 0,0001 µg/mL do mesmo PAMP (Fig. 9f).

5.2 – Dinâmica de produção e acúmulo de citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8 ao longo do tempo de cultivo por explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro sob estimulação por LPS

A dinâmica de produção e acúmulo das citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8 ao longo do tempo por explantes endometriais de novilhas azebuadas na fase de diestro, em resposta ao estímulo por 1,0 µg/mL de LPS está demonstrada na Figura 10.

Explantes endometriais estimulados por LPS, quando comparados ao grupo controle, apresentam produções significativas ($P<0,05$) de IL1 β nos períodos de 6 a 12 e 12 a 18 horas de cultivo (Fig. 10a), de IL6 nos períodos de 0 a 6 e 6 a 12 horas de cultivo (Fig. 10b) e de CXCL8 nos períodos de 6 a 12 e 18 a 24 horas de cultivo (Fig. 10c). A estimulação com LPS resulta em produção altamente significativa ($P<0,01$) de IL1 β no período de 0 a 6 horas quando comparado com o período de 18 a 24 horas e significativa ($P<0,05$) quando comparado ao período de 12 a 18 horas de cultivo (Fig. 10a). Explantes estimulados por LPS apresentam produções altamente significativas de IL6 no período de 0 a 6 horas ($P<0,01$) quando comparado ao período de 18 a 24 horas de cultivo (Fig. 10b) e significativamente maior ($P<0,05$) de CXCL8 no período de 18 a 24 horas quando comparado ao período de 0 a 6 horas de cultivo (Fig. 10c).

Em relação ao acúmulo de citocinas ao longo do tempo de cultivo, explantes endometriais estimulados por LPS apresentam acúmulos significativos ($P<0,05$) de IL1 β após 24 horas de estimulação (Fig. 10d), acúmulo altamente significativo ($P<0,05$) de IL6 após 6 horas e significativo ($P<0,05$) após 24 horas de estimulação (Fig. 10e) e acúmulo significativo ($P<0,05$) de CXCL8 após 6, 24 e 48 horas de estimulação (Fig. 10f). O acúmulo de IL1 β por explantes estimulados por LPS é significativamente maior ($P<0,05$) após 24 e 48 horas quando comparado ao período de 6 horas de estimulação (Fig. 10d), enquanto para CXCL8, o período de 48 horas de estimulação apresenta acúmulo altamente significativo ($P<0,01$) quando comparado ao período

