

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

PRODUÇÃO DE IL-1 β E IL-6 EM EXPLANTES *EX VIVO* DE ENDOMÉTRIO DE VACAS NELORE E MESTIÇAS TRATADAS COM LPS E ESTEROIDES OVARIANOS

Amanda Lima Rezende

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MG – BRASIL

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

PRODUÇÃO DE IL-1 β E IL-6 EM EXPLANTES *EX VIVO* DE ENDOMÉTRIO DE VACAS NELORE E MESTIÇAS TRATADAS COM LPS E ESTEROIDES OVARIANOS

Amanda Lima Rezende

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva).

UBERLÂNDIA – MG – BRASIL

Dezembro – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R467p
2016

Rezende, Amanda Lima, 1991
Produção de IL-1 β E IL-6 em explantes ex vivo de endométrio de vacas nelore e mestiças tratadas com LPS e esteroides ovarianos / Amanda Lima Rezende. - 2016.

47 f. : il.

Orientador: João Paulo Elsen Saut.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Bovino - Doenças - Teses. 3. Endométrio - Doenças - Teses. 4. Progesterona - Teses. I. Saut, João Paulo Elsen. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Amanda Lima Rezende – nascida na cidade de Franca, Estado de São Paulo aos treze dias do mês de abril de um mil novecentos e noventa e um. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no primeiro semestre de 2010, tendo concluído o curso em janeiro de 2015. Em dezembro de 2014 foi aprovada no processo seletivo de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (Mestrado) da UFU, na área de Produção Animal com linha de pesquisa em Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva. Ingressou no Mestrado em março de 2015, onde foi bolsista pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) no período de fevereiro de março de 2016 a dezembro de 2016, quando concluiu o Mestrado. Em sistema de dedicação exclusiva à Pós-Graduação durante todo o período, trabalhou com vacas leiteiras no período de transição e pós-parto, buscando verificar a influência do periparto na imunidade uterina e sua correlação com a ocorrência de doenças uterinas, bem como a determinação de técnicas de avaliação e tratamento destes animais neste período.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido a vida, por me abençoar e me guiar sempre pelos melhores caminhos.

Aos meus pais, pelo amor, carinho e confiança que depositaram em mim em todos os momentos. Sem a dedicação e o esforço de vocês esta conquista não seria possível.

Aos meus irmãos, meus avós e toda a família que sempre acreditaram e torceram por mim.

A Universidade Federal de Uberlândia, pela fundamental contribuição à minha formação.

Ao Professor e Orientador Dr. João Paulo Elsen Saut, por me conceder esta oportunidade e por acreditar no meu trabalho. Obrigada pela orientação, pelos ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

Aos amigos do Laboratório de Saúde em Grandes Animais (LASGRAN) e da Pós-Graduação da UFU, Paula, William, Oglênia, Eriky, Meire Ellen, Erick, Pablo, Raíssa e Layane, que sempre estiveram dispostos a ajudar e que foram essenciais para realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido para realização desta pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Resposta das interleucinas 1 β e 6 de cultivos de endométrio bovino *ex vivo* de fêmeas da raça Nelore e Mestiças frente à exposição a diferentes concentrações de lipopolissacarídeos durante 24 horas. Explantes de endométrio intacto de fêmeas Nelore ($n=17$) e Mestiças ($n=12$) cultivados em meio controle ou meio contendo 1 ou 2 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeos (LPS) (*E. coli* 0111:B4). Os sobrenadantes foram retirados após 24 horas para mensuração do acúmulo de IL-1 β (A,B) e IL-6 (D,E). Os resultados foram apresentados por meio da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística por ANOVA com pós-teste de Comparação múltipla de Bonferroni (A,B,D,E) e análise de variância (Two-way ANOVA) (C,F), a 5% de significância ($P<0,05$) 33
- Figura 2.** Resposta das interleucinas 1 β e 6 de cultivos de endométrio bovino *ex vivo* de fêmeas da raça Nelore e Mestiças nas primeiras 24 horas e entre 24 e 48 horas frente à exposição de lipopolissacarídeos. Explantes de endométrio intacto de fêmeas Nelore ($n=17$) e Mestiças ($n=12$) cultivados em meio controle ou meio contendo 1 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeos (LPS) no início (0hs) ou após 24 horas (*E. coli* 0111:B4). Nos explantes expostos a LPS no início (0hs), os sobrenadantes foram retirados após 24 horas para mensuração do acúmulo de IL-1 β e IL-6. Já nos explantes expostos a LPS após 24 horas, os sobrenadantes foram retirados após 48 horas do início do experimento para mensuração do acúmulo de IL-1 β e IL-6. Os resultados foram apresentados por meio da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística por análise de variância (Two-way ANOVA) com pós-teste de Comparação múltipla de Bonferroni, a 5% de significância ($P<0,05$) 34
- Figura 3.** Resposta das interleucinas 1 β e 6 de cultivos de endométrio bovino *ex vivo* de fêmeas da raça Nelore e Mestiças, pré-tratados com meio controle ou progesterona nas primeiras 24 horas e expostos a LPS entre 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença estatística por análise de variância Two-way ANOVA a 5% de significância ($P<0,05$). Os resultados foram apresentados através da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média. Os explantes foram pré-tratados durante 24 horas com meio controle ou com meio contendo 5ng/mL de progesterona. Após 24 horas, os explantes foram mantidos em meio controle ou desafiados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeos (*E.coli* 0111:B4). Os sobrenadantes foram retirados após 48 horas do início do experimento para mensuração do acúmulo de IL-1 β (A-C) e IL-6 (D-F) 35
- Figura 4.** Resposta das interleucinas 1 β e 6 de cultivos de endométrio bovino *ex vivo* de fêmeas da raça Nelore e Mestiças, pré-tratados com meio controle ou estradiol nas primeiras 24 horas e expostos a LPS entre 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença estatística por análise de variância Two-way ANOVA a 5% de significância ($P<0,05$). Os resultados foram apresentados através da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média. Os explantes foram pré-tratados durante 24 horas com meio controle ou com meio contendo 3 pg/mL de estradiol. Após 24 horas, os explantes foram mantidos em meio controle ou desafiados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeos (*E.coli* 0111:B4). Os sobrenadantes foram retirados após 48 horas do início do experimento para mensuração do acúmulo de IL-1 β (A-C) e IL-6 (D-F) 36

Figura 5. Resposta das interleucinas 1 β (A) e 6 (B) de cultivos de endométrio bovino *ex vivo* de fêmeas da raça Nelore e Mestiças em meio controle ou meio contendo 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipopolissacarídeos, após 24 horas de cultura. Os animais foram agrupados de acordo com as concentrações séricas de progesterona: P4 < 1 ng/mL ($n=6$); 1 < P4 < 5 ng/mL ($n=8$); P4 > 5 ng/mL ($n=17$). Os resultados foram apresentados por meio da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média. Os dados foram avaliados por análise de variância (Two-way ANOVA) com nível de significância de $P<0,05$ 37

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
<i>Imunidade Inata</i>	13
<i>Influência dos hormônios esteroides na imunidade inata</i>	14
<i>Resposta Imune no pós-parto</i>	15
<i>Doenças uterinas do pós-parto</i>	17
<i>Técnica de cultura de órgãos ex vivo (COEX).....</i>	18
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO DE IL-1β E IL-6 EM EXPLANTES EX VIVO DE ENDOMÉTRIO DE VACAS NELORE E MESTIÇAS TRATADAS COM LPS E ESTEROIDES OVARIANOS	26
RESUMO	26
ABSTRACT	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. METODOLOGIA.....	28
2.1. <i>Animais e local de execução</i>	28
2.2. <i>Coleta das amostras</i>	29
2.3. <i>Processamento das amostras</i>	29
2.4. <i>Determinação do perfil de produção das interleucinas IL-1β e IL-6 pelo endométrio bovino ex vivo de vacas mestiças e da raça Nelore em diferentes concentrações de lipopolissacarídeos.....</i>	30
2.5. <i>Avaliação da influência da progesterona e do estradiol na produção de interleucinas IL-1β e IL-6 pelo endométrio bovino exposto a lipopolissacarídeos</i>	30
2.6. <i>Determinação do perfil de produção das interleucinas IL-1β e IL-6 pelo endométrio bovino ex vivo de vacas mestiças e da raça Nelore sob diferentes concentrações de progesterona</i>	31
2.7. <i>Técnica de ELISA</i>	32
2.8. <i>Análise estatística.....</i>	32
3. RESULTADOS	32
3.1. <i>Produção das interleucinas IL-1β e IL-6 pelo endométrio bovino ex vivo de fêmeas da raça Nelore e mestiças expostos a diferentes tempos e concentrações de lipopolissacarídeos.....</i>	33
3.2. <i>Produção das interleucinas IL-1β e IL-6 pelo endométrio bovino ex vivo de fêmeas da raça Nelore e mestiças expostos aos hormônios progesterona e estradiol.....</i>	34

<i>3.3. Produção de interleucinas IL-1β E IL-6 pelo endométrio bovino sob diferentes concentrações de progesterona e expostos a lipopolissacarídeos.....</i>	36
4. DISCUSSÃO	37
5. CONCLUSÕES.....	41
AGRADECIMENTOS	41
REFERÊNCIAS	42
APÊNDICE A	46

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos grandes destaques do agronegócio brasileiro e ocupa um importante papel no cenário mundial, além de proporcionar o desenvolvimento de dois segmentos rentáveis, as cadeias produtivas da carne e do leite (IBGE, 2016). Segundo dados do IBGE (2016), o rebanho bovino brasileiro atingiu seu recorde em 2015 com 215,2 milhões de cabeças.

A produção de leite no Brasil em 2015 foi de 35 bilhões de litros, com aproximadamente 21,8 milhões de vacas ordenhadas (IBGE, 2016). Com a expansão e desenvolvimento constante da cadeia produtiva do leite, torna-se evidente a busca pela maior produtividade e eficiência reprodutiva dos animais. Dentro deste cenário, qualquer fator que impeça o bom funcionamento deste setor acarreta grandes prejuízos, como é o caso dos problemas reprodutivos, que estão diretamente relacionados com a queda da produtividade dos animais (LEFEBVRE & STOCK, 2012).

No momento do parto o útero bovino é invadido por uma grande variedade de bactérias patogênicas, que normalmente são eliminadas durante o processo natural de involução uterina. Em alguns casos essas bactérias persistem desencadeando as doenças uterinas, que causam comprometimento da função do órgão (SHELDON *et al.*, 2008).

As infecções uterinas afetam negativamente a eficiência reprodutiva do rebanho, pois além de estarem associadas à redução das taxas de concepção ao primeiro serviço e aumento do intervalo entre partos, correspondem a uma das principais causas de infertilidade e descarte involuntário de animais (LEFEBVRE & STOCK, 2012).

Dentre as doenças uterinas no pós-parto, a metrite e endometrite possuem grande destaque devido aos impactos causados na saúde e bem-estar dos animais, além dos prejuízos econômicos. A metrite é uma doença de caráter agudo, que acomete os animais logo na primeira semana após o parto e possui elevada incidência nas propriedades leiteiras. Devido a uma falha na resposta imune do hospedeiro, essas enfermidades persistem em até 20% dos animais na forma de endometrite (SHELDON *et al.*, 2009). A principal causa dessas infecções é a contaminação

bacteriana, geralmente por bactérias como *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Prevotella spp.* e *Fusobacterium necrophorum* (BEKANA *et al.*, 1994; KÖNIGSSON *et al.*, 2001; SHELDON e DOBSON, 2004; WILLIAMS *et al.*, 2005).

São muitos os desafios que compreendem o periparto de vacas leiteiras. Entre eles está a diminuição da ingestão de matéria seca, a maior demanda energética para produção de leite e a alteração brusca promovida no metabolismo dos animais, sendo estes os principais fatores responsáveis pela depressão do sistema imune e maior predisposição à ocorrência de enfermidades (HAMMON *et al.*, 2006; KIMURA; GOFF; KEHRLI, 1999). Segundo Leblanc *et al.* (2006) e (2012), pode levar até três semanas após o parto para ocorrer o restabelecimento da função imune.

