

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DAYANE OLÍMPIA GOMES

**Produção de IL-6 e IL-1 β em cultivos *ex vivo* de endométrio bovino inoculados com
Leptospira interrogans sorovar Hardjoprajitno**

**UBERLÂNDIA
2020**

DAYANE OLÍMPIA GOMES

Produção de IL-6 e IL-1 β em cultivos *ex vivo* de endométrio bovino inoculados com
Leptospira interrogans sorovar Hardjoprajitno

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro
Correia Lima

UBERLÂNDIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/016/2020				
Data:	14 de agosto de 2020	Hora de início:	08:30	Hora de encerramento:	12:00
Matrícula do Discente:	11613VET003				
Nome do Discente:	DAYANE OLIMPIA GOMES				
Título do Trabalho:	Produção de IL-6 e IL-1 β em cultivos <i>ex vivo</i> de endométrio bovino inoculado com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Hardjoprajitno.				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	ESTUDOS DE EPIDEMIOLOGIA, DE NOVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO E PREVENÇÃO DE DOENÇAS BACTERIANAS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E SELVAGENS				

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico), a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **João Paulo Elsen Saut - UFU; Ricarda Maria dos Santos - UFU; Paula Carvalho Lage von Buettner Ristow - UFBA; Cristiano Pereira Barbosa - UNIUBE; Anna Monteiro Correia Lima** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dra. Anna Monteiro Correia Lima, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Anna Monteiro Correia Lima, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/08/2020, às 12:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Carvalho Lage von Buettner Ristow, Usuário Externo**, em 14/08/2020, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **CRISTIANO PEREIRA BARBOSA, Usuário Externo**, em 14/08/2020, às 22:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 15/08/2020, às 08:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Paulo Elsen Saut, Professor(a) do Magistério Superior**, em 15/08/2020, às 22:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2074516** e o código CRC **77936320**.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

G633 2020	<p>Gomes, Dayane Olimpia, 1983- Produção de IL-6 e IL-1B em cultivos ex vivo de endométrio bovino inoculados com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Hardjoprajitno [recurso eletrônico] / Dayane Olimpia Gomes. - 2020.</p> <p>Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima . Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós- graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.596 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Veterinária. I. , Anna Monteiro Correia Lima,1973-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.</p>
--------------	---

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

Produção de IL-6 e IL-1 β em cultivos *ex vivo* de endométrio bovino inoculados com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal de Uberlândia, pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 14 de agosto de 2020

Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima (Orientadora) – FAMEV/UFU

Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut – FAMEV/UFU

Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos – FAMEV/UFU

Profa. Dra. Paula Carvalhal Lage Von Buetther Ristow – UFBA

Prof. Dr. Cristiano Pereira Barbosa – UNIUBE

AGRADECIMENTOS

A defesa do meu doutorado significa o fim de uma década em um local que se tornou minha segunda casa todos estes anos, não só pelo fato de permanecer neste local por muitas horas do dia, mas por toda vivência com pessoas maravilhosas. Agradeço a elas (família LADOC), a Deus e também a minha família por tudo que conquistei. Não seria nada do que eu sou depois de tudo e todos que conheci, aprendi, construí, e mais que isso, sou uma pessoa feliz pela oportunidade de ter vivido cada momento de incerteza, trabalho, dificuldade e muitos momentos especiais e de muita alegria que marcaram minha história. Agradeço então aos meus amigos Gabriela Bim (minha irmã de residência), querida Marília que me acompanhou em tudo e sempre tive o maior carinho, Pollyanna Mafra (minha fã), a técnica Lara (super dedicada e alto astral), minhas pupilas eternas de coração Lígia e Thais (seres humanos incríveis), as residentes maravilhosas Gabriela Alves, Melissa e Gabriela Ribeiro, os antigos residentes que são amigos queridos Danilo e Bruno, as queridas Ana Buiate e Carolina, e por último meu agradecimento especial à minha amiga que foi minha força para levantar todos dias e que tenho um enorme carinho, Andreia. Eu, Andreia e Laís (pessoa forte, mas com interior muito doce) formamos um trio de força e muita alegria no prédio do 2D, momentos que sentirei muita saudade. Agradeço à minha família que sempre estimulam a educação, os estudos e passam força e apoio sempre, especialmente à minha mãe Gélia que é uma guerreira e melhor mãe do mundo e à minha vó Marlene, minha segunda mãe. Amo todos, minha família sempre foi minha base. Ao meu esposo Francisley que sempre me apoiou e estimulou com carinho e força. Aos mestres professores que sempre estão dispostos a guiar seus alunos, em particular a professora Anna que juntas passamos por muitos momentos, de crescimento, de alegria e dificuldades, mas que no fim foram muito importante para nós e que agora, com o fim dessa etapa de vida, espero sempre ter sua amizade. Ao professor João Paulo pela oportunidade, paciência e troca de conhecimento para realização desse estudo. Enfim à Deus, nada seria como foi se Ele não permitisse, foi imenso na sua fortaleza quando precisei e foi maravilhoso por todas as dádivas de vida que conquistei nesse caminho.

RESUMO

Leptospirose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira spp.* Existem relatos de isolamento desta bactéria no trato genital de fêmeas, relacionado à abortamento e infertilidade no rebanho bovino. Já se sabe que a *Leptospira* presente nos órgãos reprodutivos de bovinos causa danos teciduais principalmente pela vasculite. Além disso, a leptospirose aguda produz níveis altos de citocinas durante a fase inicial de infecção. Entretanto, faltam estudos sobre a patogênese desse microrganismo no endométrio de vacas. Objetivou-se avaliar o perfil das citocinas inflamatórias após o desafio com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno e ao LPS de *Escherichia coli* produzidas pelo tecido uterino *ex vivo* coletados de vacas não gestantes e gestantes reativas sorologicamente ou não ao Teste de soroaglutinação microscópica (MAT). Foram utilizados 43 úteros com respectivas amostras de sangue coletadas de vacas mestiças, sendo 19 delas não gestantes (19/43) e 24 gestantes (24/43), todas sem evidência de doença clínica. Para determinação da fase gestacional foi realizada através das medidas dos fetos. Para análise de uma prévia infecção foram avaliados anticorpos anti-*Leptospira*, por meio do teste de aglutinação microscópica (MAT). Após a exposição do endométrio, com auxílio de um *punch* de 8 mm foram retirados fragmentos de endométrio (explantes) foram retirados nas regiões intercarunculares. O processamento dos explantes endometriais ocorreu em placas de cultura celular de 24 poços. As soluções adicionadas sobre os explantes foram as seguintes: a) meio controle, contendo 2 mL de solução de RPMI; b) meio RPMI, contendo 1 µg/mL de LPS de *Escherichia coli*; c) meio EMJH com inóculo de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno na concentração de 10⁸ leptospirosas por mL. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ permanecendo por 24 horas. Após esse período, os tecidos endometriais foram pesados e os sobrenadantes foram recolhidos e subsequentemente testados para determinação dos perfis de produção das interleucinas 1β e 6 pelo Kits de ELISA. Em relação ao desafio com 1 µg/mL de LPS, tanto explantes das vacas não gestantes como gestantes montaram uma resposta frente ao desafio, com aumento significativo da produção de IL-6 e IL-1β em relação aos controles. No desafio com *Leptospira*, os explantes de vacas não gestantes e gestantes, houve aumento na concentração de IL-1β. Entretanto, somente explantes das vacas não gestantes houve aumento de IL-6 em relação aos controles. Na avaliação individual das fases de gestação, somente na fase inicial (primeiro trimestre) ocorreu produção de IL-6 significativa, diferente do observado com IL-1β, sendo que ocorreu diferença significativa na produção desta citocina na fase final de gestação, no desafio com 1 µg/mL de LPS de *E. coli*. Já no desafio com *Leptospira* não houve diferença significativa entre as fases gestacionais. Conclui-se que ocorre maior estimulação da produção de citocinas do endométrio de vacas reagentes, nos desafios ao LPS e à *Leptospira*; menor estimulação da produção de IL-6 ao desafio com *Leptospira* em vacas gestantes; e maior estimulação na fase inicial e final de gestação no desafio com LPS de *E. coli* e nenhuma diferença significativa entre as fases gestacionais no desafio com *Leptospira*.

Palavras-chaves: citocinas, imunidade inata, gestação, leptospirose, útero

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis caused by a bacteria belonging to genus *Leptospira spp.* There are reports of this bacteria isolation in the female reproductive tract with are related to abortion and subfertility in bovine herds. It is known that *Leptospira* presence in reproductive organs of bovines promotes tissue damages especially by vasculitis. Moreover, acute leptospirosis produces high levels of cytokines during the onset of infection. However, few studies were performed about the pathogenesis of this microorganism in the endometrium of cows. The objective of this study was to evaluate the inflammatory cytokines profile after *Leptospira interrogans* serovars *Hardjoprajitno* and LPS of *Escherichia coli* challenges produced by uterine tissue *ex vivo* of non-pregnant and pregnant cows serologically reactive or not to Microscopic Agglutination Test (MAT). A total of 43 uterus with respective blood samples were collected from crossbred cows, from those 19 were non-pregnant and 24 pregnant, without any clinical disease evidence. To determine the pregnancy phase, the measurement of fetuses were performed. To analyze previous infection occurrence antibodies against *Leptospira* were evaluated by MAT. After endometrium exposure, fragments of endometrium tissue (explants) were collected using a punch of 8 mm in intercaruncular region. The processing of endometrial explants were done in a 24-well cell culture plates. The solutions added on explants were: a) Control medium (2 mL of RPMI solution); b) RPMI medium (1µg/mL of LPS from *Escherichia coli*); c) EMJH medium with inoculum of *Leptospira interrogans* serovars *Hardjoprajitno* (108 leptospires/mL). The plates were incubated at 37°C with 5% of CO₂ for 24 hours. After this period, uterine explants were weighed and collected and subsequently tested for interleukins (IL-1β and IL-6) production profile by ELISA kits. Considering the challenge with 1µg/mL of LPS, both pregnant and non-pregnant cows build a response due to challenge with a significant increase in IL-1β and IL-6 production compared to control group. Considering the challenge with *Leptospira*, an increase of IL-6 concentration was verified in the explants of both pregnant and non-pregnant cows related to control. However, only the explants from non-pregnant cows showed an increase of IL-6 production related to control. In the individual evaluation of pregnancy phases, during the initial phase (first trimester) only occurred significant IL-6 production, differing from IL-1β which significant production increase occurred during late gestation phase in the challenge with 1µg/mL of LPS from *E.coli*. There was no difference in cytokines production according to pregnancy phase after challenge with *Leptospira*. In conclusion, a higher stimulation of cytokines production was verified in endometrial tissues of reagent cows after LPS and *Leptospira* challenges; lower stimulation of IL-6 production in pregnant cows after *Leptospira* challenge; a higher stimulation during initial and late pregnancy phases after LPS from *E.coli* challenge, and no significant difference between pregnancy phases after *Leptospira* challenge.

Key words: cytokines, innate immunity, leptospirosis, pregnancy, uterus

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	06
2.0 OBJETIVOS.....	07
3.0 REFERENCIAL TEÓRICO.....	07
3.1 Leptospirose bovina	07
3.2 Epidemiologia da leptospirose bovina no Brasil	09
3.3 Aspectos gerais do sistema imune	10
3.4 Imunologia uterina em bovinos	12
3.5 Leptospirose e sistema imune	14
3.5.1 Imunidade inata	16
3.5.2 Imunidade adquirida.....	17
3.6 Modelo explante <i>ex vivo</i>	19
4.0 METODOLOGIA.....	20
4.1 Animais e local de execução.....	20
4.2 Histologia do tecido endometrial	21
4.3 Cultivo para preparo do inóculo.....	22
4.4 Análise sorológica pelo teste de aglutinação microscópica (MAT).....	22
4.5 Delineamento experimental.....	23
4.6 Determinação do perfil de produção das interleucinas IL-1 β e IL-6.....	24
4.7 Análise estatística.....	24
5.0 RESULTADOS	24
5.1 Considerações gerais.....	24
5.2 Análise histológica dos tecidos endometriais <i>ex vivo</i> das vacas não gestantes e gestantes do grupo controle e desafiadas com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Hardjoprajitno.....	24
5.3 Soroaglutinação microscópica em campo escuro (MAT).....	26
5.4 Produção de interleucina IL-6 em tecidos endometriais <i>ex vivo</i> de vacas não gestantes e gestantes reagentes ou não ao MAT desafiado com LPS e a <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Hardjoprajitno	26
5.5 Produção de interleucina IL-1 β em tecido endometriais <i>ex vivo</i> de vacas não gestantes e gestantes soropositivas ou não ao MAT desafiadas com LPS e a <i>Leptospira interrogans</i>	

sorovar	
Hardjoprajitno.....	27
5.6 Produção de IL-6 e IL-1 β no tecido endometrial comparando as diferentes fases gestacionais das vacas reagentes ao MAT nos desafios ao LPS e <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Hardjoprajitno.....	28
6.0 DISCUSSÃO.....	30
6.1 Análise histológica dos tecidos endometriais <i>ex vivo</i> das vacas não gestantes e gestantes do grupo controle e desafiadas com <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Hardjoprajitno.....	30
6.2 Produção de interleucina IL-6 em tecidos endometriais de vacas não gestantes e gestantes reagentes ou não ao MAT desafiadas com LPS e a <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Hardjoprajitno.....	30
6.3 Produção de interleucina IL-1 β em tecidos endometriais de vacas não gestantes e gestantes reagentes ou não ao MAT desafiadas com LPS e a <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Hardjoprajitno.....	33
6.4 Produção de IL-6 e IL-1 β em tecidos endometriais de vacas comparando as diferentes fases gestacionais das vacas reagentes ao MAT nos desafios ao LPS e <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Hardjoprajitno.....	33
7.0 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS.....	36
ANEXO	47

1.INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose mundial causada por espiroquetas patogênicas pertencentes ao gênero *Leptospira spp.* (VINCENT et al., 2019). A leptospirose bovina é caracterizada principalmente por distúrbios reprodutivos, como infertilidade, aumento dos intervalos entreaios e partos, abortamentos, fetos natimortos e crias fracas (ARASHIRO et al., 2017; LIBONATI et al., 2018; LOUREIRO; LILENBAUM, 2019).