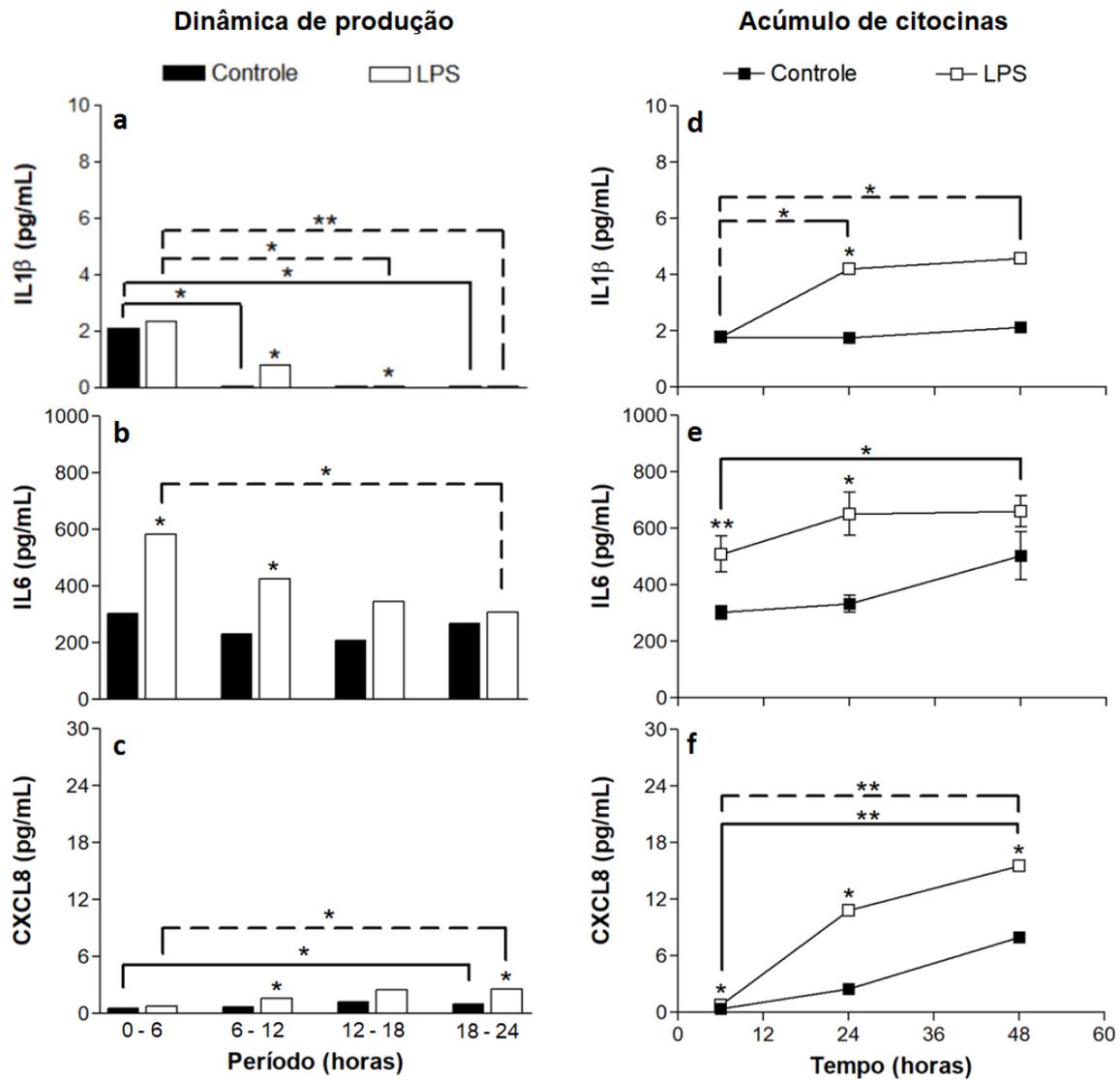


Figura 10. Dinâmica de produção e acúmulo de IL1 β , IL6 e CXCL8 ao longo do tempo de cultivo por explantes endometriais não fragmentados de novilhas azebuadas em resposta ao LPS. Explantes endometriais foram cultivados em meio controle (barras ou quadrados negros) ou meio contendo 1 μ g/mL de LPS (barras ou quadrados claros). Sobrenadantes foram colhidos a cada 6 horas durante 24 horas de cultivo (a–c) ou após 6, 24 e 48 horas de cultivo (d–f). As concentrações de IL1 β (a, d), IL6 (b, e) e CXCL8 (c, f) foram mensuradas por meio de ELISA. (n=6). Variáveis paramétricas (e) foram analisados por ANOVA, teste t não pareado para comparação entre grupo controle e tratado e teste de comparações múltiplas de Bonferroni entre as médias dos períodos de avaliação dentro de um mesmo tratamento. Valores estão apresentados na forma de concentração média por miligrama de tecido \pm erro padrão da média (E.P.M.). Variáveis não paramétricas (a-d, f) foram analisados pelo teste de Friedman e pós-teste de comparações múltiplas de Dunn para comparação entre períodos de avaliação para o mesmo tratamento e teste de Wilcoxon para comparações entre tratamentos dentro de um mesmo período de avaliação. Os valores estão apresentados na forma de concentração mediana por miligrama de tecido. Valores diferem do controle: * P <0,05 e ** P <0,01.

de 6 horas (Fig. 10f). Explantes endometriais do grupo controle após 48 horas de cultivo também acumulam concentrações significativas ($P<0,05$) de IL6 (Fig. 10e) e altamente significativas ($P<0,01$) de CXCL8 (Fig. 10f) quando comparado com o período de 6 horas de cultivo.

5.3 – Caracterização da produção de IL1 β , IL6 e CXCL8 por explantes endometriais de novilhas azebuadas em diferentes fases do ciclo estral estimulados por LPS

Os resultados de produção de citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8 por explantes endometriais de novilhas azebuadas em diferentes fases do ciclo estral estimuladas por 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de LPS se encontram na Figura 11.

A estimulação de explantes endometriais de diferentes fases do ciclo estral por LPS resulta durante as primeiras 24 horas de cultivo, acúmulo significativo ($P<0,05$) de IL1 β por explantes pertencentes à fase de diestro e proestro/estro, não havendo diferença significativa entre as produções das fases do ciclo estral (Fig. 11a). Após as 48 horas de cultivo, apenas explantes pertencentes à fase de proestro/estro ainda acumulam concentrações significativas ($P<0,05$) de IL1 β sob estimulação por LPS (Fig. 11b).

Explantes endometriais pertencentes às fases de metaestro e diestro apresentam, respectivamente quando comparado ao grupo controle, acúmulo altamente significativo ($P<0,01$) e significativo ($P<0,05$) de IL6 após 24 horas de cultivo sob estimulação de LPS (Fig. 11c). Explantes endometriais pertencentes às mesmas fases do ciclo estral ainda apresentam acúmulos significativos ($P<0,05$) de IL6 após 48 horas de cultivo sob estimulação com LPS em relação ao grupo controle (Fig. 11d). Em nenhum dos períodos avaliados há diferença ($P>0,05$) entre as produções de IL6 por explantes das três fases avaliadas.

Explantes endometriais pertencentes às fases de metaestro acumulam apenas durante as primeiras 24 horas de cultivo, sob estimulação por LPS, concentrações significativamente maiores ($P<0,05$) de CXCL8 quando comparado ao grupo controle, não diferindo a produção entre as fases do ciclo estral (Fig. 11e).