Além destes fatores, a resposta imune também pode ser influenciada pela fase do ciclo estral, de acordo com o hormônio esteróide predominante (LEWIS, 2004). Segundo a literatura, a progesterona promove uma supressão das defesas imunitárias uterinas predispondo a ocorrência de infecções, enquanto o estradiol permite uma melhor atividade das células do sistema imune inato e consequente resistência à infecções (BORGES, HEALEY e SHELDON, 2012; FISCHER *et al.*, 2010; LEWIS, 2004).

Outra possibilidade é a influência da raça sobre a resposta imune e intensidade da resposta inflamatória, pois segundo Martin *et al.* (2008) e Figueiredo *et al.* (1997), existem importantes diferenças na fisiologia e comportamento reprodutivo entre as subespécies. Segundo Benjamin *et al.* (2016); Glass *et al.* (2005); Piper *et al.* (2008) e (2010), animais das raças *Bos taurus* desenvolvem uma resposta inflamatória mais exacerbada a patógenos quando comparada aos *Bos indicus*. Outro exemplo é a menor concentração plasmática de progesterona e estradiol das vacas Nelores quando comparadas às taurinas (SARTORELLI *et al.*, 2005).

Uma das opções de avaliação da resposta imune inata é a dosagem e expressão gênica de citocinas e quimiocinas, moléculas produzidas a partir do reconhecimento de agentes patogênicos por receptores do hospedeiro. Essas moléculas são conhecidas como agentes quimiotáxicos e desencadeiam respostas de outras células, como os fagócitos, responsáveis pela eliminação do corpo estranho (DELVES *et al.*, 2013).

Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que visem uma maior compreensão dos mecanismos moduladores da resposta imune inata em

bovinos e assim, um melhor entendimento a respeito das infecções uterinas, bem como possíveis formas de prevenção e tratamento.

Uma opção para o desenvolvimento desta linha de pesquisa é a utilização de modelos *in vitro*, como a cultura de órgãos *ex vivo* (COEX), que permitem induzir uma resposta inflamatória que mimetiza as doenças uterinas e desta forma, avaliar a resposta do tecido endometrial. Essa resposta é medida através da dosagem de citocinas obtidas no sobrenadante do cultivo celular, sob diversas condições e concentrações hormonais. No caso de bovinos, estes COEX têm a vantagem de serem coletados de tratos reprodutivos de animais logo após o abate, não havendo a necessidade de procedimentos invasivos em animais vivos.

Sendo assim, objetivou-se com este estudo avaliar a influência da raça e aptidão (leite ou corte) sobre a resposta imune inata do endométrio bovino *ex vivo* ao lipopolissacarídeo em diferentes concentrações, tempo e tratamentos hormonais com progesterona e estradiol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Imunidade Inata

O sistema imune inato corresponde à segunda barreira de defesa do organismo contra agentes patogênicos, ativado quando há perda da integridade das barreiras físicas e caracterizado por mecanismos celulares e químicos de resposta rápida (TIZARD, 2009a).

O organismo do hospedeiro direciona seus mecanismos de defesa inata para os locais de invasão microbiana e lesão tecidual, que irão desencadear uma série de reações, caracterizando a inflamação. O processo inflamatório envolve a ativação e migração de diversas células, principalmente de neutrófilos e macrófagos, responsáveis pela eliminação dos agentes invasores (TIZARD, 2009b).

As células de defesa do organismo possuem dois tipos de receptores de reconhecimento de padrões associados à lesão, responsáveis pelo reconhecimento dos sinais de perigo e ativação das células do sistema imune inato, através da ligação desses receptores às alarminas (DAMPs) e aos PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos). As alarminas são moléculas liberadas por células mortas ou por células que foram lesionadas. Os PAMPs são moléculas expressas por bactérias, fungos e vírus, reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrões (PRR) presentes nas células sentinelas do organismo hospedeiro, como os macrófagos, células dendríticas e os mastócitos (TAKEUCHI e AKIRA, 2010).

Os receptores de reconhecimento de padrões podem ser expressos na superfície de células imunitárias 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 o LPS (HERATH *et al.*, 2006; TAKEUCHI e AKIRA, 2010; TURNER *et al.*, 2014).

Os receptores tipo *Toll-like* (TLRs) são os principais receptores de reconhecimento de padrões. Os TLRs que se localizam na superfície das células reconhecem principalmente proteínas e lipoproteínas microbianas, como o LPS, lipopolissacarídeo presente em algumas bactérias (CRONIN *et al.*, 2012; HERATH *et al.*, 2006; TURNER *et al.*, 2014). O LPS é uma endotoxina constituinte da membrana externa de bactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli*, responsável por sua

patogenicidade. Essa molécula é um dos tipos de PAMP, sendo reconhecido pelo organismo do hospedeiro através dos receptores do tipo TLR4 dos macrófagos e células endometriais, que, ao se ligar à molécula patogênica estimula a liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias (DELVES *et al.*, 2013).

O fator de necrose tumoral (TNF- α) juntamente com as interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 são os principais mediadores pró-inflamatórios produzidos após o reconhecimento e ligação ao patógeno. O TNF- α promove a ativação, atração, migração e aderência dos leucócitos no local da invasão, além de potencializar a liberação de citocinas e quimiocinas. Quando associado a IL-1 promove alterações nas células do endotélio vascular, aumentando a adesão dos neutrófilos (TIZARD, 2009b).

A IL-1 β é um dos tipos de IL-1 produzida pelos monócitos e estimula a produção de IL-6 e IL-8, que atuam recrutando os neutrófilos e macrófagos responsáveis pela fagocitose e eliminação bacteriana. A citocina IL-6 estabelece uma resposta precoce a infecções, promovendo o recrutamento de leucócitos e desenvolvimento de linfócitos, estimulação e regulação das proteínas de fase aguda, além da secreção de anticorpos pelas células plasmáticas. Já a quimiocina IL-8 é um potente fator quimiotático e ativador de neutrófilos e linfócitos T (PÉTRILLIP *et al.*, 2007; SCHAEFER *et al.*, 2004; VEERDONK *et al.*, 2011).

Influência dos hormônios esteroides na imunidade inata

De acordo com a literatura, a progesterona (P4) é conhecida por promover supressão do sistema imune em bovinos e outros mamíferos, deixando assim o organismo mais suscetível a infecções. Em contrapartida, sabe-se que o estradiol promove recrutamento e melhor atividade das células imunitárias, aumentando a capacidade de defesa do organismo contra agentes patogênicos (BORGES, HEALEY e SHELDON, 2012; LEWIS, 2004).

A progesterona modula o sistema imune das fêmeas de várias maneiras. Uma delas é atuando nos canais de potássio e íons-cálcio da membrana celular das células T, inibindo a expressão gênica destas células e suprimindo sua função efetora. Além disso, sob altas concentrações, atua nos linfócitos T inibindo a liberação de ácido aracídônico e a atividade das células NK, modificando o balanço das citocinas (MICHELON *et al.*, 2006).

Segundo Su *et al.* (2009), a progesterona inibe a resposta imune inata quando desafiada com LPS através da inibição do fator nuclear NF- κ B nos macrófagos, impedindo assim a expressão dos receptores TLR4 e consequentemente, a produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a P4 inibe também a ativação da enzima iNO sintetase, impedindo a produção de óxido nítrico pelos macrófagos e a destruição das células invasoras (SU *et al.*, 2009).

Em estudos realizados com cultura de órgãos *ex vivo* (COEX), tecidos endometriais quando expostos ao LPS produziam quantidades crescentes de prostaglandinas. Porém, quando adicionada a progesterona ao meio notou-se uma redução significativa desta produção (HERATH *et al.*, 2006). Sabe-se que PGF_{2α} promove um aumento na capacidade de fagocitose dos neutrófilos, além de potencializar sua quimiotaxia. Desta forma, supõe-se que a supressão da produção de prostaglandinas constitui uma outra via de modulação da resposta imune realizada pela progesterona (LEWIS, 2004).

Por outro lado, o estradiol atua modulando positivamente a resposta imune, estimulando a expressão de IL-1B e desempenhando um importante papel no recrutamento das células imunitárias (HERATH *et al.*, 2006; WIRA *et al.*, 2010).

Resposta Imune no pós-parto

A resposta imune das vacas no período pós-parto é comprometida devido às grandes mudanças que ocorrem no metabolismo destes animais durante a fase final da gestação e o início da lactação. Esta fase é conhecida como período de transição e compreende as três semanas antes e as três semanas após o parto. Neste período há um aumento expressivo na demanda de nutrientes para produção de leite, aliado ao baixo consumo de matéria seca, o que resulta em um quadro de balanço energético negativo (BEN), onde há quantidade insuficiente de nutrientes disponíveis frente à grande exigência (RABELO e CAMPOS, 2009).

O balanço energético negativo pode ter início nos últimos dias que antecedem o parto ou logo após o mesmo, concomitante ao início da lactação e pode afetar até 80% das vacas leiteiras (BORGES *et al.*, 2013). Por ser um período de grande desafio para o organismo destes animais, cerca de 75% das doenças ocorrem nos primeiros 30 dias pós-parto (DPP). Em geral, essa elevada incidência ocorre devido à redução

da função imune, que na maioria dos casos permanece de duas semanas antes até três semanas após o parto (LEBLANC *et al.*, 2006).

A grande variação hormonal que ocorre próxima ao parto com elevadas concentrações sanguíneas de estrógeno e corticóides, aliadas a queda da progesterona plasmática, promovem uma redução de até 30% na ingestão de matéria seca (IMS). Sendo assim, a IMS, o balanço energético negativo, a perda de escore de condição corporal e a resistência a insulina freqüentes neste período, contribuem para permanência da supressão imunológica (LEBLANC, 2012).

Devido à diminuição de glicose sanguínea durante o estado de balanço energético negativo, ocorre uma mobilização das reservas corporais para obtenção de energia suplementar (DRACKLEY, 1999). Os metabólitos provenientes desta mobilização como os ácidos graxos não-esterificados (NEFA) e o β-hidroxibutirato (BHBA), em níveis elevados levam a quadros de doenças metabólicas e redução da imunidade, além de serem fatores predisponentes a ocorrência de doenças reprodutivas (LEBLANC, 2010; ROCHE, 2006).

O NEFA é o metabólito sanguíneo resultante da mobilização das reservas corporais. Quando em elevadas concentrações na corrente sanguínea, corresponde ao principal indício de ocorrência do BEN (CHAPINAL *et al.*, 2011). Segundo Hammon *et al.* (2006), a presença de concentrações aumentadas de NEFA no sangue, durante o período de BEN, promove menor atividade neutrofílica no periparto dos animais. Tendo em vista que os neutrófilos representam a principal defesa fagocitária frente ao desafio bacteriano, os níveis elevados de NEFA estão relacionados a maiores ocorrências de retenção de placenta e doenças uterinas no pós-parto (CHAPINAL *et al.*, 2011; DUBUC *et al.*, 2010).

A função fagocitária dos neutrófilos é dependente da captação de glicose, a qual se encontra deficiente quando em estado de BEN. Sendo assim, sabe-se que este seja um dos fatores que perturbam a qualidade de resposta destas células frente ao desafio bacteriano (ESPOSITO *et al.*, 2014; TURNER *et al.*, 2016; WATHES *et al.*, 2009; WEISDORF, CRADDOCK e JACOB, 1982).

Apesar dos mecanismos da atividade reduzida dos polimorfonucleares no período de transição de vacas leiteiras não estarem bem esclarecidos, sabe-se que a função dos neutrófilos encontra-se prejudicada (KIMURA *et al.*, 2002). De acordo com a literatura, níveis elevados de NEFA e BHBA são indicativos de prejuízos na função

das células imunes com implicações na saúde uterina após o parto (CHAPINAL *et al.*, 2011; DUBUC *et al.*, 2010; KLUCIŃSKI *et al.*, 1988).

