

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

NADIA SIMARRO FAGUNDES

**EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS NO ENDOMÉTRIO BOVINO PRÉ-
SENSIBILIZADO COM ANTÍGENOS MATERNOS E PATERNOS E NA
INFLAMAÇÃO SUBCLÍNICA**

DOUTORADO

Uberlândia

2017

NADIA SIMARRO FAGUNDES

EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS NO ENDOMÉTRIO BOVINO PRÉ-
SENSIBILIZADO COM ANTÍGENOS MATERNO E PATERNO E NA
INFLAMAÇÃO

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
Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

Julho - 2017

EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS NO ENDOMÉTRIO BOVINO PRÉ-
SENSIBILIZADO COM ANTÍGENOS MATERNOS E PATERNOS E NA
INFLAMAÇÃO

Tese aprovada 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, 31 de julho de 2017.

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti (Orientador) –FAMEV/UFU

Prof^a. Dr^a. Ricarda Maria dos Santos –FAMEV/UFU

Prof. Dr José Octavio Jacomini –FAMEV/UFU

Prof. Dr. Cristiano Pereira Barbosa –UNIUBE

Prof. Dr. Cleber Barbosa de Oliveira -IFTM

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

- F156e
2017 Fagundes, Nadia Simarro, 1980
Expressão gênica de citocinas no endométrio bovino pré-sensibilizado com antígenos maternos e paternos e na inflamação subclínica / Nadia Simarro Fagundes. - 2017.
125 f. : il.
- Orientador: Marcelo Emílio Beletti.
Coorientador: João Paulo Elsen Saut.
Coorientador: Marcelo José Barbosa Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.35>
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Bovino - Infecções - Teses. 3. Endometrite - Teses. 4. Utero - Infecção - Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II. Saut, João Paulo Elsen. III. Silva, Marcelo José Barbosa. IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. V. Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de adquirir novos conhecimentos e por estar sempre iluminando meus caminhos e me protegendo. Obrigada!

Ao meu pai Nerlito, que mesmo não estando mais aqui, sei que sempre estará me acompanhando e comemorando comigo mais essa etapa. Amo você!

A minha mãe Marilene, que não mediu esforços para me ajudar em todos os momentos que precisei, meu muito obrigada! Amo você!

Ao meu marido Eduardo pelo companheirismo, amor e compreensão das minhas ausências. Amo você!

Aos meus filhos, Henrique e Gustavo, razão da minha vida, que eu amo mais que tudo.

As minhas irmãs, que de uma forma ou outra sempre me ajudaram e apoiaram e em especial a Naiara que sempre esteve disponível a me aconselhar a qualquer momento.

Ao meu orientador Marcelo Beletti e coorientadores João Paulo e Marcelo Silva, pela amizade e por me dar a oportunidade de aprender sempre mais.

A Aline que disponibilizou os animais e a fazenda para a realização do experimento. Sua ajuda foi fundamental!

A todos meus amigos em especial, Talita, Maria Teresa, Amanda e Paula pelo companheirismo e apoio.

A Rebeca, que disponibilizou a me ajudar, você foi fundamental! Meu muito obrigada!

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

Aos professores que aceitaram compor esta banca de defesa, Ricarda, Jacomini, Cristiano e Cleber. Obrigada por se disponibilizarem a realizar a leitura, correções e avaliação deste trabalho.

Minha gratidão à todos!

“A persistência é o menor caminho do êxito” .
(Charles Chaplin)

RESUMO

Infecções uterinas logo após o parto e perdas embrionárias relacionadas a falhas na imunotolerância ao conceito no início da gestação são importantes causas de baixa eficiência reprodutiva na bovinocultura. No presente estudo objetivou-se comparar a expressão dos genes *CCL5*, *IL-8*, *IL-6* e *IL-1 β* na mucosa endometrial com e sem inflamação, em regiões caruncular e intercaruncular, utilizando os métodos de coleta biópsia e *cytobrush* endometriais. Vinte úteros foram inseridos no experimento após avaliação da porcentagem de células polimorfonucleares (PMNs) na citologia endometrial, sendo dez sem a presença de PMNs (inflamação endometrial ausente), sete com PMNs variando entre 11 e 19% (inflamação endometrial leve) e três com PMNs entre 75 e 81% (inflamação endometrial grave). Após a coleta das amostras, foi feita a extração dos RNAs, em seguida realizada a transcrição reversa e a reação de qPCR para a quantificação da expressão gênica. Não foi observada diferença na expressão gênica entre as regiões carunculares e intercarunculares e a expressão foi dependente do grau de inflamação. Inflamações leves não apresentaram diferenças significativas em relação aos úteros não inflamados, existindo diferença apenas nas inflamações graves, tanto em amostras por biópsia como *cytobrush*. Houve influência da técnica de coleta de endométrio na expressão gênica somente na inflamação grave, sendo os melhores resultados observados em amostras colhidas por *cytobrush*. Este trabalho também teve como objetivo compreender os mecanismos da imunotolerância uterina ao conceito por meio de análise da expressão dos genes *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-6*, *IL-17*, *IFNG* e *LIF*, e o perfil destes durante o início da gestação. Foram utilizadas 45 vacas sincronizadas ao estro, submetidas à indução imunológica intrauterina, administrada no D0 (dia do estro), sendo quatro tratamentos: sêmen, PBMCs (células mononucleares de sangue periférico), sêmen e PBMCs e controle (sem indução). As biópsias uterinas *in vivo* foram coletadas em três momentos, D0 (sem indução imunológica) e dia sete (D7) e 14 (D14) após a estimulação imunológica. Após a indução imunológica, a expressão de RNAm do gene *IL-1 β* reduziu significativamente em todos os grupos sensibilizados em comparação ao controle. O gene *IL-2* apresentou maior expressão somente na indução com sêmen. Observou-se também que a expressão dos genes *IL-1 β* e *IL-2* variaram significativamente entre D0, D7 e D14 do ciclo estral. O gene *IL-6* não apresentou variações de expressão

entre as induções imunológicas e nem durante os primeiros 14 dias do ciclo estral. O resultados dos genes *IL-17*, *IFNG* e *LIF* foram inconclusivos. Conclui-se que a identificação de inflamações uterinas por meio de expressão gênica só foi possível nos casos graves, sendo os melhores resultados observados em amostras colhidas por *cytobrush*. E que a expressão dos genes *IL-1 β* e *IL-2* podem ser modulados por imunoindução, sugerindo que a sensibilização imunológica pode contribuir com o sucesso da gestação.

Palavras-chave: Biopsia edometrial, *Cytobrush*, Endometrite, Imunotolerância fetal.

ABSTRACT

Uterine infections soon after delivery and embryonic losses related to failures in the immunotolerance to the concept at the beginning of gestation are important causes of low reproductive efficiency in bovine breeding. The aim of this study was to compare the expression of the CCL5, IL-8, IL-6 and IL-1 β genes in the endometrial mucosa with and without inflammation in the caruncular and intercaruncular regions using endometrial biopsy and cytobrush collection methods. Twenty uteri were used in the experiment after evaluation of the percentage of polymorphonuclear cells (PMNs) in endometrial cytology, being ten without PMNs, seven with PMNs ranging from 11 to 19% (soft endometrial inflammation) and three with PMNs between 75 and 81% (severe endometrial inflammation). These samples were collected, its RNAs were extracted, and then the reverse transcription and the qPCR reaction were performed for the quantification of the gene expression. No difference was observed in the gene expression between the caruncular and intercaruncular regions and the expression was dependent on the degree of inflammation. Soft inflammations did not present significant differences in comparison to uninflamed uteri. On the other hand, severe inflammation presented difference in comparison to the control group, independent of the collection method, biopsy or cytobrush. The influence of the endometrial collection technique in the gene expression was observed only in the severe inflammation, and the best results were observed in samples collected by cytobrush. This study had also the objective to understand the mechanisms of uterine immunotolerance to the concept by analyzing the IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, IFNG and LIF gene expression during the early gestation. Forty-five cows synchronized to estrus were submitted to intrauterine immunological induction, administered in D0 (estrus day), with four treatments: semen, PBMCs, semen and PBMCs and control (without induction). In vivo uterine biopsies were collected at three different times: the first at D0 (no immunological induction), the second at day seven (D7) and the final one at day 14 (D14) after immunological stimulation. After immunological induction, IL-1 β mRNA expression was significantly reduced in all sensitized groups when compared to control. The IL-2 gene presented greater expression only in semen induction. It was likewise observed that IL-1 β and IL-2 gene expression varied significantly between D0, D7 and D14 of the estrous cycle. The IL-6 gene did not show expression variations from the immunological inductions nor during the first 14 days of the estrous cycle. The results of the IL-17, IFNG and LIF

genes were inconclusive. It was concluded that the identification of uterine inflammation through gene expression is only possible in severe cases, and the best results are observed in samples collected by cytobrush. In addition, the IL-1 β and IL-2 gene expression can be modulated by immune-induction, suggesting that immunological sensitization may contribute to the success of gestation.

Keywords: Edometrial biopsy, Cytobrush, Endometritis, Fetal immunotolerance.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2: Expressão de genes pró-inflamatórias segundo a técnica de coleta de amostra endometrial de vacas com e sem endometrite subclínica.....	51
Figura 1 - Expressão dos transcritos dos genes <i>IL1β</i> , <i>IL6</i> , <i>IL8</i> e <i>CCL5</i> na região caruncular e intercaruncular da mucosa endometrial de fêmeas bovinas com <i>status</i> de inflamação ausente (<i>n</i> =10), leve (<i>n</i> =7) e grave (<i>n</i> =3) coletados por meio de biopsia. O nível de Inflamação foi determinado pela técnica de citologia endometrial e considerado inflamação ausente (0% de polimorfonucleares - PMNs), leve (entre 11 e 19% PMNs) e grave (entre 71 e 85% PMNs). Os resultados estão apresentados em média + erro padrão da média e analisados por Two-way ANOVA e pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni, com valores diferentes entre grupos quando <i>P</i> <0,05.....	60
Figura 2 - Expressão dos transcritos dos genes <i>IL1β</i> , <i>IL6</i> , <i>IL8</i> e <i>CCL5</i> em amostras colhidas por <i>cytobrush</i> e biopsia caruncular (A-D) e <i>cytobrush</i> e biopsia intercaruncular (E-H) da mucosa endometrial de fêmeas bovinas com <i>status</i> de inflamação ausente (<i>n</i> =10), leve (<i>n</i> =7) e grave (<i>n</i> =3). O nível de Inflamação foi determinado pela técnica de <i>cytobrush</i> e considerado inflamação ausente (0% de polimorfonucleares - PMNs), leve (entre 11 e 19% PMNs) e grave (entre 71 e 85% PMNs). Os resultados estão apresentados em média + erro padrão da média e analisados por Two-way ANOVA e pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni, com valores diferentes entre grupos quando <i>P</i> <0,05.....	61
CAPÍTULO 3: Expressão gênica de IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, IFNG e LIF em útero de vacas sensibilizadas por infusão intrauterina de antígenos maternos e paternos no período peri-ovulatório.....	69
Figura 1: Representação gráfica do ciclo estral com protocolo hormonal de sincronização estral, assim como o delineamento experimental e números de animais amostrados.....	74
Figura 2 - Expressão dos genes IL-1B, IL2 e IL-6 em fêmeas do tratamento controle nos dias 0, 7 e 14 após o cio. Médias com letras diferentes se diferem pelo teste de t (<i>P</i> <0,05).....	79
Figura 3 - Expressão do gene IL-1 β em úteros de fêmeas em contato com diferentes antígenos, aos 7 e 14 dias após o cio. Médias com letras diferentes se diferem pelo teste de t (<i>P</i> <0,05).....	80
Figura 4 - Expressão do gene IL-2 em úteros de fêmeas em contato com diferentes antígenos, aos 7 e 14 dias após o cio. Médias com letras diferentes se diferem pelo teste de t (<i>P</i> <0,05).....	81
Figura 5 - Expressão do gene IL-6 em úteros de fêmeas em contato com diferentes antígenos, aos 7 e 14 dias após o cio. Médias com letras diferentes se diferem pelo teste de t (<i>P</i> <0,05).....	82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2: Expressão de genes pró-inflamatórias segundo a técnica de coleta de amostra endometrial de vacas com e sem endometrite subclínica

Tabela 1 – Sequencias dos primers para amplificação de RNAm por reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR)..... 59

CAPÍTULO 3: Expressão gênica de IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, IFNG e LIF em útero de vacas sensibilizadas por infusão intrauterina de antígenos maternos e paternos no período peri-ovulatório

Tabela 1 – Sequencias dos primers para amplificação de RNAm por reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR)..... 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
APCs	Célula apresentadora de antígenos
CCL5	Quimiocina ligante 5
DEL	Dias em lactação
G-CSF	Fator estimulador de colônia granulócitos
HCG	Ganadotrofina Cariônica Humana
IFNG	Interferon gama
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
ITNt	Interferon tau
LIF	Fator inibidor da leucemia
LPS	Lipopolissacarídeos
NFκB	Factor nuclear kappa B
NK	Natural Killer
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PGF α	Prostaglandina Fα
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de Embriões
PMNs	Células polimorfonucleares
TE	Transferência de Embriões
TGF-β	Fator de crescimento transformador-β
Th	Linfócito T-helper
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	T reguladoras

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivo específico.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1. Imunologia uterina.....	16
3.1.1. Citocinas.....	19
3.1.1.1. Interleucina-1 beta (IL1 β).....	19
3.1.1.2. Interleucina-2 (IL-2).....	21
3.1.1.3. Interleucina-6 (IL-6).....	21
3.1.1.4. Interleucina-8 (IL-8).....	23
3.1.1.5. Interleucina-17(IL-17).....	23
3.1.1.6. Fator inibidor da leucemia (LIF).....	24
3.1.1.7. Interferon gama (IFNG).....	25
3.1.1.8. CCL5.....	26
3.2. Imunologia da gestação.....	27
3.2.1. Indução imunológica com sêmen.....	28
3.2.2. Indução imunológica com PBMCs.....	29
3.3. Processo Inflamatório uterino no pós-parto.....	31
Referências.....	35
CAPÍTULO 2 - Expressão de genes pró-inflamatórios segundo a técnica de coleta de amostra endometrial de vacas com e sem endometrite subclínica	51
CAPÍTULO 3 - Expressão dos genes IL-1β, IL-2, IL-6, IL-17, IFNG e LIF em útero de vacas sensibilizadas por infusão intrauterina de antígenos maternos e paternos no período peri-ovulatório	69
CONSIDERAÇÕES GERAIS	96
ANEXO 1: Certificado da comissão de ética na utilização de animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia.....	97
ANEXO 2: Normas da revista Theriogenology.....	98
ANEXO 3: Normas da revista Animal Reproduction Science.....	113

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

Capítulo 1
Considerações Gerais

1. Introdução

A baixa eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que podem afetar diretamente a rentabilidade da bovinocultura. Dentre as causas desta baixa eficiência estão infecções uterinas logo após o parto e perdas embrionárias no início da gestação. Estas perdas são um grande obstáculo para o sucesso gestacional principalmente nas técnicas que utilizam a transferência de embriões (TE) produção *in vitro* de embriões (PIVE). Estima-se que 70 a 80% das perdas embrionárias ocorram entre os dias 7 e 16 de gestação, período no qual ocorre a eclosão do blastocisto, início dos processos de crescimento pré-implantação e reconhecimento materno da gestação (BERG et al., 2010; KIMURA; MATSUYAMA, 2014; MINTEN et al., 2013). Acredita-se que uma boa parte dessas perdas poderia estar relacionada a um ambiente uterino com baixa receptividade ao embrião, impedindo a gestação (ANDRADE et al., 2012; IDETA et al., 2010a).

Diferente de um embrião semi-alogênico gerado por monta natural ou inseminação artificial, o embrião produzido *in vitro* ou por TE quando introduzido em uma fêmea receptora se comporta de forma alogênica, ou seja, totalmente estranho ao sistema imune da “mãe”, uma vez que tanto a parte paterna como a materna do embrião é antigênica à receptora, podendo, portanto, ser rejeitada imunologicamente, resultando em falha de gestação (KOCH; PLATT, 2003).

Experimentos com TE em várias espécies tem demonstrado que o ambiente uterino permanece receptivo ao embrião por um limitado período de tempo após a ovulação, com um perfil de expressão gênica característico, permitindo que o endométrio responda ao sinal embrionário, evitando a rejeição (SHERWIN et al., 2004). Estudos utilizando a administração intrauterina de PBMCs (IDETA et al., 2010ab) e sêmen (ROBERTSON, 2005; SCHJENKEN; ROBERTSON, 2014) mostraram resultados favoráveis à receptividade uterina ao embrião assim como também o sucesso gestacional.

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 (CLARK; SCHUST, 2013; KOCH; PLATT, 2003; LEE et al., 2012).

Da mesma forma que as células epiteliais modificam os mecanismos de defesa quando entram em contato com os espermatozoides e o conceito, afim de promover a imunotolerancia a esses antígenos, alterações nesse mecanismo também acontecem quando microrganismos invasores contaminam o ambiente uterino durante a cópula ou após o parto (MARTINS; BORGES, 2015). No pós-parto, as inflamações uterinas podem provocar infertilidade e subfertilidade, gerando perdas significativas e afetando o desempenho reprodutivo da fêmea (SHELDON et al., 2009). Atrasos no diagnóstico dessas inflamações uterinas, principalmente quando não se tem sinais clínicos, pode aumentar o intervalo de partos, reduzindo a eficiência reprodutiva e gerando prejuízos econômicos.

A identificação da inflamação uterina utilizando análises da expressão gênica pode ser realizada por meio de amostras coletadas por *cytobrush* (GHASEMI et al. 2012) e biópsia uterina (CHAPWANYA et al. 2010), as quais podem apresentar diferentes capacidades de detecção. É possível também que a expressão gênica de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias variem de acordo com o local, grau de inflamação e o método de coleta de amostras do epitélio endometrial bovino.

Afim de traçar estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, aumentar a lucratividade do sistema de produção, é necessário maior compreensão da resposta imune uterina frente ao mecanismo de tolerância uterina ao conceito, de modo a reduzir perdas embrionárias, assim como também, uma eficiente e rápida identificação dos processos inflamatórios no pós-parto, evitando casos de infertilidade e subfertilidade.

2. Objetivos

2.1. Geral

Com o presente estudo teve-se como objetivo geral analisar as expressões de citocinas no endométrio bovino com e sem inflamação, assim como, de citocinas relacionados à imunotolerancia uterina ao conceito em amostras de úteros sensibilizados ou não por PBMC e/ou sêmen no estro.

2.2. Específico

- Comparar a resposta da expressão dos genes *CCL5*, *IL-8*, *IL-6* e *IL-1 β* no endométrio bovino de acordo com o grau de inflamação (ausente, leve e grave).
- Comparar a expressão dos genes *CCL5*, *IL-8*, *IL-6* e *IL-1 β* entre as regiões uterinas carunculares e intercarunculares em amostras colhidas por biópsia de útero bovino sadios e com processo inflamatório.
- Comparar os métodos de coletas de amostras *cytobrush* e biópsia uterina, com base na expressão dos genes *CCL5*, *IL-8*, *IL-6* e *IL-1 β* em amostras de úteros bovinos sadios e com processo inflamatório.
- Analisar a expressão de RNAm dos genes *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-6*, *IL-17*, *IFNG* e *LIF* no endométrio bovinos no dia zero (estro), sete e quatorze do ciclo estral em fêmeas não gestantes.
- Analisar a expressão de RNAm dos genes *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-6*, *IL-17*, *IFNG* e *LIF* no endométrio bovino sensibilizado no dia zero com antígenos paterno (sêmen) e/ou materno (PBMCs) de receptoras de embrião não gestantes nos dias sete e quatorze após a sua administração.

3. Revisão de Literatura

3.1 Imunologia uterina

O sistema imune tem um importante papel como órgão de defesa contra agentes externos e como mediador do equilíbrio dinâmico do organismo. No útero durante a gestação, este sistema tem participação desde a deposição do sêmen até o nascimento do concepto, assim como também no combate de microorganismos patogênicos (SOUZA; VOLTARELLI; FERRIANI, 1997). Modificações na produção de substâncias imunológicas de forma direta ou indireta podem acarretar alterações no

processo reprodutivo, podendo provocar inflamações uterinas, infertilidade e falha na gestação (MUNOZ-SUANO; HAMILTON; BETZ, 2011).

Em mamíferos, imediatamente após a cópula ocorre um rápido fluxo de células inflamatórias para o local de deposição do sêmen. Fatores seminais agem no aparelho reprodutor feminino promovendo a capacitação e sobrevivência dos espermatozoides, além de participar da modulação da resposta imune frente ao mecanismo de imunotolerância ao conceito. Também ocorrem mudanças moleculares e celulares no endométrio para facilitar o desenvolvimento e implantação embrionária (ROBERTSON, 2005; SCHJENKEN; ROBERTSON, 2014). Além disso, agentes quimiotáticos presentes no plasma seminal atraem os neutrófilos para o lúmen uterino, agindo na depuração do excesso de espermatozoides e detritos seminais (ROBERTSON, 2005).

Logo após a atração dos neutrófilos, outros leucócitos como macrófagos, células dendríticas e células T invadem os tecidos reprodutivos subjacentes com ação imunorregulatória e de remodelação tecidual, contribuindo na melhoria da receptividade endometrial, implantação e desenvolvimento inicial do embrião (ROBERTSON, 2005; SCHJENKEN; ROBERTSON, 2014). O plasma seminal induz células epiteliais que revestem a superfície uterina a produzir citocinas, fazendo com que os leucócitos extravasem da corrente sanguínea e entrem nos tecidos reprodutivos, ampliando a resposta leucocitária. (ROBERTSON, 2005). Desta forma, o fluido seminal provoca mudanças na função imune da fêmea, podendo promover um estado de tolerância imunológica facilitando a aceitação materna ao conceito (CLARK; SCHUST, 2013; ROBERTSON, et al., 2009; SCHJENKEN; ROBERTSON, 2014).

As citocinas também têm um papel importante na evolução ou interrupção da gestação. Estas 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 et al., 2006), impedindo a rejeição do embrião, sem comprometer a habilidade de combater infecções uterina provocada por microrganismos patogênicos (MUNOZ-SUANO; HAMILTON; BETZ, 2011).

Durante o estro e parto, a cervix se abre expondo o útero ao ambiente externo tornando-o susceptível à contaminação por microrganismos patogênicos (MARTINS;

BORGES, 2015). O estabelecimento da infecção uterina dependerá da espécie e número de microrganismos patogênicos e da capacidade da resposta imunológica de eliminar essa contaminação. No pós-parto, a diminuição da ingestão de alimentos e o aumento da demanda energética imposta pelo início de lactação pode debilitar o organismo da fêmea, deste modo, a instalação de um quadro infecção uterina dependerá da capacidade de involução do útero e da regeneração do endométrio (SHELDON; DOBSON, 2004; SORDILLO; AITKEN, 2009). A doença ocorrerá somente se houver a persistência da contaminação de bactérias patogênicas, sendo sua gravidade dependente da patogenicidade destas bactérias, do ambiente uterino, de fatores genéticos e da imunidade inata e adquirida da fêmea (SHELDON; DOBSON, 2004; WILLIAMS et al., 2007).

As Inflamações uterinas afetam a função do útero, ovário e eixo hipotálamo-hipófise, provocando maiores intervalos de partos e primeira inseminação ou concepção, aumentam a taxa de descarte, além de comprometer o bem-estar animal (SHELDON; DOBSON, 2004; SHELDON et al., 2008). Durante uma infecção bacteriana uterina, as células endométriais podem ativar ou reprimir certos sinais bioquímicos e moleculares relacionados à resposta imunológica inata e adquirida em bovinos (SALILEW-WONDIM et al., 2016; TURNER; HEALEY; SHELDON, 2012).

A imunidade inata atua por meio de respostas fisiológicas, fagocitárias e inflamatórias, sendo a principal responsável pela detecção do agente invasor, controle da contaminação e reparo do tecido danificado (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; SHELDON, 2014; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Ela age formando uma memória imunológica que protege o organismo quando este entra novamente em contato com o mesmo antígeno, além de elaborar respostas específicas para cada desafio antigênico, podendo ser do tipo humoral e/ou celular, sendo a primeira efetuada pelos linfócitos B e a outra pelo T (SORDILLO; AITKEN, 2009; WERLING; JUNGI, 2003).

Muitas funções imunes no trato reprodutivo feminino são reguladas por citocinas, constituídas por várias famílias de proteínas, incluindo interleucinas e quimiocinas (SHELDON et al., 2014). As células epiteliais secretam citocinas preferencialmente para o compartimento apical/luminal, com o objetivo de atrair mais células imunes, resultando em um importante gradiente de atração (FAHEY et al., 2005). As citocinas apresentam funções de crescimento, diferenciação e ativação atuando como mediadores e reguladores das respostas inflamatórias e imunológicas

frente a microorganismos e outros antígenos, como um embrião alogênico por exemplo (CHENG et al., 2008).