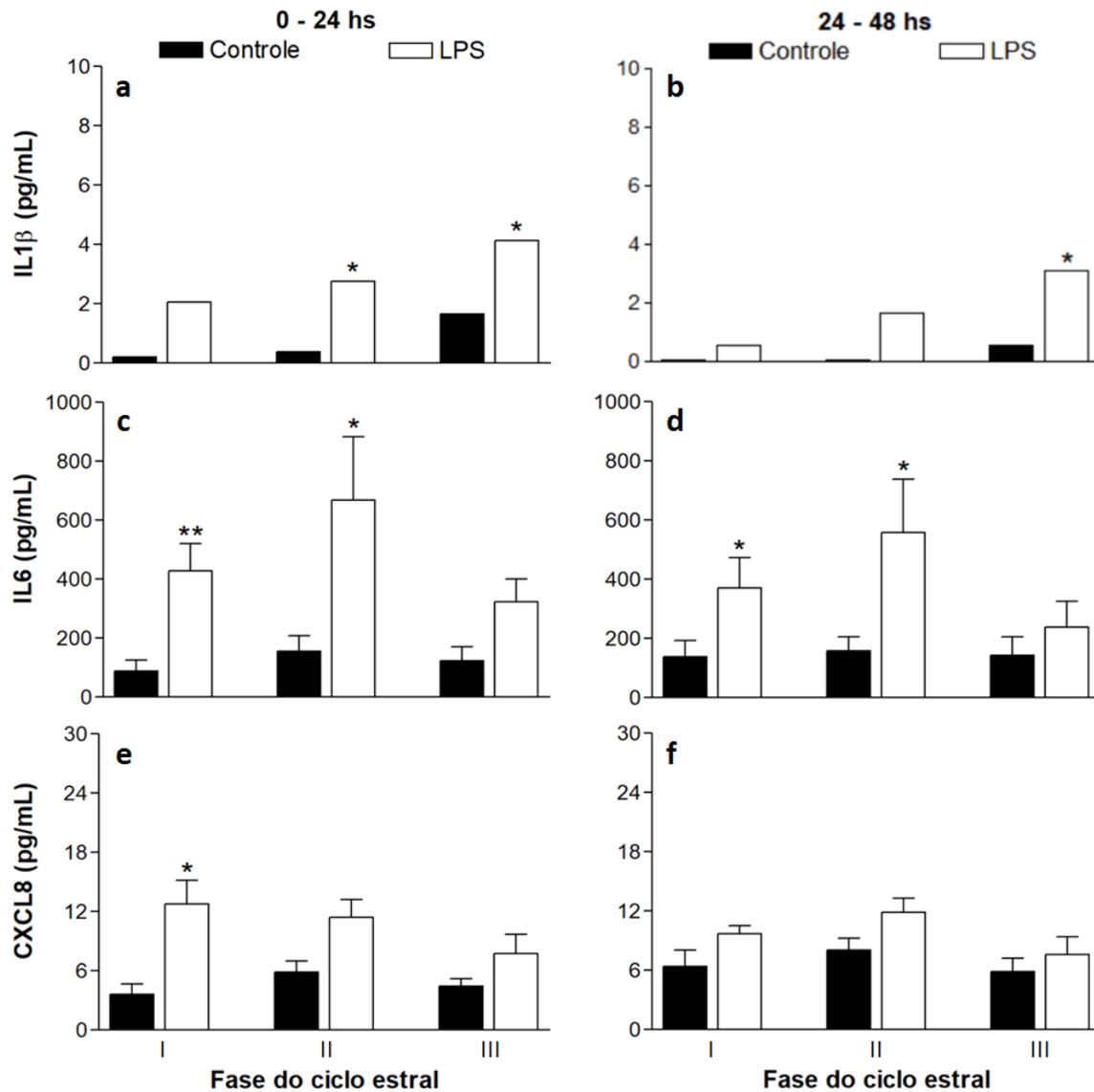


Figura 11. Produção de IL1 β , IL6 e CXCL8 em resposta ao LPS por explantes endometriais não fragmentados de novilhas azebuadas, em função da fase do ciclo estral. Explantes de novilhas azebuadas nas fases I (metaestro), II (diestro) e III (proestro-estro) do ciclo estral foram cultivados em meio controle (barras negras) ou meio contendo 1 μ g/mL de LPS (barras claras). Sobrenadantes foram coletados em 24 e 48 horas de cultivo, e as concentrações de IL1 β (a, b), IL6 (c, d) e CXCL8 (e, f) mensurada por ELISA. (n=6). Variáveis paramétricas (c-f) foram analisadas por ANOVA, usando teste t pareado para comparação dos tratamentos com o respectivo grupo controle e para comparações entre períodos de avaliação dentro do mesmo tratamento e teste de comparações múltiplas de Bonferroni entre as fases para o mesmo tratamento, dentro de um mesmo período de avaliação. Valores estão apresentados na forma de concentração média por miligrama de tecido \pm erro padrão da média (E.P.M.). Variáveis não-paramétricas (a, b) foram analisadas por teste de Kruskal-Wallis, usando teste de comparações múltiplas de Dunn para comparação das médias entre as fases para o mesmo tratamento, dentro de um mesmo período de avaliação, teste de Wilcoxon para comparação entre períodos de avaliação dentro do mesmo tratamento e para comparação dos tratamentos com o respectivo grupo controle. Valores apresentados na forma de concentração mediana por miligrama de tecido. Valores diferem do controle: * P <0,05, ** P <0,01.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado que explantes endometriais de novilhas azebuadas na fase de diestro respondem à estimulação por LPS e PGN, com produção de citocinas pró-inflamatórias IL1 β , IL6 e CXCL8. Além disso, explantes endometriais de novilhas azebuadas em fase de metaestro respondem à estimulação por LPS com maior produção de citocinas IL6 e CXCL8, em fase de diestro com maior produção de IL1 β e IL6, e em fase de proestro/estro com maior produção apenas de IL1 β , porém sem diferir as produções entre as fases do ciclo estral. Poucos trabalhos na literatura descrevem o perfil de produção de citocinas pró-inflamatórias pelo endométrio de novilhas azebuadas estimulados por PAMP e possíveis influências das fases do ciclo estral sobre a resposta inflamatória endometrial em tais animais.

As fêmeas bovinas azebuadas são animais resultantes do cruzamento entre as subespécies taurina (*Bos taurus taurus*) e zebuína (*Bos taurus indicus*), com predominância genética e fenotípica dos zebuínos. São animais de menor potencial produtivo, porém menos exigentes, mais rústicos e resistentes aos diversos desafios existentes dentro dos sistemas de criação tropical e subtropical (Abeygunawardena e Dematawewa, 2004; Alencar e Barbosa, 2009). Durante o período puerperal, as fêmeas azebuadas se mostram menos susceptíveis aos processos infecciosos do útero quando comparadas às fêmeas taurinas (González-Sanchez et al., 1999; LeBlanc et al., 2002; Williams et al., 2005; Camargos et al., 2013). Acredita-se que tal característica se deve ao maior controle dos mecanismos de regulação da resposta imune inata uterina, resultando em rápida resolução de quadros infecciosos menos severos, diferente do observado em fêmeas taurinas (Sheldon et al., 2009a; Pothmann et al., 2015).

Após o parto, a grande maioria das fêmeas bovinas apresentam algum tipo de colonização bacteriana do útero, podendo o ambiente uterino permanecer contaminado por período igual ou superior a duas semanas pós-parto (Sheldon et al., 2008). Diante dessa condição natural do pós-parto, preconizou-se a utilização de tratos genitais de novilhas nulíparas, pós-púbere, não gestantes, para a obtenção de explantes endometriais. Essa premissa experimental teve como objetivo utilizar apenas tratos genitais com menor abertura das barreiras físicas do útero e, conseqüentemente, menor contaminação bacteriana, evitando assim estimulação da produção de citocinas por fontes que não correspondessem aos PAMP utilizados no experimento, condição essa essencial para a condução do estudo (Borges et al., 2012).

Para realizar a estimulação do tecido endometrial de novilhas azebuadas, elegeu-se como metodologia a técnica de cultivo de explantes endometriais não fragmentados. Essa técnica permite a preservação da arquitetura e das interações celulares existentes no tecido, constituindo assim um modelo de avaliação mais fidedigna da resposta imune inata endometrial frente à estimulação por PAMP. Essa técnica evita também a ocorrência de inflamação estéril, ou seja, a estimulação da resposta imune inata por padrões moleculares associados a dano tecidual (DAMP) provenientes da fragmentação tecidual e digestão da matriz extracelular, como ocorre em modelos de cultivo de células purificadas (Borges et al., 2012).

O endométrio desempenha funções reprodutivas e imunológicas sob estimulação de hormônios esteroides sexuais e diversas citocinas. Por isso, acredita-se que hormônios esteroides desempenham um importante papel na modulação da resposta imune uterina (Lewis et al., 2003; Herath et al., 2006b; Sheldon et al., 2009b; Turner et al., 2012). Tratoss genitais em fase I do ciclo estral (metaestro), representativos de úteros em momento pós-ovulação, são caracterizados por baixas concentrações circulantes de estrógeno e progesterona, semelhante ao que acontece no

período pós-parto recente (Ireland et al., 1980). Tratos genitais em fase II do ciclo estral (diestro), representam úteros propícios para receber um novo embrião e normalmente estão associados a maior susceptibilidade uterina às infecções bacterianas. São caracterizados por elevada concentração circulante de progesterona e baixa de estrógeno (Ireland et al., 1980; Lewis et al., 2003; Herath et al., 2006a). Já tratos genitais em fase III (proestro/estro), representativos de úteros em estágio pré-ovulatório e normalmente associados a menor susceptibilidade uterina às infecções bacterianas, são caracterizados por elevada concentração circulante de estrógeno e baixa de progesterona (Ireland et al., 1980; Seals et al., 2003; Herath et al., 2006a; Fischer et al., 2010; Wira et al., 2010, 2011).