Doenças uterinas do pós-parto

A ocorrência de balanço energético negativo, aborto e distocia estão entre os principais fatores de risco associados ao estabelecimento das infecções uterinas (ESPOSITO *et al.*, 2014; SHELDON *et al.*, 2006; SHELDON *et al.*, 2009). A retenção de placenta, metrite e endometrite são consideradas as principais doenças que acometem o trato reprodutivo da fêmea bovina após o parto (DUBUC *et al.*, 2010; SHELDON *et al.*, 2009)

A retenção de placenta consiste na não expulsão total ou parcial das membranas fetais em até 12 horas após o parto, devido à falha nas separações das vilosidades da placenta fetal (cotilédones) com as criptas maternas (carúnculas) (JUNIOR e MARTELLI, 2014). É considerada importante fator de risco para a metrite, uma vez que, de 30 a 50% das vacas que tiveram retenção de placenta desenvolvem metrite (SHELDON *et al.*, 2009; LEBLANC, 2007).

A metrite é uma doença de caráter agudo que geralmente ocorre logo na primeira semana após o parto. É classificada em leve, moderada e grave de acordo com os sinais clínicos. A metrite leve é caracterizada clinicamente por um aumento anormal do útero, acompanhado de descarga uterina purulenta e de odor fétido, sem a presença de sinais sistêmicos. A metrite moderada, além de apresentar os sinais clínicos da metrite leve, é acompanhada por sintomatologia sistêmica, como febre, desidratação, anorexia, prostação e queda na produção de leite. Já a metrite grave, além dos sinais apresentados nos quadros anteriores, difere-se pela presença de sinais de toxemia (DUBUC, 2011; MARQUES JÚNIOR, MARTINS e BORGES, 2011). De 20 a 40% dos animais de alta produção, mantidos em sistemas intensivos, apresentam metrite na primeira semana pós-parto e este quadro persiste em até 20% dos animais na forma de endometrite clínica (SHELDON *et al.*, 2009).

A endometrite pode ser classificada em clínica e subclínica. A endometrite clínica ocorre entre 21 e 28 DPP e é caracterizada por descarga uterina purulenta aos 21 DPP ou mucopurulenta a partir dos 26 DPP. Já a endometrite subclínica não apresenta alterações macroscópicas, sendo diagnosticada através do exame de citologia endometrial e definida através da contagem de neutrófilos na lâmina, superior

a 18% entre 21 e 33 DPP, ou superior a 10% entre 34 e 47 DPP (MARQUES JÚNIOR, MARTINS e BORGES, 2011; SHELDON *et al.*, 2009).

A ocorrência de doenças uterinas tem interferência direta na eficiência reprodutiva dos animais. Animais com retenção de placenta apresentam maior predisposição ao desenvolvimento de metrite e endometrite (MAIZON *et al.*, 2004), além de redução da interleucina-8 um potente quimioatrator de células efetoras do sistema imune (WISCHRAL *et al.*, 2001). Segundo Konyves *et al.* (2009), os animais que desenvolvem metrite no pós-parto apresentam diminuição da taxa de concepção à primeira inseminação, aumento do intervalo entre partos e de dias em aberto.

Diminuição da taxa de crescimento do folículo dominante, aumento do intervalo do parto à primeira ovulação, bem como o aumento do descarte involuntário, são fatores observados no pós-parto de animais que apresentam endometrite (ROCHE, 2006).

Técnica de cultura de órgãos ex vivo (COEX)

A técnica de COEX 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. Entre outras vantagens da técnica está a detenção do controle sobre as condições ambientais e a obtenção de resultados mais fidedignos por se conhecer exatamente as doses das substâncias de interesse utilizadas diretamente no local desejado (BANSAL *et al.*, 2009; RANDALL, TURTON e FOSTER, 2011).

Este método, que se encontra em aprimoramento, além de permitir a dosagem de hormônios e mensuração da produção de proteínas, possibilita também a avaliação morfológica dos órgãos avaliados (KOLF-CLAUW *et al.*, 2009; MAHABOOB BASHA, BAZER e ROBERTS, 1979).

O tempo de incubação e a viabilidade celular estão entre as principais limitações da técnica. Apesar de ser eficaz em mimetizar as condições *in vivo* o tecido não permanece íntegro por um longo período, pois com o cessar do aporte sanguíneo entra em estado de hipoxia e posterior degradação tecidual (RANDALL, TURTON e FOSTER, 2011). Vários estudos e adaptações da técnica estão sendo realizados com

o objetivo de aumentar o tempo de incubação dos COEX sem comprometer a viabilidade celular e a integridade do tecido (KOLF-CLAUW *et al.*, 2009; RANDALL, TURTON e FOSTER, 2011).

Segundo Borges, Healey e Sheldon (2012) e Saut *et al.* (2014), a cultura de COEX de endométrio é viável por preservar a arquitetura do tecido e por ser capaz de gerar respostas imunes funcionais frente ao desafio com bactérias ou seus padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Além disso, as respostas imunes geradas pelos COEX são menos suscetíveis a inflamações estéreis, sendo estas caracterizadas pela estimulação do sistema imune inato em situações de lesão tecidual e celular, com liberação de citocinas e quimiocinas, que desencadeiam um processo inflamatório semelhante ao que ocorre na presença de patógenos. Os processos inflamatórios causados por lesão tecidual podem mascarar o resultado do experimento e torná-lo menos fidedigno (BORGES, HEALEY e SHELDON, 2012).

REFERÊNCIAS

- BANSAL, D. *et al.* An ex-vivo Human Intestinal Model to Study *Entamoeba histolytica* Pathogenesis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 11, p. e551, 17 nov. 2009.
- BEKANA, M.; JONSSON, P.; EKMAN, T.; KINDAHL, H. Intrauterine bacterial findings in postpartum cows with retained fetal membranes. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A**, v. 41, n. 9, p. 663–70, nov. 1994.
- BENJAMIN, A. .; GREEN, B. .; CROOKER, B. .; MCKAY, S. .; KERR, D. . Differential responsiveness of Holstein and Angus dermal fibroblasts to LPS challenge occurs without major differences in the methylome. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 258, 24 dez. 2016.
- BORGES, A. .; MARTINS, T. .; MUNIZ, C. .; PEIXOTO, D. .; LEITE, A. . **Balanço energético negativo e eficiência reprodutiva de vacas leiteiras**. Disponível em: <<http://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/balanco-energetico-negativo-e-eficiencia-reprodutiva-de-vacas-leiteiras>>. Acesso em: 8 nov. 2016.
- 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.
- CHAPINAL, N.; CARSON, M.; DUFFIELD, T.; CAPEL, M.; GODDEN, S.; OVERTON, M.; SANTOS, J.; LEBLANC, S. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 4897–4903, 2011.
- CRONIN, J. G.; TURNER, M. L.; GOETZE, L.; BRYANT, C. E.; SHELDON, I. M. Toll-Like Receptor 4 and MYD88-Dependent Signaling Mechanisms of the Innate Immune System Are Essential for the Response to Lipopolysaccharide by Epithelial and Stromal Cells of the Bovine Endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 2, p. 51–51, 29 fev. 2012.
- DELVES, P.J.; MARTIN, S.J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. Imunidade Inata - Fundamentos de Imunologia. In: **Fundamentos de Imunologia**. 12^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 4–35.
- DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal of dairy science**, v. 82, n. 11, p. 2259–73, nov. 1999.
- DUBUC, J. Postpartum Uterine Diseases : Prevalence , Impacts , and Treatments. **WCDS Advances in Dairy Technologyogy**, v. 23, p. 255–267, 2011.
- DUBUC, J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; LEBLANC, S. J. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 1, p. 5764–5771, 2010.
- ESPOSITO, G.; IRONS, P. C.; WEBB, E. C.; CHAPWANYA, A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal reproduction science**, v. 144, n. 3–4, p. 60–71, 30 jan. 2014.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489–505, jun. 1997.

FISCHER, C.; DRILLICH, M.; ODAU, S.; HEUWIESER, W.; EINSPANIER, R.; GABLER, C. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 5, p. 818, 2010.

GLASS, E. .; PRESTON, P. .; SPRINGBETT, A.; CRAIGMILE, S.; KIRVAR, E.; WILKIE, G.; BROWN, C. G. . *Bos taurus* and *Bos indicus* (Sahiwal) calves respond differently to infection with *Theileria annulata* and produce markedly different levels of acute phase proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 3, p. 337–347, mar. 2005.

HAMMON, D. S.; EVJEN, I. M.; DHIMAN, T. R.; GOFF, J. P.; WALTERS, J. L. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 1, p. 21–26, 2006.

HERATH, S.; FISCHER, D. P.; WERLING, D.; WILLIAMS, E. J.; LILLY, S. T.; DOBSON, H.; BRYANT, C. E.; SHELDON, I. M. Expression and Function of Toll-Like Receptor 4 in the Endometrial Cells of the Uterus. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 562–570, jan. 2006.

IBGE. Rebanho bovino alcança a marca recorde de 215,2 milhões de cabeças, mas produção de leite cai 0,4%. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&idnoticia=3268&busca=1&t=ppm-rebanho-bovino-alanca-marca-recorde-215-2-milhoes-cabecas-producao-leite>>. Acesso em: 30 set. 2016.

JUNIOR, B. G.; MARTELLI, A. ASPECTOS CLÍNICOS E FISIOPATOLÓGICOS DA RETENÇÃO DE PLACENTA EM VACAS / CLINICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF RETAINED PLACENTA IN COWS. **Saúde em Foco**, v. 1, n. 1, p. 103–117, 2014.

KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI, M. E. Effects of the Presence of the Mammary Gland on Expression of Neutrophil Adhesion Molecules and Myeloperoxidase Activity in Periparturient Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2385–2392, nov. 1999.

KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI, M. E.; REINHARDT, T. A. Decreased Neutrophil Function as a Cause of Retained Placenta in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 3, p. 544–550, mar. 2002.

KLUCIŃSKI, W.; DEGÓRSKI, A.; MIERNIK-DEGÓRSKA, E.; TARGOWSKI, S.; WINNICKA, A. Effect of ketone bodies on the phagocytic activity of bovine milk macrophages and polymorphonuclear leukocytes. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A**, v. 35, n. 8, p. 632–9, set. 1988.

KOLF-CLAUW, M.; CASTELLOTE, J.; JOLY, B.; BOURGES-ABELLA, N.; RAYMOND-LETTRON, I.; PINTON, P.; OSWALD, I. P. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin

deoxynivalenol: Histopathological analysis. **Toxicology *in vitro***, v. 23, n. 8, p. 1580–1584, dez. 2009.

KÖNIGSSON, K.; GUSTAFSSON, H.; GUNNARSSON, A.; KINDAHL, H. Clinical and bacteriological aspects on the use of oxytetracycline and flunixin in primiparous cows with induced retained placenta and post-partal endometritis. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 36, n. 5, p. 247–56, out. 2001.

KONYVES, L.; SZENCI, O.; JURKOVICH, V.; TEGZES, L.; TIRIÁN, A.; SOLYMOSI, N.; GYULAY, G.; BRYDL, E. Risk assessment of postpartum uterine disease and consequences of puerperal metritis for subsequent metabolic status, reproduction and milk yield in dairy cows. **Acta veterinaria Hungarica**, v. 57, n. 1, p. 155–69, mar. 2009.

LEBLANC, S. Prevention of Postpartum Uterine Disease. **WCDS Advances in Dairy Technology**, v. 19, p. 145–155, 2007.

LEBLANC, S. Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in the Transition Period. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. S, p. S29–S35, 2010.

LEBLANC, S. J. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 47 Suppl 5, p. 18–30, ago. 2012.

LEBLANC, S. J.; LISSEMORE, K. D.; KELTON, D. F.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. Major Advances in Disease Prevention in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 1, p. 1267–1279, 2006.

LEFEBVRE, R.C; STOCK, A. E. Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F_{2α} in postpartum dairy cows with clinical endometritis: an evidence-based evaluation. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 1, p. 79–96, 2012.

LEWIS, G. S. Steroidal regulation of uterine immune defenses. **Animal reproduction science**, v. 82–83, p. 281–94, jul. 2004.

MAHABOOB BASHA, S. M.; BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M. The secretion of a uterine specific, purple phosphatase by cultured explants of porcine endometrium: dependency upon the state of pregnancy of the donor animal. **Biology of reproduction**, v. 20, n. 3, p. 431–41, abr. 1979.

MAIZON, D. O.; OLTENACU, P. A.; GRÖHN, Y. T.; STRAWDERMAN, R. L.; EMANUELSON, U. Effects of diseases on reproductive performance in Swedish Red and White dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 66, n. 1–4, p. 113–126, dez. 2004.