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). Elas baseiam-se no padrão de produção e secreção de citocinas e nas funções e perfil de expressão de fatores de transcrição dos diferentes tipos celulares. Durante o estímulo fornecido por uma célula apresentadora de antígenos (APCs), um linfócito precursor Th0 pode se tornar uma célula Th1 ou Th2 dependendo dos vários fatores de transcrição que atuam em pontos específicos intracelulares em níveis moleculares para regular a expressão gênica das citocinas. (CHENG et al., 2008; CHEN et al., 2016; HIRAHARA; NAKAYAMA, 2016; SAITO, et al., 2010; ZHU; PAUL, 2008).

As citocinas secretadas pelos linfócitos T Helper possuem ação anti-inflamatória e pró-inflamatória cuja função depende das células imunes presentes no local e do grau de resposta a estes fatores. As células Th1 secretam citocinas pró-inflamatórias e estão envolvidas na imunidade mediada por células, como IFNG (interferon gama) e IL-2 (interleucina 2), enquanto as Th2 anti-inflamatórias são responsáveis pela estimulação da produção de anticorpos, como IL-4 (interleucina 4) e IL-10 (interleucina 10) (CHENG et al., 2008). As células Th17 produzem citocinas pró-inflamatórias, como a IL-17 (interleucina 17), com importante função na indução da inflamação, doenças autoimunes e rejeição aguda aos transplantes (CHEN et al., 2016; CROME; WANG; LEVINGS, 2010; PECK; MELLINS, 2010). Em qualquer doença infecciosa, o padrão de predominância das respostas Th1 ou Th2 é provavelmente modulado pelas características do agente patogênico e pelo perfil genético do organismo hospedeiro, cuja a imunidade inata desempenha um papel fundamental (D'ELIOS et al., 2011).

3.1.1. Citocinas

3.1.1.1. Interleucina-1 beta (IL-1 β)

A citocina IL-1 β pode ser expressa por células mononucleares, incluindo monócitos e macrófagos, e células epiteliais em resposta ao antígeno (DINARELLO,

2005; NAIR; KHANNA; SINGH, 2014). Esta citocina estimula os linfócitos B (KAUMA, 2000) e aumenta a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão pelas células endoteliais vasculares, promovendo a infiltração de células inflamatórias para o espaço extravascular. Além disso, IL-1 β ativa neutrófilos e monócitos, aumentando a fagocitose e morte bacteriana (DINARELLO, 2002; SICA et al., 1990; WANG et al., 1991). Segundo Correia-Alvarez et al. (2015), o sistema IL-1, como IL-1 β e IL-1R1, está presente no trato reprodutivo e em embriões de vários mamíferos desempenhando um importante papel durante o desenvolvimento embrionário, inclusive em bovinos. A IL-1 β é sintetizada pelo embrião humano durante seus estágios iniciais e a sua concentração tem sido correlacionada positivamente com a implantação bem sucedida após a fertilização *in vitro* e transferência para a cavidade uterina. (BARANAO et al., 1997; SHETH et al., 1991). Em vacas, a IL-1 β foi encontrada em células endometriais durante o ciclo estral (TANIKAWA et al., 2009), no embrião e no fluido uterino (MUNÓZ et al., 2012). Ela pode aumentar a percentagem de embriões que se desenvolvem para o estágio de blastocisto *in vitro* (HANSEN, 2011), além de agir na regulação da expressão de moléculas de adesão durante a implantação do blastocisto no útero (SALAMONSEN; DIMITRIADIS; ROBB, 2000). Em mulheres, foram observados baixos níveis de IL-1 β em casos de abortos recorrentes (VON WOLFF et al., 2000). Em bovinos, Oliveira et al. (2013) observaram que os níveis transcrição de RNAm do gene IL-1 β aumentaram durante a fase lútea inicial (dia 7), sendo suprimidos significativamente na fase tardia (dias 13 e 16), tendendo a um ambiente Th2 com redução de fatores pró-inflamatórios, promovendo um perfil de antecipação à gestação. Conforme Zhang et al. (2015), para o sucesso da gestação em vacas é preciso ter um ambiente uterino com predominância de citocina padrão Th2. Muñoz et al. (2012) observaram que durante o início da gestação bovina ocorre uma diminuição de IL-1 β no fluido uterino que, por sua vez, reduziria a expressão de factor nuclear kappa B (NFkB) e suas respostas pró-inflamatórias e/ou pró-apoptótico, contribuindo para a tolerância imunológica do embrião. Na gestação, a alta concentração de progesterona produzida pelo corpo lúteo inibe a expressão de IL-1 β que por sua vez inibe a prostaglandina F α (PGF α), evitando a perda embrionária (NOTHNICK; PATE, 1990).

Os níveis de expressão de IL-1 β também foram correlacionados com a saúde uterina. Fischer et al. (2010) encontraram maiores expressões em amostras de

endométrio de vacas com endometrite clínica e sub-clínica em comparação com as saudáveis. Conforme Herath et al. (2009) a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 β , foram observadas em biópsias endometriais na primeira semana pós-parto, sendo o aumento da expressão correlacionado com a diminuição dos parâmetros de fertilidade.

3.1.1.2. Interleucina-2 (IL-2)

A IL-2 é uma citocina pleiotrópica produzida após a ativação do antígeno, desempenhando papéis fundamentais na resposta imune (LIAO; LIN; LEONARD, 2013). Sua secreção se dá principalmente por meio de células Th1 ativadas e em menor proporção por células B e monócitos (WANO et al., 1984), sendo principalmente estimulada pela atividade bacteriana e seus subprodutos, e também por outras citocinas como IFNG e IL-1 (NOGUCHI et al., 1993). Descoberto como um fator de crescimento de células T, a IL-2 também promove a atividade citolítica das células T CD8 e células Natural Killer (NK) e modula os programas de diferenciação de células T em resposta ao antígeno. Além disso, a IL-2 é essencial para o desenvolvimento e manutenção de células Treg e para a morte celular induzida por ativação, mediando assim a tolerância e limitando reações imunes inadequadas (LIAO; LIN; LEONARD, 2013). Além da proliferação e diferenciação das células T, a IL-2 também pode regular os fenômenos de sobrevivência e formação de memória imunológica, participando da fase inicial de reconhecimento do antígeno, promovendo a expansão dos clones e favorecendo a sobrevivência das células ativadas (MALEK; BAYER, 2004)

Estudo em endométrio de mulheres não gestantes demonstraram altas porcentagens de células Th1 por meio da resposta imune celular, protegendo contra infecção viral e bacteriana, com liberação de IL-2, TNF- α (Fator de necrose tumoral α) e IFNG (SAITO et al., 1999). Também em mulheres, o aumento da concentração de IL-2 foi associado a casos de abortos espontâneos (MARZI et al., 1996).

3.1.1.3. Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é conhecida como uma citocina pleiotrópica que regula o crescimento de células, angiogênese, inflamação e hematopoiese (ALTUN et al., 2011). Esta é

produzida por uma variedade de células, incluindo fagócitos mononucleares, células T, e fibroblastos e atua como um fator de crescimento para as células B maduras (HONG et al., 2016; BARTON, 1997). A sua expressão foi descrita em humanos nas células da teca e granulosa, endométrio e em embriões pre-implantação (TABIBZADEH et al., 1995).

A IL-6 possui propriedades tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias, promovendo *feedback* negativo sobre a síntese de IL-1, IFNG e TNF, atenuando a síntese das citocinas pró-inflamatórias, enquanto exerce pouco efeito sobre a síntese de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e fator de crescimento transformador- β (TGF- β). 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 (SCHELLER et al., 2011). Alguns dos efeitos reguladores da IL-6 envolvem a inibição da produção de TNF promovendo *feedback* negativo, limitando a resposta inflamatória aguda (HIRANO, 1992; XING et al., 1998), bem como a indução da diferenciação de células Th17 e bloqueio do desenvolvimento de células Treg (ARRUVITO et al., 2009; MCGEACHY et al., 2007). Esta citocina também está envolvida na ativação e diferenciação de células T e induz a sua maturação final em células plasmáticas produtoras de anticorpos (HONG et al., 2016; BARTON, 1997).

Em bovinos, a expressão de RNAm do gene *IL-6* é vista em maiores quantidades na fase de alongamento e pre-implantação do embriões (MATHIALAGAN; BIXBY; ROBERTS, 1992), podendo deste modo ser essencial para a implantação e sucesso da gestação (YANG et al., 2016). É possível que alterações significativas de expressões genicas de IL-6 só ocorram próximo ao período de implantação, que conforme Hansen et al. (2010) ocorre depois do dia 18 de gestação em bovinos. Em mulheres, a IL-6 é essencial para o desenvolvimento normal da placenta (GOYAL et al., 2013) e sua expressão reduzida está associada com casos de aborto (VON WOLFF et al., 2000). O plasma seminal humano estimula a expressão endometrial de IL-6 em células epiteliais endometriais *in vitro* (GUTSCHE et al., 2003). Na ausência de estimulação plasmática seminal, a sua expressão foi significativamente diminuída sendo associada com a diminuição da proporção de fêmeas que alcançaram a gestação (BROMFIELD et al., 2014). Schjenken et al. (2014) sugeriram que esta citocina tenha um papel na manutenção da gestação.

Maiores concentrações sanguíneas IL-6 foram observadas em vacas com endometrite (ISHIKAWA et al., 2004), embora Ghasemi et al. (2012) só observaram o aumento dos níveis de IL-6 em vacas com proporções endometriais de células polimorfonucleares (PMNs) maiores que 18%. Por outro lado, Fischer et al. (2010) não encontraram diferenças significativas na expressão de mRNA IL-6 em amostras colhidas de vacas saudáveis em comparação com amostras de vacas com endometrite subclínica ou clínica.

3.1.1.4. Interleucina-8 (CXCL8 ou IL-8)

A IL-8 é uma citocina quimiostática (quimiocinas) pró-inflamatória, produzida principalmente por monócitos e macrófagos ativados em resposta à toxinas e citocinas inflamatórias, sendo um potente quimiotático direcionando os neutrófilos para o foco inflamatório, auxiliando na remoção dos patógenos (BAGGIOLINI 2001; HOCH; SCHRAUFSTATTER; COCHRANE, 1996). Segundo Galligan et al. (2000), em bovinos, a IL-8 pode desempenhar um papel tanto no recrutamento como na ativação de neutrófilos durante os processos inflamatórios.

Robertson (2005) observou que o plasma seminal estimula a expressão de IL-8 nas células epiteliais do endométrio em mulheres e ratas. Segundo Ghasemi et al. (2012) a IL-8 contribuiu diretamente para a inflamação através do recrutamento e ativação de PMNs e ainda conclui que sua expressão pode ser útil para determinar processo inflamatório do endométrio bovino. Da mesma forma, Galvão et al. (2011) constataram o aumento da expressão de IL-8 em vacas diagnosticadas com endometrite. Fischer et al. (2010) sugerem que a IL-8 pode ser um potencial marcador genético para a detecção de vacas com endometrite subclínica.

3.1.1.5. Interleucina-17 (IL-17)

A citocina pró-inflamatória IL-17, produzida por células Th17, induz a expressão de muitos mediadores de inflamação, os quais são importantes na iniciação e manutenção de processos inflamatórios, além de estar envolvida na produção de outras citocinas pró-inflamatórias (PAPPU; ANGKASEKWINAI; DONG, 2008). Esta citocina também estimula a imunidade celular e humoral alérgeno específica, induz a

363 maturação de células dendrítica e a produção de moléculas pró-angiogênicas
364 (PONGCHAROEN et al., 2007; SHEN; GAFFEN, 2008), além de recrutar neutrófilos
365 no sítio da resposta imune através da indução de fator estimulador de colônia de
366 granulócitos (G-CSF) e quimiocinas indutoras de neutrófilos, como IL-8 (DRAGON et
367 al., 2008). Além disso, também induz processo inflamatório em doenças patogênicas
368 autoimunes e rejeição de órgãos alogênicos (CROME; WANG; LEVINGS, 2010;
369 PAPPU; ANGKASEKWINAI; DONG, 2008). Estudos observaram aumento de células
370 Th17 em pacientes com aborto espontâneo, podendo ter influência na tolerância
371 durante a gestação (NAKASHIMA et al., 2010). Maeda et al. (2013) observaram que
372 a progesterona suprime a IL-17, tornando o ambiente favorável para a gestação em
373 fêmeas bovinas.

375 **3.1.1.6. Fator inibidor da leucemia (LIF)**

376
377 O LIF é uma citocina da família interleucina-6 e regula várias funções celulares
378 (MATHIEU et al., 2012). Segundo Salleh et al. (2014), ele desempenha um papel
379 indispensável antes e durante a implantação do embrião. Está envolvido na regulação
380 da receptividade uterina, crescimento e desenvolvimento do blastocisto e interação
381 entre embrião e endométrio. Também estimula a diferenciação das células
382 trofoblásticas e aumenta a capacidade do trofoblasto para atingir o estroma uterino,
383 estimula a decidualização e participa da modulação da resposta imune no útero no
384 início da gestação. Além disso, a expressão do LIF no útero durante o período de
385 implantação pode ser regulada por esteróides ovarianos em camundongos e
386 humanos.

387 Camundongas *knockout* para o gene *LIF* mostraram-se inférteis devido a uma
388 falha de implantação, demonstrando seu papel essencial para a implantação
389 embrionária (FOULADI-NASHTA et al., 2005). Além disso, em mutantes homozigotas,
390 ou seja, aquelas que possuem dois alelos negativos para o LIF, a administração de
391 LIF exógeno restaurou a capacidade de implantação embrionária (CHEN et al., 2000).
392 Estudo realizado com administração de PBMCs intrauterina em camundongos
393 observou aumento do LIF endometrial associado com a melhora na receptividade
394 endometrial e na taxa de prenhez (YU et al., 2014). Assim como também foi observado
395 que o fluido seminal estimula a secreção de LIF por células epiteliais endometriais

humanas *in vitro* (GUTSCHE et al., 2003). Menores quantidades de LIF foram observadas no líquido luminal uterino de mulheres inférteis entre os dias 6 e 13 do ciclo estral (SHERWIN et al., 2002; TAWFEEK et al., 2012). Oliveira et al. (2013) observaram um aumento progressivo na expressão de RNAm de LIF em tecidos uterinos até o dia 16, tanto em vacas prenhes como em cíclicas. Por outro lado, Oshima et al. (2003) não observaram aumento na expressão do LIF nos dias 20-21 após a ovulação em bovinos, acreditando que ele não seja necessário para a implantação do embrião. Estes mesmos autores observaram o aumento da expressão nos dias 48-49 e 74-140, o que poderia estar relacionado ao crescimento e desenvolvimento fetal e com a função das glândulas uterinas neste período. Em ruminantes, como a implantação não é invasiva, o LIF pode não ser obrigatório para este processo, mas parece ter um papel durante o estabelecimento da gestação (VOGIAGIS et al., 1997).

3.1.1.7. Interferon gama (IFNG)

O IFNG é uma citocina pró-inflamatória secretada no útero durante o início da gestação (MURPHY et al., 2009), sendo produzida pelas células imunológicas como linfócitos T e NK (TATO et al., 2004). Estudos sugerem sua ação na implantação e estabelecimento da gestação em bovinos (O'GORMAN et al., 2010), com características indutoras da imunidade celular e de abortamento. Além disso, a síntese de progesterona e prostaglandinas pelas células luteais pode ser modificada mediante ao desencadeamento da cascata de sinalização que envolve hormônios e citocinas como IFNG (OLIVEIRA et al., 2007). Esta citocina também atua na ativação de resposta imune inata e adaptativa a vírus e tumores, em parte através da transcrição de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, apoptose e apresentação e processamento de antígenos (MURPHY et al., 2009).

O IFNG induz a morte das células luteais bovinas, podendo apresentar efeitos citotóxicos diretos (OLIVEIRA et al., 2007; PATE, 1996). Em camundongos, o IFNG desempenha um papel crítico durante a implantação e manutenção da placenta em gestações normais (MURPHY et al., 2009). Desvios neste processo contribuem para complicações gestacionais sérias como a perda fetal em bovinos ou pré-eclampsia em humanos (MURPHY et al., 2009; CROY et al., 2006).

3.1.1.8. CCL5

CCL5 é uma quimiocina conhecida como RANTES (Regulated on Activated Normal T-Cell Expressed and Secreted), responsável por atrair monócitos, linfócitos T, eosinófilos e basófilos para o sítio inflamatório (KAMEYOSHI et al., 1992; SCHALL et al., 1990). A CCL5 é produzida por vários tipos de células, incluindo células T, endoteliais, epiteliais e fibroblastos. Além de quimiotaxia, ela possui atividades antimicrobianas e antivirais, melhora processos inflamatórios e participa na estimulação e indução do câncer (APPAY; ROWLAND-JONES, 2001; LEVY, 2009). Esta quimiocina está presente no sistema reprodutivo feminino e masculino, e seus níveis elevados estão associados à infecções do trato genital e infertilidade. Além disso, foram observados receptores para essa quimiocina em espermatozóides, estando a diminuição dos níveis de RNAm para CCL5 associada à diminuição nas reservas de espermatozóides nos testículos de ratos (REBOURCET et al., 2010).

3.2. Imunologia da gestação

Do ponto de vista imunológico, a gestação constitui um momento único, pois o embrião em desenvolvimento contém metade do material genético da própria mãe e a outra proveniente do pai, comportando-se como um enxerto semi alogênico e agindo como um antígeno, podendo ser reconhecido ou rejeitado pelo organismo materno (MICHELON et al., 2006). Uma regulação fina do sistema imune da mãe desafiado pelos antígenos paternos expressos pelo embrião, permitirá o desenvolvimento da gestação evitando o aborto. A gestação só é estabelecida quando se tem um ambiente uterino imunologicamente adequado que permita o reconhecimento do embrião e a tolerância aos seus antígenos. Desvios no equilíbrio dessa resposta aloimune podem provocar complicações gestacionais e/ou infertilidade (MUNOZ-SUANO; HAMILTON; BETZ, 2011).

No início do desenvolvimento embrionário ocorre uma intensa proliferação celular e, para garantir que o sistema imune materno não bloqueie esse processo, ocorre um fenômeno chamado “tolerância imunológica” (MICHELON et al., 2006). Neste, estão envolvidos hormônios, citocinas, moléculas do Complexo Principal de

Histocompatibilidade (MHC) paterno (expressas pelo embrião), células NK uterinas e Tregs (SARAFANA et al., 2007).

Além da tolerância imunológica, é preciso também que a gestação seja reconhecida. Em bovinos isso ocorre por volta do dia 16 a 18 de gestação com a secreção de interferon tau (ITNt) pelo concepto, inibindo a produção de pulsos luteolíticos de prostaglandina F2 alfa, o que impede a regressão do corpo luteo (HANSEN et al., 2010; KNICKERBOCKER et al., 1986). Citocinas, quimiocinas e aloantígenos também produzidos pelo embrião ativam o sistema imune da mãe, favorecendo a tolerância uterina ao concepto e promovendo seu reconhecimento (CLARK; SCHUST, 2013; HANSEN, 2011). Em vacas, a maioria das perdas embrionárias ocorrem entre os dias 7 e 16 de gestação período no qual ocorrem o início dos processos de reconhecimento materno da gestação e o crescimento pré-implantação com a eclosão do blastocisto (BERG et al., 2010; KIMURA; MATSUYAMA, 2014; MINTEN et al., 2013;).

Os primeiros estudos sobre a participação de citocinas na gestação demonstraram que a sensibilização materna ao embrião alogênico é orientada pelos linfócitos Th1 e Th2. Os linfócitos Th1 secretam grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias que podem induzir a reação inflamatória e a necrose placentária e comprometer o desenvolvimento do feto e/ou placenta. Por outro lado, os linfócitos Th2 produzem citocinas anti-inflamatórias que seriam benéficas a unidade feto-placenta, através da inibição da produção de citocinas Th1, promovendo a proliferação e diferenciação de células trofoblásticas e a placentação (WEGMANN et al., 1993). Vários estudos sugerem que o sucesso da implantação embrionária e manutenção da gestação dependem do equilíbrio da resposta imune, no qual o perfil Th2 prevalece sobre o Th1 no endométrio (TACHIBANA et al., 2013; TORTORELLA et al., 2014). Segundo Saito et al. (2010) o equilíbrio adequado entre Th1/Th2 na interface materno/fetal é ligeiramente deslocado para a imunidade Th2, sendo que a hiperstimulação do perfil Th1 ou Th2 pode ser prejudicial para a gestação. Conforme Lim et al. (2000) e von Wolff et al. (2000), mulheres com aborto recorrente apresentaram principalmente citocinas Th1, enquanto que as saudáveis exibiam aumento Th2. Ainda em mulheres, a modulação da resposta imune da gestação foi expandida para Th1/Th2/Th17 e Treg (SAITO et al., 2010). Em bovinos pouco se conhece sobre o perfil Th1/Th2/Th17 e Treg. Sabe-se que o padrão imune do

endometrio bovino durante a gestação favorece um ambiente 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).

O uso de imunoterapias induzindo resposta imunológica adequada para a manutenção da gestação evitando o aborto, tem sido objeto de estudo por vários autores. A administração de PBMCs (IDETA et al., 2010b; YOSHIOKA et al., 2006; OKITSU et al., 2011) e sêmen (BELLINGE et al., 1986; TREMELLEN et al., 2000), tem gerado resultados promissores para o sucesso gestacional.

3.2.1. Indução imunológica com sêmen

Durante o acasalamento, o contato do sêmen com o aparelho reprodutor feminino promove a primeira sinalização dos antígenos paternos ao sistema imune da mãe. Um segundo momento ocorre durante a implantação do embrião quando as células trofoblásticas placentárias entram em contato com os tecidos maternos (ROBERTSON et al., 2009; SCHUBERTH et al., 2008). Além de promover a sobrevivência dos espermatozoides e sua capacitação, o sêmen contém agentes sinalizadores que influenciam a fisiologia reprodutiva a fim de melhorar as chances de concepção (SCHJENKEN; ROBERTSON, 2014).

Quando o fluido seminal entra em contato com as células epiteliais e leucócitos do útero, vários mecanismos imunológicos são iniciados, incluindo a síntese de citocinas e quimiocinas e alterações que se assemelham a uma cascata inflamatória clássica. (MICHELON et al., 2006; ROBERTSON, 2005; SCHUBERTH et al., 2008). Nas espécies onde o líquido seminal atinge o trato reprodutivo superior, o perfil de secreção dessas citocinas e quimiocinas é regulado a nível de RNAm principalmente por fatores de sinalização presentes no fluido seminal e pelos hormônios esteróides ovarianos. No bovino, durante a monta natural, o líquido seminal é depositado na vagina e os espermatozoides migram através da cérvix para o útero, deixando a maior parte do plasma seminal no trato inferior (ALGHAMDI et al., 2009). Deste modo, pouco se sabe sobre as interações entre o fluido seminal e o trato reprodutivo da fêmea (SCHJENKEN; ROBERTSON, 2014).

Em 1986, estudos já mostravam que o fluido seminal favorecia ao processo de implantação. Foi observado que a deposição de sêmen em vagina de mulheres submetidas à fertilização *in vitro* no dia que o ovócito foi fecundado elevaram a taxa de implantação à 53% em comparação ao grupo controle de 23% (BELLINGE et al., 1986). Conforme Robertson et al. (2009), a excisão das glândulas vesiculares no macho reduziu a tolerância materna aos antígenos, demonstrando o papel essencial do plasma seminal nesse mecanismo. Segundo Gutsche et al. (2003) em humanos o plasma seminal estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias em células epiteliais endometriais *in vitro*. Em leitoas, a infusão intrauterina de plasma seminal 2 horas antes da inseminação artificial aumenta o número de embriões viáveis (O'LEARY et al., 2004).

Em procedimentos de fecundação *in vitro*, tanto em humanos como em bovinos, os espermatozoides são separados do plasma seminal. Para a fecundação é evidente que os componentes do plasma seminal não são necessários, mas há provas de que o sucesso e a qualidade da gestação podem estar comprometidos se as fêmeas não estiverem expostas ao plasma seminal (CLARK; SCHUST, 2013; ROBERTSON, 2005).

Em estudos com mulheres que tiveram exposição prolongada ao plasma seminal o risco de desenvolver a pré-eclâmpsia foi consideravelmente menor (BASSO; CHRISTENSEN; OLSEN, 2001; KHO et al., 2009). Respostas imunes insuficientes ou inapropriadas aos antígenos seminais após a relação sexual em humanos podem provocar alterações associadas à placentação superficial na pré-eclâmpsia e aborto espontâneo recorrente. Este fato também pode estar relacionado à incompatibilidade do parceiro, à deficiência de citocinas plasmáticas seminais ou à incapacidade feminina de responder a sinais seminais (DEKKER; ROBILLARD; HULSEY, 1998; ROBERTSON, 2005). A taxa de natalidade de casais que se submeteram a tratamento de fecundação *in vitro* foram significativamente melhores quando as mulheres se envolviam em relações sexuais ao redor do dia da TE (TREMELLEN et al., 2000).