A patogênese da doença reprodutiva causada pela leptospirose ainda é pouco conhecida. De acordo com Ellis (2015), existem evidências de que possa ocorrer infecção na região transplacentária em períodos de declínio da imunidade uterina na vaca, ou seja, o organismo desse animal se torna incapaz de prevenir a infecção na região transplacentária pelas *Leptospiras* presentes no trato genital.

O sistema imunológico uterino de vacas também tem funções importantes durante a gestação, na manutenção da gestação e no crescimento fetal, além da prevenção de infecções (PULIYATH; SINGH, 2012; MENG et al., 2013). O tecido endometrial têm mecanismos locais de resposta inata (inespecífica) e adaptativa (específica / adquirida), que mudam de acordo com o *status* endócrino durante o ciclo estral, gestação e período pós-parto (SINGH et al., 2008).

As citocinas e quimiocinas são responsáveis por recrutarem e ativarem as células do sistema imune para combaterem esses patógenos. Além disso, as citocinas também têm um papel importante na evolução ou interrupção da gestação, atraindo células imunes efetoras que atuam na modulação da resposta imune na interface materno-fetal, agindo por meio de vias complexas de feedback positivo ou negativo, controlando o nível de ativação inflamatória nesse microambiente (MICHELON et al., 2006). Essa ação das citocinas pode impedir a rejeição do embrião, sem comprometer a habilidade de combater infecções uterinas provocadas por microrganismos patogênicos (MUNOZ-SUANO; HAMILTON; BETZ, 2011).

Já se sabe que a *Leptospira* presente nos órgãos reprodutivos de bovinos causam danos teciduais principalmente pela vasculite (ADLER; MOCTEZUMA, 1991). No entanto, a resposta imune inata uterina frente à *Leptospira*, ainda é pouco entendida. Para melhor compreensão da resposta imune uterina uma das técnicas utilizadas tem sido o uso de cultivo endometrial *ex vivo*, sendo possível avaliar a produção de citocinas frente ao desafio com bactérias como *Escherichia coli* em diferentes condições hormonais (BORGES; HEALEY; SHELDON, 2012; TUNER et al., 2014).

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Conhecer o perfil de produção de citocinas inflamatórias encontradas em tecido endometrial de vacas gestantes e não gestantes, por meio da técnica de explante de tecidos uterinos *ex vivo* desafiados com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno e com LPS de *E.coli*

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar se ocorre diferença na produção de citocinas inflamatórias em explantes endometriais de vacas sorologicamente reagentes ou não reagentes ao MAT, desafiados com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno e com LPS de *E.coli*.
- Verificar se ocorre diferença na produção de citocinas inflamatórias em explantes endometriais de vacas gestantes sorologicamente reagentes ao MAT em fases diferentes de gestação desafiados com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno e com LPS de *E.coli*.

3.0 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Leptospirose bovina

Leptospirose é uma zoonose causada por bactéria do gênero *Leptospira spp.* Dentro do gênero existem *Leptopiras* patogênicas e saprófitas, com mais de 300 sorovares e 64 espécies já reconhecidos. *Leptopiras* patogênicas são capazes de infectar humanos e muitos animais domésticos e selvagens, e sobrevivem e crescem em tecidos dos hospedeiros, escapando de mecanismos naturais de defesa (VINCENT et al., 2019).

Nos países tropicais, a leptospirose bovina é endêmica. As características do clima, como a alta frequência de chuvas, temperaturas quentes e pH do solo favorecem à sobrevivência de *Leptospira* e à preservação de sua patogenicidade por longos períodos;

(ANDRE-FONTAINE; AVIAT; THORIN, 2015; MARTINS; LILENBAUM, 2015). Além do que, em áreas tropicais, há vida selvagem carregando diferentes linhagens de *Leptospira* (ASSENGA et al., 2015; KREMER et al., 2016), o que aumenta a exposição do gado a um ambiente com alta carga de contaminação.

Os bovinos são hospedeiros de manutenção das cepas dos sorogrupos Serjoe, principalmente sorovar Hardjo, que consiste em duas espécies *Hardjoprajitno* e *Hardjobovis* sorologicamente indistinguíveis e geneticamente diferentes. Infecção por cepas do sorogrupo Serjoe são bem descritos em bovinos em todo o mundo (ELLIS, 2015; ANDRE-FONTAINE; AVIAT; THORIN, 2015) e particularmente na América Latina (LIBONATI; PINTO; LILENBAUM, 2017).

A transmissão pode ocorrer de forma direta ou indireta por contato com urina contaminada ou secreções uterinas pós-aborto. Alguns estudos relatam a presença da bactéria na região do trato reprodutivo de vacas (LOUREIRO et al., 2017) e sêmen de touros (MASRI et al., 1997), portanto o contágio pode ocorrer durante o acasalamento ou técnicas assistidas de reprodução.

Os sintomas são conseqüentes da ação das toxinas produzidas pelas *Leptospiras*, as primeiras lesões ocorrem no endotélio, devido à isquemia nos vasos sanguíneos dos órgãos, com conseqüente necrose tubular renal, lesões hepatocelulares e pulmonar, meningite, miosite e placentite. Além disso, podem ocorrer hemorragias em casos agudos da doença, com presença de sintomas como icterícia e deficiência plaquetária (ADLER; MOCTEZUMA, 2010 ; ELLIS, 2015).

As alterações no sistema reprodutor são consideradas um efeito secundário à patogenia renal, ou seja, efeito da bacteremia (ELLIS, 1994). Em contraste a esse fato, há algumas evidências que sugerem que a leptospirose genital deva ser considerada uma síndrome específica. Dentre essas evidências, destaca-se a presença de algumas cepas, principalmente do sorogrupo Serjoe, que tem predileição pelo trato genital, desenvolvendo alterações reprodutivas e doença uterina crônica (DHALIWAL et al., 1996). Com isso, a leptospirose genital apresenta características individuais que podem ser trabalhadas de forma separada da doença sistêmica (LOUREIRO; LILENBAUM, 2020).

O teste de aglutinação microscópica (MAT) é o método padrão-ouro para determinar a especificidade do sorovar e os títulos de anticorpos no soro dos hospedeiros infectados (TERPSTRA, 2003), usando um painel de *Leptospiras* vivas representantes dos sorovares de maior prevalência para espécie (LIBONATI; PINTO; LILENBAUM, 2017).

Um diagnóstico adequado por meio de sorologia ou PCR é essencial. Vacas que apresentam títulos baixos e sororreatividade podem não estar relacionadas à eliminação de *Leptospiras* no ambiente (HAMOND et al., 2014). Nesse contexto, a técnica de PCR na urina pode ser útil para identificar os reservatórios e eliminar o *status* de portador renal, auxiliando na redução da contaminação ambiental e de outros animais do rebanho (GAMAGE et al., 2014; AGNONE et al., 2012; VILLANUEVA et al., 2016).

A sororreatividade para leptospirose no rebanho demonstrou estar fortemente associada à repetição do estro em animais de produção. Este aspecto, muitas vezes é de difícil diagnóstico e passa despercebido em bovinos (ARASHIRO et al., 2017; LIBONATI et al., 2018), embora já tenha sido relatado em éguas (PINNA; MARTINS; LILENBAUM, 2012; PINNA et al., 2013).

Durante a gestação, a bactéria pode ser transmitida por via transplacentária, resultando em leptospirose intra-uterina. Esta condição pode produzir isquemia e placentite na vaca, resultando em hemorragias, insuficiência hepato-renal no feto e até morte fetal. Caso o feto permaneça viável, pode apresentar anormalidades no desenvolvimento (ELLIS, 1994; ADLER; MOCTEZUMA, 2010; ELLIS, 2015).

Embora exija vigilância constante, para que ocorra uma clara redução de possíveis impactos econômicos da doença, é recomendado um sistema integrado baseado em antibioticoterapia, alterações específicas de manejo e vacinação. Com isso, impede-se a transmissão da bactéria, porém não a elimina do rebanho, mas reduz amplamente a falha reprodutiva (MUGHINI-GRAS et al., 2014). Assim, um programa de controle também deve ser claramente apresentado e entendido como uma abordagem constante e de longo prazo, com monitoramento constante do rebanho, a fim de evitar o surgimento com maior intensidade da doença (ELLIS, 2015; MARTINS; LILENBAUM, 2017).

3.2 Epidemiologia da leptospirose bovina no Brasil

Nos países tropicais como o Brasil, a leptospirose bovina é endêmica e está vinculada ao clima com a alta afluência de chuvas, temperaturas quentes e pH do solo desta forma apresentam condições que são adequadas para à sobrevivência de *Leptospiras* patogênicas e à preservação por longos períodos (ANDRE-FONTAINE; AVIAT; THORIN, 2015). Além do mais, nessas países a presença de animais selvagens que são carreadores de diferentes cepas de *Leptospira* (ASSENGA et al., 2015)

Vários estudos afirmam que sorovares Hardjo, Wolffi, Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae e Canicola são os mais frequentes, sendo o Hardjo o mais comum em bovinos (PAIXÃO et al., 2016). No Brasil, taxas de prevalência mais altas para *Leptospira* spp. são encontradas na região Centro-Oeste, principalmente no estado de Mato Grosso do Sul com 98,8% (FIGUEIREDO et al., 2009), assim como nos estados da região Nordeste, como no estado do Maranhão como apontado por Paixão et al., (2016) com prevalência de 100% da doença .

Os mais baixos índices da doença são encontrados na região Sul do país, Fávero et al., (2017) avaliaram bovinos leiteiros da região de Santa Catarina descreveram uma prevalência de 6,62% e a ocorrência da doença reprodutiva nessa região foi correlacionada a *Leptospira interrogans* Sorogrupo Sejroe (principal o sorovar Hardjoprajtino).

No estado de Minas Gerais, são poucos estudos sobre levantamentos sorológicos para averiguar a situação da leptospirose bovina, assim como os sorogrupos mais frequentes ocorridos nos rebanhos bovinos do estado. Favero et al., (2001) apontaram pesquisas no estado com prevalência de 41,3% reagentes sendo as maiores taxas aos sorovares do sorogrupo Serjo. Recentemente em estudo de Soares et al.(2018), analisando amostras de bovinos abatidos em frigoríficos com fiscalização federal encontraram prevalência de 71,8% para doença, com destaque também para os sorogrupo Serjoe .

3.3 Aspectos gerais do Sistema Imune

O sistema imune é responsável por detectar e eliminar patógenos invasores, uma vez que consegue discriminar o que é ou não próprio do organismo (CHAPLIN, 2010). Nos mamíferos, o sistema imune pode ser dividido em duas amplas categorias, a imunidade inata e a imunidade adaptativa (BONILLA; OETTGEN, 2010).

A imunidade inata é a defesa não específica contra microrganismos, e inclui barreiras da pele e mucosas, peptídeos antimicrobianos, sistema complemento e células que apresentam receptores de reconhecimento de padrões (PRR) (BONILLA; OETTGEN, 2010; TURNER; HEALEY; SHELDON,2012) composta por células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos natural killer (NK). Esse sistema é responsável por reconhecer padrões moleculares associados a patógenos, os PAMP's (WIRA et al., 2005; SOUSA, 2014)

O Sistema Imune Adaptativo se desenvolve após a exposição a patógenos, onde após a exposição destes pelas células apresentadoras de antígenos (APC's), há um reconhecimento

pelos receptores expressos na superfície de linfócitos T e B. Após ocorrer a ativação dos linfócitos, iniciará a produção de citocinas, síntese de anticorpos e citotoxicidade (WIRA et al., 2005; AOKI; NARUMIYA, 2012). Esse sistema elabora uma resposta mais específica para cada desafio antigênico que venha a enfrentar, gerando uma memória imunológica que será responsável pela proteção do hospedeiro na próxima vez em que ele entrar em contato com esse mesmo antígeno (MARTINS et al., 2016).

As principais células imunológicas envolvidas na produção de citocinas são os linfócitos T CD4⁺ auxiliares (T-helper), os quais podem ser subdivididos em várias linhagens já reconhecidas, como Th0, Th1, Th2, Th17 e células T regulatórias (Treg), sendo esta última responsável por regular as outras Th e induzir tolerância (SAITO et al., 2010). Os linfócitos T-helper são classificados com base nas citocinas produzidas, onde o Th1 produz as citocinas pró-inflamatórias IL2, interferon gama e TNF, por exemplo, que ativam macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos. Já o Th2 produz citocinas anti-inflamatórias, como IL-5 e IL-4 (SILVA et al., 2010).

A interleucina 1 β (IL-1 β) é uma citocina inflamatória essencial que desempenha um papel importante na defesa imune inata contra patógenos. Essas citocinas ativam neutrófilos e macrófagos para fagocitar o patógeno invasor e liberar radicais tóxicos de oxigênio e nitrogênio. Interleucinas 1 α e IL-1 β se ligam e ativam o mesmo receptor (DINARELLO, 1996), acionam a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF e a interleucina 6 (IL-6), e induzem um viés de Th17 nas respostas adaptativas celulares (CHUNG et al., 2009).

A interleucina IL-6 é uma citocina que pode exibir propriedades anti-inflamatórias ou pró-inflamatórias, dependendo do transdutor de sinal do receptor de IL-6 e da glicoproteína 130 (gp130) que pode estar solúvel ou ligado à membrana. Como é o caso da IL-1, a IL-6 também é produzida em muitos tipos de células. A IL-6 foi originalmente identificada como fator de diferenciação de células B, mas também possui uma variedade de funções adicionais fora das células B, como produção de proteínas de fase aguda do fígado, angiogênese, diferenciação de células T, metabolismo ósseo e crescimento neuronal (HODES; MÉNARD; RUSSO, 2016). Essa citocina tem ação pró-inflamatória quando induzida por lipopolissacarídeos (LPS) juntamente com TNF- α e IL-1, sendo usada como marcador para a ativação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias (SCHEIERMANN et al., 2011).