MARQUES JÚNIOR, A. P.; MARTINS, T. M.; BORGES, Á. M. Abordagem diagnóstica e de tratamento da infecção uterina em vacas Diagnosis and treatment of uterine infection in cows. v. 35, n. 2, p. 293–298, 2011.

MARTIN, I.; TORRES NETO, R.; OBA, E.; BURATINI, J.; BINELLI, M.; LAUFER-AMORIM, R.; FERREIRA, J. C. P. Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrous cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows. **Reproduction in domestic animals =**

Zuchthygiene, v. 43, n. 4, p. 415–21, ago. 2008.

MICHELON, T.; SILVEIRA, J. G. DA; GRAUDENZ, M.; NEUMANN, J. Imunologia da gestação. **Rev. AMRIGS**, v. 50, n. 2, p. 145–151, 2006.

PÉTRILLI, V.; DOSTERT, C.; MURUVE, D. A.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 6, p. 615–22, dez. 2007.

PIPER, E. .; JACKSON, L. .; BAGNALL, N. .; KONGSUWAN, K. .; LEW, A. .; JONSSON, N. . Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, n. 1–2, p. 110–119, 15 nov. 2008.

PIPER, E. .; JACKSON, L. .; BIELEFELDT-OHMANN, H.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A. .; JONSSON, N. . Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 4, p. 431–441, 15 mar. 2010.

RABELO, E.; CAMPOS, B. G. FISIOLOGIA DO PERÍODO DE TRANSIÇÃO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 0, 2009.

RANDALL, K. J.; TURTON, J.; FOSTER, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. **Cell Biology and Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 267–284, 8 ago. 2011.

ROCHE, J. F. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 96, p. 282–296, 2006.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2382–2394, 2005.

SAUT, J. P. E.; HEALEY, G. D.; BORGES, A. M.; SHELDON, I. M. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS *in vitro*. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 148, n. 6, p. 593–606, dez. 2014.

SCHAEFER, T. M.; DESOUZA, K.; FAHEY, J. V; BEAGLEY, K. W.; WIRA, C. R. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. **Immunology**, v. 112, n. 3, p. 428–36, jul. 2004.

SHELDON, I. M.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SCHUBERTH, H.-J. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 6, p. 1025–32, dez. 2009.

SHELDON, I. M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82, n. 83, p. 295–306, 2004.

SHELDON, I. M.; LEWIS, G. S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R. O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516–1530, 2006.

- SHELDON, I. M.; WILLIAMS, E. J.; MILLER, A. N. A.; NASH, D. M.; HERATH, S. Uterine diseases in cattle after parturition. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 176, n. 1, p. 115–21, abr. 2008.
- SU, L.; SUN, Y.; MA, F.; LÜ, P.; HUANG, H.; ZHOU, J. Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF- κ B activation and enhancing SOCS1 expression. **Immunology Letters**, v. 125, n. 2, p. 151–155, 2009.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.
- TIZARD, I. R. A defesa do organismo. In: **Imunologia Veterinária**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009a. p. 1–10.
- _____. Como se inicia a inflamação. In: **Imunologia Veterinária**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009b. p. 11–27.
- TURNER, M. L.; CRONIN, J. G.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Epithelial and Stromal Cells of Bovine Endometrium Have Roles in Innate Immunity and Initiate Inflammatory Responses to Bacterial Lipopeptides *In vitro* via Toll-Like Receptors TLR2, TLR1, and TLR6. **Endocrinology**, v. 155, n. 4, p. 1453–1465, abr. 2014.
- TURNER, M. L.; CRONIN, J. G.; NOLETO, P. G.; SHELDON, I. M. Glucose Availability and AMP-Activated Protein Kinase Link Energy Metabolism and Innate Immunity in the Bovine Endometrium. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0151416, 14 mar. 2016.
- VEERDONK, F. L. VAN DE; NETEA, M. G.; DINARELLO, C. A.; JOOSTEN, L. A. B. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. **Trends in immunology**, v. 32, n. 3, p. 110–6, mar. 2011.
- WATHES, D. C.; CHENG, Z.; CHOWDHURY, W.; FENWICK, M. A.; FITZPATRICK, R.; MORRIS, D. G.; PATTON, J.; MURPHY, J. J. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. **Physiological genomics**, v. 39, n. 1, p. 1–13, 9 set. 2009.
- WEISDORF, D. J.; CRADDOCK, P. R.; JACOB, H. S. Granulocytes utilize different energy sources for movement and phagocytosis. **Inflammation**, v. 6, n. 3, p. 245–56, set. 1982.
- WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; PFEIFFER, D. U.; ENGLAND, G. C. W.; NOAKES, D. E.; DOBSON, H.; SHELDON, I. M. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 102–117, 2005.
- WIRA, C. R.; FAHEY, J. V.; GHOSH, M.; PATEL, M. V.; HICKEY, D. K.; OCHIEL, D. O. Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 544–565, 29 mar. 2010.
- WISCHRAL, A.; VERRESCHI, I. T. ; LIMA, S. .; HAYASHI, L. .; BARNABE, R. . Pre-parturition profile of steroids and prostaglandin in cows with or without foetal

membrane retention. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 3, p. 181–188, 2001.

CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO DE IL-1 β E IL-6 EM EXPLANTES *EX VIVO* DE ENDOMÉTRIO DE VACAS NELORE E MESTIÇAS TRATADAS COM LPS E ESTEROIDES OVARIANOS

RESUMO - As infecções uterinas frequentemente acometem vacas leiteiras no período pós-parto, causando sérios prejuízos no desempenho reprodutivo. Contudo, nas vacas de corte, essas doenças são menos frequentes e de menor importância quando comparadas com as vacas de leite. Para testar a hipótese de que o endométrio de fêmeas mestiças leiteiras (*Bos taurus x Bos indicus*) quando desafiado com lipopolissacarídeos (LPS) apresenta resposta inflamatória distinta quando comparado ao de fêmeas de corte da raça Nelore (*Bos indicus*) e que essas respostas são influenciadas pelos hormônios esteroides ovarianos, objetivou-se avaliar a resposta imune inata do endométrio bovino *ex vivo* de fêmeas bovinas de aptidão corte da raça Nelore e de fêmeas mestiças leiteiras ao LPS em diferentes concentrações, tempo e tratamentos hormonais com progesterona e estradiol. Foram utilizados 32 tratos reprodutivos de vacas pós-púberes Nelore ($n=15$) e mestiças leiteiras ($n=17$), além de amostras de sangue coletadas no momento do abate dos animais para dosagem sérica de progesterona (P4). Os fragmentos de endométrio (explantes) foram coletados e cultivados durante 24 ou 48 horas, em meio controle, ou meio contendo LPS (1 ou 2 μ g/mL) ou pré-tratamento com estradiol (3 pg/mL) ou progesterona (5 ng/mL). Os sobrenadantes foram colhidos para dosagem de IL-1B e IL-6. Não houve diferença no acúmulo das IL-1 β e IL-6 entre as raças avaliadas quando estimuladas com concentrações de LPS de 1 ou 2 μ g/mL no meio de cultivo celular. O pré-tratamento com progesterona ou estradiol não interferiu na produção destas interleucinas. Concluiu-se que culturas de endométrio bovino *ex vivo* de animais Nelore (aptidão corte) e mestiços (aptidão leite) apresentam produção semelhante de IL-1B e IL-6 quando desafiados com LPS e que esta resposta não foi afetada pelos estágios do ciclo estral, hormônios esteroides exógenos em resposta ao desafio com LPS no meio de cultivo celular.

Palavras-Chave: bovinos, citocinas, doenças uterinas, imunidade inata, progesterona

ABSTRACT - Uterine infections often affect dairy cows in the postpartum period, causing significant losses in reproductive performance. However, these uterine diseases are less frequent and important in beef cows when compared to dairy cows. The hypothesis of this study was that the endometrium of crossbred dairy cows (*Bos*

taurus x Bos indicus) when challenged with lipopolysaccharide (LPS) presents a different inflammatory response compared to Nellore (*Bos indicus*) females and that these responses are influenced by ovarian steroid hormones. This study aimed to evaluate the innate immune response of *ex vivo* bovine endometrium from beef (Nelore) and dairy (crossbred) cows when challenged with lipopolysaccharide (LPS) at different concentrations, exposure times and progesterone or estradiol hormone pretreatments. For this purpose, thirty-two reproductive traits were used from Nelore ($n=15$) and crossbred dairy ($n=17$) postpubertal cows, also blood samples to measure progesterone (P4) at the time of slaughter were collected. Endometrial tissues (explants) were collected and cultured for 24 or 48 hours in a control medium or medium containing LPS (1 or 2 $\mu\text{g/mL}$), and or pretreatment with estradiol (3 pg/mL) or progesterone (5 pg/mL). Supernatants were harvested for IL-1B and IL-6 dosage. There was no difference in the accumulation of IL-1 β and IL-6 between breeds when challenged with both LPS concentrations (1 or 2 $\mu\text{g/mL}$) in the cell culture medium. Pretreatment with progesterone or estradiol did not interfere in the production of these interleukins. It was concluded that *ex vivo* organ cultures of bovine endometrium from beef (Nelore) and dairy (crossbred) cows show similar production of IL-1B and IL-6 when challenged with LPS and that this response was not affected by the estrous cycle stages, exogenous steroid hormones in response to challenge with LPS in the cell culture medium.

Keywords: bovine, cytokines, uterine diseases, innate immunity, progesterone

1. INTRODUÇÃO

As infecções uterinas afetam negativamente a eficiência reprodutiva do rebanho e estão entre as principais causas de infertilidade e descarte involuntário (LEFEBVRE & STOCK, 2012). Entre as doenças uterinas do pós-parto, a metrite e endometrite ganham destaque devido aos impactos causados na saúde e bem-estar dos animais, além dos prejuízos econômicos (SHELDON *et al.*, 2009).

A prevalência das infecções uterinas no pós-parto de vacas leiteiras é elevada, acometendo cerca de 50% dos animais (LEBLANC, 2014; LEBLANC, OSAWA & DUBUC, 2011). Os sistemas metabólico, endócrino e imunológico estão diretamente associados, de forma que, qualquer alteração em um destes sistemas promove

diminuição na competência imune e aumenta a susceptibilidade a infecções (PITTMAN, 2011; TREVISI *et al.*, 2011). O balanço energético negativo (BEN) e a decorrente supressão da resposta imune, frequentes neste período, estão entre os principais fatores relacionados à ocorrência destas infecções (DUBUC *et al.*, 2010; ESPOSITO *et al.*, 2014; LEBLANC, OSAWA & DUBUC, 2011).

A resposta imune também pode ser modulada pelos esteroides ovarianos de acordo com a fase do ciclo estral em que o animal se encontra (LEWIS, 2004). De acordo com a literatura, a progesterona promove supressão das defesas imunitárias uterinas predispondo a ocorrência de infecções, enquanto o estradiol permite uma melhor atividade das células do sistema imune inato e consequente resistência às infecções (BORGES, HEALEY & SHELDON, 2012; FISCHER *et al.*, 2010; LEWIS, 2004).

A intensidade da resposta inflamatória também difere conforme a raça devido a diferenças significativas na fisiologia e no comportamento reprodutivo dos animais taurinos e zebuíños (FIGUEIREDO *et al.*, 1997). De acordo com Benjamin *et al.* (2016), Glass *et al.* (2005), Piper *et al.* (2008) e (2010), os animais taurinos desenvolvem uma resposta inflamatória mais exacerbada a patógenos quando comparados aos zebuíños. Além disso, vacas Nelore apresentam menor concentração plasmática de progesterona e estradiol (MARTIN *et al.*, 2008) e menor incidência de infecções uterinas quando comparadas as de origem taurina (SARTORELLI *et al.*, 2005).

A partir da hipótese de que o endométrio *ex vivo* de vacas *Bos taurus* (aptidão para leite) quando desafiado com lipopolissacarídeos (LPS) apresenta resposta inflamatória distinta quando comparada as vacas *Bos indicus* (aptidão para corte) e que essas respostas são influenciadas pelos hormônios esteroides, objetivou-se avaliar a resposta imune inata do endométrio bovino *ex vivo* ao LPS em diferentes concentrações, tempo e tratamentos hormonais com progesterona e estradiol.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais e local de execução

O estudo foi conduzido no Laboratório de Saúde em Grandes Animais (LASGRAN) da Universidade Federal de Uberlândia – FAMEV/UFU. Foram utilizados 32 tratos reprodutivos (útero e ovários) e amostras de sangue coletadas de vacas mestiças e da raça Nelore, não gestantes e sem evidência de doenças clínicas, provenientes do abatedouro Santa Lúcia, localizado no município de Araguari – MG.