3.2.2. Indução imunológica com PBMCs

Outra forma de indução à tolerância materna ao conceito é a administração intrauterina de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Estas são células imunes constituídas principalmente de linfócitos T, linfócitos B e monócitos na maioria dos mamíferos. Em bovinos, as PBMCs administradas no útero são constituídas principalmente por linfócitos T perfazendo 69% das células, enquanto que os monócitos representavam apenas 17%, sugerindo que os linfócitos poderiam ajudar a estabelecer a gravidez na espécie bovina (IDETA et al., 2010a). Segundo Ideta (2010ab), a administração intrauterina dessas células pode induzir a expressão de genes específicos e, possivelmente, reações imunes que aumentam o reconhecimento materno do embrião bovino, além de favorecer um adequado ambiente uterino promovendo o desenvolvimento do embrião durante o período pré-implantação.

Em estudos com mulheres que apresentavam abortos de repetição após a transferência de embrião produzido *in vitro*, a administração intrauterina de PBMCs autólogas cultivadas por 48 horas com adição de gonadotrofina coriônica humana (hCG) e PBMCs frescas proporcionou resultados significativamente superiores para taxa de gestação, implantação e nascimento (41,2; 23,4 e 35,3% respectivamente) quando comparado com pacientes não tratadas (11,1; 4,1 e 5,5%, respectivamente) (YOSHIOKA et al., 2006). Possivelmente, várias citocinas produzidas pelas PBMCs podem desempenhar um papel positivo no útero, aumentando a receptividade do endométrio uterino e melhorando o desenvolvimento do embrião (HANSEN, 2011; IDETA et al., 2010b).

Em um outro estudo também em humanos, a infusão intrauterina de PBMCs autólogas à fresco melhorou a taxa de gestação e implantação embrionária (42,1% e 25%, respectivamente) em comparação ao grupo não tratado (16,7% e 9,4%, respectivamente) em pacientes que receberam transferência de embriões produzidos *in vitro*, após três ou mais falhas (OKITSU et al., 2011). Ideta et al. (2010b), estudando bovinos, administraram PBMCs autólogas cultivadas *in vitro* durante 24 horas no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo no dia 4 do ciclo estral (D0 = cio) de vacas receptoras de embrião. A taxa de gestação foi estabelecida no dia 60 e os resultados foram significativamente maiores no grupo tratado comparado com o controle (76,7% e 59,7%, respectivamente). Assim, apesar do período de implantação diferir, a administração intrauterina de PBMCs humanas e bovinas antes da TE têm mostrado

melhorar a taxa de gestação em ambas as espécies (IDETA et al., 2010a; YOSHIOKA et al., 2006).

3.3. Processo inflamatório uterino no pós-parto

Os processos inflamatórios mais frequentes no útero ocorrem em decorrência à contaminação por bactérias patogênicas durante e após o parto. O estabelecimento, gravidade e persistência da infecção são influenciados basicamente pela condição do ambiente uterino associado à fatores de risco, como retenção de placenta, distocias, partos gemelares, abortos e curtos períodos de gestação, por fatores genéticos e alterações nos mecanismos de defesa locais, comprometendo a resposta imunológica adequada à eliminação da contaminação (BELL; ROBERTS, 2007; BENZAQUEN et al., 2007; SHELDON; DOBSON, 2004; SHELDON et al., 2006; SHELDON et al., 2009).

As infecções uterinas são classificadas de acordo com o período em que ocorrem e seus sinais clínicos após o parto. A metrite puerperal é definida como aquela que ocorre até 21 dias após o parto e envolve todas as camadas do útero (endométrio, submucosa, muscular e serosa), sendo caracterizada por uma involução atrasada do útero, contendo secreção purulenta fétida e corrimento vaginal, podendo estar associada a sinais sistêmicos, febre e retenção de placenta (BONDURANT, 1999; SHELDON; DOBSON, 2004; SHELDON et al., 2006). A endometrite clínica é uma inflamação local das camadas superficiais do endométrio e sem alterações sistêmicas, sendo caracterizada por apresentar descarga uterina purulenta (> 50% pus) ou muco-purulenta (aproximadamente 50% de pus, 50% de muco) que persistem após 21 dias do parto. Por outro lado, uma vaca com endometrite subclínica não apresenta sinais de descarga uterina, sendo definida por apresentar mais de 18% de neutrófilos em amostras de citologia uterina coletadas 21-33 dias após parto, ou mais que 10% de neutrófilos aos 34-47 dias. Apesar de não apresentar sintomatologia clínica, a endometrite subclínica pode ser grave suficiente para prejudicar a performance reprodutiva do animal (BONDURANT, 1999; SHELDON et al., 2006; LEBLANC, 2008). Uma outra classificação das infecções uterinas é a piometra, definida por apresentar acúmulo de material purulento dentro do lúmen uterino na presença de um corpo lúteo persistente e cervix fechada (SHELDON et al., 2006).

As endometrites provocam um efeito negativo sobre o desempenho reprodutivo, sendo consideradas como uma importante causa de infertilidade e subfertilidade em rebanhos bovinos de leite e corte, reduzindo a taxa de prenhez e aumentando o intervalo parto concepção (BACHA; REGASSA, 2010; GILBERT et al., 2005; KASIMANICKAM et al., 2004; SHELDON et al., 2009), a incidência de vacas repetidoras de cio (SALASEL; MOKHTARI; TAKTAZ, 2010) e a incidência de mastite subclínica (BACHA; REGASSA, 2010).

Uma resposta inflamatória no útero pode afetar negativamente o equilíbrio no ambiente endócrino, podendo provocar perturbação da competência dos ovócitos, interferir no desenvolvimento do folículo ovariano e suprimir a atividade endócrina do hipotálamo e da hipófise em bovinos (SHELDON et al., 2014; SHELDON; OWENS; TURNER, 2017). Walker et al. (2015), estudando o perfil da expressão gênica em vacas com endometrite subclínica, observaram que a resposta inflamatória por período prolongado pode resultar em danos teciduais ou falhas em completar a involução uterina no pós-parto, criando um ambiente inadequado para uma futura gestação. E ainda, segundo os autores, se a inflamação no útero ocorrer durante o desenvolvimento embrionário, pode provocar falhas no mecanismo de inunotolerância ao embrião, resultando na sua rejeição.

Várias técnicas de diagnóstico são utilizadas para identificar as infecções uterinas, dentre as quais estão o exame clínico do animal com palpação e/ou ultrassonografia transretal, exame vaginoscópico, cultura de fluido uterino, citologia endometrial e biópsia uterina. Quando o animal não apresenta sinais clínicos, como no caso da endometrite subclínicas, o método laboratorial mais frequentemente utilizado para diagnóstico é a citologia endometrial. Essa técnica consiste na determinação do percentual de PMNs, principalmente neutrófilos, em relação às células epiteliais, podendo ser recolhidas por *cytobrush* adaptado para grandes animais (escovas genitais) (CHAPWANYA et al., 2010; KASIMANICKAM et al., 2004; KASIMANICKAM et al., 2005). Na ocorrência de organismos patogênicos, os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa, resultando em um aumento significativo na população de PMNs no lúmen uterino (MAZIERO et al., 2013). Quanto mais intenso o processo inflamatório maior o recrutamento de neutrófilos PMNs, para o lúmen uterino e infiltração no tecido endometrial (LeBLANC, et al., 2002; KASIMANICKAM et al., 2004; GILBERT et al., 2005; SHELDON et al., 2006, 2009).

As referências mais utilizadas para diagnosticar endometrite subclínica são contagens superiores a 18% de neutrófilos, aos 21-33 dias pós-parto ou, maior que 10% aos 34-47 dias (SHELDON et al., 2008; KASIMANICKAM et al., 2005), ou ainda, maior que 5% destas células aos 40-60 dias (GILBERT et al., 2005).

Os neutrófilos no endométrio bovino induzem alterações à níveis de expressão de transcritos de RNAm associados ao sistema imune, assim como também expressão gênica no embrião, relacionada à estabilidade da membrana, ciclo celular e apoptose (HOELKER et al., 2012; SALILEW-WONDIM et al., 2016). Desta forma, a análise da expressão de citocinas e quimiocinas envolvidas no processo inflamatório uterino pode ser utilizada para estudos das inflamações uterinas e as amostras para esse fim, podem ser obtidas por meio de *cytobrush* (GHASEMI et al., 2012) e biópsia endometrial (CHAPWANYA et al., 2010).

Amostras obtidas por biópsias endometriais podem ser utilizada em técnicas de extração de RNA sendo capazes de gerar extensos dados quantitativos da atividade uterina (CHAPWANYA et al., 2010). É realizada por meio de pinças específicas, tornando possível a retirada de uma pequena quantidade de tecido endometrial (MARTINS et al., 2016). No geral, as biópsias são constituídas da camada endometrial e estromal (CHAPWANYA et al., 2010), sendo que os infiltrados de leucócitos são mais intensos na medida que aumenta a resposta inflamatória. Segundo Chapwanya et al. (2010), a biópsia endometrial realizada de forma adequada é uma técnica segura, confiável e que facilita a análise celular e molecular detalhada do útero, sem alterar a fertilidade do animal. Porém, Zaayer et al. (1986) sugeriram que esse procedimento pode comprometer a fertilidade da fêmea, induzindo patologias uterinas, além de ser considerada uma técnica de difícil realização que exige conhecimentos específicos para a análise das amostras.

O endometrio uterino dos ruminantes possuem duas regiões distintas, caruncular (aglandular) e intercaruncular (glandular), que podem apresentar perfil de expressão gênica diferente de acordo com o desafio imunológico (AL-GUBORY et al, 2014). Saut et al. (2014) observaram diferenças nos valores de expressão dos *IL-1 β* , *IL-6* e *IL-8* entre as regiões do endométrio, estimuladas com LPS e *Escherichia coli*, sendo os menores níveis observados na região caruncular. Diferença na expressão gênica entre as regiões carunculares e intercarunculares também são vistas em

estudos relacionados com a implantação e desenvolvimento embrionário (AL-GUBORY et al., 2014; MANSOURI-ATTIA et al., 2009).

No geral, as técnicas de amostragem, *cytobrush* e biópsia endometrial, apresentam sensibilidades e especificidades diferentes para a detecção da endometrite. O *cytobrush* é uma técnica que apresenta alta especificidade em detectar endometrite subclínica, porém baixa sensibilidade, ao contrario da biopsia que apresenta alta especificidade e sensibilidade.

Ghasemi et al. (2012) utilizando a técnica de *cytobrush* na citologia endometrial observaram uma especificidade alta (89,9%) na detecção de endometrite subclínica, utilizando gestação de 150 dias como referência, e sensibilidade baixa (12,9%), indicando haver outras causas que impeçam a gestação. Da mesma forma Kasimanickam et al. (2004), para a gestação em 132 dias, apresentaram resultados de especificidade de 94% e sensibilidade de 36%. Em contrapartida Bonnett et al. (1993) relataram biópsia uterina com especificidade de 77% e sensibilidade de 92% e para a gestação em 120 dias pós-parto.

REFERÊNCIAS

- ALGHAMDI, A.S.; LOVAAS, B.J.; BIRD, S.L.; LAMB, G.C.; RENDAHL, A.K.; TAUBE, P.C.; FOSTER, D.N. Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding. **Animal Reproduction Science**, v.114, n.4, p.331-44, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.10.015>
- AI GUBORY, K.H.; ARIANMANESH, M.; GARREL, C.; BHATTACHARYA, S.; CASH, P.; FOWLER, P.A. Proteomic analysis of the sheep caruncular and intercaruncular endometrium reveals changes in functional proteins crucial for the establishment of pregnancy. **Reproduction**, v.147, p.599-614, 2014. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0600>
- ALTUN, T.; JINDAL, S.; GREENSEID, K.; SHU, J.; PAL, L. Low follicular fluid IL-6 levels in IVF patients are associated with increased likelihood of clinical pregnancy. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.28, n.3, p.245-251, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9502-8>
- ANDRADE, G.; FERNANDES, M.A.; KNYCHALA, R.M.; PEREIRA JUNIOR, M.V.; OLIVEIRA, A.J.; NUNES, D.P.; BONATO, G.L.; SANTOS, R.M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, p. 66-69, 2012.
- APPAY, V.; ROWLAND-JONES, S. L. RANTES: a versatile and controversial chemokine. **TRENDS in Immunology**, v.22, p.83–87, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(00\)01812-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(00)01812-3)
- ARRUVITO, L.; BILLORDO, A.; CAPUCCHIO, M.; PRADA, M.E.; FAINBOIM, L. IL-6 trans-signaling and the frequency of CD4+FOXP3+ cells in women with reproductive failure. **Journal Reproductive Immunology**, v.82, p.158–165, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.04.010>
- BACHA, B.; REGASSA, F. G. Subclinical endometritis in Zebu x Friesian crossbred dairy cows: its risk factors, association with subclinical mastitis and effect on reproductive performance. **Tropical Animal Health and Production**, v. 42, n. 3, p. 397- 403, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9433-5>
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v.392, p.564-568, 1998. <https://doi.org/10.1038/33340>
- BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **Journal of Internal Medicine**, v.250, p.91–104, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2001.00867.x>
- BARANAO, R.I.; PIAZZA, A.; RUMI, L.S.; POLAK DE FRIED E. Determination of IL-1 and IL-6 levels in human embryo culture-conditioned media. **American journal of reproductive immunology**, v.37, p.191–194, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1997.tb00212.x>

- BARTON, B.E. Molecule of the month: IL-6: Insights into Novel Biological Activities. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.85, n.1, p.16 – 20, 1997. <https://doi.org/10.1006/clin.1997.4420>
- BASSO, O.; CHRISTENSEN, K.; OLSEN, J. Higher risk of pre-eclampsia after change of partner. An effect of longer interpregnancy intervals? **Epidemiology**, v.12, n.6, p.624-629, 2001. <https://doi.org/10.1097/00001648-200111000-00008>
- BELL, M.J; ROBERTS, D.J. The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. **Theriogenology**, v.68, p. 1074-1079, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.010>
- BELLINGE, B.S.; COPELAND, C.M.; THOMAS, T.D.; MAZZUCCHELLI, R.E.; O'NEIL, G.; COHEN, M.J. The influence of patient insemination on the implantation rate in an in vitro fertilization and embryo transfer program. **Fertility and Sterility**, v. 46, n. 2, p.252-6, 1986. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)49521-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)49521-X)
- BENZAQUEN, M.E.; BENZAQUEN, M.E.; RISCO, C.A.; ARCHBALD, L.F.; MELENDEZ, P.; THATCHER, M.J.; THATCHER, W.W. Rectal temperature, calving-related factors, and the incidence of puerperal metritis in postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.2804-2814, 2007. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-482>
- BERG, D. K.; VAN LEEUWEN, J.; BEAUMONT, S.; BERG, M.; PFEFFER, P.L. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. **Theriogenology**, v. 73, n. 2, p. 250-60, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.005>
- BONDURANT, R.H. Inflammation in the bovine female reproductive tract. **Journal of Animal Science**, v.77, p.101-110, 1999. https://doi.org/10.2527/1999.77suppl_2101x
- BONNETT, B.N.; MARTIN, S.W.; MEEK, A.H. Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v.15, p.205–220, 1993. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(93\)90114-9](https://doi.org/10.1016/0167-5877(93)90114-9)
- BROMFIELD, J.J.; SCHJENKEN, J.E.; CHIN, P.Y.; CARE, A.S.; JASPER, M.J.; ROBERTSON, S.A. Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. **PNAS**, v.111, n. 6, p. 2200–2205, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305609111>
- CHAPWANYA, A.; MEADE, K.G.; NARCIANDI, F.; STANLEY, P.; MEE, J.F.; DOHERTY, M.L.; CALLANAN, J.J.; O'FARRELLY, C. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. **Theriogenology**, v.73, p. 988–994, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.015>

CHEN, J.R.; CHENG, J.G.; SHATZER, T.; SEWELL, L.; HERNANDEZ, L.; STEWART, C.L. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential for inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for sub-sequent embryogenesis. **Endocrinology**, v.141, p.4365–4372, 2000. <https://doi.org/10.1210/endo.141.12.7855>

CHEN, X.; WANG, J.; WANG, R.; SU, Q.; JUAN, J.; HUANG, H.; ZHOU, P.; LIU, J.; XU, X. Th1-, Th2-, and Th17-associated cytokine expression in hypopharyngeal carcinoma and clinical significance. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 273, p. 431-438, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00405-015-3779-2>

CHENG, X.; CHEN, Y.; XIE, J.J.; YAO, R.; YU, X.; LIAO, M.Y.; DING, Y.J.; TANG, T.T.; LIAO, Y.H.; CHENG, Y. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit atherosclerosis in Apo E(-/-) mice through modulation of Th1/Th2 balance. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.45, n.2, p.168-75, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.04.003>

CLARK, F.; SCHUST, D.J. Manifestations of immune tolerance in the human female reproductive tract. **Frontiers in Immunology**, v.4, p.26, 2013. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00026>

CORREIA-ÁLVAREZ, E.; GÓMEZ, E.; MARTÍN, D.; CARROCERA, S.; PÉREZ, S.; OTERO, J.; PEYNOT, N.; GIRAUD-DELVILLE, C.; CAAMAÑO, J.N.; SANDRA, O.; DURANTHON, V.; MUÑOZ, M. Expression and localization of interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor (type I) in the bovine endometrium and embryo, **Journal of Reproductive Immunology**, v.110, p.1-13, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.03.006>

CROY, B. A.; HEUVEL, M. J. V. D.; BORZYZCHOWSKI, A. M.; TAYADE, C. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones. **Immunological Reviews**, v.214, p.161–185, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00447.x>

DEKKER, G.A.; ROBILLARD, P.Y.; HULSEY, T.C. Immune maladaptation in the etiology of pre-eclampsia: a review of corroborative epidemiologic studies. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v.53, p.377-382, 1998. <https://doi.org/10.1097/00006254-199806000-00023>

D'ELIOS, M.M.; BENAGIANO, M.; BELLA, C.D.; AMEDEI, A. T-cell response to bacterial agentes. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.5, n.9, p.640-645, 2011. <https://doi.org/10.3855/jidc.2019>

DINARELLO, C. A. The IL-1 family and inflammatory diseases. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.20, p. S1–S13, 2002.

- 855 DINARELLO, C. A. Blocking IL-1 in systemic inflammation. **The Journal Experimental**
 856 **Medicine**, v.201, p.1355–1359, 2005. <https://doi.org/10.1084/jem.20050640>
 857
- 858 DRAGON, S.; SAFFAR, A.S.; SHAN, L.; GOUNNI, A.S. IL-17 attenuates the anti-
 859 apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils. **Molecular Immunology**, v.45, n.1,
 860 p.160-8, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.04.027>
 861
- 862 FAHEY, J.V.; SCHAEFER, T.M.; CHANNON, J.Y.; WIRA, C.R. Secretion of cytokines
 863 and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract.
 864 **Human Reproduction**, v.20, n.6, p.1439–1446, 2005.
 865 <https://doi.org/10.1093/humrep/deh806>
 866
- 867 FISCHER, C.; DRILLICH, M.; ODAU, S.; HEUWIESER, W.; EINSPANIER, R.;
 868 GABLER, C. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial
 869 epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of
 870 subclinical or clinical endometritis. **Reproduction, Fertility and Development.**, v. 22,
 871 p.818-829, 2010. <https://doi.org/10.1071/RD09120>
 872
- 873 FOULADI-NASHTA, A. A.; JONES, C. J.; NIJJAR, N.; MOHAMET, L.; SMITH, A.;
 874 CHAMBERS, I.; KIMBER, S. J. Characterization of the uterine phenotype during the
 875 peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. **Developments in Biologicals**,
 876 v.281, n. 1, p.1-21, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.01.033>
 877
- 878 GALLIGAN, C.L.; COOMBER, B.L. Effects of human IL-8 isoforms on bovine
 879 neutrophil function in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.74,
 880 p.71±85, 2000.
 881
- 882 GALVÃO, K.N.; SANTOS, N.R.; GALVÃO, J.S.; GILBERT, R.O. Association between
 883 endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows,
 884 **Theriogenology**, v.76, p.290-299, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.006>
 885
- 886 GHASEMI, F.; GONZALEZ-CANO, P.; GRIEBEL, P.J.; PALMER, C. Proinflammatory
 887 cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with
 888 and without subclinical endometritis. **Theriogenology**, v.78, p.1538–1547, 2012.
 889 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.022>
 890
- 891 GILBERT, R.O.; SHIN, S.T.; GUARD, C.L.; ERB, H.N.; FRAJBLAT, M. Prevalence of
 892 endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows.
 893 **Theriogenology**, v.64, p.1879–88, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.022>
 894
- 895 GOYAL, P.; BRUNNERT, D.; EHRHARDT, J.; BREDOW, M.; PICCENINI, S.;
 896 ZYGMUNT, M. Cytokine IL-6 secretion by trophoblasts regulated via sphingosine-1-
 897 phosphate receptor 2 Involving Rho/Rho-kinase and Rac1 signaling pathways,

- 898 **Molecular Human Reproduction**, v.19, n.8, p. 528–538, 2013.
 899 <https://doi.org/10.1093/molehr/gat023>
 900
- 901 GUTSCHE, S.; Von WOLFF, M.; STROWITZKI, T.; THALER, C.J. Seminal plasma
 902 induces mRNA expression of IL-1 β , IL-6 and LIF in endometrial epithelial cells in vitro,
 903 **Molecular Human Reproduction**, v. 9, n. 12, p. 785–791, 2003.
 904 <https://doi.org/10.1093/molehr/gag095>
 905
- 906 HANSEN, T.R.; HENKES, L.K.; ASHLEY, R.L.; BOTT, R.C.; ANTONIAZZI, A.Q.; HAN,
 907 H. Endocrine actions of interferon-tau in ruminants. **Society of Reproduction and**
 908 **Fertility Supplement** . v.67, p.325-340, 2010. <https://doi.org/10.5661/RDR-VII-325>
 909
- 910 HANSEN, P.J. The immunology of early pregnancy in farm animals. **Reproduction in**
 911 **Domestic Animals**, v. 46, p. 18-30, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01850.x>
 912
- 913 HERATH, S.; LILLY, S. T.; SANTOS, N. R.; GILBERT, R. O.; GOETZE, L.; BRYANT,
 914 C. E.; WHITE, J. O.; CRONIN, J.; SHELDON, I. M. Expression of genes associated
 915 with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease
 916 and fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.7, p.55, 2009.
 917 <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-55>
 918
- 919 HIRAHARA, K.; NAKAYAMA, T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases:
 920 beyond the Th1/Th2 paradigm. **International Immunology**, v. 28, n. 4, p. 163-171,
 921 2016. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw006>
 922
- 923 HIRANO, T. The biology of interleukin-6. **Chemical Immunology**, v.51, p.153-180,
 924 1992. <https://doi.org/10.1159/000420758>
 925
- 926 HOCH, R.C.; SCHRAUFSTATTER, I.U.; COCHRANE, C.G. *In vivo*, *invitro*, and
 927 molecular aspects of interleukin-8 and the interleukin-8 receptors. **Journal of**
 928 **Laboratory and Clinical Medicine**, v.128, p.134–145, 1996.
 929 [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(96\)90005-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(96)90005-0)
 930
- 931 HOELKER, M.; SALILEW-WONDIM, D.; DRILLICH, M.; CHRISTINE, G.B.; GHANEM,
 932 N.; GOETZE, L.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; HEUWIESER, W. Transcriptional
 933 response of the bovine endometrium and embryo to endometrial polymorphonuclear
 934 neutrophil infiltration as an indicator of subclinical inflammation of the uterine
 935 environment. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, p.778–793, 2012.
 936 <https://doi.org/10.1071/RD11171>
 937
- 938 HONG, L.; SHARP, T.; KHORSAND, B.; FISCHER, C.; ELIASON, S.; SALEM, A.K.;
 939 AKKOUCH, A.; BROGDEN, K.; AMENDT, B.A. Correction: *MicroRNA-200c* Represses
 940 IL-6, IL-8, and CCL-5 Expression and Enhances Osteogenic Differentiation, **PLoS**
 941 **One**, v.11, n.12, p.e0169381, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169381>
 942

IDETA, A.; HAYAMA, K.; NAKAMURA, Y.; SAKURAI, T.; TSUCHIYA, K.; TANAKA, S.; YAMAGUCHI, T.; FUJIWARA, H.; IMAKAWA, K.; AOYAGI, Y. Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear cells enhances early development of the pre-implantation bovine embryo. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 11, p. 954-962, 2010a. <https://doi.org/10.1002/mrd.21243>

IDETA, A.; SAKAI, S.; NAKAMURA, Y.; URAKAWA, M.; HAYAMA, K.; TSUCHIYA, K.; FUJIWARA, H.; AOYAGI, Y. Administration of peripheral blood mononuclear cells into the uterine horn to improve pregnancy rate following bovine embryo transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1-2, p. 18-23, 2010b. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.04.004>

ISHIKAWA, Y.; NAKADA, K.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; IWAI, H.; MORIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. **The Journal of Veterinary Medicine Science**, v.66, p.1403–1408, 2004. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.1403>

JANEWAY, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate Immune Recognition. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.197-216, 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>

KAMEYOSHI, Y.; DÖRSCHNER, A.; MALLET, A. I.; CHRISTOPHERS, E.; SCHRÖDER, J. M. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. **The Journal of Experimental Medicine**, v.176, n.2, p.587-592, 1992. <https://doi.org/10.1084/jem.176.2.587>

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W.H. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v.62, p.9–23, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.03.001>

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T. F.; FOSTER, R. A.; GARTLEY, C. J.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. **The Canadian Veterinary Journal**, v.46, p.255–259, 2005.