3.4 Imunologia uterina em bovinos

O útero é capaz de impedir e eliminar patógenos invasores através de mecanismos próprios de defesa, como barreiras físicas e células imunes, mantendo assim, suas atividades fisiológicas normais. Porém, danos a esses mecanismos comumente resultam em inflamação uterina, doença, infertilidade e até mesmo a morte (FU et al., 2013).

A imunidade inata no trato genital feminino é altamente dependente da expressão de TLRs (receptores do tipo Toll) que detectam PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos). Os TLRs são conservados filogeneticamente e são capazes de detectar uma quantidade diferente de PAMPs associados a fungos, vírus e bactérias (BEUTLER, 2004; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). O reconhecimento pela imunidade inata de componentes microbianos é um papel decisivo para a defesa do hospedeiro contra infecção (SAITO et al., 2010), porém como isso se procede ainda não é totalmente elucidado (ESPOSITO et al., 2014).

O controle de patógenos no endométrio depende da imunidade inata e adaptativa. A imunidade inata fornece defesa imediata e inespecífica contra patógenos e não depende da exposição prévia a micro-organismo (MORESCO; LAVINE; BEUTLER, 2011). A imunidade adaptativa depende de receptores específicos para antígenos, desta forma a resposta resulta da exposição prévia ao antígeno (SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2018).

A imunidade inata baseia-se na descoberta de que as células eucarióticas possuem PAMPs reconhecidos por receptores padrão. Esses PAMPs geralmente são moléculas altamente conservadas encontradas em procariontes, mas não em eucariotos e incluem lipopolissacarídeos (LPS), lipopeptídeos, flagelina e RNA e DNA microbiano. Receptores como receptores do tipo Toll (TLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs) se ligam aos PAMPs (KAWAI; AKIRA, 2010).

A ligação de PAMPs a TLRs ativa as vias de sinalização intracelular de NF- κ B e MAPK, que resultam na produção de peptídeos antimicrobianos, tais como β -defensinas; LAP e TAP; e mediadores inflamatórios, como IL-1 β , IL-6, IL-8 e prostaglandina E₂ (KAWAI; AKIRA, 2010; MORESCO; LAVINE; BEUTLER, 2011). As citocinas se ligam aos seus receptores cognatos, levando à inflamação e maior produção de peptídeos antimicrobianos, eicosanóides e espécies reativas de oxigênio. Citocinas no plasma periférico também causam resposta inflamatória sistêmica, incluindo piroxia, vasodilatação generalizada e liberação de proteínas de fase aguda por hepatócitos (SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2018).

Durante uma infecção bacteriana uterina, as células endometriais podem ativar ou reprimir certos sinais bioquímicos e moleculares relacionados à resposta imune inata e adquirida em bovinos (SALILEW-WONDIM et al., 2016). Os receptores de reconhecimento de padrões podem ser expressos na superfície de células imunes ou no citoplasma de células epiteliais e do estroma endometrial. As células endometriais bovinas expressam os receptores do tipo TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6. Os receptores TLR1, TLR2 e TLR6 reconhecem os lipopeptídeos bacterianos, enquanto os TLR4 detectam LPS (lipopolissacarídeos) (TUNER et al., 2014).

A imunidade adaptativa no endométrio também controla o desenvolvimento da endometrite, mas este mecanismo é pouco conhecido. Um estudo descreve áreas ricas em células T e células B no endométrio pós-parto, geralmente compreendendo focos linfocitários no estroma (LUCY; EVANS; POOCK, 2016). Além disso, a resposta imune adaptativa também é evidente em animais pós-parto, com aumento abundante de anticorpos (DHALIWAL; MURRAY; WOLDEHIWET, 2001).

As células endometriais têm respostas que sustentam o sistema imunológico, produzindo fatores pró-inflamatórios, como citocinas, sensores, moléculas efetoras e quimiocinas. Essa resposta é importante durante a gestação e crescimento fetal, bem como na prevenção de infecção e imuno-rejeição do embrião semi-alógeno (VELÁZQUEZ et al., 2019).

Em vários estudos com novilhas e vacas leiteiras, houve correlações positivas entre as concentrações relativamente maiores de progesterona e as funções imunes no período pós-concepção (MICHELON; SILVEIRAI; NEUMANN, 2006; MORRIS; DISKIN, 2008; FORDE et al., 2011). Todos esses achados indicam que o endométrio de bovinos é remodelado ao longo do ciclo estral, e as mudanças mais importantes são alterações nas moléculas de sinalização inter e intracelular, muitas das quais afetam os processos imunológicos e regulam a resposta imune. As células epiteliais luminiais do endométrio respondem e apoiam a resposta imune produzindo fatores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (LEBLANC, 2012; PETER et al., 2015).

As citocinas também têm um papel importante na evolução ou interrupção da gestação. Elas atraem células imunes efetoras que atuam na modulação da resposta imune na interface materno-fetal, agindo por meio de vias complexas de feedback positivo ou negativo, controlando o nível de ativação inflamatória nesse microambiente (MICHELON; SILVEIRAI; NEUMANN, 2006), impedindo a rejeição do embrião, sem comprometer a

habilidade de combater infecções uterinas provocada por micro-organismos patogênicos (HAMILTON; BETZ, 2011).

O IFNT (interferon-tau) é secretado pelo conceito para impedir a regressão do corpo lúteo e garantir a continuação da produção de progesterona além do período funcional típico do corpo lúteo, se a gestação ocorreu (BAZER et al., 2008). Além disso, IFNT, que é um interferon do tipo I, é responsável pela modificação das funções das células imune uterinas, resultando em um ótimo ambiente para o crescimento embrionário. IFNT aparentemente funciona no endométrio para melhorar a expressão de genes, regulando a receptividade uterina e o desenvolvimento embrionário (VELÁZQUEZ et al., 2019). A resposta durante o alongamento embrionário em bovinos é caracterizada pela expansão de monócitos e células dendríticas no estroma endometrial desde o dia 13 da gestação (OLIVEIRA et al., 2013).

Deste modo, uma gestação bem sucedida depende da modulação precisa da resposta imune materna, promovendo um ambiente receptivo e embriotrófico para o desenvolvimento do embrião e, ao mesmo tempo, eliminando os agentes patogênicos que podem estar presentes no endométrio (LEE et al., 2012).

Em bovinos pouco se conhece sobre o perfil Th1/Th2/Th17 e Treg. Sabe-se que o padrão imune do endométrio bovino durante a gestação favorece um ambiente para Th2, sendo que na fase lútea tardia do ciclo estral há menor concentração dos fatores pró-inflamatórios, enquanto que os anti-inflamatórios aumentam de forma constante (OLIVEIRA et al., 2013).

Durante o período que precede o parto e nas condições de imunossupressão, a proliferação de leucócitos, principalmente linfócitos e neutrófilos, é severamente deprimida. Também as funções fundamentais dessas células, tais como a habilidade de agregar e fagocitar dos neutrófilos, a atividade citotóxica dos linfócitos e também a produção quimiotática da interleucina 8 (IL-8) para ativação desses leucócitos é reduzida nesse período (MORDAK; ANTHONY, 2015).

3.5 Leptospirose e Resposta imune

O mecanismo de lesão provocado pela *Leptospira* nos hospedeiros é pouco compreendido (ROSSINI et al., 2020). Os estudos apontam para ação direta da bactéria sobre células do hospedeiro com produção de toxinas e enzimas proteolíticas, e consequente lesão tecidual (DAHER; DE ABREU; DA SILVA JUNIOR, 2010). Essa ação está relacionada à inibição da expressão de genes que codificam proteínas do citoesqueleto de células endoteliais

e da matriz extracelular, proporcionando uma maior motilidade e disseminação das *Leptospiras* (MARTINEZ-LOPEZ,FAHEY; COBURN, 2010).

As proteínas de membrana externa são capazes de estimular a imunidade heteróloga, dessa forma, provavelmente exista interação patógeno-hospedeiro devido às suas localizações. As proteínas de adesão da membrana externa são fundamentais para que as *Leptospiras* consigam penetrar, disseminar e persistir nos tecidos dos hospedeiros. As análises genômicas comparativas indicam que as *Leptospiras* têm fatores de virulências únicos(ADLER; MOCTEZUMA, 2010; EVANGELISTA;COBURN, 2010)

Os fatores de virulência são o LPS (Lipopolissacarídeo), hemolisinas, esfingomielinases, proteínas da membrana externa e outras proteínas de superfície como as moléculas de adesão. Ristow et al., (2007) avaliando a proteína Loa22 relatou sendo a proteína um dos primeiros fatores de virulência de *Leptospiras* patogênicas, além disso um potente antígeno para utilização em vacina. Outras proteínas como as hemolisinas são capazes de lisar os eritrócitos e outras membranas celulares, como as esfingomielinases que estão ligadas com atividade de hemolíticos e tem caráter patogênico das *Leptospiras*, pois sabe-se que há ausência de genes de esfingomielinase em *Leptospiras* saprófitas (NARAYANAVARI et al., 2015). Isso sugere funções de virulência ou a permanência em hospedeiros mamíferos (ADLER; MOCTEZUMA, 2010; EVANGELISTA;COBURN, 2010).

Outro fator de virulência é o LPS leptospiral, que é semelhante quimicamente e imunologicamente ao LPS das bactérias Gram-negativas, porém sua atividade biológica é menor (FAINE, ADLER,BOLIN,PEROLAT,1999).

A resistência do hospedeiro às *Leptospiras* patogênicas ocorre devido à resposta imune, principalmente mediada pela resposta imune humoral com produção de anticorpos aglutinantes contra o LPS (EVANGELISTA;COBURN, 2010). Essa resposta imune humoral aparece na primeira semana de infecção e ativa a fagocitose por neutrófilos e macrófagos, além da ativação do sistema complemento para neutralizar as *Leptospiras* (MOHAMMED et al., 2011).

Alguns estudos também sugerem que as *Leptospiras*, apesar de serem patógenos extracelulares, podem persistir dentro dos macrófagos (TOMA et al., 2011) e são capazes de translocar facilmente através das camadas celulares (BAROCCHI et al., 2002) na tentativa de alcançar a corrente sanguínea rapidamente e, assim, evitar a morte pelas células dos hospedeiros (SILVEIRA et al., 2017).

Tanto o sistema imune inato (DAHER et al., 2010) quanto adquirido (CHASSIN et al., 2009), participam da mediação da ação das *Leptospiras* sobre o organismo do hospedeiro. Duas famílias de receptores, os Toll-like (TLRs) e Nod-like (NLRs) desempenham papel importante na patogênese das *Leptospiras* (MOGENSEN, 2009). Entre os TLRs, o TLR2 e TLR4 são os mais estudados na leptospirose.

3.5.1- Imunidade Inata

A leptospirose provoca inflamação com níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias no sangue e nos órgãos de humanos e animais (WANG et al., 2012; PAPA; KOTROTSIOU, 2015). As células mielóides, como monócitos, macrófagos e células dendríticas, reconhecem os microrganismos através de numerosos receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Embora não fagocíticas, as células epiteliais desempenham um papel importante na imunidade inata, pois também expressam PRRs e podem produzir citocinas (JANEWAY; MEDZHITOV, 1999; ASHKAR; ROSENTHAL, 2005).

Monócitos e macrófagos utilizam a ativação mediada por PRR para fornecer informações imunológicas inatas para proteção do hospedeiro, especialmente durante os estágios iniciais da infecção por leptospirose. O LPS e as hemolisinas estimulam os macrófagos a produzir IL-1 β , IL-6, IFN e TNF- α (ISOGAI et al., 1990; WANG et al., 2012). Além disso, os macrófagos desafiados com LPS leptospiral aumentam a atividade fagocítica. O papel do anticorpo parece ser importante para a morte de *Leptospiras* mediada por macrófagos. Vários estudos demonstraram que a fagocitose, processo que requer opsonização com anticorpos homólogos, leva à diminuição da viabilidade bacteriana (CINCO; BANFI; SORANZO, 1981; BANFI et al., 1982; JOST et al., 1986). As *Leptospiras* possuem mecanismos que prejudicam a função de macrófagos induzindo a apoptose destes (DAVIS; HAAKE; RAMAKRISHNAN, 2009).

O LPS de bactérias Gram negativas é capaz de ativar TLR4, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (MILLER; ERNST; BADER, 2005). As citocinas constituem os principais mediadores inflamatórios que controlam as respostas imunes à infecção (DENNEY et al., 2011), e a regulação diferencial da expressão de citocinas foi associada aos resultados clínicos na leptospirose humana. Níveis de expressão de citocinas incluindo IL-10, IL-1 β e TNF- α , foram previamente avaliados como potentes marcadores de gravidade da leptospirose em humanos (REIS et al., 2013; MIKULSKI et al., 2015;

CHIRATHAWORN et al., 2016). Entretanto, a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias leva a distúrbios patológicos e lesão tecidual (BARTON, 2008).

Em um estudo de Reis et al. (2013), foi demonstrado que as concentrações de IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 e TNF- α , foram significativamente maiores em pacientes com casos leves, enquanto o baixo nível de TNF- α esteve relacionado com o desfecho fatal. Níveis elevados de TNF- α no soro de pacientes com leptospirose foram observados por (ESTAVOYER et al., 1991) e Tajiki; Salomão. (1996) que o associaram à gravidade da infecção. Conclusão semelhante com alto nível de TNF- α foi descrita por Marinho (2008) em ensaio experimental com *Leptospira interrogans* sorovar Icterohaemorrhagiae em camundongos geneticamente selecionados.

Hamsters infectados experimentalmente expressam citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4 e IL-10, 1 a 4 dias após a infecção por *L. interrogans*. Em hamsters imunizados com bacterina contra *L. interrogans* sorovar Autumnalis, os níveis de IFN- γ e TNF- α estão correlacionados com a gravidade da infecção e da patologia pulmonar (CHIDEROLI et al., 2017).