2.2. Coleta das amostras

Os tratos reprodutivos e as amostras de sangue foram coletados no abatedouro e acondicionados em caixas térmicas devidamente refrigeradas e conduzidas ao Laboratório de Saúde em Grandes Animais (LASGRAN – FAMEV/UFU) para análise e processamento do material. Os úteros foram avaliados macroscopicamente e somente os não gestantes e sem evidência de doenças clínicas foram utilizados no experimento. Os respectivos ovários também foram analisados para determinação da fase do ciclo estral, posteriormente confirmada através da dosagem sérica de progesterona.

2.3. Processamento das amostras

Após a seleção dos úteros, iniciou-se o processamento individual de cada peça. A superfície externa foi lavada com álcool 70% e, com o auxílio de tesoura estéril foi realizada uma incisão longitudinal no corno uterino *ipsilateral* ao ovário com corpo lúteo, ou no caso de anestro, o que apresentava uma estrutura dominante.

Após a exposição do endométrio, este foi lavado com solução de Dulbecco's phosphate-buffered (D-PBS; Sigma-Aldrich® Ltd, Dorset, UK) suplementado com 50UI/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich®). Utilizando um *punch* estéril (KRUUSE®) de 8mm próprio para biópsia, foram retirados 8 fragmentos de endométrio (explantes) de regiões intercarunculares, inseridos em 25 ml de solução de Hank's Balanced Salt (HBSS; Sigma-Aldrich®) suplementado com 50 UI/mL de penicilina (Sigma-Aldrich®), 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 2.5 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich®).

Na sequência, os explantes foram imersos na mesma solução suplementada de Hank's Balanced Salt por mais duas vezes, já no interior da cabine de segurança

biológica, para então serem transferidos para placas de cultura celular de 24 poços (um explante em cada poço, totalizando oito poços por animal). Cada poço continha 1mL de meio completo de cultura composto por RPMI 1640 (GIBCO®), Soro fetal bovino (Cutilab®) pré-tratado por 24 horas com T-70 dextran (Sigma-Aldrich® C6241) e carvão livre de esteroides (Sigma-Aldrich®) e suplementado com 50 UI/mL de penicilina (Sigma-Aldrich®), 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 2.5 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich®).

2.4. Determinação do perfil de produção das interleucinas IL-1 β e IL-6 pelo endométrio bovino ex vivo de vacas mestiças e da raça Nelore em diferentes concentrações de lipopolissacarídeos

Com o objetivo de avaliar o perfil da produção das interleucinas IL-1 β e IL-6 pelo endométrio bovino exposto ao LPS, foram utilizados explantes coletados de vacas mestiças leiteiras ($n=17$) e da raça Nelore ($n=15$) e estes foram submetidos aos tratamentos descritos a seguir. Além do meio de cultura completo (1 mL), um par de poços foi submetido ao tratamento com LPS e cada poço recebeu uma determinada concentração, sendo eles: a) tratamento 1 - concentração final do meio com 1 µg/mL de Lipopolissacarídeos (*E. coli* 0111:B4 – Sigma-Aldrich® L2880); e b) tratamento 2 - concentração final do meio com 2 µg/ml de Lipopolissacarídeos (*E. coli* 0111:B4 – Sigma-Aldrich® L2880).

As placas de cultura foram levadas para estufa de CO₂ à temperatura de 37°C onde permaneceram por 24 horas. Transcorridas 24 horas, as placas foram retiradas da estufa de CO₂ e levadas para cabine de segurança, onde os sobrenadantes foram retirados e congelados e os explantes pesados e armazenados em formaldeído a 10%.

2.5. Avaliação da influência da progesterona e do estradiol na produção de interleucinas IL-1 β e IL-6 pelo endométrio bovino exposto a lipopolissacarídeos

Com o objetivo de avaliar a influência dos hormônios progesterona e estradiol na produção das interleucinas IL-1 β e IL-6 pelo endométrio bovino quando submetido ao LPS, os explantes foram submetidos aos tratamentos descritos a seguir. Além do meio de cultura completo (1 mL), cada par de poços foi submetido a um tratamento,

sendo eles: a) Dois controles: meio de cultura completo (1mL); b) Progesterona: concentração final do meio contendo 5 ng/ml de progesterona (Sigma-Aldrich® P8783) (1mL); c) Estradiol: concentração final do meio contendo 3 pg/mL de estradiol (Sigma-Aldrich® E2758) (1 mL).

As soluções estoque e base dos hormônios eram de 20 μ g/mL diluídas em etanol absoluto (ITAJÁ®). Transcorridas às 24 horas, as placas foram retiradas da estufa de CO₂ e levadas para cabine de segurança e os sobrenadantes retirados e descartados.

Um poço de cada par dos tratamentos realizados no primeiro dia, além de receberem o respectivo meio de cultura, foram tratados com 1mL de LPS na concentração de 1 μ g/ml. Em seguida, foram levados novamente à estufa de CO₂ à temperatura de 37º onde permaneceram por mais 24 horas.

Após 48 horas do início do experimento, os sobrenadantes de todos os poços foram retirados e congelados para posterior análise através do método de ELISA. Os explantes foram pesados e colocados em tubos tipo *eppendorf* contendo 0,8 mL de RNA later (Ambion®).

2.6. Determinação do perfil de produção das interleucinas IL-1 β e IL-6 pelo endométrio bovino ex vivo de vacas mestiças e da raça Nelore sob diferentes concentrações de progesterona

Com o objetivo de avaliar a produção das interleucinas IL-1 β e IL-6 pelo endométrio bovino sob diferentes concentrações de progesterona, foi realizada a dosagem sérica de progesterona a partir das amostras de sangue coletadas no momento do abate.

As amostras de sangue colhidas das carcaças dos animais no momento do abate foram mantidas em caixa térmica devidamente refrigeradas e conduzidas ao laboratório, onde foram centrifugadas a 720g durante 10 minutos em centrífuga clínica Global Trade (modelo 80-2B-15mL). O soro separado foi acondicionado em microtubos tipo *eppendorf* e armazenados em ultrafreezer a -80ºc para posterior análise e dosagem de progesterona através da técnica de quimioluminescência (LIMA, 2012; LOPES *et al.*, 2015).

De acordo com as concentrações plasmáticas de progesterona obtidas, os animais foram divididos em três grupos, sendo eles: 1) P4 < 1ng/mL; 2) 1 < P4 < 5ng/mL e 3) P4 > 5ng/mL.

2.7. Técnica de ELISA

O método de ELISA foi realizado para determinação das interleucinas presentes no sobrenadante. As concentrações de IL-6 e IL-1 β foram mensuradas de acordo com as instruções do fabricante incluídas nos kits de ELISA específicos para cada citocina (ThermoScientific® Bovine IL-6 Reagent Kit; Rockford, USA.; ThermoScientific® BovineIL-1B Reagent Kit).

2.8. Análise estatística

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

Para avaliar a diferença nas concentrações de IL-1B e IL-6 quando os explantes foram submetidos a diferentes concentrações de LPS durante 24 horas, inicialmente, os dados foram submetidos ao Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se apresentavam ou não distribuição paramétrica. As variáveis com distribuição paramétrica foram submetidas à análise de variância (ANOVA paramétrica) e pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni. As variáveis com distribuição não-paramétrica foram analisadas pelo teste de Kruskall-Wallis (ANOVA não-paramétrica) e pós-teste de Comparação Múltipla de Dunn's.

Para verificar a influência da raça, ciclo estral e diferença entre os hormônios esteroides, utilizou-se a análise de variância (Two-way ANOVA) e nas situações onde houve significância, o pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni foi conduzido. O nível de significância para todos os testes foi de 95% ($P<0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Produção das interleucinas IL-1 β e IL-6 pelo endométrio bovino ex vivo de fêmeas da raça Nelore e mestiças expostos a diferentes tempos e concentrações de lipopolissacarídeos

Para avaliar o perfil de produção das interleucinas IL-1 β e IL-6 pelo endométrio bovino quando submetido ao LPS, foram utilizados explantes de vacas mestiças leiteiras e da raça Nelore expostos durante 24 horas sob as concentrações de 1 e 2 $\mu\text{g/mL}$ de LPS. Em relação ao explantes de fêmeas Nelore, houve acúmulo dependente da concentração de LPS para IL-1 β ($P=0,0116$) e independente para IL-6 ($P<0,0001$) (Figura 1A, 1D). Já em relação aos explantes endometriais coletados de fêmeas mestiças, houve acúmulo de IL-1 β ($P=0,0033$) e IL-6 ($P=0,0017$) após as 24 horas de exposição e este acúmulo não foi dependente da concentração de LPS no meio (Figura 1B, 1E).

Não houve diferença no acúmulo das IL-1 β e IL-6 entre as raças avaliadas quando estimuladas com concentrações de LPS de 1 ou 2 $\mu\text{g/mL}$ no meio de cultivo celular, durante 24horas (Figura 1C, 1F).

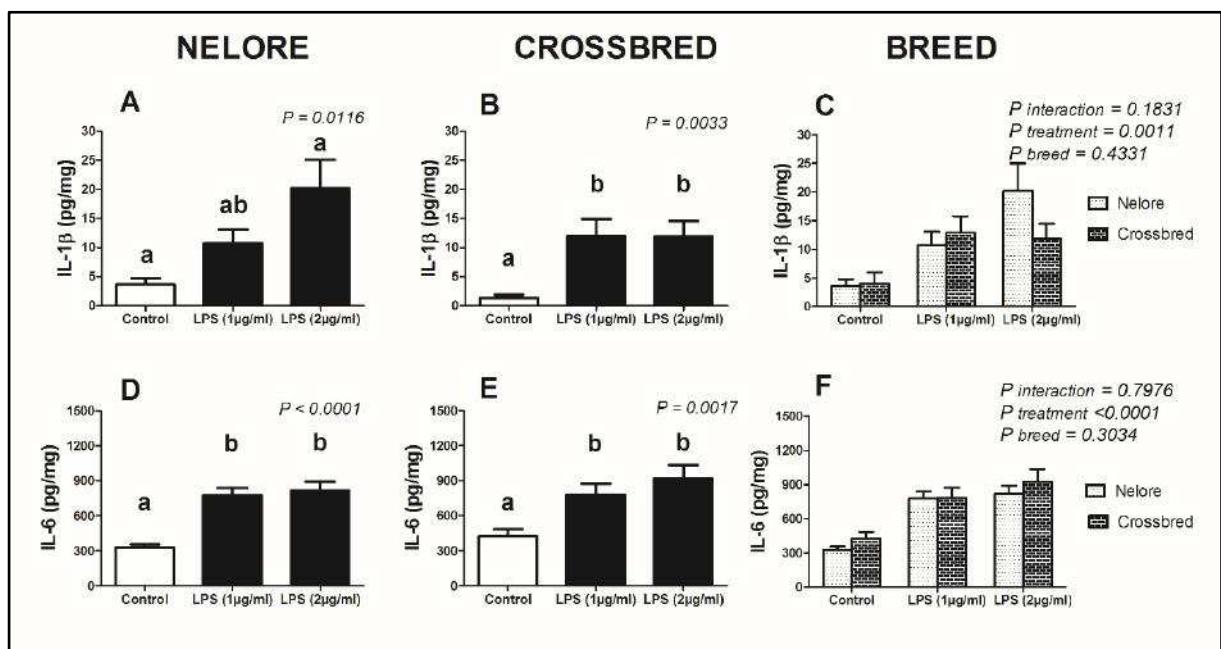


Figura 1. Resposta das interleucinas 1 β e 6 de cultivos de endométrio bovino ex vivo de fêmeas da raça Nelore e Mestiças frente à exposição a diferentes concentrações de lipopolissacarídeos durante 24 horas. Explantes de endométrio intacto de fêmeas Nelore ($n=17$) e Mestiças ($n=12$) cultivados em meio controle ou meio contendo 1 ou 2 $\mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeos (*E. coli* 0111:B4). Os sobrenadantes foram retirados após 24 horas para mensuração do acúmulo de IL-1 β (A,B) e IL-6 (D,E). Os resultados foram apresentados por meio da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média. Letras diferentes

indicam diferença estatística por ANOVA com pós-teste de Comparação múltipla de Bonferroni (A,B,D,E) e análise de variância (Two-way ANOVA) (C,F), a 5% de significância ($P<0,05$).