KAUMA, S. W. Cytokines in implantation. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v.55, p.31–42, 2000.

KHO, E. M.; MCCOWAN, L. M.; NORTH, R. A.; ROBERTS, C. T.; CHAN, E.; BLACK, M. A.; TAYLOR, R. S.; DEKKER, G. A.; SCOPE Consortium. Duration of sexual relationship and its effect on preeclampsia and small for gestational age perinatal outcome. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 82, p.66-73, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.04.011>

KIMURA, K.; MATSUYAMA, S. Successful nonsurgical transfer of bovine elongating conceptuses and its application to sexing. **Journal of Reproduction and Development**, v. 60, n. 3, p. 210-215, 2014. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-137>

KNICKERBOCKER, J. J.; THATCHER, W. W.; BAZER, F. W.; DROST, M.; BARRON. D. H.; FINCHER, K. B.; ROBERTS, R. M. Proteins secreted by day-16 to -18 bovine conceptuses extend corpus luteum function in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.77, p. 381–391, 1986. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0770381>

KOCH, C.A.; PLATT, J.L. Natural mechanisms for evading graft rejection: the fetus as an allograft. **Springer Semin Immunopathol**, v. 25, p. 95-117, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00281-003-0136-0>

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2237-2249, 2002. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74303-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74303-8)

LEBLANC, J.S. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. **The veterinary Journal**, v. 176, p. 102-114, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.019>

LEE, S.K.; KIM, J.Y.; LEE, M.; GILMAN-SACHS, A.; KWAK-KIM, J. Th17 and Regulatory T cells in Women with Recurrent Pregnancy Loss. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.67, p.311-318, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01116.x>

LEVY, J. A. The unexpected pleiotropic activities of RANTES. **The Journal of Immunology**, v.182, p.3945–3946, 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0990015>

LIAO, W.; LIN, J.X.; LEONARD, W.J. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy, **Immunity**, v.38, n.1, p.13-25, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.01.004>

LIM, K.J.; ODUKOYA, O.A.; AJJAN, R.A.; LI, T.C.; WEETMAN, A.P.; COOKE, I.D. The role of T-helper cytokines in human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.73, n.1, p. 136-142, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00457-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00457-4)

MAEDA, Y.; OHTSUKA, H.; TOMIOKA, M.; OIKAWA, M. Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and Regulatory Tcell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows. **Veterinary Research Communications**, v.37, p.43–49, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11259-012-9545-7>

- MALEK, T.R.; BAYER, A.L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. **Nature Reviews. Immunology**; v. 4, p.665-74, 2004. <https://doi.org/10.1038/nri1435>
- MANSOURI-ATTIA, N.; AUBERT, J.; REINAUD, P.; GIRAUD-DELVILLE, C.; TAGHOUTI, G.; GALIO, L.; EVERTS, R.E.; DEGRELLE, S.; RICHARD, C.; HUE, I.; YANG, X.; TIAN, X.C.; LEWIN, H.A.; RENARD, J.P.; SANDRA, O. Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation, **Physiological Genomics**, v.39, p.14–27, 2009. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90404.2008>
- MARTINS, T.M.; BORGES, A. M. Imunologia uterina e fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.129-135, 2015.
- MARTINS, T.M.; SANTOS, R.L.; PAIXÃO, T.A.; MOL, J.P.S.; MUNIZ, C.S.; BORGES, Â.M. Modelo experimental de endometrite em vacas inoculadas com *Escherichia coli* inativada por meio de infusão uterina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.1, p.247-251, 2016. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8133>
- MARZI, M.; VIGANO, A.; TRABATTONI, D.; VILLA, M.L.; SALVAGGIO, A.; CLERICI, E.; CLERICI, M. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. **Clinical & Experimental Immunology**, v.106, p.127–133, 1996. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.d01-809.x>
- MATHIALAGAN, N.; BIXBY, J. A.; ROBERTS, R. M. Expression of interleukin-6 in porcine, ovine, and bovine preimplantation conceptuses. **Molecular Reproduction and Development**, v.32, n.4, p.324-330, 1992. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080320404>
- MATHIEU, M.E.; SAUCOURT, C.; MOURNETAS, V.; GAUTHEREAU, X.; THÉZÉ, N.; PRALORAN, V.; THIÉBAUD, P.; BŒUF, H. LIF-dependent signaling: new pieces in the lego. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.8, n.1, p.1–15, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9261-7>
- MAZIERO, R.R.D.; MATTOS, M. C. C.; TEIXEIRA, L. B. C.; MARTIN, I.; FERREIRA, J. C. P. Biópsias endometriais seriadas em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o ciclo estral. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.4, p.371-376, 2013.
- MCGEACHY, M.J.; BAK-JENSEN, K.S.; CHEN, Y.; TATO, C.M.; BLUMENSCHIN, W.; MCCLANAHAN, T.; CUA, D.J. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T (H) -17 cell-mediated pathology. **Nature Immunology**, v.8, n.12, p.1390-7, 2007. <https://doi.org/10.1038/ni1539>
- MICHELON, T.; DA SILVEIRA, J. G.; GRAUDENZ, M.; NEUMANN, J. Imunologia da gestação. **Revista amrigs – associação médica do rio grande do sul**, v.50, n. 2, p.145-151, 2006.

- 1077 MINTEN, M. A.; BILBY, T.R.; BRUNO, R.G.S.; ALLEN, C.C.; MADSEN, C.A.; WANG,
1078 Z.; SAWYER, J.E.; TIBARY, A.; NEIBERGS, H.L.; GEARY, T.W.; BAUERSACHS, S.;
1079 SPENCER, T.E. Effects of fertility on gene expression and function of the bovine
1080 endometrium. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e69444, 2013.
1081 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069444>
1082
- 1083 MUÑOZ, M.; CORRALES, F.J; CAAMAÑO, J.N.; DÍEZ, C.; TRIGAL, B.; MORA, M.I.;
1084 MARTÍN, D.; CARROCERA, S.; GÓMEZ, E. Proteome of the Early Embryo–Maternal
1085 Dialogue in the Cattle Uterus. **Journal of Proteome Research**, v.11, p.751–766,
1086 2012.
1087
- 1088 MUNOZ-SUANO, A.; HAMILTON, A.B.; BETZ, A.G. Gimme shelter: the imune system
1089 during pregnancy. **Immunological Reviews**, v. 241, p.20–38, 2011.
1090 <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x>
1091
- 1092 MURPHY, S.P.; TAYADE, C.; ASHKAR, A.A.; HATTA, K.; ZHANG, J.; CROY, B.A.
1093 Interferon gamma in successful pregnancies. **Biology of Reproduction**, v.80, p.848–
1094 859, 2009. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073353>
1095
- 1096 NAIR, R. R.; KHANNA, A.; SINGH, K. Association of interleukin 1 beta (IL-1B) gene
1097 polymorphism with early pregnancy loss risk in the North Indian population.
1098 **International Journal of Immunogenetics**, v.41, n.1, p.41–43, 2014.
1099 <https://doi.org/10.1111/iji.12044>
1100
- 1101 NAKASHIMA, A.; ITO, M.; SHIMA, T.; BAC, N.D.; HIDAKA, T.; SAITO, S.
1102 Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. **American**
1103 **Journal of Reproductive Immunology**, v.64, p.4–11, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00812.x>
1104
1105
- 1106 NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em
1107 reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39,
1108 p.414–421, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300046>
1109
- 1110 NOGUCHI, M.; NAKAMURA, Y.; RUSSELL, S.M.; ZIEGLER, S.F.; TSANG, M.; CAO,
1111 X.; LEONARD, W.J. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of
1112 the interleukin-7 receptor. **Science**, v.262, n.5141, p.1877–80, 1993.
1113 <https://doi.org/10.1126/science.8266077>
1114
- 1115 NOTHNICK, W.B.; PATE, J.L. Interleukin-1 β is a Potent Stimulator of Prostaglandin
1116 Synthesis in Bovine Luteal Cells. **Biology of Reproduction**, v.43, n.5, p.898–903,
1117 1990. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.5.898>
1118
- 1119 O'GORMAN, G.M.; AL NAIB, A.; ELLIS, S.A.; MAMO, S.; O'DOHERTY, A.M.;
1120 LONERGAN, P.; FAIR, T. Regulation of a Bovine Nonclassical Major Histocompatibility

- 1121 Complex Class I Gene Promoter. **Biology of Reproduction**, v.83, n.2, p.296-306,
1122 2010. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082560>
1123
- 1124 OKITSU, O.; KIYOKAWA, M.; ODA, T.; MIYAKEA, K.; SATO, Y.; FUJIWARA, H.
1125 Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells increases
1126 clinical pregnancy rates in frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with
1127 repeated implantation failure. **Journal of Reproductive Immunology**, v.92, p.82–87,
1128 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.07.001>
1129
- 1130 O'LEARY, S.; JASPER, M.J.; WARNES, G.M.; ARMSTRONG, D.T.; ROBERTSON,
1131 S.A. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment
1132 and embryo development in the pig. **Reproduction**, v. 128, n. 2, p. 237-47, 2004.
1133 <https://doi.org/10.1530/rep.1.00160>
1134
- 1135 OLIVEIRA, M.A.; TARAZONA, A.M.; RUÍZ, T.C.; GIRALDO, C.E. Vías implicadas en
1136 la luteólisis bovina. **Revista Colombiana Ciencias Pecuária**, v.20, p.387-393, 2007.
1137
- 1138 OLIVEIRA, L. J.; MANSOURRI-ATTIA, N.; FAHEY, A.G.; BROWNE, J.; FORDE, N.;
1139 ROCHE, J.F.; LONERGAN, P.; FAIR, T. Characterization of the Th profile of the bovine
1140 endometrium during the oestrus cycle and early pregnancy. **Immune Rspnse to**
1141 **Early Pregnancy in Cattle**, v. 8, n. 10, p. 1-13, 2013.
1142
- 1143 OSHIMA, K.; WATANABE, H.; YOSHIHARA, K.; KOJIMA, T.; DOCHI, O.;
1144 TAKENOUCHI, N.; FUKUSHIMA, M.; KOMATSU, M. Gene expression of leukemia
1145 inhibitory factor (LIF) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) in bovine
1146 endometrium during early pregnancy. **Theriogenology**, v.60, p. 1217–1226, 2003.
1147 [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01365-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01365-1)
1148
- 1149 PAPPU, B.P.; ANGKASEKWINAI, P.; DONG, C. Regulatory mechanisms of helper T
1150 cell differentiation: New lessons learned from interleukin 17 family cytokines,
1151 **Pharmacology & Therapeutics.**, v.117, n.3, p. 374–384, 2008.
1152 <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.12.003>
1153
- 1154 PATE, J.L. Intercellular communication in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**.
1155 v.45 p.1381–1397,1996. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00102-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00102-1)
1156
- 1157 PECK, A.; MELLINS E.D. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type
1158 17 example. **Immunology**, v.129, p.147–153, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03189.x>
1159
1160
- 1161 PONGCHAROEN, S.; SOMRAN, J.; SRITIPPAYAWAN, S.; NIUMSUP, P.;
1162 CHANCHAN, P.; BUTKHAMCHOT, P.; TATIWAT, P.; KUNNGURN, S.; SEARLE, R.F.
1163 Interleukin-17 expression in the human placenta. **Placenta**, v.28, n.1, p.59-63, 2007.
1164 <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.01.016>
1165

- REBOURCET, D.; ODET, F.; VÉROT, A.; COMBE, E.; MEUGNIER, E.; PESENTI, S.; LEDUQUE, P.; DÉCHAUD, H.; MAGRE, S.; LE MAGUERESSE-BATTISTONI, B. The effects of an in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on male reproductive function: identification of Ccl5 as a potential marker. **International Journal of Andrology**, v.33, p.413–424, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01020.x>
- ROBERTSON, S. A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. **Cell and Tissue Research**, v.322, p.43–52, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-1127-3>
- ROBERTSON, S.A.; GUERIN, L.R.; MOLDENHAUER, L.M.; HAYBALL, J.D. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy – the contribution of seminal fluid. **Journal of Reproductive Immunology**, v.83, n.1–2, p.109-16, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.08.003>
- SAITO, S.; TSUKAGUCHI, N.; HASEGAWA, T.; MICHIMATA, T.; TSUDA, H.; NARITA, N. Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 42, n. 4, p. 240–245, 1999. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1999.tb00097.x>
- SAITO, S.; NAKASHIMA, A.; SHIMA, T.; ITO, M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, p. 601-610, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00852.x>
- SALAMONSEN, L.A.; DIMITRIADIS, E.; ROBB, L. Cytokines in implantation, **Seminars in Reproductive Medicine**, v.18, n.3, p.299-310, 2000. <https://doi.org/10.1055/s-2000-12567>
- SALASEL, B.; MOKHTARI, A.; TAKTAZ, T. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. **Theriogenology**, v.74, p.1271-1278, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.05.033>
- SALILEW-WONDIM, D.; IBRAHIM, S.; GEBREMEDHN, S.; TESFAYE, D.; HEPPELMANN, M.; BOLLWEIN, H.; PFARRER, C.; THOLEN, E.; NEUHOFF, C.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Clinical and subclinical endometritis induced alterations in bovine endometrial transcriptome and miRNome profile. **BMC Genomics**, v.17, p.218, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2513-9>
- SALLEH, N.; GIRIBABU, N. Leukemia Inhibitory Factor: Roles in Embryo Implantation and in Nonhormonal Contraception. **The Scientific World Journal**, vol. 2014, p. 10, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/201514>

- 1210 SARAFANA, S.; COELHO, R.; NEVES, A.; TRINDADE, J.C. Aspectos da imunologia
1211 da gravidez. **Acta Medica Portuguesa**, v.20, p.355-358, 2007.
1212
- 1213 SAUT, J.P.E.; HEALEY, G.D.; BORGES, A.M.; SHELDON, I.M. Ovarian steroids do
1214 not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or
1215 LPS *in vitro* **Reproduction**, v.148, p.593–606, 2014. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0230>
1216
- 1217 SCHALL, T.J.; BACON, K.; TOY, K.J.; GOEDDEL, D.V. Selective Attraction of
1218 Monocytes and T Lymphocytes of the Memory Phenotype by Cytokine RANTES.
1219 **Nature**, v.347, p. 669 – 671, 1990. <https://doi.org/10.1038/347669a0>
1220
- 1221 SCHELLER J, CHALARIS A, SCHMIDT-ARRAS D, ROSE-JOHN S. The pro- and anti-
1222 inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta**,
1223 v.1813, n.5, p.878-88, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>
1224
- 1225 SCHJENKEN, J.E.; ROBERTSON, S.A. Seminal Fluid and Immune Adaptation for
1226 Pregnancy – Comparative Biology in Mammalian Species. **Reproduction in**
1227 **Domestic Animals**, v.49, p.27–36, 2014. <https://doi.org/10.1111/rda.12383>
1228
- 1229 SCHUBERTH, H.J.; TAYLOR, U.; ZERBE, H.; WABERSKI, D.; HUNTER, R.; RATH,
1230 D. Immunological responses to sēmen in the female genital tract. **Theriogenology**, v.
1231 70, p. 1174-1181, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.020>
1232
- 1233 SHELDON, I.M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal**
1234 **Reproduction Science**, V. 82-83, p. 295-360, 2004.
1235 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.006>
1236
- 1237 SHELDON, I.M.; LEWIS, G.S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R.O. Defining postpartum
1238 uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v.65, p.1516-1530, 2006.
1239 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.021>
1240
- 1241 SHELDON, I.M.; WILLIAMS, E.J.; MILLER, A.N.A.; NASH, D.M.; HERATH, S. Uterine
1242 diseases in cattle after parturition. **The Veterinary Journal**, v.176, p.115-121, 2008.
1243 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.031>
1244
- 1245 SHELDON, I.M.; PRICE, S.B.; CRONIN, J.; GILBERT, R.O.; GADSBY, J.E.
1246 Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high
1247 producing dairy cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, n.1, p.1-9, 2009.
1248 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01465.x>
1249
- 1250 SHELDON, I.M.; CRONIN, J.G.; HEALEY, G.D.; GABLER, C.; HEUWIESER, W.;
1251 STREYL, D.; BROMFIELD, J.J.; MIYAMOTO, A.; FERGANI, C.; DOBSON H. Innate
1252 immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and
1253 disease. **Reproduction**, v. 148, p. R41–R51, 2014. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0163>
1254

- 1255 SHELDON, M.I.; OWENS, S.E.; TURNER, M.L. Innate immunity and the sensing of
1256 infection, damage and danger in the female genital tract. **Journal of Reproductive**
1257 **Immunology**, v.119, p. 67–73, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.07.002>
1258
- 1259 SHEN. F.; GAFFEN, S.L. Structure-function relationships in the IL-17 receptor:
1260 implications for signal transduction and therapy. **Cytokine**, v.41, n.2, p.92-104, 2008.
1261 <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.11.013>
1262
- 1263 SHERWIN, J.R.; SMITH, S.K.; WILSON, A.; SHARKEY, A.M. Soluble gp130 is Up-
1264 Regulated in the Implantation Window and Shows Altered Secretion in Patients with
1265 Primary Unexplained Infertility. **The Journal of Clinical Endocrinology &**
1266 **Metabolism**, v. 87, n.8, p.3953–3960, 2002. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.8.8766>
1267
- 1268 SHERWIN, J.R.; FREEMAN, T.C.; STEPHENS, R.J.; KIMBER, S.; SMITH, A.G.;
1269 CHAMBERS, I.; SMITH, S.K.; SHARKEY, A.M. Identification of genes regulated by
1270 leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation. **Molecular**
1271 **Endocrinology**, v.18, n. 9, p. 2185-2195, 2004. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0110>
1272
- 1273 SHETH, K.V.; ROCA, G.L.; AL-SEDAIRY, S.T.; PARHAR, R.S.; HAMILTON, C.J.; AL-
1274 ABDUL JABBAR, F. Prediction of successful embryo implantation by measuring
1275 interleukin-1-alpha and immunosuppressive factor(s) in preimplantation embryo
1276 culture fluid. **Fertility and Sterility**, v.55, p.952–957, 1991. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)54305-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)54305-2)
1277
1278
- 1279 SICA, A.; MATSUSHIMA, K.; VAN DAMME, J.; WANG, J.M.; POLENTARUTTI, N.;
1280 DEJANA, E.; COLOTTA, F.; MANTOVANI, A. IL-1 transcriptionally activates the
1281 neutrophil chemotactic factor/IL-8 gene in endothelial cells. **Immunology**, v.69, p.548
1282 –53, 1990.
1283
- 1284 SORDILLO, L.M.; AITKEN, S.L. Impact of oxidative stress on the health and immune
1285 function of dairy cattle. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.128, n.1-3.
1286 P.104–109, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.305>
1287
- 1288 SOUZA, S.S.; VOLTARELLI, J.C.; FERRIANI, R.A. I. Imunologia da reprodução
1289 humana. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.30, p.277-288, 1997.
1290
- 1291 TABIBZADEH, S.; KONG, Q.F.; BABAKNIA, A.; MAY, L.T. Progressive rise in the
1292 expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated
1293 during the implantation window. **Human Reproduction**, v.10, n.10, p.2793-9, 1995.
1294 <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a135793>
1295
- 1296 TACHIBANA, Y.; NAKANO, Y.; NAGAOKA, K.; KIKUCHI, M.; NAMBO, Y.; HANEDA,
1297 S.; MATSUI, M.; MIYAKE, Y.; IMAKAWA, K. Expression of endometrial immune-
1298 related genes possibly functioning during early pregnancy in the mare. **Journal of**
1299 **Reproduction and Development**, v. 59, n. 1, p. 85-91, 2013.

1300

1301 TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation, **Cell**,
 1302 v.140, p.805–820, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>

1303

1304 TANIKAWA, M.; KIM, T.S.; OKUDA, K.; RYOO, Z. T.; PARK, S.B.; SHIN, J.H.; PARK,
 1305 C.K.; LEE, D.S. Cell-type specificity of interleukins 1 and 10 on prostaglandin and
 1306 plasminogen activator production in bovine endometrial cells, **Animal Reproduction**
 1307 **Science**, v.114, p.32–42, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.09.003>

1308

1309 TATO, C.M.; MARTINS, G.A.; HIGH, F.A.; DICIOCCIO, C.B.; REINER, S.L.; HUNTER,
 1310 C.A. Cutting Edge: Innate production of IFN-gamma by NK cells is independent of
 1311 epigenetic modification of the IFN-gamma promoter. **The Journal of Immunology**,
 1312 v.173, n.3, p.1514–1517, 2004. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1514>

1313

1314 TAWFEEK, M.A.; EID, M.A.; HASAN, A.M.; MOSTAFA, M.; EL-SEROGY, H.A.
 1315 Assessment of leukemia inhibitory factor and glycoprotein 130 expression in
 1316 endometrium and uterine flushing: a possible diagnostic tool for impaired fertility. **BMC**
 1317 **Women's Health**, v. 12, n.10, p.1, 2012. <https://doi.org/10.1186/1472-6874-12-10>

1318

1319 TORTORELLA, C.; PIAZZOLLA, G.; MATTEO, M.; PINTO, V.; TINELLI, R.; SABBÀ,
 1320 C.; FANELLI, M.; CICINELLI, E. Interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor
 1321 α in menstrual effluents as biomarkers of chronic endometritis. **Fertility and Sterility**,
 1322 v. 101, n. 1, p. 242–247, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.041>

1323

1324 TREMELLEN, K.P.; VALBUENA, D.; LANDERAS J.; BALLESTEROS, A.; MARTINEZ,
 1325 J.; MENDOZA, S.; NORMAN, R.J.; ROBERTSON, S.A.; SIMÓN, C. The effect of
 1326 intercourse on pregnancy rates during assisted human reproduction. **Human**
 1327 **Reproduction**, v.15, n.12, p.2653–2658, 2000.

1328

1329 TURNER, M.L.; HEALEY, G.D.; SHELDON, I.M. Immunity and Inflammation in the
 1330 Uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p. 402–409, 2012.
 1331 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02104.x>

1332

1333 VOGIAGIS, D.; SALAMONSEN, L.A.; SANDEMAN, R.M.; SQUIRES, T.J.; BUTT, A.R.;
 1334 FRY, R.C. Effect of Immunisation Against Leukaemia Inhibitory Factor on the
 1335 Establishment of Pregnancy in Sheep. **Reproduction Nutrition Development**, v.37,
 1336 n.4, p.459–468, 1997. <https://doi.org/10.1051/rnd:19970407>

1337

1338 VON WOLFF, M.; THALER, C.J.; STROWITZKI, T.; BROOME, J.; STOLZ, W.;
 1339 TABIBZADEH, S. Regulated expression of cytokines in human endometrium
 1340 throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. **Molecular Human**
 1341 **Reproduction**, v.6, n.7, p. 627–634, 2000. <https://doi.org/10.1093/molehr/6.7.627>

1342

- 1343 WALKER, C.G.; MEIER, S.; HUSSEIN, H.; MCDUGALL, S.; BURKE, C.R.; ROCHE,
1344 J.R.; MITCHELL, M.D. Modulation of the immune system during post-partum uterine
1345 inflammation. **Physiological Genomics**, v.47, p.89-101, 2015.
1346 <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00098.2014>
- 1347
1348 WANG, J.M.; SICA, A.; PERI, G.; WALTER, S.; PADURA, I.M.; LIBBY, P.; CESKA,
1349 M.; LINDLEY, I.; COLOTTA, F.; MANTOVANI, A. Expression of monocyte chemotactic
1350 protein and interleukin-8 by cytokine-activated human vascular smooth muscle cells.
1351 **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.11, p.1166 –74, 1991.
1352 <https://doi.org/10.1161/01.ATV.11.5.1166>
1353
- 1354 WANO, Y.; UCHIYAMA, T.; MAEDA, M.; UCHINO, H.; YODOI, J. Characterization of
1355 human interleukin 2 receptor (Tac antigen) in normal and leukemic T cells: co-
1356 expression of normal and aberrant receptors on Hut-102 cells. **The Journal of**
1357 **Immunology**, v.132, n.6, p.3005-3010, 1984.
1358
- 1359 WEGMANN, T.G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T.R. Bidirectional cytokine
1360 interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2
1361 phenomenon? **Immunology Today**, v.14, p.353-6, 1993. [https://doi.org/10.1016/0167-](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90235-D)
1362 [5699\(93\)90235-D](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90235-D)
1363
- 1364 WERLING, D.; JUNGI, T.W. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune
1365 response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.91, n.1, p.1-12, 2003.
1366 [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00228-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00228-3)
- 1367
1368 WILLIAMS, E.J.; FISCHER, D.P.; NOAKES, D.E.; ENGLAND, G.C.; RYCROFT, A.;
1369 DOBSON, H.; SHELDON, I.M. The relationship between uterine pathogen growth
1370 density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, v.68,
1371 p.549-559, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.056>
- 1372
1373 XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X. F.; ACHONG,
1374 M. K. IL-6 is na antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic
1375 acute inflammatory responses. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, p.311–320,
1376 1998. <https://doi.org/10.1172/JCI1368>
- 1377
1378 YANG L.; WANG Y.; MA X.; WANG S.; ZHANG L. Changes in expression of Th1 and
1379 Th2 cytokines in bovine peripheral blood mononuclear cells during early pregnancy.
1380 **Indian Journal of Animal Research**, v.50, n.4, p.466-470, 2016.
- 1381
1382 YOSHIOKA, S.; FUJIWARA, H.; NAKAYAMA, T.; KOSAKA, K.; MORI, T.; FUJII, S.
1383 Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes
1384 implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. **Human**
1385 **Reproduction**, v. 21, n. 12, p. 3290-4, 2006. <https://doi.org/10.1093/humrep/del312>

YU, N.; YANG, J.; GUO, Y.; FANG, J.; YIN, T.; LUO, J.; LI, X.; LI, W.; ZHAO, Q.; ZOU, Y.; XU, W. Intrauterine Administration of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Improves Endometrial Receptivity in Mice with Embryonic Implantation Dysfunction. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.71, p. 24–33, 2014.