Pesquisa recente com diferentes linhagens de macrófagos *in vitro* da espécie bovina incubadas com cepas atenuadas e virulentas de *Leptospira interrogans* sorovar Pomona, mostrou que ambas as cepas apresentaram expressão gênica de regulares de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e TNF α . Somente o nível de expressão da citocina IL-10 foi estatisticamente diferente entre as cepas, apresentando nível mais alto para cepa virulenta (NAGEL et al., 2019).

SILVA et al. (2019) avaliaram a capacidade de fagocitose de *Leptospira* pelas células do baço, em três linhagens de roedores. Além disso, avaliaram os efeitos do tratamento com CCL2 (quimiocina ligante 2) na fagocitose, e concluíram que ocorreu maior capacidade de fagocitose e modulação precoce de algumas quimiocinas, correlacionando isto com a resistência à leptospirose. E ainda, a exposição ao CCL2 não interferiu na fagocitose de *Leptospira* em condições experimentais, mas atuou na modulação da expressão de quimiocinas durante a infecção por *Leptospira*.

3.5.2 Imunidade Adquirida

Estudo realizado por Tu; Adler; Faine (1982) demonstrou que, para a maioria das espécies, a imunidade protetora pode ser passivamente transferida através do soro, sendo os anticorpos, fatores cruciais na proteção contra a leptospirose. No entanto, anticorpos produzidos durante a infecção, que desempenham um papel importante na opsonização e

aglutinação das *Leptospiras*, são predominantemente direcionadas contra a porção LPS. Como consequência disso, a imunidade gerada é limitada ao sorovar infectante. Vários relatórios publicados mostraram que uma resposta imune humoral significativa pode ser induzida pelo uso de antígenos recombinantes, embora se deva notar que essa resposta imune não pode ser correlacionada com proteção (SILVEIRA et al., 2017).

A infecção causada pelas *Leptospiras* patogênicas em humanos é dividida em dois estágios, o primeiro estágio é o estágio agudo ou septicemia, que dura de 7 a 10 dias com dor de cabeça e mialgia. O segundo estágio é o estágio imune, que ocorre após a primeira semana de infecção e dura de 4 a 30 dias. Durante o primeiro estágio, as *Leptospiras* estão presentes no sangue, onde a multiplicação bacteriana é alta; uma vez que o segundo estágio inicia, o nível de anticorpos IgM e IgG começa a aumentar, e esse aumento no título de anticorpos é correlacionado à eliminação de *Leptospiras* (AQIB et al., 2019).

A imunidade celular, embora pouco compreendida, está associada à proteção nos bovinos. As vacinas com sorovar monovalente de células inteiras utilizam sorovares infectantes mais prevalentes em bovinos, e induzem a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ e CD, protegendo contra a colonização e insuficiência renal (NAIMAN et al., 2002).

As vacinas polivalentes podem ser uma alternativa para prevenir a leptospirose em rebanhos bovinos, porém no momento não há vacina contra leptospirose com proteção cruzada entre diferentes sorovares, sendo necessário o uso de vacinas específicas. A memória imunológica depende do número de células T recrutadas. Uma vacina pode ser ineficaz quando a concentração de antígenos é incapaz de aumentar o recrutamento de células T, limitando a imunogenicidade da vacina (FÁVERO et al., 2018).

Os antígenos ativam as citocinas pró-inflamatórias para desencadear um mecanismo de resposta imune na presença de infecção ou vacinação (HESSE et al., 2017). Como por exemplo a citocina IL-10 que possui uma ação anti-inflamatória e exerce um papel regulador em várias inflamações e infecções sendo produzidas pelas células Th1 durante a proliferação celular (FÁVERO et al., 2018).

Além disso, alguns estudos demonstraram um aumento nos níveis séricos de interferon gama (IFN- γ) em bovinos vacinados com o sorovar Hardjo, onde os animais apresentam redução da colonização renal por *Leptospira* sp. (ZUERNER et al., 2011).

3.6 Modelo explante *ex vivo*

A técnica de cultura de órgãos *ex vivo*, ou modelo *ex vivo* consiste no cultivo de fragmentos de tecidos, incubados em placas, com meio de cultura e temperatura semelhante à corpórea, obtidos com o auxílio de *punch* de biópsia ou bisturi. Esta técnica visa mimetizar as condições do organismo vivo, com a vantagem da não utilização experimental de animais (REZENDE, 2016).

Os explantes de endométrio intactos também fornecem um modelo de cultura de tecidos melhor, quando comparados aos modelos de tecidos fragmentados, porque mantêm a arquitetura dos tecidos e interações celulares, que são essenciais para a função normal do tecido (CUKIERMAN et al., 2001). A disponibilidade de nutrientes do meio de cultura provavelmente prolonga a viabilidade do epitélio e células estromais periféricas de explantes, em até 48 horas (BERSINGER et al., 2010).

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; HEALEY; SHELDON, 2012).

O modelo de cultura de órgãos *ex vivo* é uma técnica bem instituída em várias espécies, como estudo de Costa (2018) avaliando a produção de citocinas no útero de cadelas com piometra, a fim de entender o efeito de condições prévias encontradas no ambiente uterino sobre a resposta imune inata local; podendo reduzir assim, o número de estudos *in vivo* na espécie. Da mesma forma, em estudos recentes, o modelo foi aplicado na espécie equina (DE BARROS, 2019), objetivando a melhor compreensão da endometrite; e em suínos, onde avaliaram a expressão gênica dos receptores TLRs em tecido endometrial, durante as fases de ciclo estral e gestacional (YOO et al., 2018).

No entanto, entre suas principais desvantagens estão a necessidade para infraestrutura específica e despesas financeiras elevadas (DESILETS et al., 2011).

O processo de desenvolvimento das endometrites, comuns em bovinos no pós-parto, pode ser estudado com aplicação de LPS de bactérias gram-negativas (DENG et al., 2019) ou com bactérias vivas (KORZEKWA, et al., 2016). Estes estudos, utilizando modelo explante ou

modelo *ex vivo*, permitem uma melhor compreensão do processo gestacional e abortivo e possibilitam a avaliação de complicações durante a gestação.

Da mesma forma, Wallace et al. (2019) utilizaram a técnica de explantes *ex vivo* de endométrios de vacas gestantes, com o intuito de avaliar a presença de genes de expressão de glicoproteínas associadas a gestação (PAGs), que estão presentes no início da gestação, produzidas principalmente pelo trofoblasto.

Esse é o primeiro estudo a correlacionar a técnica de explante *ex vivo* ao desafio com *Leptospira* viva, para avaliação de repostas imunes na fase gestacional e não gestacional.

4. METODOLOGIA

A Metodologia foi sumarizada em esquema (ANEXO)

4.1. Animais e local de execução

Foram coletados os tratos reprodutivos e as amostras de sangue das vacas respectivamente, as coletas ocorreram no abatedouro comercial localizado no município de Araguari, Minas Gerais, Brasil. Após a coleta as amostras foram acondicionadas em caixa térmica devidamente refrigerada e conduzidas ao laboratório para análise e processamento do material, respeitando-se o tempo máximo de duas horas entre a coleta e o início do processamento laboratorial.

O estudo foi conduzido no Laboratório de Saúde em Grandes Animais (LASGRAN) e Laboratório de Doenças Infecto Contagiosas (LADOC) da FAMEV/UFU. Amostras de sangue e útero de 43 vacas mestiças, destas amostras eram de vacas não gestantes (19/43) e vacas gestantes (24/43), sem evidência de doenças clínicas.

Para determinação da idade gestacional foi realizada a medida do comprimento dos fetos com auxílio de fita métrica e interpretadas conforme o descrito por Rexroad; Casida; Tyler (1974). Os fetos que estavam na fase final de gestação foram determinados os tamanhos no abatedouro e coletados somente o útero das vacas. Os outros fetos em fases inicial e média esse procedimento foi realizado já no local do processamento das amostras.

4.2 Histologia do tecido endometrial

Para avaliação da integridade dos tecidos endometriais após 24 horas de incubação, foram coletados os explantes das vacas não gestantes e gestantes utilizados como controle e desafiados com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno. Estes foram armazenados em solução de formol tamponado 10 % por 24 horas e posteriormente em álcool 70 % até o processamento da técnica de histologia.

No laboratório de Histopatologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), a preparação dos tecidos endometriais foi realizada de acordo com as técnicas histológicas descritas por Junqueira e Carneiro (2004).

Para leitura das lâminas histopatológicas dos explantes empregou-se o método de coloração por hematoxilina e eosina (HE) e observação em microscopia óptica em aumento de 4x e 10x. As lâminas com secções histológicas foram lidas e classificadas segundo o escore de lesão inflamatória descrito por Chapwanya et al. (2009) (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização histopatológica de escore de lesão em útero bovino com diferentes graus de alterações.

Escore de lesão	Descrição histopatológica do útero
0	Nenhuma evidência de inflamação, tecido uterino inerte, quiescente.
1	Inflamação de baixo grau, pouca infiltração de linfócitos e células plasmáticas, poucas áreas fibróticas, degeneração glandular cística, alterações vasculares.
2	Inflamação moderada que mostra leucócitos proeminentes, pequena fibrose periglandular ou vascular no sangue, menor degeneração glandular cística.
3	Inflamação grave, alta infiltração de células polimorfonucleares, atrofia da glândula uterina, degeneração cística e necrose, fibrose extensa de vasos sanguíneos, infiltração de neutrófilos e macrófagos no endométrio, sítios isolados de edema, congestionamento vascular, hemorragia, ruptura ou perda epitelial.

Fonte: CHAPWANYA et al. (2009)

4.3 Cultivo para preparo do inóculo

Para preparo dos inóculos foram utilizados isolados de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno cedidos e mantidos pelo Laboratório de doenças infecto contagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LADOC). Os inóculos foram preparados adicionando 1 ml de cultura de estoque de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno para 10 ml de meio líquido EMJH (DIFCO) (suplementado 10% de soro de coelho) e incubado a 28 °C por 1 semana. No dia do processamento do cultivo dos explantes foram selecionados inóculos de acordo com a leitura na densidade óptica no espectrofotômetro (BIOMATE 3S THERMO FISHER SCIENTIFIC®) a 420 nm, somente sendo utilizados aqueles que obtiveram absorvância de 0,32 (equivale aproximadamente 10^8 UFC / mL) (WUTHIEKANUN et al., 2013).

4.4 Análise sorológica pelo teste de aglutinação microscópica (MAT)

Para análise de uma prévia infecção utilizaram-se anticorpos anti *Leptospira* spp por meio do teste de aglutinação microscópica (MAT) com um painel completo incluindo 24 sorovares representando 24 sorogrupos, de acordo com os padrões internacionais (TERPSTRA, 2003). As amostras de soro foram inicialmente diluídas a 1:100 utilizando 50 µL de soro e 2,45 mL de solução salina tamponada, após a diluição em sequência 50 µL do soro diluído foi distribuído em microplacas e 50 µL do sorovar foram adicionados. Finalmente, diluições seriadas foram realizadas. O sorovar infeccioso presuntivo foi considerado o que apresentou maior título. As amostras de soro foram consideradas reativas quando atingiram títulos ≥ 100 .

Os sorovares testados foram: Australis, Autumnalis, Bataviae, Brasilienses, Bratislava, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Grippothyphosa, Guaricura, Hardjoprajitno, Hebdomadis, Icterohamorrhagiaie, Javanica, Panamá, Pomona, Sejroe, Shermani, Tarassovi, Wolffi, B12 e B34.

De acordo com os resultados encontrados na sorologia foi definido a formação dos grupos com vacas reagentes ou não ao MAT e que se apresentavam gestantes ou não,

formando os seguintes grupos : a) vacas não-gestantes e não-reagentes ao MAT ; b) vacas não-gestantes e reagentes ao MAT; c) vacas gestantes e não-reagentes ao MAT ; d) vacas gestantes e reagentes ao MAT .

4.5 Delineamento experimental

Processamento das amostras

No laboratório, os úteros foram avaliados macroscopicamente e somente aqueles sem evidência de doenças clínicas foram utilizados no experimento. Os úteros foram divididos em grupos gestantes e não gestantes. Após a seleção dos úteros, foi feito de forma individual o processamento dos mesmos. A superfície externa do órgão foi lavada com álcool 70% em seguida com o auxílio de tesoura estéril foi realizada uma incisão longitudinal no corno uterino *ipsilateral* ao ovário que apresentava corpo lúteo.

Após a exposição do endométrio, o mesmo foi lavado com solução de Dulbecco's phosphate-buffered (D-PBS; Sigma-Aldrich), suplementado com 50 UI/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e anfotericina B (2.5 µg/mL) (Antibiotic-antimycotic; Gibco®). Utilizando um *punch* estéril (KRUUSE®) de 8 mm próprio para biópsia, foram retirados fragmentos de endométrio (explantes) de regiões intercarunculares.

Em sequência a retirada dos explantes, estes foram inseridos em 25 mL de solução de Hank's Balanced Salt (HBSS; Sigma-Aldrich®) suplementado com 50 UI/mL de penicilina (GIBCO), 50 µg/mL de estreptomicina (GIBCO) e 2.5 µg/mL de anfotericina B (GIBCO).

Em seguida, dentro da cabine de segurança biológica, os explantes foram lavados na mesma solução suplementada de Hank's Balanced Salt por mais duas vezes, e então foram transferidos para placas de cultura celular de 24 poços (um explante em cada poço, totalizando seis poços por animal).