Também não foi observado diferença na concentração de IL-1 β e IL-6, entre as raças, nos cultivos dos explantes durante 48 horas (Figura 2). A mensuração do acúmulo de IL-6 foi semelhante nas primeiras 24 horas ao se comparar com a concentração entre 24 e 48 horas de cultivo (Figura 2 D-F). Já para a IL-1 β o acúmulo foi maior nas primeiras 24 horas, reduzindo entre 24 e 48 horas de cultivo (Figura 2 A-C).

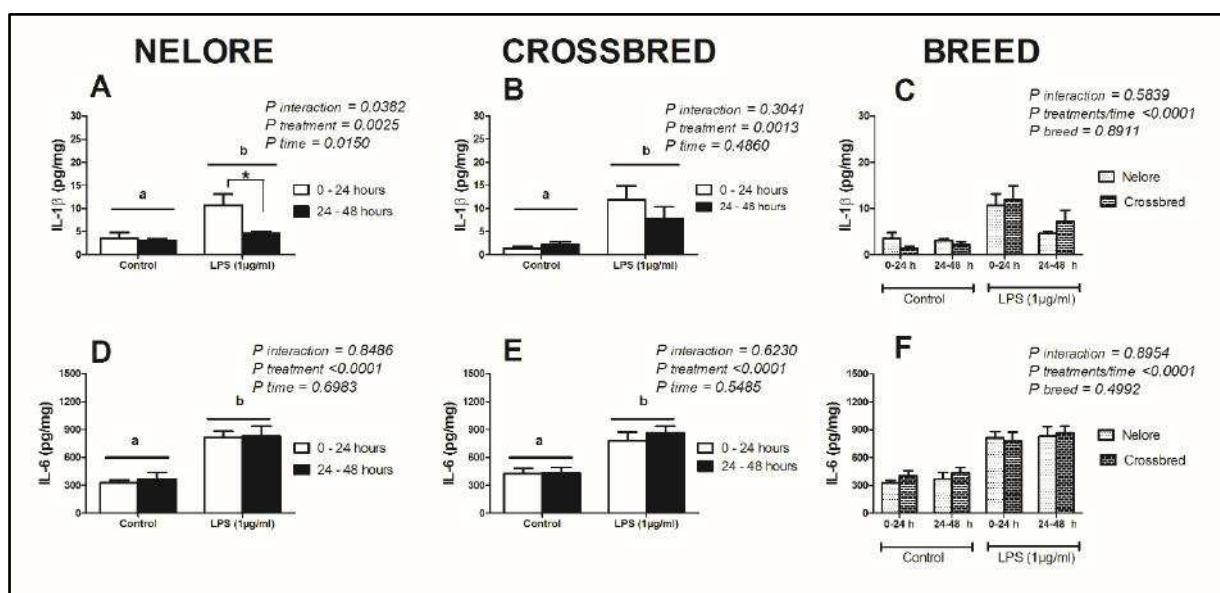


Figura 2. Resposta das interleucinas 1 β e 6 de cultivos de endométrio bovino *ex vivo* de fêmeas da raça Nelore e Mestiças nas primeiras 24 horas e entre 24 e 48 horas frente à exposição de lipopolissacarídeos. Explantes de endométrio intacto de fêmeas Nelore ($n=17$) e Mestiças ($n=12$) cultivados em meio controle ou meio contendo 1 μ g/mL de lipopolissacarídeos (LPS) no início (0hs) ou após 24 horas (*E. coli* 0111:B4). Nos explantes expostos a LPS no início (0hs), os sobrenadantes foram retirados após 24 horas para mensuração do acúmulo de IL-1 β e IL-6. Já nos explantes expostos a LPS após 24 horas, os sobrenadantes foram retirados após 48 horas do início do experimento para mensuração do acúmulo de IL-1 β e IL-6. Os resultados foram apresentados por meio da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferença estatística por análise de variância (Two-way ANOVA) com pós-teste de Comparação múltipla de Bonferroni, a 5% de significância ($P<0,05$).

3.2. Produção das interleucinas IL-1 β e IL-6 pelo endométrio bovino *ex vivo* de fêmeas da raça Nelore e mestiças expostos aos hormônios progesterona e estradiol

Explantes de endométrios bovinos *ex vivo* pré-tratados com progesterona e expostos a 1 μ g/mL de LPS responderam significativamente com acúmulo de IL-1 β

(Figura 3A, 3B) e IL 6 (Figura 3D, 3E) em fêmeas Nelore e mestiças. Entretanto, não houve interferência do pré-tratamento com progesterona no acúmulo das IL-1 β e IL-6 ao se comparar com os explantes em meio controle expostos ao LPS. Além disso, a resposta ao LPS foi semelhante entre os explantes das raças avaliadas, em ambas as interleucinas 1 β e 6 (Figura 3C, 3F).

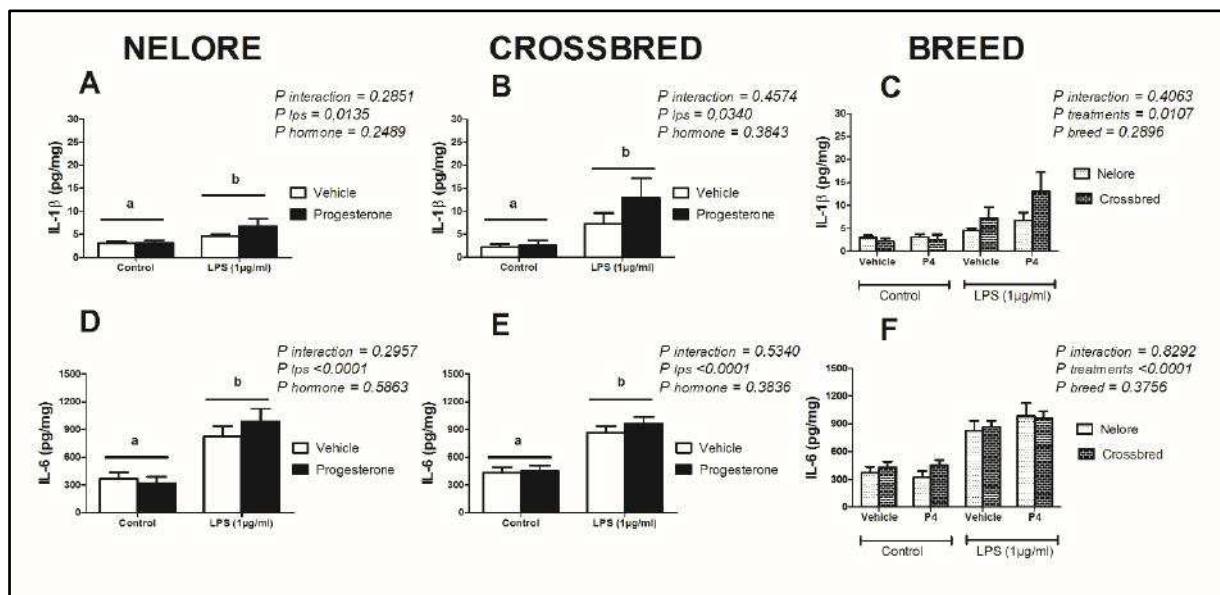


Figura 3. Resposta das interleucinas 1 β e 6 de cultivos de endométrio bovino *ex vivo* de fêmeas da raça Nelore e Mestiças, pré-tratados com meio controle ou progesterona nas primeiras 24 horas e expostos a LPS entre 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença estatística por análise de variância Two-way ANOVA a 5% de significância ($P<0,05$). Os resultados foram apresentados através da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média. Os explantes foram pré-tratados durante 24 horas com meio controle ou com meio contendo 5ng/mL de progesterona. Após 24 horas, os explantes foram mantidos em meio controle ou desafiados com 1 μ g/mL de lipopolissacarídeos (*E.coli* 0111:B4). Os sobrenadantes foram retirados após 48 horas do início do experimento para mensuração do acúmulo de IL-1 β (A-C) e IL-6 (D-F).

Ao realizar o pré-tratamento (24 horas) dos explantes com estradiol e posterior exposição a 1 μ g/mL de LPS, houve acúmulo significativo de IL-1 β e IL-6 tanto em fêmeas Nelore (Figura 4A, 4D) como nas fêmeas mestiças (Figura 4B, 4E). Porém, não houve interferência do pré-tratamento com estradiol no acúmulo das IL-1B e IL-6 ao se comparar com explantes em meio controle expostos ao LPS. Além disso, a resposta ao LPS foi semelhante entre os explantes das raças avaliadas, em ambas as interleucinas 1 β e 6 (Figura 4C, 4F).

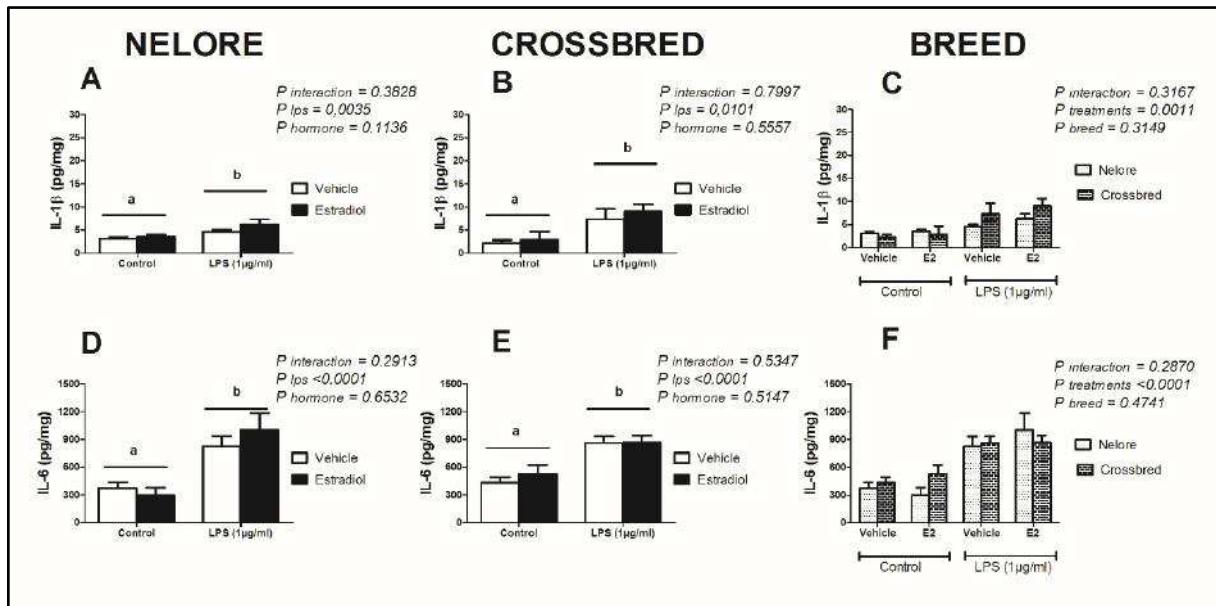


Figura 4. Resposta das interleucinas 1 β e 6 de cultivos de endométrio bovino *ex vivo* de fêmeas da raça Nelore e Mestiças, pré-tratados com meio controle ou estradiol nas primeiras 24 horas e expostos a LPS entre 24 e 48 horas. Letras distintas indicam diferença estatística por análise de variância Two-way ANOVA a 5% de significância ($P<0,05$). Os resultados foram apresentados através da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média. Os explantes foram pré-tratados durante 24 horas com meio controle ou com meio contendo 3 pg/mL de estradiol. Após 24 horas, os explantes foram mantidos em meio controle ou desafiados com 1 μ g/mL de lipopolissacarídeos (*E.coli* 0111:B4). Os sobrenadantes foram retirados após 48 horas do início do experimento para mensuração do acúmulo de IL-1 β (A-C) e IL-6 (D-F).