<https://doi.org/10.1111/aji.12150>

ZAAYER, D.; van der HORST, C. J. Non-fertility in cows: treatment with PGF and investigation of uterine biopsies. **Cytobios**, v.45, p.55-70, 1986.

ZHANG, L.; XIA, Y.; TANG, F.; LI, S.J.; YANG, L.; WANG, B. The regulation of intrauterine immune cytokines and chemokines during early pregnancy in the bovine, **Large Animal Review**, v.21, p.23-31, 2015.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: Fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557–1569, 2008. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>

CAPÍTULO 2:

Expressão de genes pró-inflamatórios segundo a técnica de coleta de amostra endometrial de vacas com e sem endometrite subclínica

(Artigo escrito segundo as normas da revista Theriogenology, anexo 2: normas da revista)

Expressão de genes pró-inflamatórias segundo a técnica de coleta de amostra endometrial de vacas com e sem endometrite subclínica

Proinflammatory gene expression according to the collection technique of endometrial samples from cows with and without subclinical endometritis

Nadia Simarro Fagundes ^a, Maria Teresa Nunes Pacheco Rezende ^a,
Amanda Lima Rezende ^a, Paula Batista de Alvarenga ^a, Marcelo José Barbosa
Silva^b, Marcelo Emílio Beletti ^a, João Paulo Elsen Saut ^{a*}

^a Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus Umuarana, Av. Pará, Bloco 2T, 1720, Bairro Umarama, Uberlândia, Minas Gerais 38400-902, Brasil.

^b Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas, Campus Umuarana, Av. Pará, Bloco 4C, Laboratório de Imunologia, Bairro Umarama, Uberlândia, Minas Gerais, 38400-902, Brasil.

*Correspondências enviar para João Paulo Elsen Saut; jpsaut@famev.ufu.br

Resumo

A inflamação uterina provoca efeito negativo sobre o desempenho reprodutivo, sendo considerada importante causa de infertilidade e subfertilidade em rebanhos bovinos leiteiros. Pesquisas recentes têm utilizado a expressão gênica em seus delineamentos experimentais, buscando avaliar a resposta inflamatória uterina em animais vivos por meio das técnicas de coleta de amostra endometrial por biopsia uterina ou *cytobrush*. Pouco se conhece sobre o perfil da expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias *in vivo* entre o endométrio caruncular e intercaruncular, entre os métodos de coleta de tecido endometrial, biopsia e *cytobrush*, e na porcentagem de PMNs nos quadros de endometrite subclínica. No presente estudo, foram utilizados 64 úteros de abatedouro, com características de involução uterina completa e sem sinais de doença clínica. Vinte úteros foram inseridos no experimento após avaliação da porcentagem de células polimorfonucleares (PMNs) na citologia endometrial, sendo dez sem a

presença de PMNs (inflamação endometrial ausente), sete com PMNs variando entre 11 e 19% (inflamação endometrial leve) e três com PMNs entre 75 e 81% (inflamação endometrial grave). Os resultados observados no perfil de expressões dos transcritos dos genes *IL1 β* , *IL6*, *IL8* e *CCL5* demonstraram não haver influência do local de biopsia endometrial em nenhum dos graus de inflamação. Entretanto, a expressão foi maior nos endométrios com inflamação grave quando comparado aos endométrios sem e com inflamação leve. Não houve diferença na expressão dos genes avaliados entre endométrios sem e com inflamação leve. Em endométrios saudáveis e com inflamação leve, não foram observadas diferenças na expressão de RNA de nenhum dos genes estudados em relação aos métodos de coleta por *cytobrush* e biopsia uterina, tanto da região caruncular como da intercaruncular. Quando a inflamação uterina foi classificada como grave todos os genes foram mais expressos nas amostras colhidas pelo *cytobrush* em comparação às amostras de biopsias uterinas de ambas as regiões. Em conclusão, não houve diferença na expressão gênica entre as regiões carunculares e intercarunculares, sendo a resposta dependente do grau de inflamação. Inflamações leves determinadas na citologia endometrial não são identificadas na expressão dos genes estudados, tanto na biopsia como no *cytobrush*. Houve influência da técnica de coleta de endométrio na expressão dos genes estudados somente nos quadros de inflamação grave, sendo o *cytobrush* o mais indicado.

Palavras-chave: cytobrush, biopsia endometrial, caruncular, intercaruncular

1. Introdução

A inflamação uterina provoca efeito negativo sobre o desempenho reprodutivo, sendo considerada importante causa de infertilidade e subfertilidade em rebanhos bovinos leiteiros [1]. Ela pode reduzir a taxa de prenhez e aumentar o intervalo parto-concepção, número de inseminações por gestação [2-3,1], incidência de vacas repetidoras de cio [4] e os casos de mastite subclínica [2]. Ainda, caso a inflamação ocorra durante a fase de desenvolvimento embrionário pode provocar a interrupção da gestação [5].

Na ocorrência de organismos patogênicos no ambiente uterino, os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa, resultando em aumento significativo na população de polimorfonucleares (PMNs) [6]. A presença de infiltrados PMNs no endométrio bovino, nos casos de endometrite, induz alterações no perfil de expressão de transcritos de RNAm associados com o sistema imune, além de promover alterações na expressão gênica no embrião [7,8].

O endométrio regula a resposta inflamatória através da produção e liberação de citocinas e quimiocinas [9] que têm função de atrair e ativar células imunológicas hematopoiéticas a fim de combater a contaminação no local [10]. Diversas citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas no processo inflamatório em bovino, entre elas estão a interleucina 1 β (IL1 β) [11], interleucina 6 (IL6) [12] e as quimiocinas CCL5 (RANTES - Regulated on Activated Normal T-Cell Expressed and Secreted) [13] e interleucina 8 (IL8 ou CXCL8) [9,11,14]. Sabe-se que em vacas com endometrite subclínica o perfil de expressão gênica indica resposta imune ativa com ambiente uterino pró-inflamatório [5].

A endometrite subclínica pode ser identificada através da citologia endometrial que utiliza o percentual de PMNs em relação às células epiteliais endometriais. As referências mais utilizadas para definir a endometrite subclínica são contagens superiores a 18% de PMNs, aos 21-33 dias em lactação (DEL), e maior que 10% aos 34-47 DEL [15,16], ou ainda, maior que 5% destas células aos 40-60 DEL [17]. De acordo Williams et al. [18], a contagem de neutrófilos na citologia endometrial também pode ser utilizada para classificar os níveis de inflamações endometriais em ausente (<5% de neutrófilos), leve (5-25% de neutrófilos), moderada (25-75% de neutrófilos) e grave (>75% de neutrófilos).

A biopsia endometrial é outro método utilizado para diagnóstico de inflamações uterinas, capaz de gerar extensos dados quantitativos da atividade uterina [19], além de avaliar a saúde do útero [6]. Esta técnica é realizada por meio de pinças específicas, tornando possível a retirada de pequena amostra de tecido endometrial [20] suficiente para a análise celular e molecular, como as técnicas de extração de RNA [19]. Do mesmo modo, a técnica do *cytobrush* tem demonstrado ser eficiente para a obtenção de material, tanto para o exame citológico quanto para a extração de RNA, além de ser considerado um método rápido, fácil e pouco invasivo [14].

Pesquisas recentes têm utilizado a expressão gênica em seus delineamentos experimentais, buscando avaliar a resposta inflamatória uterina em animais vivos por meio das técnicas de coleta de amostra endometrial por biopsia uterina [6,19,21] ou pela técnica de escova endometrial, conhecida como *cytobrush* [3,4,11,14,22,23].

Sabe-se que a porcentagem de PMNs em amostras endometriais, coletadas por *cytobrush*, influencia na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias [11,14] e que em cultivo endometrial *ex vivo* quando desafiado com LPS ou *Escherichia coli* há diferença na produção de citocinas pró-inflamatórias entre as regiões carunculares e intercarunculares [24]. Entretanto, têm-se poucos dados se há variação na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias *in vivo* entre o endométrio caruncular e intercaruncular, entre os métodos de coleta de tecido endometrial (biopsia ou *cytobrush*) e na porcentagem de PMNs nos quadros de endometrite subclínica.

Deste modo, o objetivo do estudo foi comparar a resposta da expressão dos genes *CCL5*, *IL8*, *IL6* e *IL1 β* no epitélio endometrial bovino de acordo com o local de coleta de amostras endometriais (caruncular ou intercaruncular), o método de coleta (biopsia ou *cytobrush*) e o grau de inflamação (ausente, leve ou grave).

2. Material e métodos

2.1. Coleta das amostras do epitélio endometrial

Um total de 64 úteros de vacas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) não gestantes foi coletado de abatedouro comercial no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Imediatamente após o abate, em local apropriado no abatedouro, os úteros foram selecionados e as amostras coletadas. Os critérios de inclusão foram úteros com características macroscópicas de involução uterina completa, sem secreção uterina sem evidência de doenças (metrite, cervicite ou endometrite clínica), de acordo com Sheldon et al. [25].

Após a seleção dos úteros, a superfície externa foi lavada com álcool 70% e, com o auxílio de tesoura estéril, realizou-se incisão longitudinal aleatória de um dos cornos uterinos e exposição do endométrio. Com auxílio de *punch* estéril (Kruuse®, Langeskov, Denmark) de 8 mm próprio para biopsia, tesoura oftálmica e escova

endometrial (Labor Import[®], Osasco, Brasil) foram coletadas amostras endometriais para extração de RNA e exame citológico de acordo com o delineamento proposto.

2.2. Classificação do status de inflamação uterina

Para a determinação do grau de inflamação endometrial foram coletadas amostras endometriais, por meio da técnica de escova endometrial (*cytobrush*), conforme descrito por Kaufmann et al. [26].

As lâminas de citologia endometrial, preparadas a partir das amostras coletadas pelo *cytobrush* dos 64 úteros, foram coradas utilizando o kit Panótico rápido (Laborclin[®], Pinhais, Brasil), conforme especificações do fabricante. A avaliação foi realizada por dois observadores, sendo a leitura feita no aumento de 40X. Para a classificação do *status* de inflamação uterina, foram contadas 200 células e registrados o percentual de PMNs e células epiteliais.

De acordo com os resultados do exame citológico das 64 amostras recolhidas, dez foram selecionadas de úteros que apresentavam 100% de células epiteliais, ou seja, endométrios sem inflamação, e outros dez com inflamação, acima de 10% de PMNs. Com base em Williams et al. [18], as amostras foram novamente classificadas em normal ou inflamação ausente (menos que 5% de neutrófilos), leve (entre 5 a 25% de neutrófilos) e grave (acima de 75% de neutrófilos).

Deste modo, do total de 64 úteros que apresentaram os critérios de inclusão e avaliado a porcentagem de PMNs na citologia endometrial, 20 foram inseridos no experimento, sendo dez úteros sem a presença de PMNs (inflamação endometrial ausente), sete com PMNs variando entre 11 e 19% (inflamação endometrial leve) e três com PMNs entre 75 e 81% (inflamação endometrial grave).

2.3. Delineamento experimental

Para o estudo foram propostos dois experimentos:

- *Experimento 1*, com objetivo de verificar se há diferença entre as regiões carunculares e intercarunculares do epitélio endometrial bovino na resposta da expressão dos genes *CCL5*, *IL8*, *IL6* e *IL1β* em diferentes graus de inflamação subclínica. Para tanto, foram coletados fragmentos do epitélio endometrial das regiões

carunculares e intercarunculares do útero, com auxílio de *punch* estéril (Kruuse®) de 8 mm. As amostras foram armazenadas em microtubos e acondicionadas em nitrogênio líquido a -196°C para posterior análise da expressão do RNAm dos genes selecionados.

- *Experimento 2*, objetivou-se comparar a resposta da expressão dos genes *CCL5*, *IL8*, *IL6* e *IL1β* entre as técnicas de coleta de amostras do epitélio endometrial, biópsia e escova endometrial (*cytobrush*), de endométrios com diferentes graus de inflamação subclínica. Para tanto, realizou-se no endométrio exposto a coleta de amostras pela técnica de escova endometrial (*cytobrush*). As escovas foram cortadas de modo a caber no interior de microtubos (2ml) e acondicionadas em nitrogênio líquido a -196°C para análise da expressão do RNAm dos genes selecionados.

2.4. Extração do RNA e transcrição reversa

As extrações de RNAs das amostras de tecido uterino, foram realizadas no aparelho Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA), utilizando o kit de extração de RNA de tecido Maxwell® 16 LEV simply RNA Tissue Kit (Referência: AS1340, Promega, Madison, WI, USA). O procedimento foi realizado conforme as instruções do fabricante.

Os fragmentos de biópsia foram pesados (máximo de 50 mg) e macerados em 200 µl de solução de homogeneização com auxílio do Pellet Pestles® (Sigma Aldrich). Aos microtubos contendo as escovas do *cytobrush* foram adicionados 200 µl de solução de homogeneização e centrifugados de modo a recuperar a secreção uterina. Em seguida, tanto nas amostras de tecido quanto nas de secreção uterina, foram adicionados 200µl de tampão de lise, agitadas em vortex, centrifugadas e os sobrenadantes coletados e colocados nas *cartridges* (suporte disponível no kit). Posteriormente, as *cartridges* com todos os reagentes preparados foram colocadas dentro do aparelho Maxwell® 16 Instrument para extração mecânica dos RNAs. Ao final, o RNA total foi quantificado no Quantus™ Fluorometer utilizando o kit QuantiFluor® RNA System (Referência: E3310, Promega, Madison, WI, USA) conforme o fabricante. Todos os RNAs foram armazenados em ultra freezer a -80°C até a transcrição reversa.

A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Referência: A5001, Promega, Madison, WI, USA). Todas as etapas foram seguidas de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, para cada amostra, 7µl de Primer Mix (1µl de Oligo DT, 1µl de Random Primer e 5µl de RNA total foi incubado a 70°C por 5 minutos) e 13µl de RT Mix (5µl de água livre de RNase, 4µl de 5X Reaction Buffer, 1µl de dNTP Mix, 1,5µl de MgCl₂ (1,5mM), 0,5µl de RNasin e 1µl de Enzima RT) foram misturados e incubados em termociclador por 1 hora a 42°C e então por 15 minutos a 70°C para a desnaturação da enzima transcriptase reversa. Ao final, o cDNA de cada amostra foi quantificado no Quantus™ Fluorometer utilizando o kit Quantifluor™ ssDNA System (Referência: E3190, Promega, Madison, WI, USA) conforme indicações do fabricante e armazenado em freezer a -20°C até a utilização em PCR em tempo real.

2.5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR

A quantificação da expressão dos genes *IL1β*, *IL6*, *IL8* e *CCL5* foram realizados no aparelho **Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System** (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), através do método comparativo de *threshold cycles* (Ct). Em todo o experimento foram utilizadas placas de 96 poços Axygen® PCR-96 AB-C (Axygen Scientific, Union City, CA, USA) e as amplificações foram conduzidas em duplicata com 1 controle negativo para cada gene. As condições da reação foram determinadas em ciclos previamente padronizados de 50°C por 2 min, 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, totalizando aproximadamente 2 horas.

Para a reação, utilizou-se o kit Quantinova™ Sybr® Green PCR (Referência:), as proporções dos reagentes utilizados no mix para cada amostra foram as seguintes: 5µl de sybr green PCR Master MIX, 1,0 µl de QN ROX Reference Dye, 0,5µl de *primer forward*, 0,5µl de *primer reverse*, 1,0µl de água livre de RNase e 2,0µl de cDNA na concentração de 20,5ng/µl, totalizando 10µl de reação.

Os primers utilizados para amplificação dos genes *IL1β*, *IL6*, *IL8* e *CCL5* estão na tabela 1 [24]. A curva de eficiência dos *primers* foi realizada com quatro pontos e fator de diluição 1:2, tendo como ponto inicial a concentração de 855ng de cDNA. O gene endógeno *SUZ12* foi selecionado conforme resultados obtidos por Walker et al.

[27], que propõe esse gene como sendo o mais adequado para uso no endométrio bovino durante o início da gestação ou ciclo estral.

Tabela 1 – Sequências dos primers para amplificação de RNAm por reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR)

Gene	Direção do primer	Sequência do primer (5'-3')
IL1 β	<i>Forward</i>	TCCTATTCTCTCCAGCCA
	<i>Reverse</i>	AGCCTCAAATAACAGCTCATTC
IL6	<i>Forward</i>	ATGACTTCTGCTTTCCCTACCC
	<i>Reverse</i>	GCTGCTTTTCACACTCATCATTC
IL8	<i>Forward</i>	CACATTCCACACCTTTCCAC
	<i>Reverse</i>	CCTTCTGCACCCACTTTTC
CCL5	<i>Forward</i>	CTTTGCCTATATCTCCCGCC
	<i>Reverse</i>	TCTCGCACCCACTTCTTCTC
SUZ12	<i>Forward</i>	GAAGATGGAGAAGTGAACA
	<i>Reverse</i>	GACGGAGAGGTAAACAAGTATC

2.6. Análise estatística

O experimento foi conduzido em um desenho fatorial 3 x 3 (métodos de coleta de amostras: *cytobrush*, biopsia da região caruncular e biopsia da região intercaruncular x *status* de inflamação uterina: ausente, leve e grave). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, California, USA), com o animal como unidade experimental.

Os dados foram submetidos ao Teste de Kolmogorov-Smirnov para determinar se os grupos apresentavam ou não distribuição normal ($P < 0,05$), sendo os dados não paramétricos transformados em log₁₀ (variável). Os valores da expressão gênica foram separados em diferentes grupos de acordo com os experimentos realizados e procedido o Teste de Two-way ANOVA com pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni. Diferenças foram consideradas quando $P < 0,05$.

3. Resultados

Os fragmentos obtidos por meio das biopsias endometriais, coletados com auxílio de *punch* (8mm), com peso variando entre 32 e 116 mg ($69,9 \pm 20$) e resultaram em quantificação de RNA média de $131,7 \pm 60,1$ ng/ μ l após sua extração, sendo $133,4 \pm 67,5$ ng/ μ l a média das amostras da região caruncular e $130,0 \pm 53,0$ ng/ μ l da intercaruncular. As amostras coletadas com *cytobrush* obtiveram média $175,9 \pm 66,4$ ng/ μ l de RNA extraídos.

3.1. Experimento 1 – comparação da expressão gênica de amostras das regiões carunculares e intercarunculares da mucosa endometrial bovino coletadas pela técnica de biopsia endometrial – grau de inflamação subclínica

As expressões dos transcritos dos genes *IL1 β* , *IL6*, *IL8* e *CCL5* estão apresentadas na Figura 1 e não sofreram influência do local de biopsia endometrial em nenhum dos graus de inflamação. Entretanto, a expressão dos transcritos foi maior nos endométrios com inflamação grave quando comparado aos endométrios sem e com inflamação leve. Não houve diferença na expressão dos genes avaliados entre endométrios sem e com inflamação leve.

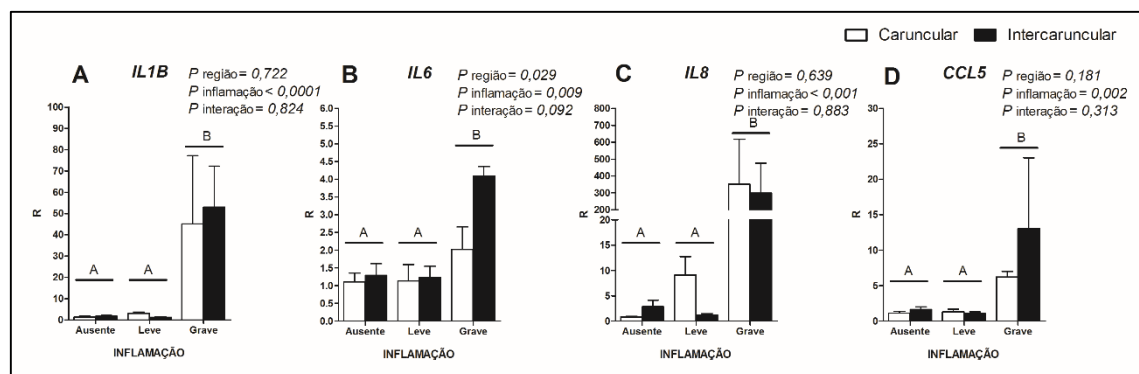


Fig. 1. Expressão dos transcritos dos genes *IL1 β* , *IL6*, *IL8* e *CCL5* na região caruncular e intercaruncular da mucosa endometrial de fêmeas bovinas com *status* de inflamação ausente ($n=10$), leve ($n=7$) e grave ($n=3$) coletados por meio de biopsia. O nível de Inflamação foi determinado pela técnica de citologia endometrial e considerado inflamação ausente (0% de polimorfonucleares - PMNs), leve (entre 11 e 19% PMNs) e grave (entre 71 e 85% PMNs). Os resultados estão apresentados em média + erro padrão da média e analisados por Two-way ANOVA e pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni, com valores diferentes entre grupos quando $P < 0,05$.

3.2. Experimento 2 – comparação da expressão gênica entre as técnicas de coleta *cytobrush* e *biopsia* (regiões caruncular e intercaruncular) da mucosa endometrial bovino – grau de inflamação subclínica

Em endométrios saudáveis e com inflamação leve, não foram observadas diferenças na expressão de RNAm de nenhum dos genes estudados (*IL1 β* , *IL6*, *IL8* e *CCL5*) em relação aos métodos de coleta por *cytobrush* e biópsia uterina, tanto da região caruncular como da intercaruncular (Fig. 2).

Quando a inflamação uterina foi classificada como grave todos os genes foram mais expressos nas amostras colhidas pelo *cytobrush* em comparação às amostras de biópsias uterinas de ambas as regiões (Fig. 2). Este aumento foi observado na expressão do gene *IL1 β* de 29.086,1; 45,1 e 52,9 vezes ao utilizar, respectivamente, os métodos de *cytobrush* e biópsia da região caruncular e intercaruncular. Assim como observado aumento do gene *IL6* de 129,2; 2,02 e 4,1 vezes, do gene *IL8* de 114.574,9; 351,9 e 298,4 vezes e do gene *CCL5* de 36,5; 6,3 e 13,1 vezes para os mesmos métodos, respectivamente.