As soluções adicionadas sobre os explantes foram as seguintes:

a) meio controle, contendo 2 mL de meio completo, sendo solução de RPMI 1640 (Gibco®) com a adição de 10% soro fetal bovino (Cultilab®), 50 UI/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 2.5 µg/mL de anfotericina B (Gibco®)

b) meio RPMI 1640 (Gibco®) com a adição de 10% soro fetal bovino (Cultilab®). contendo LPS de *Escherichia coli* (*E.coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich®) na concentração de 1 µg/mL

c) meio EMJH (DIFCO) com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno, utilizou-se inóculo com concentração média de 10^8 /mL de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno. Antes da adição do inóculo em cada poço com explante foram adicionados 1mL da solução RPMI 1640 (Gibco®) com a adição de 10% soro fetal bovino (Cultilab®).

As placas foram levadas para estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de vapor e permaneceram incubadas por 24 horas.

4.6 Determinação do perfil de produção das interleucinas IL-1 β e IL-6

Após 24 horas de incubação, os tecidos endometriais foram pesados e os sobrenadantes foram recolhidos e subsequentemente testados. Os perfis de produção das interleucinas 1 β e 6 foram mensurados conforme as instruções do fabricante descritas nos Kits de ELISA já utilizados por Saut et al.(2014), específicos para cada citocina (Bovine IL-6 Reagente Kit, ThermoScientific®, Bovine IL-1 β ELISA Kit, Invitrogen®).

4.7 Análise estatística

Para a realização da análise estatística e elaboração dos gráficos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e o fator explante foi considerado como unidade experimental. Os dados foram inicialmente tabulados em planilhas do programa Microsoft Excel e a estatística descritiva apresentada em média e erro padrão da média.

Para avaliar as diferenças nas concentrações das citocinas IL-1 β e IL-6 em relação ao desafio com 1 μ g/mL de LPS ou 10^8 /mL de *Leptospira interrogans* sorovar hardjoprajitno, a correlação com presença ou não de gestação e o efeito de reação ao MAT utilizou-se o teste de *Two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni ($P < 0,05$).

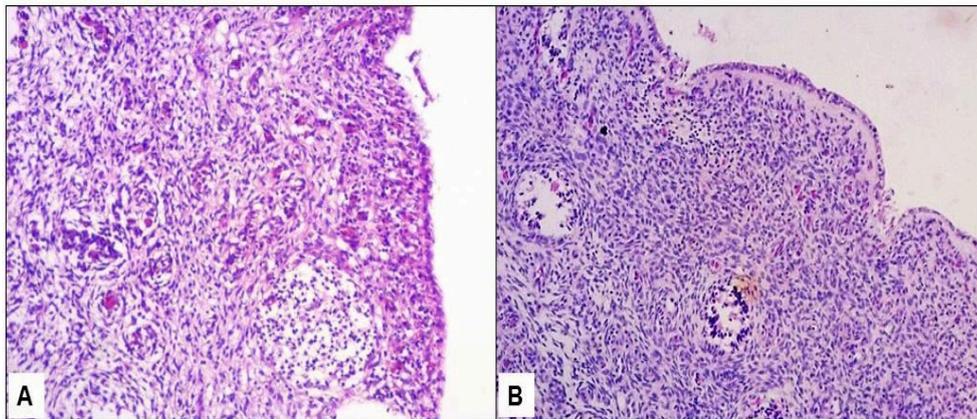
5. RESULTADOS

5.1 Considerações gerais

Para melhor compreensão dos resultados e discussão, estes foram subdivididos em tópicos.

5.2 Análise histológica dos tecidos endometriais *ex vivo* das vacas não gestantes e gestantes do grupo controle e desafiadas com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

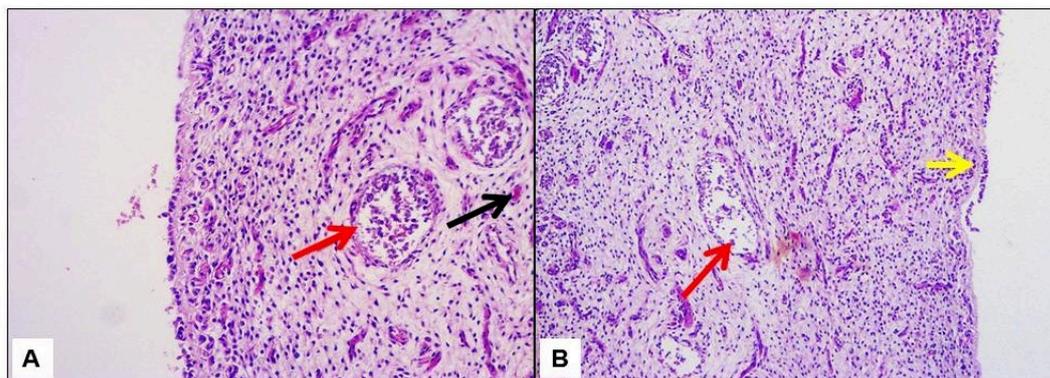
Dos tecidos do grupo controle, a lâmina de tecidos endometriais *ex vivo* das vacas não gestantes e gestantes não apresentava alterações vasculares e teciduais e nenhuma alteração inflamatória (Figura 1A e 1B). As amostras de tecidos endometriais de vacas não gestantes e gestantes desafiadas com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno apresentaram lesão inflamatória grau 1 com degeneração glandular cística, alterações vasculares e a presença de poucas células inflamatórias caracterizando infiltrado inflamatório na região periglandular (Figura 2A e 2B).



Fonte: arquivo pessoal

(A) útero não gravídico; (B) útero gravídico

Figura 1- Fotomicrografia dos tecidos endometriais *ex vivo* de vacas do grupo controle não inoculado com *Leptospira spp.* Coloração hematoxilina eosina, objetiva 10X.



Fonte: arquivo pessoal

Figura 2 - Fotomicrografia de tecidos endometriais *ex vivo* de vacas não e gestantes indicando lesão de escore 1. A seta vermelha indica degeneração glandular cística, a seta preta aponta alterações vasculares e a seta amarela indica célula inflamatória abaixo do epitélio de revestimento uterino. Objetiva 10X (A) e objetiva 4x (B).

5.3 Soroaglutinação microscópica em campo escuro (MAT)

Do total de 43 amostras de soro testadas, 69,8% (30/43) foram reagentes aos sorovares de *Leptospira spp.* A distribuição dos grupos de acordo com reação ao MAT e a frequência dos títulos dos animais estão na tabela 2.

GRUPOS	Nº VACAS REAGENTES OU NÃO - MAT	TÍTULOS
Vacas não gestantes	Não Reagentes (n=9)	0
Vacas não gestantes	Reagentes (n=10)	100 (n=2) 200 (n=4) 400 (n=2) 800(n=2)
Vacas gestantes	Não reagentes (n=4)	0
Vacas gestantes	Reagentes (n=20)	100 (n=4) 200 (n=4) 400 (n=9) 800 (n=2) 1600(n=1)

Do total de 20 úteros das vacas gestantes reagentes ao MAT, nove úteros estavam em fase inicial, cinco 5 em fase média e 6 seis em fase final de gestação (primeiro, segundo e terceiro trimestres).

5.4 Produção de interleucina IL-6 em tecidos endometriais *ex vivo* de vacas não gestantes e gestantes reagentes ou não ao MAT desafiado com LPS e a *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

Em relação ao desafio com 1µg/mL LPS, tanto os tecidos endometriais das vacas não gestantes como gestantes montaram uma resposta frente ao desafio com LPS, com aumento significativo da produção de IL-6 em relação aos controles ($P < 0,0001$), após 24 horas de tratamento (Figura 3A).

O mesmo ocorreu no desafio com 10^8 /mL de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno nos tecidos endometriais de vacas não-gestantes (Figura 3B). Contrário o que

ocorreu nos tecidos endometriais de vacas gestantes que não aumentaram a produção de IL-6 em relação ao controle e ainda essa produção foi menor do que a produção dos tecidos endometriais das vacas não-gestantes desafiadas com 10^8 /mL de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno ($P < 0,0001$), após 24 horas de tratamento.

Ao se avaliar a produção da IL-6, os tecidos endometriais das vacas não gestantes reagentes no MAT tiveram uma produção maior de IL-6 quando desafiadas tanto com $1\mu\text{g/mL}$ LPS como com 10^8 /mL de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno, após 24 horas de tratamento. Os tecidos endometriais de vacas gestantes não houve diferença na produção de IL-6, entre vacas reagentes ou não no MAT, quando desafiadas com $1\mu\text{g/mL}$ LPS ou 10^8 /mL de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno.

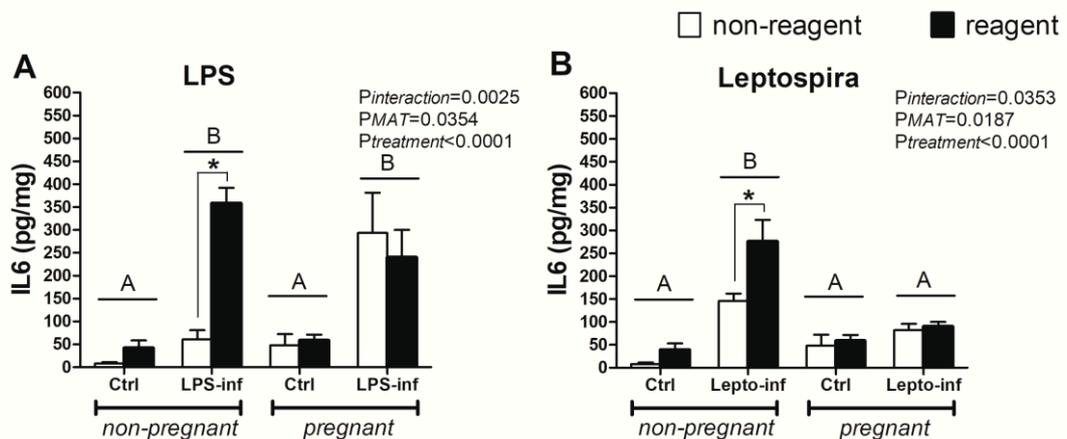


Figura 3. Produção da interleucina 6 (IL-6) pelo endométrio *ex vivo* de vacas não-gestantes e gestantes sorologicamente reagentes e não-reagentes ao MAT exposto aos tratamentos com $1\mu\text{g/mL}$ de LPS de *E. coli* e 10^8 *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

5.5 Produção de interleucina IL-1 β em tecidos endometrias *ex vivo* de vacas não gestantes e gestantes soreagente ou não ao MAT desafiadas com LPS e a *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

Em relação ao desafio com $1\mu\text{g/mL}$ LPS (Figura 4A) e 10^8 /mL de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno (Figura 4B), tanto os tecidos endometrias das vacas não gestantes como gestantes montaram uma resposta com aumento significativo da produção de IL-1 β em relação aos controles ($P < 0,0001$).

Ao se avaliar a produção da IL-1 β , não houve diferença significativa entre os tecidos endometriais das vacas não gestantes ou gestantes, reagentes ou não no MAT, quando desafiadas com 1 μ g/mL LPS ou 10⁸/mL de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno.

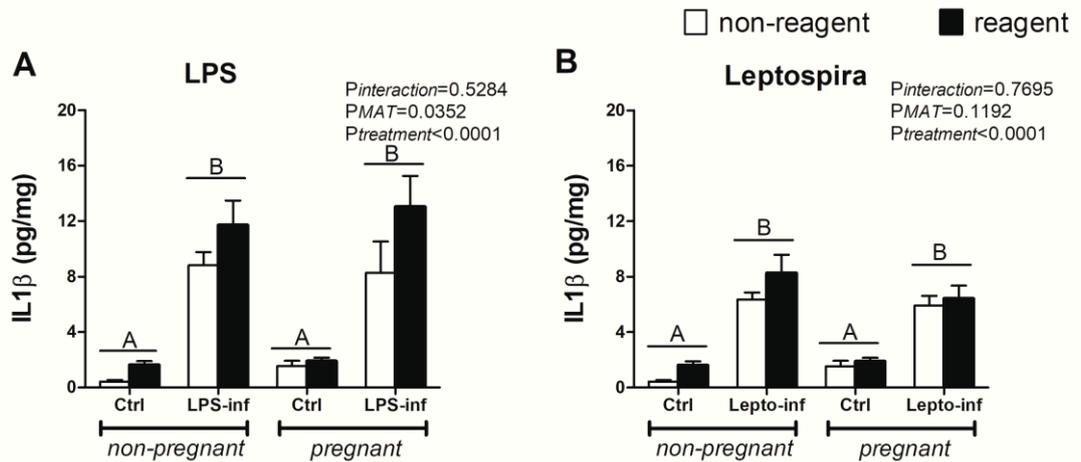


Figura 4. Produção da interleucina 1 β pelo endométrio *ex vivo* de vacas não-gestantes e gestantes sorologicamente reagentes e não-reagentes ao MAT exposto aos tratamentos com 1 μ g/mL de LPS de *E. coli* e 10⁸ *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

5.6 Produção de IL-6 e IL-1 β no tecido endometrial comparando as diferentes fases gestacionais das vacas reagentes ao MAT nos desafios ao LPS e *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

Os níveis de produção da IL-6 após ao desafio ao LPS foram altos quando comparado com controle, no entanto, na avaliação individual das fases de gestação, somente a fase inicial (primeiro trimestre) foi significativa (figura 5), diferente do observado IL-1 β que ocorreu diferença significativa na produção desta citocina na fase final de gestação (terceiro trimestre)(figura 6), e também oposto no desafio a 10⁸ de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno que não houve diferença significativa entre as fases gestacionais (figura 5 e 6).