Para avaliação da produção de citocinas por explantes endometriais de novilhas azebuadas estimulados por diferentes PAMP e para o estudo da dinâmica de produção e acúmulo de citocinas por explantes estimulados por LPS, tratos genitais de novilhas azebuadas em diestro (Fase II) foram utilizados devido às características de maior susceptibilidade às infecções bacterianas e por esta fase estar associada a processos inflamatórios crônicos que resultam em quadros de subfertilidade ou infertilidade. Acredita-se que alterações nos mecanismos que ajustam a resposta inflamatória endometrial, resultando em respostas crônicas, estejam presentes no momento em que ocorre o reconhecimento materno da gestação e implantação do embrião, eventos esses compreendidos na fase de diestro (Sheldon et al., 2009a; Pothmann et al., 2015).

Explantes endometriais de novilhas azebuadas, em fase de diestro, respondem com elevação da produção de citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8 à estimulação por LPS durante 24 horas iniciais de cultivo e elevação de IL1 β à estimulação por PGN durante 48 horas de cultivo. A produção de IL1 β , IL6 e CXCL8 reflete o aumento da expressão de RNAm codificador de tais citocinas frente a estimulação de PRR presentes na superfície das células que constituem o endométrio. Isso mimetiza os acontecimentos que ocorrem no útero de fêmeas bovinas contaminadas no pós-parto por bactérias Gram-negativo e Gram-positivo, como *E. coli* e *T. pyogenes* por exemplo, além de enfatizar o importante papel exercido pelo endométrio dentro da resposta imune inata como barreira às infecções uterinas (Herath et al., 2006; Borges et al., 2012). Resultados similares foram observados por Borges et al. (2012), onde explantes endometriais de novilhas taurinas em metaestro responderam com aumento da produção de IL6 em resposta ao LPS e IL1 β em resposta ao PGN. Saut et al. (2014) avaliou a produção de citocinas pró-inflamatórias por explantes endometriais de novilhas com aptidão leiteira e de corte, e observou que em ambas as categorias, os explantes aumentaram a expressão de RNAm e produção de IL1 β , IL6 e CXCL8 em resposta à estimulação por LPS e *E. coli*.

No presente estudo, a estimulação de explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro por PAM3 não resultou em aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, diferente do observado por Borges et al. (2012) em explantes endometriais de novilhas taurinas em metaestro e por Turner et al. (2014) em cultivo primário de células epiteliais e estromais de endométrio de novilhas de corte. Borges et al. (2012) observaram aumento da produção de IL1 β , IL6 e CXCL8 em resposta à estimulação por PAM3 e Turner et al. (2014) observou maior acúmulo de IL6 e CXCL8 em resposta a peptídeos di e triacetilados. O PAM3 é uma lipoproteína triacetilada sintética, purificada, cuja porção lipopeptídica tripalmitolada mimetiza os aminoácidos acetilados da porção final das lipoproteínas de bactérias Gram-negativo e Gram-positivo. Lipoproteínas triacetiladas são potentes ativadores do fator de transcrição NF- κ B, através do seu reconhecimento pelo PRR dimérico TLR1/2 (Janeway e Medzhitov, 2002; Sheldon et al., 2014). O não aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta ao PAM3, pelos explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro, pode ser explicado pela ausência de estimulação pelo próprio

PAMP utilizado, devido à concentração utilizada ou por perda da função estimulante da lipoproteína, ou pela não formação do dímero TLR1/2, responsável pelo reconhecimento de tais lipoproteínas e desencadeamento da sinalização intracelular.

Em relação à dinâmica de produção de citocinas e seu acúmulo ao longo do tempo de cultivo sob estimulação por LPS, explantes endometriais de novilhas azebuadas em diestro elevam a produção de IL1 β dentro de 6 a 18 horas de estimulação, com acúmulos significativos após de 24 horas de cultivo. Perfil quase semelhante foi observado para a quimiocina CXCL8, cuja produção se elevou a partir de 6 a 12 horas, com acúmulos significativos já a partir das 6 horas de cultivo. A produção de IL6 se elevou logo no início da estimulação, permanecendo elevada durante 12 horas de estimulação, com acúmulos significativos detectáveis até 24 horas de cultivo. Esses resultados demonstram o importante papel desempenhado por tais citocinas durante a resposta inflamatória aguda (Baumann e Gauldie, 1994; Dinarello, 1998; Davies et al., 2008). Em processos infecciosos do útero, o reconhecimento de microrganismos invasores através de PRR em células epiteliais, estromais e fagócitos resulta na produção e secreção de conjunto de citocinas no meio extracelular, para atuação autócrina, parácrina e endócrina. A IL1 β atua sobre células adjacentes e células endoteliais das vênulas, iniciando e amplificando o processo inflamatório, induzindo a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IL6 e CXCL8, aumentando a capacidade de adesão de neutrófilos e monócitos às células endoteliais e sua migração para o tecido (Dinarello, 1994; 1998; Leung et al., 2001; Borges et al., 2012). A IL6 estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado, a produção de neutrófilos e monócitos pela medula óssea, além de atuar como agente quimiotático e ativador de fagócitos no sítio inflamatório (Baumann e Gauldie, 1994; Davies et al., 2008; Turner et al., 2014). A citocina CXCL8 atua como agente quimiotático para neutrófilos, ativando e direcionando-os da corrente circulatória para o sítio inflamatório. Os neutrófilos são as principais células efetoras em respostas inflamatórias agudas e sua estimulação por CXCL8 resulta em maior capacidade de adesão ao endotélio das vênulas e de destruição de microrganismos (Schaefer et al., 2004; Turner et al., 2014; Tizard, 2013; Kumar et al., 2015).