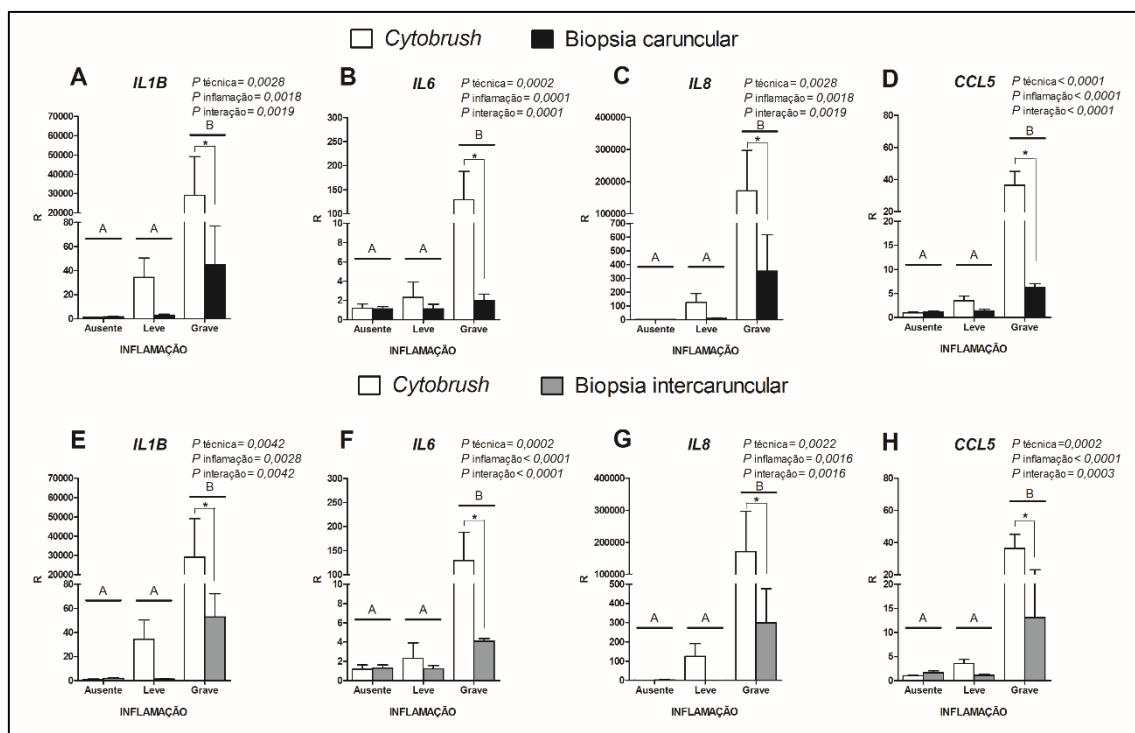


Fig. 2. Expressão dos transcritos dos genes *IL1 β* , *IL6*, *IL8* e *CCL5* em amostras colhidas por *cytobrush* e biópsia caruncular (A-D) e *cytobrush* e biópsia intercaruncular (E-H) da mucosa endometrial de fêmeas bovinas com status de inflamação ausente ($n=10$), leve ($n=7$) e grave ($n=3$). O nível de Inflamação foi determinado pela técnica de *cytobrush* e considerado inflamação ausente (0% de polimorfonucleares - PMNs), leve (entre 11 e 19% PMNs) e grave (entre 71 e 85% PMNs). Os resultados estão apresentados em média + erro padrão da média e analisados por Two-way ANOVA e pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni, com valores diferentes entre grupos quando $P<0,05$.

4. Discussão

Os resultados deste estudo mostraram que a expressão dos genes *IL1 β* , *IL6*, *IL8* e *CCL5* foi semelhante entre amostras de endométrios sem e com inflamação leve. Portanto, demonstrou-se que a expressão dos genes *IL1 β* , *IL6*, *IL8* e *CCL5* não está relacionada com a porcentagem de PMNs em endométrio com grau leve de inflamação.

Este resultado corrobora com Fisher et al. [11] que, ao considerarem o ponto de corte de >5% PMNs para endometrite subclínica, não observaram diferença na expressão dos genes *IL6* e *IL8* entre vacas com e sem endometrite subclínica, apenas para o *IL1 β* . Estes mesmos autores demonstraram haver aumento na expressão de *IL1 β* e *IL6* no período da ovulação e, portanto, sofrendo interferência do ciclo estral. Além disso, ressaltaram a importância das células do epitélio endometrial na expressão destes genes, já que também são coletadas por meio da técnica de *cytobrush* [28] e não apenas as células de defesa. Os resultados também corroboram com os descritos por Ghasemi et al. [14], que verificaram ser a porcentagem > 18% de PMNs como sendo o menor ponto de corte para o diagnóstico de endometrite subclínica, em vacas entre 28 e 41 DEL, onde há elevação significativa da expressão gênica dos mediadores pró-inflamatórios *IL6*, *IL8* e *TNF α* .

Observou-se na literatura consultada que as referências mais utilizadas para classificação de endometrite subclínica, por meio do percentual de PMNs na citologia endometrial, foram superiores a 18% de neutrófilos, aos 21-33 dias pós-parto ou, maior que 10% aos 34-47 dias [15,16]. Nos casos onde se utiliza como ponto de corte percentual acima de 18%, sugere-se que a avaliação da expressão dos genes *IL1 β* , *IL6*, *IL8* e *CCL5* poderia ser utilizada na diferenciação entre vacas com e sem endometrite subclínica. No entanto, nas pesquisas que definem pontos de corte bem inferiores a 19% para diagnóstico de endometrite subclínica, como os observados na literatura de >3% [4], > 6,5% [29] e >5% de neutrófilos [11,17], o uso da expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios não seria indicada, pois poderiam não apresentar diferença entre vacas com e sem endometrite subclínica.

Este estudo suporta os resultados de McDougall et al. [30] que citam que o percentual de PMNs seria o melhor avaliador do desempenho reprodutivo do que outros exames como a bacteriologia ou escore vaginal de inflamação. Também os encontrados por Barlund et al. [23] que mostraram ser o exame de *cytobrush* o método mais eficiente no diagnóstico de endometrite aos 28-41 DEL, quando comparado com

a vaginoscopia, avaliação ultrassonográfica do fluido e parede uterina e citologia endometrial coletada por lavagem uterina. Apesar destas vantagens sobre outros exames, Barlund et al. [23] demonstraram que a técnica de *cytobrush* tem alta especificidade (89,9%) em detectar endometrite subclínica, utilizando prenhez aos 150 dpp como referência, porém uma sensibilidade muito baixa (12,9%).

Entretanto, quando a presença de PMNs foi alta (>75%), caracterizando inflamação endometrial grave, houve diferença na expressão dos genes em relação às amostras de endométrios sem e com inflamação leve. Esta diferença foi observada tanto na coleta realizada por meio de biopsia como na *cytobrush*, reforçando a importância do conhecimento do percentual de PMNs nas amostras e não apenas a determinação de um ponto de corte mínimo para o diagnóstico da endometrite subclínica.

Nos quadros de inflamação grave, as amostras coletadas por *cytobrush* apresentaram os maiores níveis de expressão dos genes pró-inflamatórios avaliados, em comparação às amostras coletadas por biopsia endometrial caruncular ou intercaruncular. Ghasemi et al. [14] mostraram que a técnica do *cytobrush* permite recuperar células epiteliais endometriais e infiltrados PMNs, além de suficiente RNA para análise da expressão gênica da interface entre útero e lúmen uterino, diferente das biopsias endometriais que podem incluir múltiplas camadas uterinas. De acordo com Chapwanya et al. [19], as biopsias endometriais são constituídas da camada endometrial e estromal, sendo que os infiltrados de leucócitos são mais intensos na medida que aumenta a resposta inflamatória. Nestas condições, as amostras das biopsias provavelmente terão uma menor concentração de células inflamatórias e, conseqüentemente, de células que estão expressando os genes ligados a este processo inflamatório, visto que o processo inflamatório comumente se inicia nas camadas mais superficiais.

Os PMNs são os tipos de células inflamatórias predominantes encontradas no fluido uterino, sendo considerada a primeira resposta do sistema imune inato a uma infecção. Quanto mais intenso o processo inflamatório maior o recrutamento de PMNs, principalmente neutrófilos, para o lúmen uterino e infiltração no tecido endometrial [1,3,17,25,31].

O uso da biopsia uterina ainda é considerado controverso em relação à perturbação da fertilidade pós-exame. Ela poderia comprometer a fertilidade da vaca

induzindo patologias uterinas, além de ser considerada uma técnica de difícil realização que exige conhecimentos para a análise das amostras [32]. Por outro lado, a técnica de biopsia endometrial, assim como a histopatologia, tem se mostrado eficaz por ser capaz de gerar extensos dados quantitativos da atividade uterina [6,33,19], além de ser utilizada para a obtenção de amostras em análise celular e molecular detalhada do útero [14,19].

Segundo Chapwanya et al. [19], o uso adequado da biopsia endometrial permite que a técnica seja segura e confiável, sendo uma valiosa ferramenta para fins clínicos e de pesquisa podendo facilitar a descoberta de biomarcadores ou alvos terapêuticos necessários para reverter patologias uterinas. Diferentemente da *cytobrush* que, apesar de alta especificidade, 89,9% [14] e 94% [3], apresenta baixa sensibilidade, de 12,9% [14] e 36% [3], quando utilizada como diagnóstico de endometrite subclínica, a biopsia uterina apresenta alta sensibilidade (92%) e especificidade (77%) [33].

Neste estudo não foi observado diferença na expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias avaliadas entre as áreas carunculares e intercarunculares, contrapondo resultados em cultivo endometrial de regiões carunculares e intercarunculares *ex vivo* quando desafiados com LPS ou *Escherichia coli*, onde a concentração das citocinas *IL1 β* , *IL6* e *IL8* foi maior na região intercaruncular do que na caruncular [24]. Diferenças na expressão gênica entre as regiões carunculares e intercarunculares também são vistas em estudos relacionados com a implantação e desenvolvimento embrionário [34, 35].

5. Conclusão

Não houve diferença na expressão gênica de *IL1 β* , *IL6*, *IL8* e *CCL5* entre as regiões do endométrio. Inflamações leves identificadas na citologia endometrial não foram confirmadas pelas expressões dos genes estudados. Expressões significativas foram observadas na inflamação grave, em ambos os tipos de coleta de amostras (biopsia ou *cytobrush*). Houve influência da técnica de coleta de endométrio na expressão dos genes estudados somente nos quadros de inflamação grave, sendo o *cytobrush* o mais efetivo.

Referências

- [1] Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod Domest Anim* 2009;44:1-9 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01465.x>
- [2] Bacha B, Regassa FG. Subclinical endometritis in Zebu x Friesian crossbred dairy cows: its risk factors, association with subclinical mastitis and effect on reproductive performance. *Trop Anim Health Prod* 2010;42:397-403 <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9433-5>
- [3] Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 2004;62:9-23 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.03.001>
- [4] Salasel B, Mokhtari A, Taktaz T. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology* 2010;74:1271-8 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.05.033>
- [5] Walker CG, Meier S, Hussein H, McDougall S, Burke CR, Roche JR, et al. Modulation of the immune system during post-partum uterine inflammation. *Physiol Genomics* 2015;47:89-101 <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00098.2014>
- [6] Maziero RRD, Mattos MCC, Teixeira LBC, Martin I, Ferreira JCP. Biópsias endometriais seriadas em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o ciclo estral. *Rev Bras Reprod Anim* 2013;37:371-6
- [7] Hoelker M, Salilew-Wondim D, Drillich M, Christine GB, Ghanem N, Goetze L, et al. Transcriptional response of the bovine endometrium and embryo to endometrial polymorphonuclear neutrophil infiltration as an indicator of subclinical inflammation of the uterine environment. *Reprod Fert Develop* 2012;24:778-793 <https://doi.org/10.1071/RD11171>
- [8] Salilew-Wondim D, Ibrahim S, Gebremedhn S, Tesfaye D, Heppelmann M. Bollwein H, et al. Clinical and subclinical endometritis induced alterations in bovine endometrial transcriptome and miRNome profile. *BMC Genomics* 2016;17:2016 <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2513-9>
- [9] Galvão KN, Santos NR, Galvão JS, Gilbert RO. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows, *Theriogenology* 2011;76:290-9 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.006>
- [10] Turner ML, Healey GD, Sheldon IM. Immunity and Inflammation in the Uterus. *Reprod Dom Anim* 2012;47:402-9 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02104.x>
- [11] 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. *Reprod Fertil Dev* 2010;22:818-829 <https://doi.org/10.1071/RD09120>
- [12] Ishikawa Y, Nakada K, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H, Moriyoshi M, et al. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. *J Vet Med Sci* 2004;66:1403–8 <https://doi.org/10.1292/jvms.66.1403>
- [13] Rebourcet D, Odet F, Vérot A, Combe E, Meugnier E, Pesenti S, et al. The effects of an in utero exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on male reproductive function: identification of Ccl5 as a potential marker. *Int J Androl* 2010;33:413–424 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01020.x>
- [14] Ghasemi F, Gonzalez-Cano P, Griebel PJ, Palmer C. Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology* 2012;78:1538–1547 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.022>
- [15] Sheldon IM, Williams EJ, Miller ANA, Nash DM, Herath S. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J* 2008;176:115–121 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.031>
- [16] Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, et al. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J* 2005;46:255–9
- [17] Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 2005;64:1879–88 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.022>
- [18] Williams BL, Senger PL, Stephens LR, Ward ACS, Relationships between days post partum, observed estrus and uterine microflora in commercial dairy cows. *Theriogenology* 1988;30:555-561 [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90205-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90205-1)
- [19] Chapwanya A, Meade KG, Narciandi F, Stanley P, Mee JF, Doherty ML, et al. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology* 2010;73:988–994 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.015>
- [20] Martins TM, Santos RL, Paixão TA, Mol JPS, Muniz CS, Borges ÁM. Modelo experimental de endometrite em vacas inoculadas com *Escherichia coli* inativada por meio de infusão uterina. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2016;68:247-251 <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8133>
- [21] Herath S, Lilly ST, Santos NR, Gilbert RO, Goetze L, Bryant CE, White JO, Cronin J, Sheldon IM. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:55 <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-55>
- [22] Pascottini OB, Hostens M, Dini P, Vandepitte J, Ducatelle R, Opsomer G. Comparison between cytology and histopathology to evaluate subclinical endometritis

- in dairy cows. Theriogenology 2016;86:1550-1556
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.014>
- [23] Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. Theriogenology 2008;69:714-723 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.005>
- [24] Saut JPE, Healey GD, Borges AM, Sheldon IM. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS *in vitro* Reproduction 2014;148:593–606 <https://doi.org/10.1530/REP-14-0230>
- [25] Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology 2006;65:1516-1530
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.021>
- [26] Kaufmann TB, Drillich M, Tenhagen BA, Forderung D, Heuwieser W. Prevalence of bovine subclinical endometritis 4h after insemination and its effects on first service conception rate. Theriogenology 2009;71:385–391
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.005>
- [27] Walker CG, Meier S, Mitchell MD, Roche JR, Littlejohn M. Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. BMC Mol Biol 2009;10:100 <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-100>
- [28] Gabler C, Drillich M, Fischer C, Holder C, Heuwieser W, Einspanier R. Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. Theriogenology 2009;71:993–1004
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.009>
- [29] Galvão KN, Frajblat M, Brittin SB, Butler WR, Guard CL, Gilbert RO. Effect of prostaglandin F_{2α} on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. J Dairy Sci 2009;92:4906-4913 <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1984>
- [30] McDougall S, Hussein H, Aberdein D, Buckle K, Roche J, Burke C, et al. Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. Theriogenology 2011;76:229–240.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.024>
- [31] LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, et al. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. J Dairy Sci 2002;85:2237-2249 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74303-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74303-8)
- [32] Zaayer D, van der Horst CJ. Non-fertility in cows: treatment with PGF and investigation of uterine biopsies. Cytobios 1986;45:55-70
- [33] Bonnett BN, Martin SW, Meek AH. Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. Prev Vet Med 1993;15:205–220 [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(93\)90114-9](https://doi.org/10.1016/0167-5877(93)90114-9)

[34] Al-Gubory KH, Arianmanesh M, Garrel C, Bhattacharya S, Cash P, Fowler PA. Proteomic analysis of the sheep caruncular and intercaruncular endometrium reveals changes in functional proteins crucial for the establishment of pregnancy. *Reproduction* 2014;147:599-614 <https://doi.org/10.1530/REP-13-0600>

[35] Mansouri-Attia N, Aubert J, Reinaud P, Giraud-Delville C, Taghouti G, Galio L, et al. Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation, *Physiol Genomics* 2009;39:14–27 <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90404.2008>

Fahey JV, Schaefer TM, Channon JY, Wira CR. Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. *Hum Reprod* 2005;20:1439–1446 <https://doi.org/10.1093/humrep/deh806>

CAPÍTULO 3:

Expressão dos genes IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, IFNG e LIF em útero de vacas sensibilizadas por infusão intrauterina de antígenos maternos e paternos no período peri-ovulatório

(Artigo escrito segundo as normas da revista Animal reproduction Science, anexo 3: normas da revista)

Expressão dos genes IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17, IFNG e LIF em útero de vacas sensibilizadas por infusão intrauterina de antígenos maternos e paternos no período peri-ovulatório

Nadia Simarro Fagundes ^a, Talita Vieta Junqueira^a, Aline Costa de Lucio ^a, Naiara Simarro Fagundes^a, Marcelo José Barbosa Silva^b, João Paulo Elsen Saut ^a, Marcelo Emílio Beletti ^{a*}

^a Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus Umuarama, Av. Pará, Bloco 2T, 1720, Bairro Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais 38400-902, Brasil.

^b Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Ciências Biomédicas, Campus Umuarama, Av. Pará, Bloco 4C, Laboratório de Imunologia, Bairro Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, 38400-902, Brasil.

*Correspondências enviar para Marcelo Emílio Beletti; mebeletti@ufu.br

Resumo

Acredita-se que uma boa parte das perdas embrionárias poderia estar relacionada a um ambiente uterino com baixa receptividade ao embrião. Com o objetivo de compreender os mecanismos de tolerância imunológica no útero, o presente estudo analisou a expressão dos genes *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-6*, *IL-17*, *IFNG* e *LIF* no ciclo estral e após indução imunológica com sêmen e/ou células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em úteros de 45 fêmeas bovinas cruzadas (nelore x Holandês) submetidas a sincronização do ciclo estral, sendo D0 o dia da indução imunológica. Os animais foram distribuídos de acordo com a indução imunológica: antígenos paternos (sêmen), materno (PBMCs), materno e paterno simultaneamente e controle (sem indução imunológica). As biópsias uterinas *in vivo* foram coletadas, nos dias zero (D0) (sem indução imunológica) e sete (D7) e 14 (D14) do ciclo estral (com e sem estimulação imunológica). Foi realizada a extrações dos RNAs, a transcrição reversa

e a reação de qPCR para a quantificação da expressão gênica das amostras. Após a indução imunológica, a expressão de RNAm do gene *IL-1 β* diminuiu significativamente em todos os grupos sensibilizados em comparação ao controle. O gene *IL-2* apresentou maior expressão somente na indução com sêmen. Observou-se também que a expressão dos genes *IL-1 β* e *IL-2* variou significativamente entre D0, D7 e D14 do ciclo estral. O gene *IL-6* não apresentou variações de expressão entre os grupos estudados. Em conclusão, os resultados obtidos sugerem que a sensibilização imunológica pode contribuir para preparar o ambiente uterino para uma gestação.

Palavras chave: Biópsia uterina, perda embrionária, imunotolerância fetal.

1. Introdução

A baixa eficiência reprodutiva pode afetar diretamente a rentabilidade da bovinocultura. As perdas embrionárias são um grande obstáculo para o sucesso gestacional principalmente nas técnicas que utilizam a transferência de embriões. Em bovinos, a maioria dessas perdas ocorrem durante as primeiras três semanas de gestação, particularmente entre os dias 7 e 16 de gestação (Sreenan e Diskin, 1987; Berg et al., 2010; Minten et al., 2013). Acredita-se que uma boa parte dessas perdas poderiam estar relacionadas a um ambiente uterino com baixa receptividade ao embrião, impedindo a gestação (Hansen, 1997; Ideta et al., 2010a). Diferente de um embrião semi-alógeno gerado por monta natural ou inseminação artificial, o embrião produzido *in vitro* quando introduzido em uma fêmea receptora se comporta de forma alógena, ou seja, totalmente estranho ao sistema imune da “mãe”, uma vez que tanto a parte paterna como a materna do embrião são antigênicas à receptora, podendo, portanto, ser rejeitada imunologicamente, resultando em perda gestacional (Koch e

Platt, 2003; Michelon et al., 2006). Experimentos com TE em várias espécies tem demonstrado que após a ovulação o ambiente uterino permanece receptivo ao embrião por um limitado período de tempo, com um perfil de expressão gênica característico, permitindo que o endométrio responda ao sinal embrionário, evitando a rejeição (Sherwin et al., 2004). Uma regulação fina do sistema imune da mãe desafiado pelos antígenos paternos expressos pelo embrião, permitiria o desenvolvimento da gestação evitando perdas. Deste modo, a gestação só é estabelecida quando se tem um ambiente uterino imunologicamente adequado que permita o reconhecimento do embrião e a tolerância aos seus antígenos. Desvios no equilíbrio dessa resposta aloimune podem provocar complicações gestacionais e/ou infertilidade (Munoz-Suano et al., 2011).

Durante o início da gestação e implantação, há expressão de citocinas, que tem como objetivo atrair células imunes efetoras na interface materno-fetal a fim de modular o nível inflamatório nesse microambiente (Michelon et al., 2006). Vários estudos em mamíferos, utilizaram o sêmen (Robertson, 2005; Schjenken and Robertson, 2014) e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) (Ideta et al., 2010ab; Yu et al., 2016) para induzir a produção de citocinas no ambiente uterino, de modo a melhorar a receptividade do endométrio ao embrião.

Com o objetivo de compreender os mecanismos de tolerância imunológica relacionados a receptividade uterina em vacas, o presente estudo analisou a expressão dos genes *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-6*, *IL-17*, *IFNG* e *LIF*, envolvidos com o início da gestação em relação ao mecanismo de tolerancia uterina, e o perfil de expressão desses genes após uma indução imunológica com sêmen e/ou PBMC em úteros de receptoras.

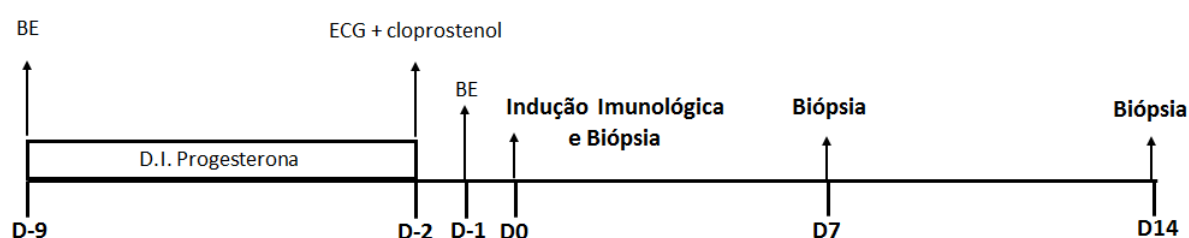
2. Materiais e Métodos

Esse estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA), segundo o protocolo número 023/15.

2.1. Preparo dos animais e delineamento experimental

Foram utilizadas para o experimento 45 vacas cruzadas (Nelore - *Bos indicus* x Holandês - *Bos taurus*) não gestantes, de idades semelhantes, confinadas com a mesma dieta alimentar e hídrica. Foram submetidas a sincronização do ciclo estral, utilizando protocolo de 10 dias [D-9: 2 ml de benzoato de estradiol (100 mg) + dispositivo intravaginal de progesterona (1,00 g); D-2: retirada do dispositivo intravaginal + 1,5 ml de gonadotrofina sérica equina (5000 UI) e 1,0 ml de cloprostenol (0,500 mg); D-1: 1 ml benzoato de estradiol (100mg); D0: estro], sendo considerado D-9 início do protocolo hormonal e D0 o dia da indução imunológica. As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em 4 tratamentos de acordo com a indução imunológica: antígenos paternos (sêmen), antígeno materno (PBMCs), antígenos materno e paterno simultaneamente (PBMCs + sêmen) e controle (sem indução imunológica). As biópsias uterinas *in vivo* foram coletadas em três momentos; dias 0, 7 e 14 (D0, D7 e D14 respectivamente) do ciclo estral, sendo cinco animais em cada grupo: controle D0, D7 e D14 e com indução imunológica (Sêmen, PBMCs e Sêmen + PBMCs) D7 e D14, totalizando 45 amostras (Fig. 1). A coleta das amostras foi realizada no corno uterino com o auxílio de uma pinça para biópsia uterina bovina (Martins et al., 2016), sendo retirado um pequeno fragmento de aproximadamente 3 mm³ para análise molecular de expressão gênica. De cada fêmea foi retirada apenas uma biópsia para evitar a interferência de processos inflamatórios provocados pela lesão. Após a coleta, as biópsias foram imediatamente inseridas em microtubos RNase/DNase-free

contendo 1:5 wt/vol de solução estabilizadora de RNA, RNeasy da *Ambion*®, acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e, posteriormente mantidas *overnight* a 4°C para penetração total do RNeasy no tecido, de acordo com o protocolo do fabricante. Após esse período, as amostras foram estocadas no ultra freezer a - 80°C até o seu processamento. Ao final do experimento os animais foram destinados ao abate.



Números de amostras recolhidas por biópsia, nos D0, D7 e D14 entre os grupos controle e indução imunológica.

	Controle	Sêmen	PBMCs	Sêmen + PBMCs
D0	5	-	-	-
D7	5	5	5	5
D14	5	5	5	5

Figura 1: Representação gráfica do ciclo estral com protocolo hormonal de sincronização estral, assim como o delineamento experimental e números de animais amostrados.

BE: Benzoato de estradiol

D.I.: Dispositivo intravaginal

ECG: Gonadotrofina sérica equina

PBMCs: Células mononucleares de sangue periférico

2.2. Preparação dos antígenos para a indução imunológica e administração em receptoras

Para a indução imunológica paterna foi utilizado como antígeno o sêmen de quatro touros doadores férteis, formando um *pool*. O procedimento de coleta ocorreu com o auxílio de um eletroejaculador e/ou da massagem da vesícula seminal. O *pool* de sêmen foi acondicionado em microtubos com volume de 2,0 ml cada e em seguida, congelados a -20°C, onde permaneceram até a data da inoculação uterina,

promovendo a preservação das características antigênicas e a morte dos espermatozoides (método desenvolvido pelos autores).