3.3. Produção de interleucinas IL-1 β E IL-6 pelo endométrio bovino sob diferentes concentrações de progesterona e expostos a lipopolissacarídeos

Como não houve diferença entre os explantes de fêmeas da raça Nelore e mestiças, os animais foram agrupados para se investigar o efeito das diferentes concentrações de progesterona na produção das interleucinas IL-1 β e IL-6. Após a dosagem de progesterona, os animais foram reagrupados de acordo com a concentração de progesterona no soro, da seguinte forma: 1) P4 < 1 ng/mL ($n=6$); 2) 1 < P4 < 5 ng/mL ($n=8$) e 3) P4 > 5 ng/mL ($n=17$). Os explantes acumularam mais IL-1 β ($P=0,0092$) e IL-6 ($P<0,0001$) em resposta ao LPS. Entretanto, não houve diferença entre os grupos (concentrações distintas de P4) em relação às concentrações de IL-1 β ($P=0,8352$) e IL-6 ($P=0,0527$) (Figura 5).

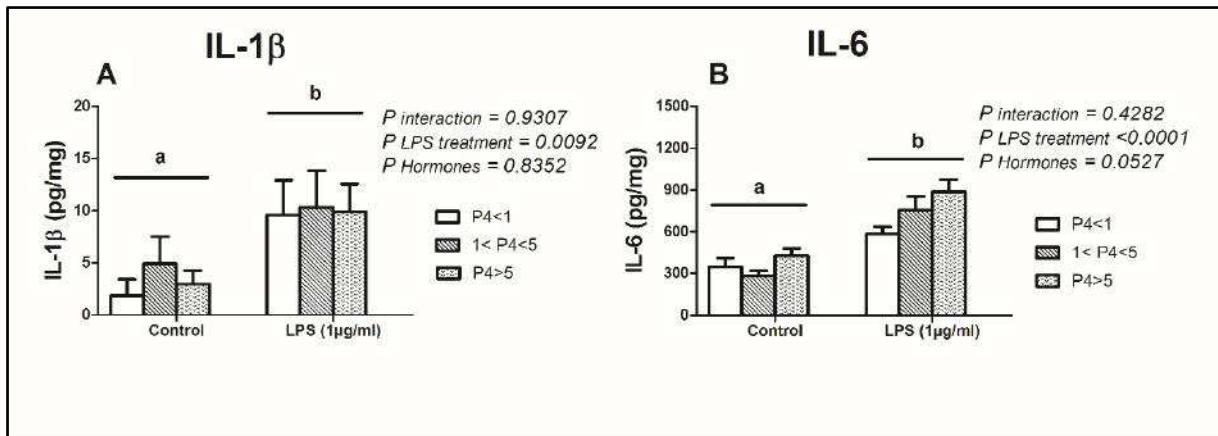


Figura 5. Resposta das interleucinas 1 β (A) e 6 (B) de cultivos de endométrio bovino *ex vivo* de fêmeas da raça Nelore e Mestiças em meio controle ou meio contendo 1 μ g/mL de lipopolissacáridos, após 24 horas de cultura. Os animais foram agrupados de acordo com as concentrações séricas de progesterona: P4 < 1 ng/mL ($n=6$); 1 < P4 < 5 ng/mL ($n=8$); P4 > 5 ng/mL ($n=17$). Os resultados foram apresentados por meio da concentração média por mg de tecido + erro padrão da média. Os dados foram avaliados por análise de variância (Two-way ANOVA) com nível de significância de $P<0,05$.

4. DISCUSSÃO

Utilizou-se a proposta de cultura de órgãos *ex vivo* de endométrio bovino, conforme técnica descrita por Borges, Healey e Sheldon (2012), no intuito de manter a arquitetura das células no tecido e reduzir os efeitos de fatores humorais e da imunidade adaptativa *in vivo* (SAUT *et al.*, 2014) e, desta forma verificar como o fator raça e aptidão interferem na resposta imune inata do endométrio bovino quando estimulado por LPS de bactérias gram-negativas como a *E. coli* (ELLIOT *et al.*, 1968; HUSZENICZA *et al.*, 1999), uma das principais bactérias responsáveis por infecções uterinas no pós-parto (WILLIAMS *et al.*, 2005).

Os explantes de endométrio bovino de fêmeas da raça Nelore e mestiça responderam ao estímulo do LPS, com aumento de IL-1 β e IL-6, corroborando na validação da técnica de Borges, Healey e Sheldon (2012), tanto em relação à concentração como ao tempo de exposição ao LPS. Estes resultados reforçam a importância do endométrio como barreira essencial nas infecções uterinas e no reconhecimento de PAMPs, o qual é dependente de receptores de reconhecimento, como os TLR4, expressos pelas células endometriais (HERATH *et al.*, 2006, 2009; SHELDON & BROMFIELD, 2011).

A utilização deste modelo experimental de explantes de endométrio já está bem estabelecida e é frequentemente utilizado em pesquisas de diferentes espécies, como

em cadelas, na busca de melhor entendimento do complexo piometra – hiperplasia endometrial cística (SILVA *et al.*, 2012) e em bovinos (BERTAN MEMBRIVE *et al.*, 2014; GUNARETNAM, PRETHEEBAN e RAJAMAHENDRAN, 2013; HEALEY *et al.*, 2016; TURNER *et al.*, 2016).

A hipótese de que endométrios de fêmeas mestiças leiteiras, por serem animais híbridos *Bos taurus* x *Bos indicus* e de aptidão leiteira, montariam uma resposta imune inata diferenciada, com aumento das IL-1 β e IL-6 na exposição ao LPS, em relação às fêmeas de raça Nelore (*Bos indicus*) de aptidão para corte, foi descartada, pois não se observou diferença na resposta destas interleucinas em explantes de endométrios quando expostos a diferentes tempos e concentrações de LPS e a pré-tratamentos hormonais. Este resultado corroborou com os resultados de Saut *et al.* (2014), que não encontraram diferença na resposta entre vacas de aptidão leiteira e de corte, ambas da espécie *Bos taurus*, em relação à concentração ou expressão gênica de interleucinas pró-inflamatórias, utilizando o mesmo modelo experimental de explantes de endométrios bovinos expostos a 1 μ g/ml de LPS ou 1x10³ CFU/mL de *E. coli*.

Entretanto, discordou de estudos que mostram que raças *Bos taurus* desenvolvem uma resposta inflamatória mais intensa a patógenos do que raças *Bos indicus*, promovendo uma inflamação crônica. Segundo Piper *et al.* (2008) e (2010), em estudos com infestação induzida de carrapatos *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* em animais *Bos taurus* e *Bos indicus*, ocorreu maior expressão dos genes associados à resposta imune inata que induzem quimiotaxia e ativação de neutrófilos, como CXCL8, CXCL2 e CXCL5, em animais *Bos taurus*, com intensa resposta inflamatória quando comparados aos *Bos indicus*. Em outro estudo, onde foram induzidas infecções experimentais com *Theileria annulata*, ao se comparar bezerros taurinos e zebuíños, observou-se o excesso de estimulação das vias que envolviam citocinas pró-inflamatórias, com intensa produção de proteínas de fase aguda nos bezerros taurinos, ao contrário dos zebuíños, que apresentaram menor estimulação do sistema imune inato, com respostas inflamatórias mais brandas (GLASS *et al.*, 2005).

Ao se trabalhar com cultivos celulares específicos de fibroblastos isolados da pele de vacas Holandesas, Benjamin *et al.* (2016) mostraram que estas fêmeas apresentavam níveis mais altos de IL-8 em resposta ao tratamento com 100 ng/ml de LPS e 1 ng/ml de IL-1 β , do que culturas de fibroblastos de fêmeas da raça Angus, além de maior expressão de genes relacionados ao reconhecimento de PAMPs e da

ativação da cascata do NFK β , sugerindo que animais da raça Holandesa detectam e respondem a infecções por bactérias gram-negativas com maior vigor do que animais Angus. Sendo assim, mesmo sendo ambas as raças de origem taurina, foi observada diferença na produção das interleucinas de acordo com aptidão, para leite (Holandesa) ou para corte (Angus).

Um melhor entendimento nas variações das respostas imunes inatas entre as raças propiciariam novos cruzamentos, seleções ou práticas de manejo no intuito de obter animais mais hábeis na eliminação de patógenos (BENJAMIN *et al.*, 2016, 2015; KANDASAMY *et al.*, 2011), principalmente nessa fase pós-parto onde há um desafio muito grande para vacas leiteiras, que consequentemente, se tornam mais predispostas à ocorrência de doenças, especialmente as uterinas (BORGES *et al.*, 2013; LEBLANC, 2012; SHELDON *et al.*, 2009).

Pesquisas relacionadas à glândula mamária têm mostrado que vacas que apresentam menor intensidade na resposta imune inata, em cultivos *in vitro* de fibroblastos da derme frente à exposição por LPS, são mais eficientes em conter infecções intra-mamárias experimentais por E.coli e retornam mais rapidamente a produção leiteira (KANDASAMY *et al.*, 2011).

Não foram encontrados estudos relativos à intensidade da resposta imune inata, entre *Bos taurus* e *Bos indicus* ou vacas de aptidão leiteira e corte, com foco nas infecções uterinas. Entretanto, sabe-se que em relação às raças de corte e leite, a incidência e as consequências das doenças uterinas no pós-parto são distintas, uma vez que, em vacas mestiças leiteiras esses índices são elevados e interferem no desempenho reprodutivo futuro dos animais. Fato que não ocorre com vacas de origem zebuína, que apresentam baixa incidência de doenças uterinas e estas na maioria das vezes não comprometem os índices reprodutivos (MARQUES JÚNIOR, MARTINS e BORGES, 2011; SANTOS *et al.*, 2009).

Buscando avaliar a resposta imune inata uterina em outras condições fisiológicas, na tentativa de se encontrar diferenças entre as raças, foi proposto o pré-tratamento com os hormônios esteroides progesterona e estradiol. Mesmo nessas condições não foi possível observar diferença na resposta ao estímulo com LPS, reforçando a tese de que as diferenças raciais ou de aptidão possam não interferir na síntese das interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6. Além disso, corroborou com os achados de Saut *et al.* (2014), que verificaram que não há efeito dos hormônios esteroides ovarianos exógenos, nem inibição dos seus respectivos receptores

nucleares de certas citocinas e quimiocinas de tecido ou células endometriais na resposta ao LPS ou *E. coli*. Estes autores verificaram o efeito na resposta imune inata uterina apenas quando foi adicionado ao meio o glicocorticoide dexametasona, um reconhecido modulador da resposta imune inata (KERN *et al.*, 1988; WAAGE e BAKKE, 1988).

Na pesquisa de Saut *et al.* (2014) foram utilizados explantes de endométrios bovinos *Bos taurus* de aptidão para corte, que, além de não verificar o efeito de hormônios ovarianos esteroides externos, também não verificaram efeito dos estágios do ciclo estral. Os resultados do presente estudo sugerem que o mesmo ocorra também com fêmeas *Bos indicus* de aptidão corte e fêmeas híbridas *Bos taurus x Bos indicus* de aptidão leiteira. No entanto, reforça-se que estes resultados *ex vivo* não refletem o observado *in vivo*, onde a predominância destes hormônios interferem na resposta imune dos animais (HERATH *et al.*, 2006; SU *et al.*, 2009; WIRA *et al.*, 2010).

De acordo com Martin *et al.* (2008) e Figueiredo *et al.* (1997), existem diferenças importantes na fisiologia e comportamento reprodutivo dos animais taurinos e zebuínos. Contudo, com base nos resultados encontrados, não houve diferença na resposta *in vitro* das interleucinas 1 β e 6 entre as raças estudadas, o que torna necessário a busca por outras hipóteses que visem esclarecer a maior predisposição dos animais mestiços e de aptidão leiteira às doenças uterinas no pós-parto, bem como os fatores externos que possam interferir na resposta imune *in vivo* destes animais.