Utilizando explantes endometriais de novilhas taurinas em metaestro estimulados por LPS, Borges et al. (2012) observaram dinâmica de produção e acúmulo de IL1 β e IL6 semelhantes aos encontrados no presente estudo. Entretanto, a dinâmica de produção de CXCL8 não se alterou durante os períodos de estimulação por LPS e apenas foi observado acúmulo extremamente significativo dessa citocina após 24 horas de cultivo, diferente do observado no presente estudo, onde o acúmulo já se mostrou significativo com seis horas de cultivo. Em trabalhos de Chapwanya et al. (2009) e Fischer et al. (2010), os autores observaram aumento da expressão de RNAm para CXCL8 no endométrio de vacas taurinas em pós-parto recente ou acometidas por endometrite citológica. Isso demonstra que a CXCL8 possui ação pró-inflamatória nos processos infecciosos uterinos logo após o parto, como também em processos inflamatórios crônicos relacionados com subfertilidade, onde se observa aumento da população de neutrófilos no endométrio durante a fase de diestro (Fischer et al., 2010; Gabler et al., 2010).

Para avaliação da influência dos hormônios esteroides sexuais sobre a produção de citocinas por explantes endometriais estimulados por LPS, foram utilizados explantes endometriais de novilhas azebuadas em todas as fases do ciclo estral. Dessa forma, foi possível avaliar os efeitos dos ambientes endócrinos com baixa concentração de hormônios esteroides (Fase I - metaestro), com predominância de progesterona (Fase II - diestro) e com predominância de estrógeno (Fase III - proestro/estro) sobre a produção de citocinas pelo tecido endometrial estimulado por LPS.

Explantos endometriais de novilhas azebuadas sob estimulação por LPS elevam a produção de IL6 e CXCL8 no metaestro, de IL1 β e IL6 no diestro e apenas de IL1 β no proestro/estro. Entretanto não há diferenças entre as produções de citocinas pró-inflamatórias por explantes endometriais de novilhas azebuadas, em diferentes fases do ciclo estral, estimulados por LPS. Isso demonstra que o ambiente endócrino regente nas diferentes fases do ciclo estral não influencia diretamente na capacidade da resposta imune inata uterina. Logo a característica de maior ou menor susceptibilidade a processos infecciosos e inflamatórios do útero é consequência de associações entre diversos fatores físicos, endócrinos, celulares e moleculares.

Resultados de trabalhos recentes demonstraram, assim como o presente estudo, que as diferentes fases do ciclo estral e os hormônios esteroides sexuais não exercem influência sobre a resposta inflamatória do endométrio *in vitro* (Borges et al., 2012; Saut et al., 2014; Turner et al., 2014). Borges et al. (2012) demonstraram que explantes endometriais de novilhas taurinas, em diferentes fases do ciclo estral, acumularam mais citocinas pró-inflamatórias frente ao estímulo pelo LPS, porém sem diferença significativa entre fases do ciclo estral. Explantes endometriais e culturas de células epiteliais e estromais purificadas, previamente sensibilizados por estrógeno ou progesterona, respondem com o aumento da expressão e produção de citocinas após desafio com LPS ou lipopeptídeos, porém esse aumento não é afetado pelos hormônios esteroides (Saut et al., 2014; Turner et al., 2014). Além disso, os mesmos trabalhos de Turner et al. (2014) e Saut et al. (2014) demonstraram, respectivamente, redução na produção de IL6 em culturas de células epiteliais e estromais purificadas desafiadas por lipopeptídeos e redução na produção de IL1 β por explantes endometriais desafiados com LPS, quando os mesmos foram pré-sensibilizados pelo corticosteroide dexametasona. Isso demonstra o efeito supressor de esteroides sobre a ativação do fator de transcrição NF- κ B e, conseqüentemente, sobre a transcrição de RNAm e síntese de citocinas pró-inflamatórias (Ogawa et al., 2005; Herath et al., 2006a; King et al., 2010).

Diante dos resultados obtidos e discutidos no presente trabalho, rejeita-se a hipótese de menor produção de citocinas pró-inflamatórias pelo endométrio de novilhas azebuadas frente à estimulação por PAMP, conferindo maior resistência aos processos infecciosos uterinos em tais animais e rejeita-se também a hipótese de variações dos hormônios esteroides sexuais durante o ciclo estral determinam períodos de maior ou menor susceptibilidade às infecções bacterianas do útero em fêmeas azebuadas.

7. CONCLUSÕES

Explantos endometriais de novilhas azebuadas em diestro respondem com produção de citocinas pró-inflamatórias IL1 β , IL6 e CXCL8 à estimulação por lipopolissacarídeo (LPS) e produção apenas de IL1 β à estimulação por peptídeoglicano (PGN).

Explantos endometriais de novilhas azebuadas em diestro acumulam maiores concentrações de IL1 β , IL6 e CXCL8 logo após o início da estimulação por lipopolissacarídeo (LPS), indicando o importante papel que tais citocinas desempenham na resposta inflamatória aguda.

As diferentes fases do ciclo estral não exercem influência sobre a produção de citocinas IL1 β , IL6 e CXCL8 por explantes endometriais de novilhas azebuadas em resposta à estimulação por lipopolissacarídeo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYGUNAWARDENA, H.; DEMATAWEWA, C. M. B. Pre-pubertal and postpartum anestrus in tropical Zebu cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82 e83, 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.
- AKIRA, S. Editorial - Toll-like receptors families: structure and function. *Semin. Immunol.*, v.16, p.1-2, 2004.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and immunity. *Cell*, v.124, p.783-801, 2006.
- ALENCAR, M. M.; BARBOSA, P. F. Melhoria genética 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: 06 de dez. 2016.
- ALSEMGEEST, S. P.; TAVERNE, M. A.; BOOSMAN, R.; et al. Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, n.1, p.164-167, 1993.
- AMARAL, R.; RUAS, J. R. M.; MARCATTI NETO, A.; et al. Sistema de produção de leite em pasto com vacas F1 HZ. Belo Horizonte: EPAMIG, 2006. 32p. Boletim Técnico 78.
- AMOS, M. R.; HEALEY, G. D.; GOLDSTONE, R. J. et al. Differential endometrial cell sensitivity to a cholesterol-dependent cytolysin links *Trueperella pyogenes* to uterine disease in cattle. *Biol. Reprod.*, v.90, n.3, p.1-13, 2014.
- ARCHBALD, L. F.; SCHULTZ, R. H.; FAHNING, M. L.; et al. A sequential histological study of the post-partum bovine uterus. *J. Reprod. Fert.*, v.29, p.133-136, 1972.
- AZAWI, O.I. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.105, p.187-208, 2008.
- AUSUBEL, F. M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.*, v.6, p.973-979, 2005.
- BAUMANN, H.; GLAUDIE, J. The acute phase response. *Immunol. Today*, v.15, n.2, p.74-80, 1994.
- BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.*, v.73, p.2804-2819, 1995.
- BOM DURANT, R. H. Inflammation in the bovine reproductive tract. *J Dairy Sci.*, v.82, n.2, p.101-110, 1999.
- BORGES, A. 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.