Para a indução materna os antígenos utilizados foram as PBMCs obtidas do sangue de uma vaca doadora da raça Girolando, coletado através da veia jugular com o auxílio de bolsas estéreis de transfusão sanguínea com anticoagulante CPDA-1 (*Citrate phosphate dextrose-adenine 1*). As PBMCs foram separadas do sangue por meio do gradiente Ficoll-Paque™ PLUS. Para isso, 15 ml de sangue diluído em solução tampão fosfato (PBS) foi depositado sobre 15 ml de Ficoll e centrifugado a 2000 rpm por 20 minutos para a separação das células por densidade, resultando na formação de uma nuvem de leucócitos. A fração contendo os leucócitos foi coletada e novamente diluída em 6 ml de PBS e centrifugada à 2000 rpm por 5 minutos para a eliminação do Ficoll que é tóxico para as células, sendo este procedimento repetido por 2 vezes. Com a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi resuspendido em 1 ml de PBS. Assim, foi feita a contagem em câmara de Neubauer, com diluição de 1:10. A concentração foi estabelecida à $(2-4) \times 10^7$ células/ml, semelhante a concentração de 1×10^6 células/ml utilizada por Ideta et al. (2010a) em bovinos, e padronizada com auxílio de PBS. As alíquotas foram acondicionadas em microtubos de 1,0 ml e congeladas a -20°C , onde permaneceram até a data da inoculação uterina promovendo a preservação dos antígenos.

Com o auxílio de uma sonda de infusão intrauterina, as soluções, contendo ou não antígenos, foram inoculados no corpo do útero das receptoras no D0 do ciclo estral, seguindo o seguinte protocolo: controle - 4,0 ml de PBS; indução paterna - 2,0 ml de sêmen + 2,0 ml de PBS; indução materna - 1,0 ml de PBMCs na concentração de $(2-4) \times 10^7$ células/ml + 3,0 ml de PBS e Indução materna e paterna - 2,0 ml de sêmen + 1,0 ml de PBMCs na concentração de $(2-4) \times 10^7$ células/ml + 1,0 ml de PBS.

2.3. *Extração do RNA e transcrição reversa*

As extrações de RNAs das amostras de tecido uterino foram realizadas no aparelho Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA) utilizando o kit de extração de RNA de tecido Maxwell® 16 LEV simply RNA Tissue Kit (Referência: AS1340, Promega, Madison, WI, USA). O procedimento foi realizado conforme as instruções do fabricante. Os fragmentos de biopsia foram macerados em 200 µL de solução de homogeneização com auxílio do Pellet Pestles® (Sigma Aldrich), em seguida adicionados 200 µL de tampão de lise, agitados em vortex, centrifugados e os sobrenadantes coletados e acondicionados nas *cartridges* (suporte disponível no kit) juntamente com o restante dos reagentes, seguindo para o aparelho Maxwell® 16 Instrument para extração mecânica dos RNAs. Ao final, o RNA total foi quantificado no Quantus™ Fluorometer utilizando o kit QuantiFluor® RNA System (Referência: E3310, Promega, Madison, WI, USA), conforme recomendação do fabricante. Todos os RNAs foram armazenados em ultra freezer a -80°C até a transcrição reversa. Está foi realizada utilizando o QuantiNova™ Reverse Transcription Kit (Referência: A5001, Promega, Madison, WI, USA). Todas as etapas foram seguidas de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, para cada amostra, 7 µL de Primer Mix (1 µL de Oligo DT, 1 µL de Random Primer e 5 µL de RNA total, incubado a 70°C por 5 minutos) e 13 µL de RT Mix (5 µL de água livre de RNase, 4 µL de 5X Reaction Buffer, 1 µL de dNTP Mix, 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL de RNAsin e 1 µL de Enzima RT) foram misturados e incubados em termociclador por 1 hora a 42°C e então por 15 minutos a 70°C para a desnaturação da enzima transcriptase reversa. Ao final, o DNA complementar (cDNA) de cada amostra foi quantificado no Quantus™ Fluorometer utilizando o kit QuantiFluor™ ssDNA System (Referência: E3190, Promega, Madison,

WI, USA) conforme indicações do fabricante e armazenado em freezer a -20°C até a utilização em PCR em tempo real.

2.4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR

A quantificação da expressão dos genes *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-6*, *IL-17*, *IFNG* e *LIF* foi realizada no aparelho Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) por meio do método comparativo de *threshold cycles* (Ct). Em todo o experimento foram utilizadas placas de 96 poços Axygen® PCR-96 AB-C (Axygen Scientific, Union City, CA, USA) e as amplificações foram conduzidas em duplicata com 1 controle negativo para cada gene. As condições da reação foram determinadas em ciclos previamente padronizados de 50°C por 2 min, 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, totalizando aproximadamente 2 horas. Para a reação, utilizou-se o kit Quantinova™ Sybr® Green PCR (Qiagen, Crawley, West Sussex, UK), sendo utilizadas as seguintes proporções de reagentes para o mix de cada amostra: 5 μ L de sybr green PCR Master MIX, 1,0 μ L de QN ROX Reference Dye, 0,5 μ L de *primer forward*, 0,5 μ L de *primer reverse*, 1,0 μ L de água livre de RNase e 2,0 μ L de cDNA na concentração de 5,2 ng/ μ L, totalizando 10 μ L de reação. Os primers utilizados para amplificação dos genes estão na Tabela 1. A curva de eficiência dos *primers* foi realizada com 4 pontos e fator de diluição 1:2, tendo como ponto inicial a concentração de 855 ng de cDNA. O gene normalizador (Housekeeping) foi selecionado conforme resultados obtidos por Walker et al. (2009), que propõem o *SUZ12* como sendo o gene mais adequado para estudo do endométrio bovino durante o início da gestação ou ciclo estral.

201 Tabela 1 – Sequencias dos primers para amplificação de RNAm por reação em cadeia de polimerase
 202 em tempo real (qRT-PCR)

Gene	Direção do primer	Sequencia do primer (5'-3')
<i>IL-1β</i>	<i>Forward</i>	TCCTATTCTCTCCAGCCA
	<i>Reverse</i>	AGCCTCAAATAACAGCTCATTC
<i>IL-6</i>	<i>Forward</i>	ATGACTTCTGCTTTCCTACCC
	<i>Reverse</i>	GCTGCTTTCACACTCATCATTC
<i>IL-2</i>	<i>Forward</i>	CACTACTCACAGTAACCTCAAC
	<i>Reverse</i>	CAACGAGTGCAAGAGTTAGT
<i>LIF</i>	<i>Forward</i>	GCTGTTTCTCTCTCTGTCTTAC
	<i>Reverse</i>	CTTGAAGGAGACCTTAGATGC
<i>IL-17</i>	<i>Forward</i>	CAGCGAGCACAAGTTCAT
	<i>Reverse</i>	GAAGCAGTAGCAGTGACATAG
<i>IFNG</i>	<i>Forward</i>	CGGCCTAACTCTCTCCTAAA
	<i>Reverse</i>	CTGGCCATAAGAACCAGAAA
<i>SUZ12</i>	<i>Forward</i>	GAAGATGGAGAAGTGGAACA
	<i>Reverse</i>	GACGGAGAGGTAAACAAGTATC

203

204 2.5. Análise estatística

205 Os dados foram transformados (log10) e, posteriormente, submetidos à análise de
 206 variâncias, sendo as médias comparadas pelo teste de t ($p < 0,05$), por meio do
 207 software estatístico SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Adicionalmente, foi
 208 calculado o desvio padrão das médias. A comparação entre as proporções de
 209 amostras com genes expressos foi feita pelo teste Exato de Fisher (Vassarstats).

210

211 3. Resultados

212 Os genes *IL-1 β* , *IL-2* e *IL-6* foram amplificados em 92,8%, 72,4% e 78,6% das
 213 amostras, respectivamente sendo possível a análise dos tratamentos.

214 Para compreender o comportamento dos genes *IL-1 β* , *IL-2* e *IL-6* no ciclo estral,
 215 a expressão destes genes foi avaliada no tecido uterino sem indução imunológica
 216 (controle) no dia 0, 7 e 14 (Figura 2). O gene *IL-1 β* foi mais expresso no D7 do que no
 217 D14 do ciclo estral, porém ambos não apresentaram diferenças em relação ao D0

(estro). Por outro lado, observou-se uma diminuição da expressão do gene *IL-2* após o D0, sendo este expresso 55,6 vezes menos no D7 e 27,0 vezes menos no D14 do ciclo estral. A expressão do gene *IL6* não foi influenciado pelos diferentes momentos do ciclo estral analisados.

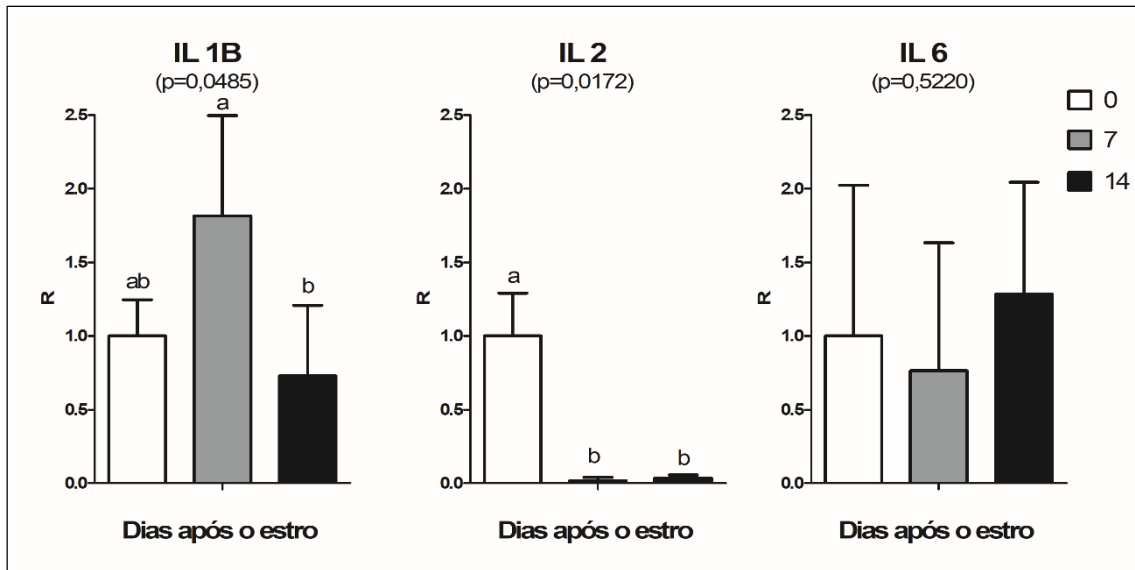


Figura 2: Expressão dos genes *IL-1β*, *IL-2* e *IL-6* em fêmeas do tratamento controle nos dias 0, 7 e 14 do ciclo estral. Médias com letras diferentes se diferem pelo teste de t ($p < 0,05$).

No D7 do ciclo estral, os antígenos PBMCs, sêmen e PBMCs + sêmen levaram a uma redução na expressão do gene *IL-1β*, em comparação ao controle (3,7, 5,0 e 4,4 vezes, respectivamente), mas sem diferenças entre os diferentes antígenos (Figura 3). Entretanto, estas reduções não foram mais observadas no D14.

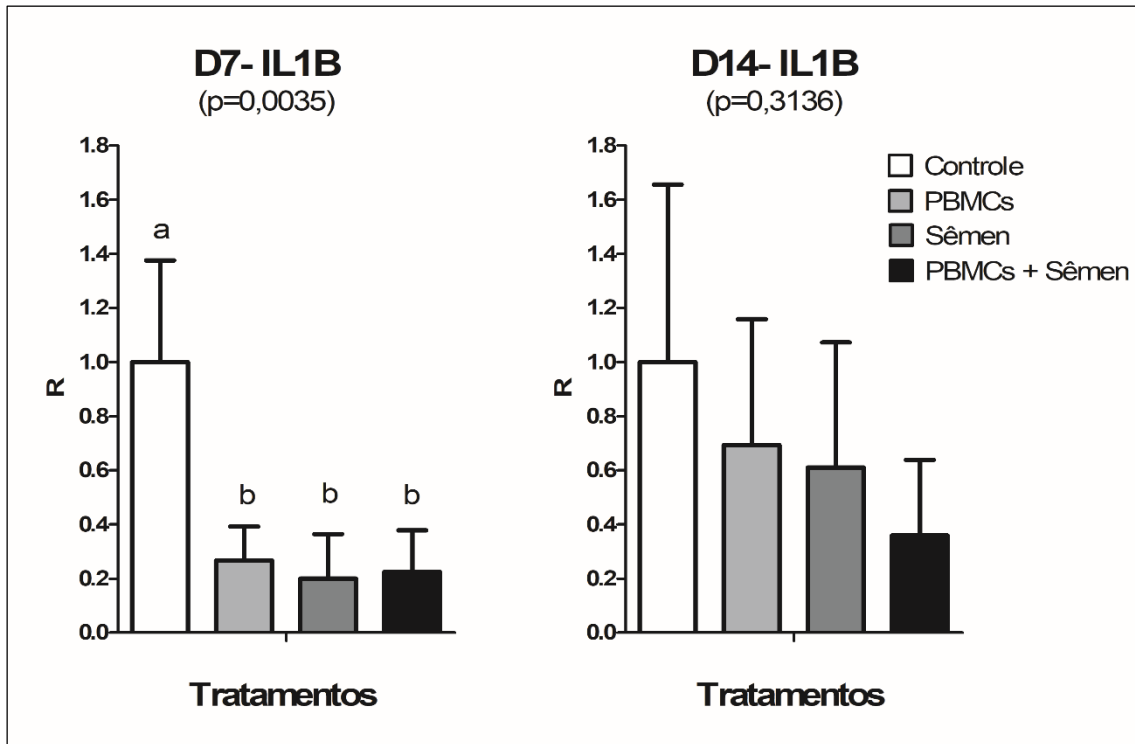


Figura 3: Expressão do gene *IL-1β* em úteros de fêmeas em contato com diferentes antígenos, no D7 e 14 do ciclo estral. Médias com letras diferentes se diferem pelo teste de t ($p < 0,05$).

O sêmen induziu aumento na expressão do gene *IL-2* de 50,5 vezes no D7 e 17,4 vezes no D14 em comparação ao controle (Figura 4). Entretanto, este efeito não foi observado quando o sêmen foi administrado junto ao PBMCs, assim como também não foi observado quando o PBMCs foi utilizado isoladamente.

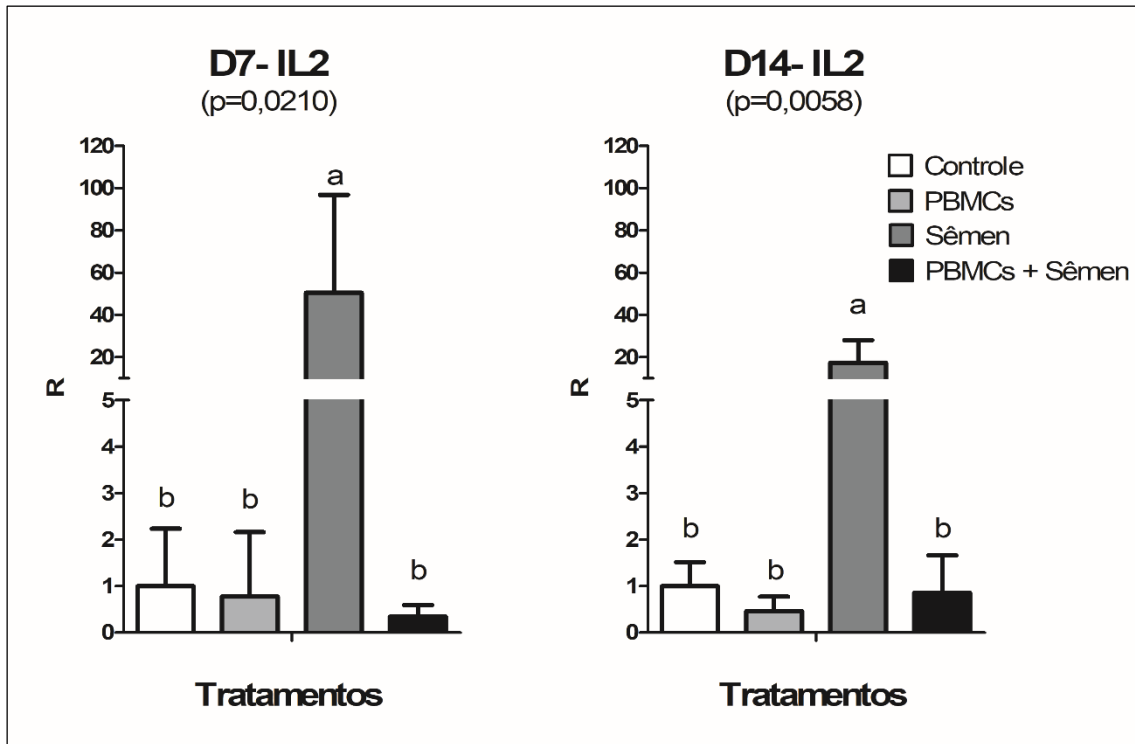


Figura 4: Expressão do gene *IL-2* em úteros de fêmeas em contato com diferentes antígenos, no D7 e 14 do ciclo estral. Médias com letras diferentes se diferem pelo teste de t ($p<0,05$).

Os antígenos PBMCs e sêmen, assim como o seu uso em conjunto, não influenciaram a expressão do gene *IL-6* no útero de fêmeas no D7 e D14 do ciclo estral (Figura 5).

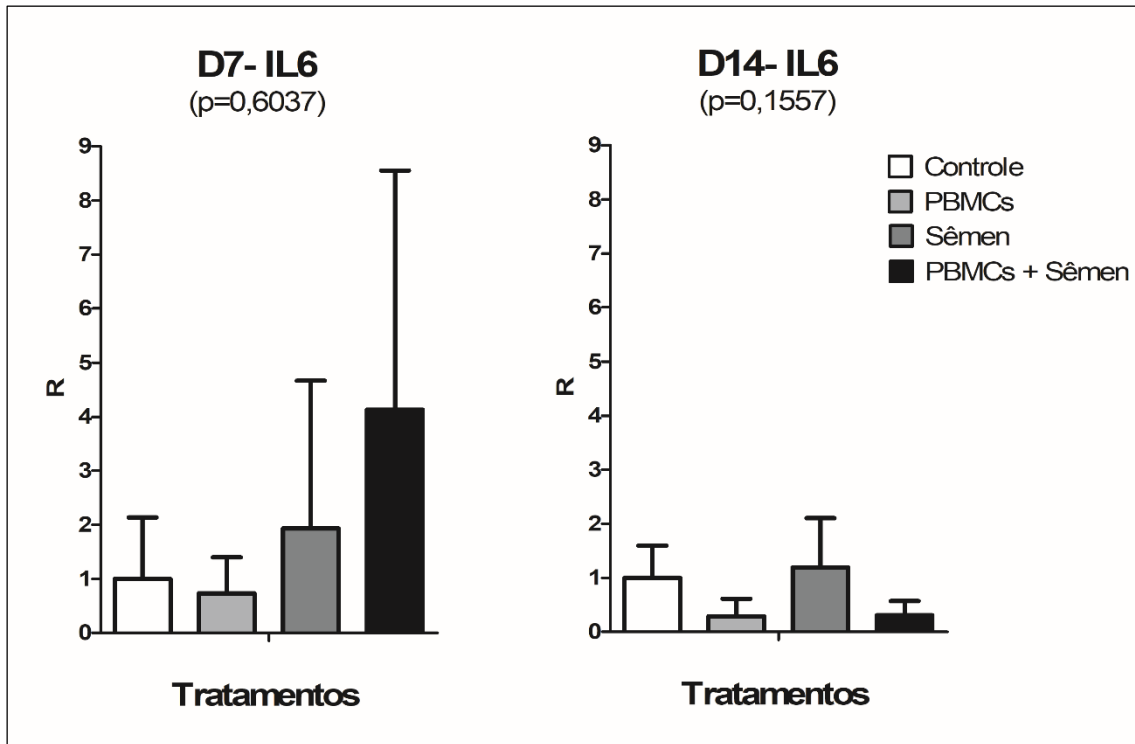


Figura 5: Expressão do gene *IL-6* em úteros de fêmeas em contato com diferentes antígenos, no D7 e 14 do ciclo estral. Médias com letras diferentes se diferem pelo teste de t ($p<0,05$).

Os genes *LIF*, *IL-17* e *IFNG* não apresentaram uma amplificação consistente neste estudo, pois apenas 56,8%, 32,2% e 39,4% das amostras apresentaram amplificação destes genes, respectivamente. A proporção de amplificação dos genes *IL-17* e *IFNG* de amostras do tratamento controle não diferiram entre os dias do ciclo estral ($p=0,9999$ e $p=0,9999$, respectivamente). Porém, observou-se uma tendência ($p=0,1142$) de diminuição da porcentagem de amostras que apresentaram amplificação do gene *LIF* com o decorrer dos dias do ciclo estral (D0: 100%, D7:40% e D14:25%). No D7 do ciclo estral, os diferentes antígenos não influenciaram a proporção de amostras com amplificação dos genes *LIF*, *IL-17* e *IFNG* ($p=0,3873$, $p=0,2131$ e $p=0,8214$, respectivamente). Do mesmo modo, não foram observadas alterações na proporção de amostras com amplificação destes genes no D14 do ciclo estral ($p=0,2495$, $p=0,24495$ e $p=0,5224$, respectivamente). Também não foram

observadas alterações na proporção de amostras com amplificação dos genes *LIF*, *IL-17* e *IFNG* entre D7 e D14 para os tratamentos PBMCs ($p=0,5238$, $p=0,4444$ e $p=0,5238$), sêmen ($p=0,9999$, $p=0,9999$ e $p=0,9999$) e PBMCs + sêmen ($p=0,1964$, $p=0,4346$ e $p=0,4346$, respectivamente).

4. Discussão

Uma gestação bem-sucedida depende da modulação precisa dos recursos imunológicos maternos, a fim de proporcionar um ambiente receptivo e embriotrófico para o desenvolvimento de um feto semi-alogênico ou alogênico (Lee et al., 2012; Clark e Schust, 2013; Oliveira et al., 2013). As citocinas também possuem um papel importante na evolução ou interrupção da gestação, elas atraem células imunes efectoras que atuam na modulação da resposta imune na interface materno-fetal, controlando o nível de ativação inflamatória nesse microambiente (Michelon et al., 2006).

4.1. Perfil de transcrição dos genes *IL1 β* , *IL-2* e *IL-6* durante o ciclo estral de fêmeas não sensibilizadas imunologicamente

A citocina *IL-1 β* tem sido encontrada em células endometriais durante o ciclo estral em vacas (Correia-Álvarez et al., 2015). Neste experimento, durante o ciclo estral de fêmeas sem indução imunológica houve maior expressão do gene *IL-1 β* no D7 comparado com D14, embora não exibiram diferenças em relação ao D0 (estro). Estes resultados estão de acordo com o estudo de Oliveira et al. (2013) em bovinos, que observaram aumento dos níveis de transcrição de RNAm do gene *IL-1 β* durante a fase lútea inicial (dia 7), sendo suprimidos significativamente na fase tardia (dias 13 e 16). A citocina *IL-1 β* em humanos tem a função de ativar neutrófilos e monócitos

289 aumentando a fagocitose e morte bacteriana, além de aumentar a expressão de
290 quimiocinas, como a IL-8 que tem como principal função atrair neutrófilos, e moléculas
291 de adesão pelas células endoteliais vasculares promovendo a infiltração de células
292 inflamatórias para o espaço extravascular (Sica et al., 1990; Wang et al., 1991;
293 Dinarello, 2002). Logo após a introdução do sêmen ocorre uma migração de
294 neutrófilos das células epiteliais para o lúmen uterino, a fim de assegurar a depuração
295 de microorganismos, patógenos e restos seminais que permaneceram no trato
296 reprodutivo feminino após a sua introdução (Robertson, 2005). Deste modo a maior
297 expressão de *IL-1 β* observada no D7, ainda pode ser reflexo desse mecanismo de
298 limpeza preventivo, embora no presente experimento, não tenha ocorrido a
299 inseminação das fêmeas. A redução da expressão de *IL-1 β* no D14 pode estar
300 relacionada a uma modulação do ambiente uterino para promover tolerância
301 imunológica ao embrião. Conforme Forde et al. (2011), as alterações observadas no
302 endométrio bovino dos dias 1 a 16 do ciclo estral podem ocorrer como um padrão de
303 preparação do ambiente uterino para a gestação. Esse perfil de preparação acontece
304 independente se a vaca ficará gestante ou não, tendendo a um ambiente Th2 com
305 redução de fatores pró-inflamatórios como o IL-1 β que apresenta expressão reduzida
306 na fase lútea tardia (Oliveira et al., 2013). Conforme Zhang et al. (2015), para o
307 sucesso da gestação em vacas é preciso ter um ambiente uterino com predominância
308 de citocina padrão Th2. Muñoz et al. (2012) observaram que durante o início da
309 gestação bovina ocorre uma diminuição de IL-1 β no fluido uterino que potencialmente
310 poderia reduzir a expressão de *NF κ B* e suas respostas pró-inflamatórias e/ou pró-
311 apoptótico amenizando as respostas imunes inatas maternas e contribuindo para a
312 tolerância imunológica do embrião.