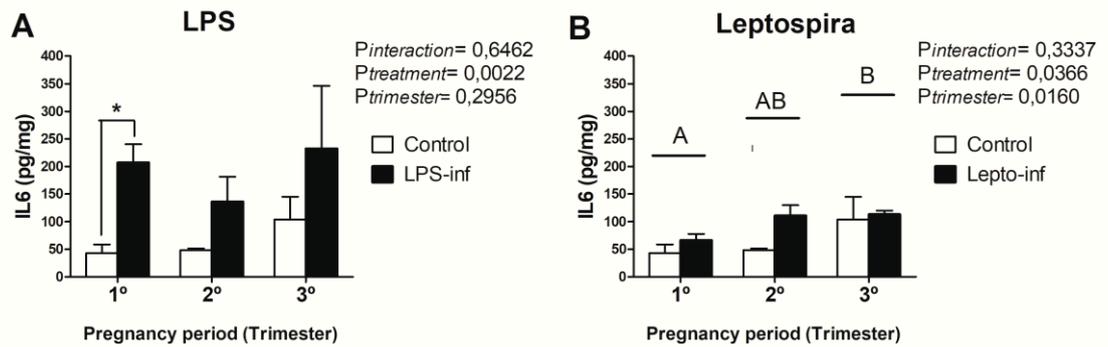


Figura 5. Produção da interleucina 6 pelo tecido endometrial *ex vivo* de vacas gestantes sorologicamente reagentes ao MAT exposto aos tratamentos com 1 μ g/mL de LPS de *E. coli* e 10⁸ *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

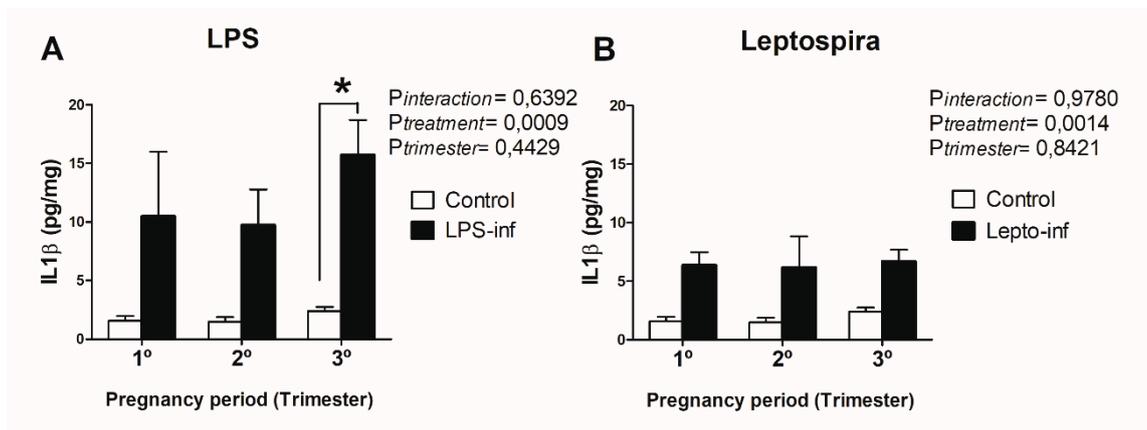


Figura 6 Produção da interleucina 1 β pelo endométrio *ex vivo* de vacas gestantes sorologicamente reagentes ao MAT exposto aos tratamentos com 1 μ g/mL de LPS de *E. coli* e 10⁸ *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

No desafio com 10⁸ *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno os tecidos endometriais gestantes não produziram uma resposta significativa de IL-6 e IL-1 β nas diferentes fases de gestação como ao desafio ao LPS de *E. coli*. Resultado que indica que mesmo as vacas sororeagentes, a resposta imune inata não responde como esperado após outros desafios.

6. DISCUSSÃO

6.1 Análise histológica dos tecidos endometriais *ex vivo* das vacas não gestantes e gestantes do grupo controle e desafiadas com *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

Os resultados da análise histológica dos tecidos endometriais *ex vivo*, evidenciam que a técnica de explantes endometriais comparando com tecido íntegro, mostraram que o modelo permanece com arquitetura íntegra por até 48 horas, além de produzir citocinas em quantidade competente conforme Borges; Healey; Sheldon (2012). Salientando que esta pesquisa foi a pioneira no modelo de explantes endometriais avaliando a resposta a infecção experimental em vacas reagentes ou não ao MAT avaliando a resposta das citocinas frente ao desafio da *Leptospira* spp. viva.

Nos achados dos tecidos endometriais desafiados com *Leptospira*, mostraram lesões moderadas, como observado por Slee; Mcorist (1983), avaliando fetos e placentas resultantes de abortos de bovinos sororeagentes a *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo, os abortos ocorrem no período 5-8 meses de gestação, não foram encontradas lesões características causadas por *Leptospira* nas placentas, mas nefrite intersticial nos fetos. Colaborando com os resultados, independente das fases das gestações as lesões nos úteros podem não serem evidentes, quando desafiados com *Leptospira*.

Contribuindo aos achados desta pesquisa Mineiro et al.(2011), na avaliação histológica de tecidos endometriais de vacas reagentes ao MAT, descreveram o tecido edemaciado com alterações vascular e presença de infiltrado linfocitário difuso nas regiões perivascular e periglandular, do mesmo modo foi observado nos explantes endometriais desafiados com *Leptospira*.

6.2 Produção de interleucina IL-6 em tecidos endometriais de vacas não gestantes e gestantes reagentes ou não ao MAT desafiadas com LPS e a *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

Nesta pesquisa a resposta ao LPS da *E.coli* foi alta comparada a resposta causada pelo inóculo de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno viva. Em outros estudos Borges; Healey; sheldon (2012); Sheldon, (2012) mostraram que, ocorre maior resposta do útero a

infecção por *E.coli* viva comparado ao LPS da bactéria. A alta produção de citocinas produzida pelo LPS da *Escherichia coli*, é justificado pelo fato do LPS leptospiral considerado menos patogênico do que LPS de Gram-negativo típico, porém estimula uma forte resposta imunológica, dependendo da natureza da interação hospedeiro-sorovar (BEN, 2014).

Outra hipótese para baixa resposta das citocinas frente a *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno viva comparado ao LPS é a influência da espécie do hospedeiro e o sorovar, assim como Wilson-welder et al.(2016), em que a incubação de células polimorfonucleares de bovinos com *Leptospiras* inativadas por período de 2 horas induziu menor expressão gênica das citocinas IL-1 β , IL-8, MIP-1 α e TNF- α , comparado com tratamento com *E.coli*. Segundo os autores possivelmente a resposta dos bovinos como hospedeiros ao sorovar Hardjo é diferente comparando as outras espécies de animais, manifestando de forma crônica com repostas moderada.

Os resultados mostraram que os endométrios provenientes de vacas sororeagentes não-gestantes, quando desafiados com LPS de *E.Coli* ou *Leptospira*, mostraram um aumento significativo de IL-6, sugerindo que animais sororeagentes teriam uma resposta aumentada e mais intensa em uma segunda exposição ou manutenção da exposição ao LPS de bactérias Gram-negativas. Respaldaado pelo fato que em bovinos, os transcritos de mRNA para citocinas IL-1 β e IL-6 e a quimiocina IL-8 são mais abundantes no endométrio de animais doentes do que em animais normais (TUNER et al., 2014).

Assim, desafios frequentes aumentam a resposta imune, que já foi iniciada em outros contatos prévios com outros patógenos, justificando o nível elevado da citocina IL-6 e em animais sororeagentes em relação aos não-reagentes, tanto para o desafio com LPS, componente que pode ser encontrado na parede de bactérias Gram-negativas (SIMPSON; TRENT, 2019) quanto para *Leptospira*.

Além disso, existem fatores correlacionados com a interação entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa, que podem justificar a resposta dos animais reagentes responderem de forma mais intensa aos desafios ao LPS e a *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno. Inalcterra e Dominguez (2020) demonstraram através de resultados de vários estudos em plantas e animais vertebrados e invertebrados, que a resposta imune inata demonstra um retorno mais eficaz em um segundo contato tanto em tecidos danificados como não danificados, essa memória é chamada de defesa primária, podendo ocorrer a diversos tipos de patógenos e sem especificidade, como por exemplo vacinas contra um tipo de

antígeno que podem produzir uma proteção a outro tipo de patógeno. Os autores sugerem que essas alterações estão correlacionadas com modificações epigenéticas, que não estão ainda bem esclarecidas.

Para determinação da concentração do inóculo de *Leptospira* de 10^8 UFC/ mL testada nesse estudo, atentou-se que a concentração era empregada em estudos anteriores como (MAURICIO; HURTADOS, 2001; PÉREZ CÁRDENAS et al., 2010; VIRIYAKOSOL et al., 2006; JANWITTHAYANAN et al., 2013; WUTHIEKANUN et al., 2013).

No desafio com a dose de 10^8 *Leptospira* em tecidos endometriais gestacionais os níveis de IL-6 não aumentaram de forma significativa, diferindo destes resultados (YANG et al., 2018), analisaram os níveis de expressão de IL-4 e IL-10 de células polimorfonucleares de vacas gestantes em fase inicial com estágio morular de desenvolvimento, obtiveram aumento significativo na produção dessas citocinas. Tal como IL-4, IL-6 e IL-10 são citocinas com perfil Th 2, consideradas essenciais na gestação (XIAO et al., 2015).

A IL-6 é uma citocina multifuncional altamente expressa no trato reprodutivo feminino e no tecido gestacional e exerce papéis diferentes durante a gestação, como o desenvolvimento de placenta e adaptações imunológicas necessárias para tolerar o feto. Diferindo ao resultado encontrado nesta pesquisa que foi encontrada níveis baixos de IL-6 nos tecidos gestacionais, a literatura afirma que essa citocina também desempenha um papel na patogênese da infertilidade como em casos de distúrbios gestacionais; nascimentos prematuros que são associados a níveis elevados de IL-6 no soro materno (LA ROCCA et al., 2014).

Embora os sinais clínicos da leptospirose sejam diferentes em cada paciente, a resposta inflamatória é comum a todos, e as citocinas TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12 estão envolvidas na resposta inflamatória durante a doença em bovinos (WILSON-WELDER et al., 2016; WANG et al., 2014), diferindo o que ocorreu nos explantes das vacas gestantes que não montaram resposta inflamatória frente a mesmo desafio.

Chassin et al.(2009), em pesquisa com camundongos *in vivo* inoculados com *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni, demonstraram que ocorre aumento significativo da citocina pro inflamatórias IL-6 nos tecidos de órgãos como rim, fígado e pulmão após três dias da infecção, o que justifica a baixa produção de citocinas no período de vinte quatro horas como neste desafio.

6.3 Análise de produção de interleucina IL-1 β em tecidos endometriais *ex vivo* de vacas não gestantes e gestantes soroagente ou não ao MAT desafiadas com LPS e a *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

No presente estudo a citocina IL-1 β apresentou aumento nos tecidos endometriais *ex vivo* de vacas não gestantes e gestantes, esse aumento da expressão dessa citocina também foi descrito por Wang et al. (2014), que trabalharam com cadelas, constataram o aumento da expressão das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 em tecido uterino *in vivo* de cadelas não gestantes infectadas experimentalmente com 2×10^8 *Leptospira interrogans* sorovar Autumnalis, com alterações marcantes para IL-1 β .

Estes resultados em endométrio de vacas também confirmam os achados em camundongos fêmeas não gestantes infectados experimentalmente com infusões intrauterinas com *Leptospira interrogans* sorovar Autumnalis, com doses iguais usadas neste estudo de 10^8 *Leptospira*/mL. Os autores descreveram que estes camundongos apresentaram aumento significativo da expressão das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, nas amostras de tecidos uterinos, em resposta a infecção e superior nos animais não-tratados com os produtos emodina, timol e astragalina quando comparado aos animais tratados (ZHANG et al., 2017).

O aumento da resposta da IL-1 β , aos desafios ao LPS e a *Leptospira* nos endométrios gestantes é atribuído a produção dessa citocina em diversas células como células hematopoiéticas, como células dendríticas, monócitos sanguíneos, células T, macrófagos teciduais e também pode ser sintetizada por tecidos e células uterinas, incluindo músculo liso miometrial. A indução de sua transcrição é desencadeada por estímulos microbianos, padrões moleculares associados a danos (DAMPs) em tecidos maternos com aumento físico progressivo, à medida que a gestação avança, que estimulam receptores (TLR4) ou citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β (ISHIGURO et al., 2016).

6.4 Produção de IL-6 e IL-1 β em tecidos endometriais de vacas comparando as diferentes fases gestacionais das vacas reagentes ao MAT nos desafios ao LPS e *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno

A gestação é um paradoxo imunológico criado pela interação entre o sistema imunológico materno, feto e útero. Ainda, o que está se tornando claro é que o conceito e outros mediadores endócrinos, incluindo progesterona, modulam ativamente a resposta imune

materna durante a gestação para facilitar o crescimento e desenvolvimento da placenta em funcionamento. No entanto, as evidências mostram que a montagem dos sinais do feto induzem uma tolerância (Th2) orientando na função das células imunes na interface do sistema materno-fetal (OTT et al., 2014).

A citocina IL-6 é importante na gestação, principalmente pelo fato da expressão elevada desta proteína ocorrer em casos de infertilidade, recorrência de aborto espontâneo, pré-eclâmpsia e parto prematuro em humanos, em animais como porcas em gestação, ocorre maior expressão e elevação dessa citocina na fase mediana e final da gestação. No qual difere este estudo que apresentaram níveis elevados de IL-6 que ocorreram no início da gestação de bovinos desafiados ao LPS de *E.coli* (YOO et al., 2017).

Nesta pesquisa os explantes endometriais em fase final de gestação responderam significativamente com aumento na produção de IL-1 β frente ao desafio com LPS, Deb; Chaturvedi; Jaiswal (2005) avaliando a expressão gênica desta citocina frente ao 1 μ g de LPS em tecidos endometriais de camundongos gestantes na fase pré implantação (até 5 dias), também verificaram que os animais desafiados apresentaram alta expressão de forma crescente com o tempo evolução, confirmando os resultados encontrados.

Semelhante também a esse resultado Pang et al. (2019) compararam os animais que sofreram aborto e os que mantiveram a gestação normal, após infectarem camundongos fêmeas gestantes com LPS (dose 2,5 μ m / 200 μ l), os animais que sofreram aborto apresentaram declínio na produção de IL-5 e IL-13 e os animais que mantiveram a gestação apresentaram significativo aumento na produção das citocinas.