- BORSBERRY, S.; DOBSON, H. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *Vet. Rec.*, v.124, p.217-219, 1989.
- BROMFIELD, J. J.; SANTOS, J. E. P.; BLOCK, J. et al. Uterine infection: linking infection and immunity with infertility in the high-producing dairy cow. In: PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM. *J. Anim. Sci.*, v.93, p.2021-2033, 2015.
- BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I. M. Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. *Endocrinology*, v.152, p.5029-5040, 2011.
- BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I. M. Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex *ex vivo* and in the murine ovary *in vivo*. *Biol. Reprod.*, v.88, n.4, p.1-9, 2013.
- BUTLER, W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60, p.449-457, 2000.
- BUTLER, W. R. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartumdairy cows. *Livest. Prod. Sci.*, v.83, p.211-218, 2003.
- 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.
- CAMARGOS, A. S.; GIOSSO, 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.
- CHALLIS, J. R.; LOCKWOOD, C. J.; MYATT, L.; et al. Inflammation and pregnancy. *Reprod. Sci.*, v.16, p.206-215, 2009.
- 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 tool in bovine reproduction. *Theriogenology*, v.73, p.988-994, 2010.
- CHAPWANYA, A.; MEADE, K. G.; FOLEY, C. et al. The postpartum endometrial inflammatory response: a normal physiological event with potential implications for bovine fertility. *Reprod., Fertil. and Dev.*, v.24, p.1028-1039, 2012.
- 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.; et al. 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, n.2, p.1-9, 2012.

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.53, 2008.

DAVIS, B. K.; WEN, H., TING, J.P-Y. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol.*, v.29, p.707-735, 2011.

DEGUILLAUME, L.; GEFFRE, A.; DESQUILBET, L.; et al. Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.95, p.1776-1783, 2012.

DE BOER, M. W.; LEBLANC, S. J.; DUBUC, J.; et al. Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.97, p.3983-3999, 2014.

DINARELLO, C. A. The interleukin-1 family: 10 years of Discovery. *The FASEB Journal*, v.8, p.1314-1325, 1994.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.856, p.1-11, 1998.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. *Eur. J. Immunol.*, v.37, p.S34-S45, 2007.

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.

DOBSON, H.; SMITH, R.; ROYAL, R. et al. The high-producing dairy cow and its reproductive performance. *Reprod. Domest. Anim.*, v.42, n.2, p.17-23, 2007.

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, 2010.

ESPOSITO, G.; IRONS, P. C.; WEBB, E. C.; et al. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.144, n.3-4, p.60-71, 2014.

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.

FERREIRA, A. M. Manejo reprodutivo e sua importância na eficiência da atividade leiteira. Coronel Pacheco, MG: EMBRAPA-CNPGL, 1991. 47p.

- FERGANI, C.; ROUTLY, J. E.; JONES, D. N.; et al. Kisspeptin, c-Fos and CRFR type 2 expression in the preoptic area and mediobasal hypothalamus during the follicular phase of intact ewes, and alteration after LPS. *Physiology & Behavior*, v.110–111, p.158–168, 2013.
- FISCHER, C.; DRILLICH, M.; ODAU, S.; et al. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.22, p.818–829, 2010.
- FOURICHON, C.; SEEGER, H.; MALHER, X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology*, v.53, p.1729-1759, 2000.
- GABLER, C.; FISCHER, C.; DRILLICH, M.; et al. Time-dependent mRNA expression. Of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.8, p.152-160, 2010.
- GALVÃO, K. N.; FRAJBLAT, M.; BRITTIN, S. B.; et al. Effect of prostaglandin F_{2α} on subclinical endometrites and fertility in dairy cow. *J. Dairy Sci.*, v.92, p.4906-4913, 2009.
- GALVÃO, K. N.; SANTOS, N. R.; GALVÃO, J. S. et al. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology*, v.76, p.290-299, 2011.
- GIER, H. T.; MARION, G. B. Uterus of the cow after parturition: involutinal changes. *Am. J. Vet. Res.*, v.29, p.83-96, 1968.
- GILBERT, R. O.; SHIN, S. T.; GUARD, C. L. et al. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, v.64, p.1879-1888, 2005.
- GIRARDIN, S. E.; BONECA, I. G.; CARNEIRO, L. A. et al. NOD1 detects a unique muropeptide 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.
- 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, 1999.
- GRIFFIN, J. F. T.; HARTIGAN, P. J.; NUNN, W. R. Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometrites during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology*, v.1, p.91–106, 1974.
- HASHIMOTO, C.; HUDSON, K. L.; ANDERSON, K. V. The toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, v.52, p.269-279, 1988.

- HERATH, S.; BRYANT, C. E.; SHELDON, I. M. Bovine endometrial cells express toll-like receptor 4 (TLR4) and secrete prostaglandins in response to lipopolysaccharide. *Endocrine Abstracts*, v.10, OC24, 2005.
- 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, n.1, p.562-570, 2006^a.
- HERATH, S.; DOBSON, H.; BRYANT, C. E.; et al. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. *J. Reprod. Immunol.*, v.69, p.13-22, 2006b.
- HERATH, S.; WILLIAMS, E. J.; LILLY, S. T.; et al. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction*, v.134, p.683-693, 2007.
- HERATH, S.; LILLY, S. T.; FISCHER, D. P.; et al. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F_{2α} to prostaglandin E₂ in bovine endometrium. *Endocrinology*, v.150, n.4, 1912-1920, 2009^a.
- 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, p.55-67, 2009b.
- HERMAN, A. P.; MISZTAL, T.; ROMANOWICZ, K.; et al. Central injection of exogenous IL-1β in the control activities of hypothalamic-pituitary-gonadal axis in anestrous ewes. *Reprod. Domest. Anim.*, v.47, p.44-52, 2012.
- HERMAN, A. P.; HERMAN, A.; TOMASZEWSKA-ZAREMBA, D. Immune stress up regulates TLR4 and Tollip gene expression in the hypothalamus of ewes. *J. Anim. Feed Sci.*, v.22, p.13-18, 2013.
- HIRVONEN, J.; HUSZENICZA, G.; KULCSÁR, M. et al. Acute-phase response in dairy cows with acute postpartum metritis. *Theriogenology*, v.51, p.1071-1083, 1999.
- 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.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Produção da Pecuária Municipal*: Rebanho Bovino alcança a marca recorde de 215,2 milhões de cabeças, mas produção de leite cai 0,4%. Rio de Janeiro: IBGE, 2016. Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&idnoticia=3268&busca=1&t=ppm-rebanho-bovino-alcanca-marca-recorde-215-2-milhoes-cabecas-producao-leite>. Acesso em: 06 dez. 2016.
- IRELAND, J. J.; MURPHEE, R. L., COULSON, P. B. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J. Dairy. Sci.*, v.63, p.155-160, 1980.
- JANEWAY, C. A. Jr; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annu. Ver. Immunol.*, v.20, p.197-216, 2002.