Desta forma, sugere-se que outros fatores presentes no pós-parto de vacas mestiças leiteiras, como o balanço energético negativo, hipoglicemia e hipocalcemia, manejo do periparto, a parição, entre outros, sejam responsáveis pela depressão da resposta imune inata nestes animais e menor resistência das células de defesa frente ao desafio bacteriano (ALERI *et al.*, 2016; ESPOSITO *et al.*, 2014; WATHES *et al.*, 2009; WEISDORF, CRADDOCK e JACOB, 1982). Recentemente, Turner *et al.* (2016) mostraram a interferência negativa do estresse metabólico energético na resposta inflamatória a PAMPs do tecido endometrial bovino, demonstrando a integração entre o metabolismo energético e a imunidade inata no endométrio bovino. Portanto, delineamentos experimentais utilizando como ferramentas os explantes e as células de endométrio bovino, tem se tornado uma alternativa interessante na busca de determinar os mecanismos que interferem na imunidade inata uterina.

5. CONCLUSÕES

Os explantes de endométrios intactos de vacas da raça Nelore e vacas Mestiças apresentam respostas semelhantes e acumulam IL-1 β e IL-6 frente à exposição de lipopolissacarídeos (LPS), durante 24 horas.

Não houve efeito das diferentes concentrações de progesterona na produção das interleucinas e os hormônio esteroides progesterona e estradiol não influenciam na resposta de IL-1 β e IL-6 quando desafiados com LPS no meio de cultivo celular.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo 486143/2013-9), à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro para a execução do trabalho e bolsas de estudos concedidas.

REFERÊNCIAS

- ALERI, J.; HINE, B.; PYMAN, M.; MANSELL, P.; WALES, W.; MALLARD, B.; FISHER, A. Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. **Research in Veterinary Science**, v. 108, p. 8–17, out. 2016.
- BENJAMIN, A. .; GREEN, B. .; CROOKER, B. .; MCKAY, S. .; KERR, D. . Differential responsiveness of Holstein and Angus dermal fibroblasts to LPS challenge occurs without major differences in the methylome. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 258, 24 dez. 2016.
- BENJAMIN, A. L.; GREEN, B.B.; HAYDEN, L.R.; BARLOW, J.W.; KERR, D.E. Cow-to-cow variation in fibroblast response to a toll-like receptor 2/6 agonist and its relation to mastitis caused by intramammary challenge with *Staphylococcus aureus*. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 3, p. 1836–50, mar. 2015.
- BERTAN MEMBRIVE, C. .; CUNHA, P. . DA; MEIRELLES, F. .; BINELLI, M. Calcium potentiates the effect of estradiol on PGF_{2α} production in the bovine endometrium. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 25, 2014.
- BORGES, A. .; MARTINS, T. .; MUNIZ, C. .; PEIXOTO, D. .; LEITE, A. . **Balanço energético negativo e eficiência reprodutiva de vacas leiteiras**. Disponível em: <<http://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/balanco-energetico-negativo-e-eficiencia-reprodutiva-de-vacas-leiteiras>>. Acesso em: 8 nov. 2016.
- 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.
- DUBUC, J.; LESLIE, K.E.; WALTON, J.S.; LEBLANC, S.J. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5764–5771, dez. 2010.
- ELLIOTT, L.; MCMAHON, K. J.; GIER, H. T.; MARION, G. B. Uterus of the cow after parturition: bacterial content. **American journal of veterinary research**, v. 29, n. 1, p. 77–81, jan. 1968.
- ESPOSITO, G.; IRONS, P. C.; WEBB, E. C.; CHAPWANYA, A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n. 3–4, p. 60–71, jan. 2014.
- FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489–505, jun. 1997.
- FISCHER, C.; DRILLICH, M.; ODAU, S.; HEUWIESER, W.; EINSPANIER, R.; GABLER, C. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 5, p. 818, 2010.

- GLASS, E.; PRESTON, P.; SPRINGBETT, A.; CRAIGMILE, S.; KIRVAR, E.; WILKIE, G.; BROWN, C. G. *Bos taurus* and *Bos indicus* (Sahiwal) calves respond differently to infection with *Theileria annulata* and produce markedly different levels of acute phase proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 3, p. 337–347, mar. 2005.
- GUNARETNAM, I.; PRETHEEBAN, T.; RAJAMAHENDRAN, R. Effects of ammonia and urea *in vitro* on mRNA of candidate bovine endometrial genes. **Animal Reproduction Science**, v. 141, n. 1–2, p. 42–51, set. 2013.
- HEALEY, G. D.; COLLIER, C.; GRIFFIN, S.; SCHUBERTH, H. .; SANDRA, O.; SMITH, D. .; MAHAN, S.; DIEUZY-LABAYE, I.; SHELDON, I. M. Mevalonate Biosynthesis Intermediates Are Key Regulators of Innate Immunity in Bovine Endometritis. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 2, p. 823–831, 15 jan. 2016.
- HERATH, S.; FISCHER, D. P.; WERLING, D.; WILLIAMS, E. J.; LILLY, S. T.; DOBSON, H.; BRYANT, C. E.; SHELDON, I. M. Expression and Function of Toll-Like Receptor 4 in the Endometrial Cells of the Uterus. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 562–570, jan. 2006.
- HERATH, S.; LILLY, S. T.; FISCHER, D. P.; WILLIAMS, E. J.; DOBSON, H.; BRYANT, C. E.; SHELDON, I. M. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F₂alpha to prostaglandin E2 in bovine endometrium. **Endocrinology**, v. 150, n. 4, p. 1912–20, abr. 2009.
- HUSZENICZA, G.; FODOR, M.; GACS, M.; KULCSAR, M.; DOHMEN, M.J.W.; VAMOS, M.; PORKOLAB.L.; KEGL, T.; BARTYIK, J.; LOHUIS, J.A.C.M.; JANOSI, S.; SZITA, G. Uterine Bacteriology, Resumption of Cyclic Ovarian Activity and Fertility in Postpartum Cows kept in Large-Scale Dairy Herds. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 3–4, p. 237–245, ago. 1999.
- KANDASAMY, S.; GREEN, B. B.; BENJAMIN, A. L.; KERR, D. E. Between-cow variation in dermal fibroblast response to lipopolysaccharide reflected in resolution of inflammation during *Escherichia coli* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 5963–5975, dez. 2011.
- KERN, J. A.; LAMB, R. J.; REED, J. .; DANIELE, R. P.; NOWELL, P. . Dexamethasone inhibition of interleukin 1 beta production by human monocytes. Posttranscriptional mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 81, n. 1, p. 237–244, 1 jan. 1988.
- LEBLANC, S. J. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 47 Suppl 5, p. 18–30, ago. 2012.
- _____. Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. **Animal**, v. 8, n. 1, p. 54–63, 2014.
- LEBLANC, S. J.; OSAWA, T.; DUBUC, J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 1610–1618, 2011.
- LEFEBVRE, R.C; STOCK, A. E. Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F₂ α in postpartum dairy cows with clinical endometritis: an evidence-

based evaluation. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 1, p. 79–96, 2012.

LEWIS, G. S. Steroidal regulation of uterine immune defenses. **Animal reproduction science**, v. 82–83, p. 281–94, jul. 2004.

LIMA, H. L. D. S. **Avaliação do perfil da progesterona plasmática em ovinos por quimioluminescência durante a gestação**. [s.l.] Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2012.

LOPES, P. R.; FURTADO, P. V; SOUZA, R. H. F. A.; OLIVEIRA, C. A. Importância e metodologias para mensuração dos esteróides sexuais em ruminantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte**, v. 39, n. 3, p. 322–328, 2015.

MARQUES JÚNIOR, A. P.; MARTINS, T. M.; BORGES, Á. M. Abordagem diagnóstica e de tratamento da infecção uterina em vacas Diagnosis and treatment of uterine infection in cows. v. 35, n. 2, p. 293–298, 2011.

MARTIN, I.; TORRES NETO, R.; OBA, E.; BURATINI, J.; BINELLI, M.; LAUFER-AMORIM, R.; FERREIRA, J. C. P. Immunohistochemical detection of receptors for oestrogen and progesterone in endometrial glands and stroma during the oestrous cycle in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 43, n. 4, p. 415–21, ago. 2008.

PIPER, E. .; JACKSON, L. .; BAGNALL, N. .; KONGSUWAN, K. .; LEW, A. .; JONSSON, N. . Gene expression in the skin of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, n. 1–2, p. 110–119, 15 nov. 2008.

PIPER, E. .; JACKSON, L. .; BIELEFELDT-OHMANN, H.; GONDRO, C.; LEW-TABOR, A. .; JONSSON, N. . Tick-susceptible *Bos taurus* cattle display an increased cellular response at the site of larval *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* attachment, compared with tick-resistant *Bos indicus* cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 4, p. 431–441, 15 mar. 2010.

PITTMAN, D. Q. J. A Neuro-Endocrine-Immune Symphony. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 23, n. 12, p. 1296–1297, dez. 2011.

SANTOS, N. R.; LAMB, G. C.; BROWN, D. R.; GILBERT, R. O. Postpartum endometrial cytology in beef cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 739–745, 15 mar. 2009.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2382–2394, 2005.

SAUT, J. P. E.; HEALEY, G. D.; BORGES, A. M.; SHELDON, I. M. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS *in vitro*. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 148, n. 6, p. 593–606, dez. 2014.

SHELDON, I. M.; BROMFIELD, J. J. Innate Immunity in the Human Endometrium and Ovary. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 66, p. 63–71, jul. 2011.

- SHELDON, I. M.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SCHUBERTH, H.-J. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 6, p. 1025–32, dez. 2009.
- SILVA, E.; HENRIQUES, S.; BRITO, S.; FERREIRA-DIAS, G.; LOPES-DA-COSTA, L.; MATEUS, L. Oestrous cycle-related changes in production of Toll-like receptors and prostaglandins in the canine endometrium. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 96, n. 1–2, p. 45–57, dez. 2012.
- SU, L.; SUN, Y.; MA, F.; LÜ, P.; HUANG, H.; ZHOU, J. Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF- κ B activation and enhancing SOCS1 expression. **Immunology Letters**, v. 125, n. 2, p. 151–155, 2009.
- TREVISI, E.; AMADORI, M.; ARCHETTI, I.; LACETERA, N.; BERTONI, G. Inflammatory Response and Acute Phase Proteins in the Transition Period of High-Yielding Dairy Cows. *In: Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases*. [s.l.] InTech, 2011. .
- TURNER, M. L.; CRONIN, J. G.; NOLETO, P. G.; SHELDON, I. M. Glucose Availability and AMP-Activated Protein Kinase Link Energy Metabolism and Innate Immunity in the Bovine Endometrium. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0151416, 14 mar. 2016.
- WAAGE, A.; BAKKE, O. Glucocorticoids suppress the production of tumour necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. **Immunology**, v. 63, n. 2, p. 299–302, fev. 1988.
- WATHES, D. C.; CHENG, Z.; CHOWDHURY, W.; FENWICK, M. A.; FITZPATRICK, R.; MORRIS, D. G.; PATTON, J.; MURPHY, J. J. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. **Physiological genomics**, v. 39, n. 1, p. 1–13, 9 set. 2009.
- WEISDORF, D. J.; CRADDOCK, P. R.; JACOB, H. S. Granulocytes utilize different energy sources for movement and phagocytosis. **Inflammation**, v. 6, n. 3, p. 245–56, set. 1982.
- WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; PFEIFFER, D. U.; ENGLAND, G. C. W.; NOAKES, D. E.; DOBSON, H.; SHELDON, I. M. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 102–117, 2005.
- WIRA, C. R.; FAHEY, J. V.; GHOSH, M.; PATEL, M. V.; HICKEY, D. K.; OCHIEL, D. O. Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 544–565, 29 mar. 2010.

APÊNDICE A

	Controle	LPS	Controle	LPS	Controle	LPS
Controle	Meio controle	LPS 1x				
Controle	LPS 2x	Meio controle				
P4	P4 + controle	P4 + controle				
E2	E2 + controle	E2 + controle				

Apêndice 1A: Placa de cultivo no primeiro período de cultura (0 - 24 horas).

	Controle	LPS	Controle	LPS	Controle	LPS
Controle	Meio controle					
Controle		controle + LPS				
P4	P4 + controle	P4 + LPS				
E2	E2 + controle	E2 + LPS				

Apêndice 2A: Placa de cultivo no segundo período de cultura (24 - 48 horas).