No desafio com a *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno não houve diferença significativa entre as fases gestacionais na produção de citocinas inflamatórias. Entretanto as cepas do sorogrupo Sejroe estão fortemente associadas à infecção uterina, como descrito no estudo realizado em hamsters infectados experimentalmente (PINTO et al., 2020). Outro fator a acrescentar sobre a patogenia da doença é o fato da *Leptospira* não ser encontrada em tecidos uterinos, somente em placentas, cordões umbilicais e órgãos de fetos após abortos em éguas que geralmente sofrem aborto no terço final de gestação (DIVERS et al., 2019)

Os resultados desta pesquisa, mostram que as vacas em fase gestacional apresentaram títulos baixos e algumas títulos elevados na sorologia oposto ao estudo de Dhaliwal et al. (1996) que após inocularem 10⁵ *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo de forma intrauterina em vacas que posteriormente foram inseminadas, observaram que ocorreu diminuição da taxa de gestação. Além disso, esses animais apresentaram soroconversão no MAT, com títulos

máximos 1:100 e nos períodos estrais seguintes produziram anticorpos IgA e IgG, na presente pesquisa as vacas apresentaram títulos superiores de até 1:800 no MAT em fase gestacional.

7.0 CONCLUSÃO

Ocorreu estimulação de produção de citocinas inflamatórias em tecidos endometriais *ex vivo* de vacas não gestantes e gestantes nos desafios ao LPS de *E.Coli* e *Leptospira interrogans* sorovar Hardjoprajitno, contribuindo para compreensão da resposta imunológica neste tecido. Os desafios resultaram em maiores produções de IL-6 em tecidos endometriais de vacas não gestantes e reagentes à *Leptospira* spp, mostrando uma possível interação da resposta imune inata e adaptativa após um prévio contato. Oposto no desafio com *Leptospira* no qual ocorreu menor estimulação de produção da IL-6 em vacas gestantes. Ademais nos tecidos endometriais *ex vivos* em fases iniciais de gestação foram encontrados maiores estímulos de IL-6 e na fase final de gestação maiores estímulos de IL-1 β no desafio ao LPS, oposto ao desafio a *Leptospira* que não ocorreu diferença significativa entre as fases gestacionais.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), projeto APQ-00937-15 e projeto APQ-03740-1

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. DE LA P. Leptospira and leptospirosis. In: **Journal of Biological Education**. v. 140 25p.287-296.
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. DE LA P. Leptospira and leptospirosis. **Journal of Biological Education**, 2010. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- AGNONE, A. et al. Antigen-Specific T Cells and Cytokines Detection as Useful Tool for Understanding Immunity against **Zoonotic Infections**. v. 2012, 2012.
DOI:<https://doi.org/10.1155/2012/768789>
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- ANDRE-FONTAINE, G.; AVIAT, F.; THORIN, C. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. **Current Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 136–142, 2015. DOI:<https://doi.org/10.1007/s00284-015-0836-4>
- AOKI, T.; NARUMIYA, S. Prostaglandins and chronic inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 6, p. 304–311, 2012.
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.02.004>
- AQIB, A. I. et al. Leptospirosis: Rising Nuisance for Cattle and Threat to Public Health. In: **Bacterial Cattle Diseases**.2019. DOI: 10.5772/intechopen.82211
- ARASHIRO, E. K. N. et al. Repetition of estrus is the most frequent reproductive problem after breeding in dairy cattle from Rio de Janeiro, Brazil. **Ciencia Rural**, v. 47, n. 7, 2017.
<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20161092>
- ASHKAR, A.; ROSENTHAL, K. Toll-like Receptor 9, CpG DNA and Innate Immunity. **Current Molecular Medicine**, v. 2, n. 6, p. 545–556, 2005.
DOI: <https://doi.org/10.2174/1566524023362159>
- ASSENKA, J. A. et al. Predominant Leptospiral Serogroups Circulating among Humans, Livestock and Wildlife in Katavi-Rukwa Ecosystem, Tanzania. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–14, 2015. . doi: [10.1371/journal.pntd.0003607](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003607)
- BANFI, E. et al. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospires. **Journal of General Microbiology**, v. 128, n. 4, p. 813–816, 1982. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-4-813>
- BAROCCHI, M. A. et al. Rapid Translocation of Polarized MDCK Cell Monolayers by. **Society**, v. 70, n. 12, p. 6926–6932, 2002. . DOI: 10.1128/IAI.70.12.6926-6932.2002
- BAZER, F. W. et al. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: Interactions among novel cell signaling pathways. **Reproductive Biology**, v. 8, n. 3, p. 179–211, 2008. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60012-6](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60012-6)
- BEN, A. **Leptospira an Leptospirosis**. Vol. 387. Springer, 2014.

BERSINGER, N. A. et al. Morphology of human endometrial explants and secretion of stromal marker proteins in short-and long-term cultures. **Gynecological Surgery**, v. 7, n. 1, p. 75–80, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10397-009-0520-4>

BEUTLER, B. Innate immunity: An overview. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 12, p. 845–859, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, p. S33–S40, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>

BORGES, Á. M.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Explants of Intact Endometrium to Model Bovine Innate Immunity and Inflammation Ex Vivo. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 6, p. 526–539, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01106.x>

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, p. S3–S23, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980>

CHAPWANYA, A. et al. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1396–1407, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.006>

CHASSIN, C. et al. TLR4- and TLR2-Mediated B Cell Responses Control the Clearance of the Bacterial Pathogen, *Leptospira interrogans*. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 4, p. 2669–2677, 2009. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900506>

CHIDEROLI, R. T. et al. Culture Strategies for Isolation of Fastidious *Leptospira* Serovar Hardjo and Molecular Differentiation of Genotypes Hardjobovis and Hardjoprajitno. v. 8, n. November, p. 1–8, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02155>

CHIRATHAWORN, C. et al. Cytokine Cytokine levels as biomarkers for leptospirosis patients. **Cytokine**, v. 85, p. 80–82, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.06.007>

CHUNG, Y. et al. Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 576–587, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.02.007>

CINCO, M.; BANFI, E.; SORANZO, M. R. Studies on the interaction between macrophages and leptospires. **Journal of General Microbiology**, v. 124, n. Pt 2, p. 409–413, 1981. <https://doi.org/10.1099/00221287-124-2-409>

COSTA, À. DE S. **Estudo retrospectivo e in vitro da resposta imune uterina em cadelas com desordens reprodutivas no município de Uberlândia - MG.** [s.l: s.n.]. <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.1055>

CUKIERMAN, E. et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1708–1712, 2001. DOI: 10.1126/science.1064829

DAHER, EDE F; DE ABREU, KL; DA SILVA JUNIOR, G. Leptospirosis-associated acute kidney injury. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101->

28002010000400010.

DAVIS, J. M.; HAAKE, D. A.; RAMAKRISHNAN, L. *Leptospira interrogans* stably infects zebrafish embryos, altering phagocyte behavior and homing to specific tissues. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 6, p. 2–7, 2009.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000463>

DE BARROS, M. R. M. **The ex vivo and in vitro transcriptomic profiles of equine endometrium using an explant model to further study endometritis.** Tese de doutorado.2019 [s.l: s.n.].

DEB, K.; CHATURVEDI, M. M.; JAISWAL, Y. K. Gram-negative bacterial LPS induced poor uterine receptivity and implantation failure in mouse: Alterations in IL-1 β expression in the preimplantation embryo and uterine horns. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 13, n. 3, p. 125–133, 2005. <https://doi.org/10.1080/10647440500147885>

DENG, Y. et al. Regulatory roles of PGE2 in LPS-induced tissue damage in bovine endometrial explants. **European Journal of Pharmacology**, v. 852, n. November 2018, p. 207–217, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.03.044>

DENNEY, J. M. et al. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. **Cytokine**, v. 53, n. 2, p. 170–177, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.11.005>

DESILETS, D. J. et al. Endoscopic simulators. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 73, n. 5, p. 861–867, 2011. DOI: doi.org/10.1016/j.gie.2011.01.063

DHALIWAL, G. S. et al. Reduced conception rates in dairy cattle associated with serological evidence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection. **Veterinary Record**, v. 139, n. 5, p. 110–114, 1996. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.139.5.110>

DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; WOLDEHIWET, Z. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 3–4, p. 135–152, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00124-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00124-5)

DINARELLO, C. A. REVIEW ARTICLE Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. **British Medical Journal**, v. s4-1, n. 147, p. 863, 1996. <https://doi.org/10.1182/blood.V87.6.2095.bloodjournal8762095>

DIVERS, T. J. et al. Leptospirosis: An important infectious disease in North American horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 3, p. 287–292, 2019. <https://doi.org/10.1111/evj.13069>

ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 10, n. 3, p. 463–478, 1994. DOI: <https://www.springer.com/gp/book/9783662450581>

ELLIS, W. A. **Animal Leptospirosis**. Berlin, Heidelberg, 2015. p. 99-137.

ESPOSITO, G. et al. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n. 3–4, p. 60–97, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.007>

- ESTAVOYER, J. M. et al. Tumor necrosis factor in patients with leptospirosis [1]. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 1245–1246, 1991. DOI: [10.1093/clinids/13.6.1245](https://doi.org/10.1093/clinids/13.6.1245)
- FAINE, S. et al. Leptospira and leptospirosis, Melbourne. **Australia: MediSci**, p. 259, 1999
- FÁVERO, J. F. et al. Immune response of a commercial vaccine against *Leptospira interrogans*: Antibodies and cytokine levels. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 46–49, 2018. DOI: [10.1016/j.micpath.2017.10.042](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.042)
- FAVERO, M. et al. Leptospirose Bovina - Variantes Sorológicas Predominantes Em Colheitas Efetuadas No Período De 1984 a 1997 Em Rebanhos De 21 Estados Do Brasil. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 29–35, 2001.
- FIGUEIREDO, A. DE O. et al. Prevalência e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 375–381, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000500003>
- FORDE, N. et al. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 163–169, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.025>
- FU, Y. et al. Lipopolysaccharide increases Toll-like receptor 4 and downstream Toll-like receptor signaling molecules expression in bovine endometrial epithelial cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 151, n. 1–2, p. 20–27, 2013. DOI: [10.1016/j.vetimm.2012.09.039](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.039)
- GAMAGE, C. D. et al. Carrier status of leptospirosis among cattle in Sri Lanka: A zoonotic threat to public health. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, n. 1, p. 91–96, 2014. DOI: [10.1111/tbed.12014](https://doi.org/10.1111/tbed.12014)
- HAMILTON, A. B.; BETZ, A. G. Gimme shelter - the immune system during pregnancy (Munoz-Suano 2011) (impressão ok).pdf. **Immunological Reviews**, v. 241, p. 20–38, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x>
- HAMOND, C. et al. Urinary PCR as an increasingly useful tool for an accurate diagnosis of leptospirosis in livestock. **Veterinary Research Communications**, v. 38, n. 1, p. 81–85, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11259-013-9582-x>
- HESSE, M. et al. Immune response to *Salmonella* infections in vaccinated and non-vaccinated turkeys. **Research in Veterinary Science**, v. 115, n. April, p. 165–173, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.04.002>
- HODES, G. E.; MÉNARD, C.; RUSSO, S. J. Integrating Interleukin-6 into depression diagnosis and treatment. **Neurobiology of Stress**, v. 4, p. 15–22, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.03.003>
- INCALCATERRA, S.; DOMINGUEZ, J. A. Trained Immunity at a Glance; A Review on the Innate Immune Memory and its Potential Role in Infections, Diseases and New Therapeutic Strategies. **Advanced Journal of Graduate Research**, v. 8, n. 1, p. 68–81, 2020.

DOI: <https://doi.org/10.21467/ajgr.8.1.68-81>

ISHIGURO, T. et al. Interleukin (IL) -1 in rat parturition : IL-1 receptors 1 and 2 and accessory proteins abundance in pregnant rat uterus at term – regulation by progesterone.

Physiological Reports, v. 4, n. II, p. 1–12, 2016.

<https://doi.org/10.14814/phy2.12866>

ISOGAI, E. et al. Macrophage Activation by Leptospiral Lipopolysaccharide. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, v. 273, n. 2, p. 200–208, 1990. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(11\)80250-1](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80250-1)

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immunity: Lipoproteins take their Toll on the host. **Current Biology**, v. 9, n. 23, p. 879–882, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)80073-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)80073-1)

JANWITTHAYANAN, W. et al. In vivo gene expression and immunoreactivity of Leptospira collagenase. **Microbiological Research**, v. 168, n. 5, p. 268–272, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.005>

JOST, B. H. et al. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 269–275, 1986. <https://doi.org/10.1099/00222615-22-3-269>

JUNQUEIRA, LUIZ CARLOS.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10^a edição ed. Guanabara Koogan, v. 130, 2004.

KAREN V EVANGELISTA; COBURN, J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology**, p. 209–234, 2010. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.102>

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010.

DOI:<https://doi.org/10.1038/ni.1863>

KORZEKWA, A. J., ŁUPICKA, M., SZCZYM-SOCHA, ZEPAŃSKA, A. A., PIOTROWICZ, E., BARAŃSKI, W. **Veterinary Immunology and Immunopathology** In vitro cow uterine response to Escherichia coli , leukotrienes and cytokines. v. 182, p. 59–62, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.001>

KREMER, F. S. et al. Draft genome of the leptospira interrogans strains, acegua, RCA, prea, and capivara, obtained from wildlife maintenance hosts and infected domestic animals.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 111, n. 4, p. 280–283, 2016. DOI:

<https://doi.org/10.1590/0074-02760160010>

LA ROCCA, C. et al. The immunology of pregnancy: Regulatory T cells control maternal immune tolerance toward the fetus. **Immunology Letters**, v. 162, n. 1, p. 41–48, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.06.013>

LEBLANC, S. J. Interactions of Metabolism, Inflammation, and Reproductive Tract Health in the Postpartum Period in Dairy Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n.