- JANEWAY JR, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; et al. Infectious agents and how they cause disease. In: IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE. New York: Garland Publishing, 2001. p.382–388.
- JOST, B. H.; BILLINGTON, S. J. Arcanobacterium pyogenes: molecular pathogenesis of na animal opportunist. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.88, p.87-102, 2005.
- 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.
- KINDAHL, H.; BEKANA, M.; KASK, K. et al. Endocrine aspects of uterine involution in the cow. *Reprod. Dom. Anim.*, v.34, p.261-268, 1999.
- KING, A. E.; COLLINS, F.; KLONISCH, T.; et al. Na additive interaction between the NFkappaB and estrogen receptor signalling pathways in human endometrial epithelial cells. *Hum. Reprod.*, v.25, p.510-518, 2010.
- 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.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 9. ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2015. 1391p.
- LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometrites and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.2223-2236, 2002.
- LEBLANC, S. J. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *The Vet. J.*, v.176, p.102-114, 2008.
- LEBLANC, S. J.; OSAWA, T.; DUBUC, J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v.76, p.1610-1618, 2011.
- LEBLANC, S. J. Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. *Animal*, v.8, n.1, p.54-63, 2014.
- LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L.; et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/ Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, v.86, p.973–983, 1996.

- LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B. et al. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*, v.130, p.485-495, 2005.
- LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; VAN KNEGSEL, A. T. M.; et al. Nutrient Prioritization in Dairy Cows Early Postpartum: Mismatch Between Metabolism and Fertility? *Reprod. Dom. Anim.*, v.43, n.2, p.96-103, 2008.
- LEUNG, S. T.; CHENG, Z.; SHELDRIK, E.L.; et al. The effects of lipopolysaccharide and interleukins-1alpha, -2 and -6 on oxytocin receptor expression and prostaglandina production in bovine endometrium. *J. Endocrinol.*, v.168, p.497-508, 2001.
- 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. Endocrinol.*, v.1, p.117, 2003.
- 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.
- MADOZ, L. V.; GIULIODORI, M. J.; JAUREGUIBERRY, M. et al. The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.96, p.1-7, 2013.
- MARKUSFELD, O. Periparturient traits in seven high dairy herds: incidence rates, association with parity, and interrelationships among traits. *J. Dairy Sci.*, v.70, p.158-166, 1987.
- 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, n.5, p.1348-1356, 2013.
- MARTINS, T. M.; SANTOS, R. L.; PAIXÃO, T. A.; et al. Imunidade inata uterine em vacas após o parto. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.38, n.4, p.214-219, 2014.
- MCDOUGALL, S. Effect of intrauterine antibiotic treatment on reproductive performance of dairy cows following periparturient disease. *N. Z. Vet. J.*, v.49, p.150-158, 2001.

- MCDUGALL, 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.
- MCDUGALL, S.; BOER, M.; COMPTON, C.; et al. Clinical trial of treatment programs for purulent vaginal discharge in lactating dairy cattle in New Zealand. *Theriogenology*. V.79, p.1139-1145, 2013.
- 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.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the Drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, v.388, p.394-397, 1997.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, v.9, p.4-9, 1997.
- MUZIO, M.; MANTOVANI, A. Toll-like receptors. *Microbes and Infection*, v.2, p.251-255, 2000.
- OGAWA, S.; LOZACH, J.; BENNER, C.; et al. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and Toll-like receptors. *Cell*, v.122, p.707-721, 2005.
- OLSON, J. D.; BALL, L.; MORTIMER, R. G.; et al. Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with piometra and retained fetal membranes. *Am. J. Vet. Res.*, v.45, p.2251-2255, 1984.
- OVERTON, M.; FETROW, J. Economics of postpartum uterine health. Dairy Cattle Reproduction Council Convention Omaha, Nebraska, 2008, p 39-44.
- PETROFF, M.G.; PETROFF, B.K.; PATE, J.L. Mechanisms of cytokine-induced death of culture bovine luteal cells. *Reproduction*, v.121, p.753-760, 2001.
- PETZL, N. Periparturient expression of endometrial Toll-like receptors and β -defensins in cattle (Abstract). 2007. 168p. Tesis (Doctor of Veterinary Medicine) - Hannover School of Veterinary Medicine, Hannover.
- 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.
- POTHMANN, H.; PRUNNER, I.; WAGENER, K. et al. The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows. *Theriogenology*, v.83, p.1249-1253, 2015.

PRICE, J. C.; BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I. M. Pathogen-associated molecular patterns initiate inflammation and perturb the endocrine function of bovine granulosa cells from ovarian dominant follicles via TLR2 and TLR4 pathways. *Endocrinology*, v.154, p.3377–3386, 2013.

PRICE, J. C.; SHELDON, I. M. Granulosa cells from emerged antral follicles of the bovine ovary initiate inflammation in response to bacterial pathogen-associated molecular patterns via Toll-like receptor pathways. *Biol. Reprod.*, v.89, n.5, p.119-130, 2013.

QUAYLE, A. J. et al. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J. Reprod. Immunol.*, v.57, p.61-79, 2002.

RINALDI, M.; CECILIANI, F.; LECCHI, C.; et al. Differential effects of alpha1-acid glycoprotein on bovine neutrophil respiratory burst activity and IL-8 production. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.126, p.199-210, 2008.

ROMANO, M.; SIRONI, M.; TONIATTI, C.; et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leucocyte recruitment. *Immunity*, v.6, p.315-325, 1997.

ROWSON, L. E.; LAMMING, G. E.; FRY, R. M. Influence of ovarian hormones on uterine infection. *Nature*, v.171, p.749-750, 1953.

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.; SILVA, E. A.; QUEIROZ, D. S.; et al. Vacas F1 Holandês x Zebu: uma opção para sistema de produção de leite em condições tropicais. *Inf Agropec.*, v.35, p.113-120, 2014.

RUDER, C. A.; SASSER, R. G.; WILLIAMS, R. J.; et al. Uterine infections in the postpartum cow, II: possible synergistic effect of *Fusobacterium necrophorum* and *Corynebacterium pyogenes*. *Theriogenology*, v.15, p.573–580, 1981.

SALASEL, B.; MOKHTARI, A.; TAKTAZ, T. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology*, v.74, p.1271-1278, 2010.

SANNMANN, I; ARLT, S; HEUWIESER, W. A critical evaluation of diagnostic methods used to identify dairy cows with acute post-partum metritis in the current literature. *J. Dairy Sci.*, v.79, p.436-444, 2012.

SAUT, J. P. E.; HEALEY, G. D.; BORGES, A. M.; et al. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS *in vitro*. *Reproduction*, v.148, p.593-606, 2014.

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.

SCHAFER, W. R.; FISCHER, L.; ROTH, K. et al. Critical evaluation of human endometrial explants as an ex vivo model system: a molecular approach. *Moll. Hum. Reprod.*, v.17, p.255-65, 2011.

SEALS, R. C.; WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; LEWIS, G. S. Uterine response to infectious bacteria in estrous cyclic ewes. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.49, p.269–278, 2003.

SECRETARIA DE ESTADO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO DE MINAS GERAIS. *Bovinocultura: leite e corte*. Belo Horizonte: SEAPA-MG, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq_Relatorios/Pecuaria/2016/Dez/bovinocultura_leite_corte_dez_2016.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2016.

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.837-8845, 2002.

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, 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, 2009a.

SHELDON, I.M.; PRICE, S.B.; CRONIN, J. et al. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod. Dom. Anim.*, v.44, supl.3, p.1-9, 2009b.

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, n.9, p.1-10, 2010.

SHELDON, I. M.; CRONIN, J. G.; HEALEY, G. D.; et al. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. *Reproduction*, v.148, p.R41-R51, 2014.

SHAW, M. H.; REIMER, T.; KIM, Y. G.; et al. NOD-like receptors (NLRs): bonafide intracellular microbial sensors. *Curr. Opin. Immunol.*, v.20, p.377-382, 2008.

SICA, A.; MATSUSHIMA, K.; VAN, D. J.; et al. IL-1 transcriptionally activates the neutrophil chemotactic factor/IL-8 gene in endothelial cells. *Immunology*, v.69, p.548-553, 1990.

SIEGMUND, B.; LEHR, H. A.; FANTUZZI, G.; et al. IL-1 beta – converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.98, p.13249-13254, 2001.

SKARZYNSKI, D. J.; MIYAMOTO, Y.; OKUDA, K. Production of prostaglandin F₂α by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor α: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Biol. Reprod.*, v.62, p.1116-1120, 2000.

- 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.
- SPENCER, T. E. Early pregnancy: concepts, challenges and potential solutions. *Animal Frontiers*, v.3, n.4, p.48-55, 2013.
- STEEL, D. M.; WHITEHEAD, A. S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, sérum amyloid P componente and sérum amyloid A protein. *Immunol. Today*, v.15, n.2, p.81-88 1994.
- STROBER, W.; MURRAY, P. J.; KITANI, A.; et al. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Ver. Immunol.*, v.6, p.9-20, 2006.
- SWANGCHAN-UTHAI, T.; LAVENDER, C. R. M.; , CHENG, Z. et al. Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide. *Biol. Reprod.*, v.87, p.1-13, 2012.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. *Sem. Immunol.*, v.16, p.3-9, 2004.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Toll-like receptors: their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.*, v.1, p.625-635, 2001.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, v.140, p.805-820, 2010.
- TIZARD, I. R. *Veterinary Immunology*. 9. ed. Philadelphia: Saunders-Elsevier, 2013. 568p.
- TROWELL, O. A. The culture of mature organs in a synthetic médium. *Exp. Cell Res.*, v.16, p.118-147, 1959.
- TURNER, M. L.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Immunity and inflammation in the uterus. *Reprod. Dom. Anim.*, v.47, p.402-409, 2012.
- TURNER, M. L.; Cronin, J. G.; Healey, G. D.; et al. Epithelial and stromal cells of bovine endometrium have roles in innate immunity and initiate inflammatory responses to bacterial lipopeptides in vitro via Toll-like receptors TLR2, TLR1, TLR6. *Endocrinology*, v.155, n.4, p.1453-1465, 2014.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. *Dairy: world markets and trade*. Washington: USDA, 2016. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2016.
- VILELA, D. Cruzamento errado pode deteriorar a genética. *Noticiário Tortuga*, São Paulo, ano 49, n.432, Jul-Ago, 2003.
- WATHES, D. C.; CHENG, Z.; CHOWDHURY, W.; et al. Negative energy balance alters global gene expression and imune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiol. Genomics*, v.39, p.1-13, 2009.

WERLING, D.; SUTTER, F.; ARNOLD, M.; et al. Characterization of acute phase response of heifers to a prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide. *Res. Vet. Sci.*, v.61, p.252-257, 1996.

WERLING, D.; JUNGI, T. W. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.91, p.1-12, 2003.

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.

WIRA, C. R.; FAHEY, J. V.; GHOSH, M. et al. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.53, p.65-76, 2005.

WIRA, C. R.; GRANT-TSCHUDY, K. S.; CRANE-GODREAU, M. A. et al. Sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.63, p.544-565, 2010.

WIRA, C. R.; PATEL, M. V.; GHOSH, M.; et al. Innate immunity in the human female reproductive tract: endocrine regulation of endogenous antimicrobial protection against HIV and other sexually transmitted infections. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.65, p.196-211, 2011.

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.

9. ANEXOS

Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
<p>Senhor(a) Professor(a) Álan Maia Borges,</p> <p>Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Caracterização da resposta imune inata do útero de fêmeas Zebu por meio de estudos "in vitro" com explantes endometriais, submetido a esta comissão pelo protocolo 158 / 2013, a CEUA decidiu aprovar a sua solicitação.</p> <p>Justificativa: Aprovado na reunião do dia 09/12/2013.</p> <p>Para acessar ao seu projeto clique no link: https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/ Belo Horizonte, 10/12/2013.</p> <p>Atenciosamente.</p> <p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p> <p>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</p>	