SUPPL. 5, p. 18–30, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02109.x>

LEE, S. K. et al. Th17 and Regulatory T cells in Women with Recurrent Pregnancy Loss. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 4, p. 311–318, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01116.x>

LIBONATI, H. A. et al. Leptospirosis is strongly associated to estrus repetition on cattle **Tropical animal health and production.**, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1604-9>

LIBONATI, H.; PINTO, P. S.; LILENBAUM, W. Microbial Pathogenesis Seronegativity of bovines face to their own recovered leptospiral isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 108, p. 101–103, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.001>

LOUREIRO, A. P. et al. High frequency of leptospiral vaginal carriers among slaughtered cows. **Animal Reproduction Science**, 2017. DOI: [10.1016/j.anireprosci.2017.01.008](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.01.008)

LOUREIRO, A. P.; LILENBAUM, W. Theriogenology Genital bovine leptospirosis : A new look for an old disease. **Theriogenology**, v. 141, p. 41–47, 2020. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.011>

LUCY, M. C.; EVANS, T. J.; POOCK, S. E. SC. **Theriogenology**, 2016. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2016.05.030](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.030)

MARINHO, M. LEPTOSPIROSE: FATORES EPIDEMIOLÓGICOS, FISIOPATOLÓGICOS E IMUNOPATOGÊNICOS. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 428–434, 2008. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992005000200009>

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Comments of Environmental Conditions for the Maintenance of Leptospira in Tropical Scenarios. **Current Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 624–625, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0894-7>

MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment. **Research in Veterinary Science**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.021>

MARTINS, T. M. et al. Modelo experimental de endometrite em vacas inoculadas com. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 247–251, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8133>

MASRI, S. A. et al. A Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Leptospira spp. in Bovine Semen. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 1, p. 15–20, 1997.

MAURICIO, A.; HURTADOS, E. Aproximación a la prevalencia serológica real de la leptospirosis en porcinos-cría. **Ciencia & Tecnología Agropecuaria**, p. 1–6, 2001. https://doi.org/10.21930/rcta.vol3_num2_art:182

MENG, Z. et al. Curcumin inhibits LPS-induced inflammation in rat vascular smooth muscle

cells in vitro via ROS-relative TLR4-MAPK/NF- κ B pathways. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 7, p. 901–911, 2013. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.24>

MICHELON, T.; SIILVEIRAI, J. G. . G.; NEUMANN, M. . Pregnancy immunology. **Rev. AMRIGS**, p. 145-151, 2006, v. 50, p. 145–151, 2006.

MIKULSKI, M. et al. Severity markers in severe leptospirosis: a cohort study. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 4, p. 687–695, 2015. . DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2275-8>

MILLER, S. I.; ERNST, R. K.; BADER, M. W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 36–46, 2005. DOI:<https://doi.org/10.1038/nrmicro1068>

MINEIRO, A. L. B. B. et al. Serology, polymerase chain reaction and histopathology for leptospirosis in samples collected at slaughter from dairy cows of Parnaíba region, state of Piauí, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 10, p. 859–866, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352007000500003>

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 240–273, 2009.

MOHAMMED, H. et al. LEPTOSPIRA: Morphology, Classification and Pathogenesis. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 02, n. 06, 2011. <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0265-N-REV>

MORDAK, R.; ANTHONY, S. P. Periparturient stress and immune suppression as a potential cause of retained placenta in highly productive dairy cows: Examples of prevention. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, n. 1, p. 1–8, 2015. DOI:<https://doi.org/10.1186/s13028-015-0175-2>

MORESCO, E. M. Y.; LAVINE, D.; BEUTLER, B. Toll-like receptors. **Current Biology**, v. 21, n. 13, p. R488–R493, 2011. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.039>

MORRIS, D.; DISKIN, M. Effect of progesterone on embryo survival. **Animal**, v. 2, n. 8, p. 1112–1119, 2008. doi:10.1017/S1751731108002474

MUGHINI-GRAS, L. et al. Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 6, p. 1172–1181, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268813001817>

NAGEL, A. et al. Bovine macrophages responses to the infection with virulent and attenuated *Leptospira interrogans* serovar Pomona. **Veterinary Microbiology**, v. 233, n. April, p. 124–132, 2019. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.033>

NAIMAN, B. M. et al. Evaluation of Type 1 Immune Response in Naïve and Vaccinated Animals following Challenge with. **Society**, v. 70, n. 11, p. 6147–6157, 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.11.6147-6157.2002

NARAYANAVARI, S. A. et al. Role of sph2 gene regulation in hemolytic and sphingomyelinase activities produced by leptospira interrogans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 8, p. 1–23, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003952>

- OLIVEIRA, L. J. et al. Characterization of the Th Profile of the Bovine Endometrium during the Oestrous Cycle and Early Pregnancy. **PLoS One** v. 8, n. 10, p. 1–13, 2013. <http://dx.doi.org/10.26512/2015.03.D.18380>
- OTT, T. L. et al. Maternal immune responses to conceptus signals during early pregnancy in ruminants. **Animal Reproduction (AR)** p. 237–245, 2014.
- PAIXÃO, A. P. et al. *Leptospira* spp. em bovinos leiteiros do estado do Maranhão, Brasil: frequência, fatores de risco e mapeamento de rebanhos reagentes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, n. 0, p. 1–12, 2016. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001022014>
- PANG, X. LI et al. Molecular detection of uterine innate lymphoid cells in the immunological mouse model of pregnancy loss. **International Immunopharmacology**, v. 68, n. December 2018, p. 1–6, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.12.046>
- PAPA, A.; KOTROTSIOU, T. Cytokines in human leptospirosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 14, p. 749–754, 2015. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trv095>
- PÉREZ CÁRDENAS, J. E. et al. BEHAVIOR OF IgM and IgG LEVELS IN PREGNANT SOWS IN HERDS OF THE COFFEE-GROWING REGION OF COLOMBIA VACCINED AGAINST LEPTOSPIRA WITH A PENTA-VALENT VACCINE. **Biosalud**, v. 9, n. 1, p. 17–33, 2010.
- PETER, S. et al. Puerperal influence of bovine uterine health status on the mRNA expression of pro-inflammatory factors. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 449–462, 2015. <http://dx.doi.org/10.17169/refubium-20809>
- PINNA, A. et al. Influence of seroreactivity to leptospira and reproductive failures in recipient mares of equine embryo transfer programmes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 4, p. 2008–2010, 2013. . <https://doi.org/10.1111/rda.12166>
- PINNA, A.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Leptospirosis and embryo recovery rate in mares. **Veterinary Record**, v. 170, n. 2, p. 60, 2012. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.e296>
- PINTO, P. S. et al. Short communication: Uterine leptospiral infection is strongly associated to strains of serogroup Sejroe on experimentally infected hamsters. **Microbial Pathogenesis**, v. 142, n. March 2019, p. 104030, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104030>
- PULIYATH, G.; SINGH, S. Leptospirosis in pregnancy. p. 2491–2496, 2012. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, DOI <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1625-7>
- REIS, E. A. G. et al. Cytokine Response Signatures in Disease Progression and Development of Severe Clinical Outcomes for Leptospirosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. 1–8, 2013. doi: [10.1371/journal.pntd.0002457](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002457)
- REXROAD, C. E.; CASIDA, L. E.; TYLER, W. J. Crown-Rump Length of Fetuses in Purebred Holstein-Friesian Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n. 3, p. 346–347, 1974. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(74\)84891-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(74)84891-5)
- REZENDE, L. A. **PRODUÇÃO DE IL-1 β E IL-6 EM EXPLANTES EX VIVO DE ENDOMÉTRIO DE VACAS NELORE E MESTIÇAS TRATADAS COM LPS E**

ESTEROIDES OVARIANOSNo. [s.l.] Universidade Federal de Uberlandia, 2016.
<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/18061>

RISTOW, P. et al. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 7, p. 0894–0903, 2007. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030097>

ROSSINI, A. D. et al. Identification of a novel protein in the genome sequences of *Leptospira interrogans* with the ability to interact with host's components. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 53, n. 1, p. 163–175, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.12.012>

SAITO, S. et al. Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 601–610, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x>

SALILEW-WONDIM, D. et al. Clinical and subclinical endometritis induced alterations in bovine endometrial transcriptome and miRNome profile. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–21, 2016. . DOI :<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2513-9>

SAUT, J. P. E. et al. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS in vitro. **Reproduction**, v. 148, n. 6, p. 593–606, 2014. DOI: 10.1530/REP-14-0230

SCHEIERMANN, P. et al. Comparing hemodynamics, blood gas analyses and proinflammatory cytokines in endotoxemic and severely septic rats. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 6, p. 719–723, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.01.020>

SHELDON, I. M.; CRONIN, J. G.; BROMFIELD, J. J. Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle. **Animal Biosciences**, n. October, p. 1–24, 2018. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115227>

SILVA, P. L. D. et al. Phagocytosis of *Leptospira* by leukocytes from mice with different susceptibility to leptospirosis and possible role of chemokines. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1371-9>

SILVA, R. A. et al. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. **European Respiratory Journal**, v. 35, n. 5, p. 994–1002, 2010. DOI: 10.1183/09031936.00049509

SILVEIRA, M. M. et al. DNA vaccines against leptospirosis: A literature review. **Vaccine**, v. 35, n. 42, p. 5559–5567, 2017. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.067>

SIMPSON, B. W.; TRENT, M. S. Pushing the envelope: LPS modifications and their consequences. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 403–416, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0201-x>

SINGH, J. et al. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. **Veterinary Journal**, v. 175, n. 3, p. 301–309, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.02.003>

SLEE, K. J.; MCORIST, S.; SKILBECK, N. W. Bovine abortion associated with *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection. **Australian veterinary journal**, v. 60, n. 7, p. 204-206, n. 1, 1983. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1751-0813.1983.tb09583.x>

SOARES, P. M. **SITUAÇÃO DA LEPTOSPIROSE EM BOVINOS DESTINADOS AO ABATE NO TRIÂNGULO MINEIRO: SOROLOGIA, ISOLAMENTO E EPIDEMIOLOGIA**. 2018. Uberlândia, Minas Gerais [s.l.: s.n.]. <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.476>

SOUSA, F. O. DE. **A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNE ARTIFICIAL PARA INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOLÓGICOS DA SEPSE**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

TAJIKI, M. H.; SALOMÃO, R. Association of Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor. **Clinical infectious diseases** [s.l.: s.n.]. v. 23p. 1177–1178. <https://doi.org/10.1093/clinids/23.5.1177>

TERPSTRA, W. J. ET AL. **Human Leptospirosis; guide for diagnosis, surveillance and control**. World Health Organization, 2003.

TOMA, C. et al. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1783–1792, 2011. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>

TU, V.; ADLER, B.; FAINE, S. The role of macrophages in the protection of mice against leptospirosis: In vitro and in vivo studies. **Pathology**, v. 14, n. 4, p. 463–468, 1982. <https://doi.org/10.3109/00313028209092128>

TUNER, M. L. et al. Have Roles in Innate Immunity and Initiate Inflammatory Responses to Bacterial Lipopeptides In **Endocrinology**. v. 155, n. April, p. 1453–1465, 2014. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1822>

VELÁZQUEZ, M. M. L. et al. Immune status during postpartum , peri-implantation and early pregnancy in cattle : An updated view. **Animal Reproduction Science**, v. 206, n. April, p. 1–10, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.05.010>

VILLANUEVA, M. A. et al. Molecular epidemiology of pathogenic *Leptospira* spp. among large ruminants in the Philippines. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 2016. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0289>

VINCENT, A. T. et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>

VIRIYAKOSOL, S. et al. Toll-Like Receptor 4 Protects against Lethal. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 887–895, 2006. DOI: 10.1128/IAI.74.2.887-895.2006

WALLACE, R. M. et al. Theriogenology Bovine pregnancy associated glycoproteins can alter selected transcripts in bovine endometrial explants. **Theriogenology**, v. 131, p. 123–132, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.026>

WANG, H. et al. Leptospiral hemolysins induce proinflammatory cytokines through toll-like receptor 2-and 4-mediated JNK and NF- κ B signaling pathways. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012. doi: [10.1371/journal.pone.0042266](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042266)

WANG, W. et al. Microbial Pathogenesis *Leptospira interrogans* induces uterine inflammatory responses and abnormal expression of extracellular matrix proteins in dogs. **Microbial Pathogenesis**, v. 75, p. 1–6, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.07.011>

WILSON-WELDER, J. H. et al. Interaction of bovine peripheral blood polymorphonuclear cells and *Leptospira* species; innate responses in the natural bovine reservoir host. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUL, p. 1–14, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01110>

WUTHIEKANUN, V. et al. Rapid Isolation and Susceptibility Testing of *Leptospira* spp . Using a New Solid Medium , LVW Agar. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 297–302, 2013. DOI: 10.1128/AAC.01812-12

XIAO, J. P. et al. Low maternal vitamin D status during the second trimester of pregnancy: A cross-sectional study in Wuxi, China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 3–11, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117748>

YANG, L. et al. Differential expression of interferon-gamma, IL-4 and IL-10 in peripheral blood mononuclear cells during early pregnancy of the bovine. **Reproductive Biology**, v. 18, n. 3, p. 312–315, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.06.005>

YOO, I. et al. Expression and regulation of interleukin 6 and its receptor at the maternal-conceptus interface during pregnancy in pigs. **Theriogenology**, v. 96, p. 85–91, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.003>

YOO, I. et al. **Analysis of stage-specific expression of the toll-like receptor family in the porcine endometrium throughout the estrous cycle and pregnancy.** [s.l.] Elsevier Inc., 2018. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.003>

ZHANG, W. et al. Inhibitory Effects of Emodin , Thymol , and Astragalin on *Leptospira interrogans* -Induced Inflammatory Response in the Uterine and Endometrium Epithelial Cells of Mice. **Inflammation** v. 40, n. 2, p. 666–675, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10753-017-0513-9>

ZUERNER, R. L. et al. A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 4, p. 684–691, 2011. DOI: 10.1128/CVI.00288-10

ANEXO

Fluxograma da Metodologia