Após o D0, o presente estudo observou uma redução significativa da expressão do gene *IL-2* tanto no D7 como no D14. A *IL-2* é produzida após a ativação do antígeno desempenhando papéis fundamentais na resposta imune. Segundo Zhang et al. (2015) em bovinos a expressão descendente de citocinas Th1 como *IL-2*, e ascendente de Th2 durante o início da gestação regula a imunossupressão materna promovendo o sucesso gestacional. Estudos tem demonstrado que a prostaglandina E2 presente na gestação inibe a expressão de *IL-2* nos linfócitos bovinos (Emond et al., 1998). Da mesma forma Leung et al. (2000) não detectaram a presença de expressão de RNAm do gene *IL-2* em vacas gestantes, sendo somente observada em fêmeas ciclando no dia 16. Desse modo o perfil de expressão do gene *IL-2* após o D0 (estro) também tende a uma antecipação da gestação com redução significativa de expressão de RNAm de *IL-2* até o dia 14.

A expressão do gene *IL-6* não variou significativamente entre os momentos analisados. Conforme Yang et al. (2014) a *IL-6* é produzida principalmente por células Th2 podendo estar envolvida no reconhecimento materno da gestação e na tolerância imune ao embrião. Yang et al. (2016) observaram expressões significativamente altas de RNAm de *IL-6* em PBMCs bovinas no dia 30 de gestação, sugerindo que essa citocina seja essencial para implantação embrionária. Mathialagan et al. (1992) observaram a expressão de RNAm de *IL-6* em embriões em fase de alongamento e pré-implantação. Oliveira et al. (2013) observaram que o perfil de expressão de RNAm do gene *IL-6* não foi significativamente regulado até o dia 16 do ciclo estral bovino. Desta forma os resultados deste estudo, corroboram com a literatura, visto que a expressão de RNAm do gene *IL-6* não foi regulada até o D14 do ciclo estral.

4.2. Perfil de transcrição dos genes *IL-1 β* , *IL-2* e *IL-6* em fêmeas sensibilizadas imunologicamente

Os animais sensibilizados imunologicamente apresentaram uma redução significativa da expressão do gene *IL-1 β* no D7 em todos os grupos de indução. Esses dados sugerem que em ambientes uterinos com maiores expressões de *IL-1 β* , sugestivo de perda gestacional, o tratamento com indução imunológica pode reduzir sua expressão proporcionando um ambiente uterino favorável ao reconhecimento da gestação. A alta concentração de progesterona produzida pelo corpo luteo na gestação, inibe a expressão de *IL-1 β* que por sua vez inibe a PGF α evitando a luteólise e consequentemente a perda do embrião (Nothnick e Pate, 1990). Deste modo, a redução da expressão de RNAm para o gene *IL-1 β* por meio da indução imunológica poderia evitar uma luteólise, aumentando as chances de sucesso gestacional.

No tratamento de indução com sêmen foi observado aumento significativo de expressão de RNAm de *IL-2* em relação aos outros grupos de sensibilização. De perfil Th1, a expressão reduzida de *IL-2* durante o início da gestação pode ajudar a promover a imunotolerância uterina (Zhang et al., 2015). Por outro lado, analisando PBMC sanguíneas de fêmeas bovinas gestantes e ciclando, do dia 18 até o dia 30, Yang et al. (2016), observaram uma regulação positiva de RNAm de *IL-2* com aumento significativo em gestantes e de acordo com os autores, embora a *IL-2* seja uma citocina Th1, o aumento de sua expressão pode estar associado com uma gestação bem-sucedida. De acordo com a literatura, não está claro se a maior expressão do gene *IL-2* promove um ambiente uterino favorável à gestação, deste modo, é preciso mais estudos para elucidar a maior expressão de *IL-2* induzida pelo sêmen.

No presente estudo não foi observado variações na expressão de transcritos do gene *IL-6*. Em bovinos a expressão desse gene é vista em maior quantidades na

fase de alongamento e pre-implantação do embriões (Mathialagan et al., 1992) podendo ser essencial para a implantação e sucesso da gestação (Yang et al., 2016). Deste modo é possível que alterações significativas de expressões gênicas de *IL-6* só ocorram próximo ao período de implantação, que em bovinos ocorre depois do dia 18 de gestação (Hansen et al., 2010).

De um modo geral, o sêmen provoca mudanças na função imune da fêmea podendo promover um estado de tolerância imunológica facilitando a aceitação materna durante a implantação do embrião (Robertson et al., 2009; Robertson e Sarah et al., 2002). Bellinge et al. (1986) depositaram sêmen na vagina de mulheres submetidas à fertilização *in vitro* no dia da fecundação do ovócito e observaram que a taxa de implantação foi de 53% em comparação a 23% do grupo controle. Em leitoas a infusão intra-uterina de plasma seminal duas horas antes de inseminação artificial aumentou o número de embriões viáveis (O'Leary et al., 2004). Durante a monta natural em bovinos, o líquido seminal é depositado na vagina e os espermatozoides migram através da cérvix para o útero, deixando a maior parte do plasma seminal no trato inferior (Alghamdi et al., 2009). Desta forma, pouco se sabe sobre as interações entre o fluido seminal e o trato reprodutivo da fêmea bovina (Schjenken e Robertson, 2014), no presente estudo, o plasma seminal juntamente com os espermatozoides mortos influenciaram a expressão de RNAm dos genes *IL-1 β* e *IL-2* no endométrio, demonstrando sua interação com o ambiente uterino. Deste modo é necessário mais estudos sobre a ação do plasma seminal influenciando a tolerância imunológica uterina em bovinos.

A administração intrauterina de PBMC autólogas cultivadas *in vitro* durante 24 horas aumentou a taxa de gestação das vacas tratadas em relação as do controle (76,7% e 59,7%, respectivamente) (Ideta et al., 2010a). Em mulheres que

apresentavam abortos de repetição após TE-PIV, a administração intrauterina de PBMCs autólogas cultivadas por 48 horas com adição de hCG e PBMCs frescas proporcionou resultados significativamente superiores para taxa de gestação, implantação e nascimento (41,2; 23,4 e 35,3%, respectivamente) quando comparado com pacientes não tratadas (11,1; 4,1 e 5,5%, respectivamente) (Yoshioka et al., 2006). Da mesma forma, a infusão intra-uterina de PBMCs autólogas a fresco melhorou a taxa de gestação e implantação embrionária (42,1% e 25%, respectivamente) em comparação ao grupo não tratado (16,7% e 9,4%, respectivamente) em mulheres que receberam transferência de embriões após três ou mais falhas repetidas de FIV (Okitsu et al., 2011). No presente estudo as PBMCs foram coletadas e congeladas a -80°C e administradas após o descongelamento, diferente de outros trabalhos que utilizaram células frescas ou cultivadas por 24 a 48 horas e tratadas com hCG.

O presente estudo analisou o efeito da sensibilização imunológica na expressão de RNAm dos genes *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-6*, *IL-17*, *IFNG* e *LIF* relacionados ao início da gestação, através da indução imunológica. A influência do embrião no ambiente uterino não foi avaliada, permanecendo as fêmeas vazias durante o experimento. Segundo Oliveira et al. (2013) o perfil imune do endométrio bovino no ciclo estral favorece um ambiente em antecipação à gestação e a presença do embrião colabora para ajustar este ambiente. Conforme Forde et al. (2011), a expressão gênica no endométrio de novilhas gestantes e cíclicas não foi alterada devido à presença ou não do embrião nos dias 5, 7 e 13 após a ovulação em relação ao reconhecimento materno da gestação. Deste modo, provavelmente a ausência do embrião não influenciou nossos resultados

4.3. Expressão dos genes *IL-17*, *LIF* e *IFNG*

Diversas amostras analisadas não apresentaram amplificação dos genes *IL-17*, *LIF* e *IFNG* de forma significativa, mesmo após repetição da análise em duplicata por mais duas vezes. É possível que a expressão desses genes seja baixa nos 7 e 14 do ciclo estral, mesmo após a indução imunológica. Tanto o *IFNG* como a *IL-17* são citocinas pró-inflamatórias e estão relacionadas com a morte fetal. Segundo Oliveira et al. (2007) o *IFNG* induz a morte das células luteais bovinas podendo apresentar efeitos citotóxicos diretos. A citocina *IL-17* produzidas por células Th17 induz a expressão de muitos mediadores de inflamação sendo importante na iniciação e manutenção de processos inflamatórios e na produção de outras citocinas pró-inflamatórias (Pappu e Dong, 2008). Está envolvida na indução de processo inflamatório em doenças patogênicas autoimunes e rejeição de órgãos alogênicos (Crome et al., 2010). Segundo Maeda et al. (2013) em bovinos a progesterona suprime o *IFNG* e o *IL-17* tornando um ambiente favorável para gestação. Deste modo, a baixa proporção de amostras que expressaram os genes *IFNG* e *IL-17* neste estudo pode ser devido à presença de progesterona nos dias 7 e 14 do ciclo estral, mesmo sobre efeito de indução imunológica. Da mesma forma, a baixa quantidade de amostras que continham RNAm para o gene *LIF*, corrobora com os achados de Oshima et al. (2003) que não observaram aumento na expressão do *LIF* nos dias 20-21 após a ovulação em bovinos, acreditando que ele não seja necessário para a implantação do embrião. Estes mesmos autores observaram o aumento da expressão nos dias 48-49 e 74-140 o que poderia estar relacionado ao crescimento e desenvolvimento fetal e com a função das glândulas uterinas neste período. Desta forma é possível que o *LIF* não seja necessário na implantação do embrião, visto que na vaca a “implantação” ocorre depois do dia 18 de gestação (Hansen et al., 2010).

5. Conclusão

Em conclusão, a expressão de RNAm do gene *IL-1 β* foi modulada de modo a promover um ambiente uterino favorável a gestação nas sensibilizações imunológicas com sêmen, PBMCs e ambas juntas. A expressão de RNAm do gene *IL-2* foi maior somente na indução com sêmen. Deste modo, os resultados obtidos sugerem que a sensibilização imunológica pode contribuir para preparar o ambiente uterino para uma gestação.

Referências

- Andrade, G.; Fernandes, M.A.; Knychala, R.M.; Pereira Junior, M.V.; Oliveira, A.J.; Nunes, D.P.; Bonato, G.L.; Santos, R.M., 2012. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Rev. Bras Reprod. Anim. 36, 66-69.
- Berg, D. K.; Van Leeuwen, J.; Beaumont, S.; Berg, M.; Pfeffer, P.L., 2010. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. Theriogenology. 73, 250-60. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.005>
- Clark, F.; Schust, D.J., 2013. Manifestations of immune tolerance in the human female reproductive tract. Front. Immunol. 4, 26. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00026>
- Correia-Álvarez, E.; Gómez, E.; Martín, D.; Carrocera, S.; Pérez, S.; Otero, J.; Peynot, N.; Giraud-Delville, C.; Caamaño, J.N.; Sandra, O.; Duranthon, V.; Muñoz, M., 2015. Expression and localization of interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor (type I) in the bovine endometrium and embryo, J. Reprod. Immunol. 110, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.03.006>
- Crome, S.Q., Wang, A.Y., Levings, M.K., 2010. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. Clin. Exp. Immunol. 159, 109–119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04037.x>
- Dinarelli, C. A., 2002. The IL-1 family and inflammatory diseases. Clin. Exp. Rheumatol. 20, S1–S13.

- 462 Emond, V., Fortier, M.A., Murphy, B.D., Lambert, R.D., 1998. Prostaglandin E2 regulates both
 463 interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene expression in bovine
 464 lymphocytes. *Biol. Reprod.* 58, 143-151. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.1.143>
- 465 Forde, N., Carter, F., Spencer, T.E., Bazer, F.W., Sandra, O., Mansouri-Attia, N., Okumu, L.A.,
 466 McGettigan, P.A., Mehta, J.P., McBride, R., O'Gaora, P., Roche, J.F., Lonergan, P., 2011.
 467 Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she
 468 is pregnant? *Biol. Reprod.* 85, 144-156. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.090019>
- 469 Hansen, P.J. 1997. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. *Theriogenology*
 470 47:121–130. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00346-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00346-9)
- 471 Hansen, T.R., Henkes, L.K., Ashley, R.L., Bott, R.C., Antoniazzi, A.Q., Han, H., 2010. Endocrine actions
 472 of interferon-tau in ruminants. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 67, 325-340. [https://doi.org/10.5661/RDR-](https://doi.org/10.5661/RDR-VII-325)
 473 [VII-325](https://doi.org/10.5661/RDR-VII-325)
- 474 Ideta, A., Hayama, K., Nakamura, Y., Sakurai, T., Tsuchiya, K., Tanaka, S., Yamaguchi, T., Fujiwara,
 475 H., Imakawa, K., Aoyagi, Y., 2010 a. Intrauterine administration of peripheral blood mononuclear
 476 cells enhances early development of the pre-implantation bovine embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 77,
 477 954-962. <https://doi.org/10.1002/mrd.21243>
- 478 Ideta, A., Sakai, S., Nakamura, Y., Urakawa, M., Hayama, K., Tsuchiya, K., Fujiwara, H., Aoyagi, Y.,
 479 2010b. Administration of peripheral blood mononuclear cells into the uterine horn to improve
 480 pregnancy rate following bovine embryo transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 117(1-2), 18-23.
 481 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.04.004>
- 482 Kimura, K., Matsuyama, S., 2014. Successful nonsurgical transfer of bovine elongating conceptuses
 483 and its application to sexing. *J Reprod Dev.* 60(3), 210-215. <https://doi.org/10.1262/jrd.2013-137>
- 484 Koch, C.A., Platt, J.L., 2003. Natural mechanisms for evading graft rejection: the fetus as an allograft.
 485 *Springer Semin. Immunopathol.* 25, 95-117. <https://doi.org/10.1007/s00281-003-0136-0>
- 486 Lee, S.K., Kim, J.Y., Lee, M., Gilman-Sachs, A., Kwak-Kim, J., 2012. Th17 and Regulatory T cells in
 487 Women with Recurrent Pregnancy Loss. *Am J Reprod Immunol.* 67, 311-318.
 488 <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01116.x>

- 489 Leung, S. T., Derecka, K., Mann, G. E., Flint, A. P. F., Wathes, D. C., 2000. Uterine lymphocyte
490 distribution and interleukin expression during early pregnancy in cows. *J. Reprod. Fertil.* 119, 25–
491 33.
- 492 Liao, W., Lin, J.X., Leonard, W.J., 2013. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses,
493 Tolerance, and Immunotherapy, *Immunity* 38(1), 13-25.
494 <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.01.004>
- 495 Maeda, Y., Ohtsuka, H., Tomioka, M., Oikawa, M., 2013. Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and
496 Regulatory Tcell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows.
497 *Vet. Res. Commun.* 37, 43–49. <https://doi.org/10.1007/s11259-012-9545-7>
- 498 Martins, T.M., Santos, R.L., Paixão, T.A., Mol, J.P.S., Muniz, C.S., Borges, Á.M., 2016. Modelo
499 experimental de endometrite em vacas inoculadas com *Escherichia coli* inativada por meio de
500 infusão uterina. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 68(1), 247-251. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8133>
- 501 Mathialagan, N., Bixby, J. A., Roberts, R. M., 1992. Expression of interleukin-6 in porcine, ovine, and
502 bovine preimplantation conceptuses. *Mol. Reprod. Dev.* 32(4), 324-330.
503 <https://doi.org/10.1002/mrd.1080320404>
- 504 Michelon, T.; Da Silveira, J. G.; Graudenz, M.; Neumann, J. 2006. Imunologia da gestação. *Revista*
505 *amrigs*, 50(2), 145-151.
- 506 Minten, M. A., Bilby, T.R., Bruno, R.G.S., Allen, C.C., Madsen, C.A., Wang, Z., Sawyer, J.E., Tibary, A.,
507 Neibergs, H.L., Geary, T.W., Bauersachs, S., Spencer, T.E., 2013. Effects of fertility on gene
508 expression and function of the bovine endometrium. *PLoS One.* 8(8), e69444.
509 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069444>
- 510 Muñoz, M., Corrales, F.J, Caamaño, J.N., Díez, C., Trigal, B., Mora, M.I., Martín, D., Carrocera, S.,
511 Gómez, E., 2012. Proteome of the Early Embryo–Maternal Dialogue in the Cattle Uterus. *J.*
512 *Proteome Res.* 11, 751–766.
- 513 Munoz-Suano, A., Hamilton, A.B., Betz, A.G., 2011. Gimme shelter: the immune system during
514 pregnancy. *Immunol. Rev.* 241, 20–38. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x>

- 515 Neves, J.P., Miranda, K.L., Tortorella, R.D., 2010. Progresso científico em reprodução na primeira
 516 década do século XXI. Rev Bras Zootecn. 39, 414-421. [https://doi.org/10.1590/S1516-](https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300046)
 517 [35982010001300046](https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300046)
- 518 Nothnick, W.B., Pate, J.L., 1990. Interleukin-1 β is a Potent Stimulator of Prostaglandin Synthesis in
 519 Bovine Luteal Cells. Biol. Reprod. 43(5), 898-903. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.5.898>
- 520 Okitsu, O., Kiyokawa, M., Oda, T., Miyakea, K., Sato, Y., Fujiwara, H., 2011. Intrauterine administration
 521 of autologous peripheral blood mononuclear cells increases clinical pregnancy rates in
 522 frozen/thawed embryo transfer cycles of patients with repeated implantation failure. J. Reprod.
 523 Immunol. 92, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.07.001>
- 524 Oliveira, M.A.; Tarazona, A.M.; Ruíz, T.C.; Giraldo, C.E. 2007. Vías implicadas en la luteólisis bovina.
 525 Rev Colomb Cienc Pec. 20, 387-393.
- 526 Oliveira, L. J., Mansourri-Attia, N., Fahey, A.G., Browne, J., Forde, N., Roche, J.F., Lonergan, P., Fair,
 527 T. 2013. Characterization of the Th profile of the bovine endometrium during the oestrus cycle and
 528 early pregnancy. PLoS One. 8(10), e75571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075571>
- 529 Oshima, K., Watanabe, H., Yoshihara, K., Kojima, T., Dochi, O., Takenouchi, N., Fukushima, M.,
 530 Komatsu, M. 2003. Gene expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and macrophage colony
 531 stimulating factor (M-CSF) in bovine endometrium during early pregnancy. Theriogenology. 60,
 532 1217–1226. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01365-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01365-1)
- 533 Pappu, B.P., Angkasekwina, P., Dong, C., 2008. Regulatory mechanisms of helper T cell differentiation:
 534 New lessons learned from interleukin 17 family cytokines. Pharmacol. Ther. 117(3), 374–384.
 535 <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.12.003>
- 536 Robertson, S. A., 2005. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. Cell
 537 Tissue Res. 322, 43–52. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-1127-3>
- 538 Schjenken, J.E., Robertson, S.A., 2014. Seminal Fluid and Immune Adaptation for Pregnancy –
 539 Comparative Biology in Mammalian Species. Reprod. Domest. Anim. 49, 27–36.
 540 <https://doi.org/10.1111/rda.12383>

- 541 Sherwin, J.R., Freeman, T.C., Stephens, R.J., Kimber, S., Smith, A.G., Chambers, I., Smith, S.K.,
 542 Sharkey, A.M. 2004. Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse
 543 uterus at the time of implantation. *Mol. Endocrinol.* 18(9), 2185-2195.
 544 <https://doi.org/10.1210/me.2004-0110>
- 545 Sreenan, J.M., Diskin, M.G. 1987. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow.
 546 *Therio* 27, 99–113. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(87\)90073-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(87)90073-2)
- 547 Sica, A., Matsushima, K., Van Damme, J., Wang, J.M., Polentarutti, N., Dejana, E., Colotta, F.,
 548 Mantovani, A., 1990. IL-1 transcriptionally activates the neutrophil chemotactic factor/IL-8 gene in
 549 endothelial cells. *Immunology.* 69, 548 –53.
- 550 Walker, C. G., Meier, S., Mitchell, M.D., Roche, J.R., Littlejohn, M., 2009. Evaluation of real-time PCR
 551 endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. *Bmc Mol Biol.*
 552 10(1), 100. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-100>
- 553 Wang, J.M., Sica, A., Peri, G., Walter, S., Padura, I.M., Libby, P., Ceska, M., Lindley, I., Colotta, F.,
 554 Mantovani, A. 1991. Expression of monocyte chemotactic protein and interleukin-8 by cytokine-
 555 activated human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 11, 1166 –74.
 556 <https://doi.org/10.1161/01.ATV.11.5.1166>
- 557 Yang L., Zhang L.Y., Qiao H.Y., Liu N., Wang Y.X., Li S.J., 2014. Maternal immune regulation by
 558 conceptus during early pregnancy in the bovine. *Asian J Anim Vet Adv.* 9, 610-620.
 559 <https://doi.org/10.3923/ajava.2014.610.620>
- 560 Yang L., Wang Y., Ma X., Wang S., Zhang L., 2016. Changes in expression of Th1 and Th2 cytokines
 561 in bovine peripheral blood mononuclear cells during early pregnancy. *Indian J Anim Res.* 50(4),
 562 466-470.
- 563 Yoshioka, S., Fujiwara, H., Nakayama, T., Kosaka, K., Mori, T., Fujii, S., 2006. Intrauterine
 564 administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in
 565 patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. *Hum. Reprod.* 21(12), 3290-3294.
 566 <https://doi.org/10.1093/humrep/del312>

Yu, N., Yang, J., Guo, Y., Fang, J., Yin, T., Luo, J., Li, X., Li, W., Zhao, Q., Zou, Y., Xu, W., 2014.
Intrauterine Administration of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Improves Endometrial
Receptivity in Mice with Embryonic Implantation Dysfunction. *Am J Reprod Immunol.* 71, 24–33.
<https://doi.org/10.1111/aji.12150>

Zhang, L., Xia, Y., Tang, F., Li, S.J., Yang, L., Wang, B., 2015. The regulation of intrauterine immune
cytokines and chemokines during early pregnancy in the bovine, *Large Anim Ver.* 21, 23-31.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da expressão de transcritos de genes relacionados com processos imunológicos no útero é uma grande ferramenta para a análise molecular relacionada a processos de inumolerância fetal assim como também em inflamações uterinas pós-parto.

As maiorias das perdas embrionárias ocorrem no começo da gestação por volta dos dias 7 a 16, em decorrência de um não reconhecimento da gestação. A ausência de uma modulação imunológica do ambiente uterino de forma a aceitar a presença do embrião durante a gestação pode ser a causa de muitos casos de perdas embrionárias. Uma sensibilização imunológica desse ambiente uterino pode preparar o sistema imune para receber de forma aceitável um embrião alogênico. Diferente de um embrião semi-alogênico gerado por monta natural ou inseminação artificial, o embrião produzido *in vitro* quando introduzido em uma fêmea receptora se comporta de forma alogênica, ou seja, totalmente estranho ao sistema imune da “mãe”, uma vez que tanto a parte paterna como a materna do embrião é antigênica à receptora, podendo aumentar ainda mais os índices de perdas gestacionais. Os resultados observados nesse estudo comprovam que a sensibilização com antígenos materno e paternos provoca alterações que podem ser favoráveis a tolerância imune do embrião. Apesar deste indicativo, em bovinos pouco se sabe sobre esse mecanismo de imunotolerância, sendo necessários novos estudos.

A análise de expressão gênica também pode ser uma ferramenta de estudo em processos inflamatórios no pós-parto. A identificação da endometrite subclínica geralmente é realizado por citologia endometrial, que no presente estudo demonstrou ser o método mais eficaz do que a análise da expressão genica. A expressão de genes relacionados ao processo inflamatório uterino só apresentou valores significativos quando a inflamação foi grave, desta forma os processos leves não seriam identificados. Também observamos que o *cytobrush* é mais indicado para expressão gênica além de ser uma técnica de coleta mais rápida e segura do que a biopsia uterina. Outro ponto importante é que não houve diferenças significativas na expressão gênica entre as biopsias das regiões carunculares e intercarunculares para inflamação uterina, deste modo coletas realizadas *in vivo* não precisariam preocupar com a identificação da região amostrada.

ANEXO 1: Certificado da comissão de ética na utilização de animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –

CERTIFICADO



Certificamos que o projeto intitulado “Indução imunológica por antígenos maternos e paternos em fêmeas bovinas receptoras de embriões produzidos *in vitro*”, protocolo nº 023/15, sob a responsabilidade de Marcelo Emílio Beletti – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica– encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de 22/05/2015.

(We certify that the project entitled " Indução imunológica por antígenos maternos e paternos em fêmeas bovinas receptoras de embriões produzidos *in vitro* ", protocol 023/15, under the responsibility of Marcelo Emílio Beletti - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of 22/05/2015).

Vigência do Projeto	Início: 01/06/15 / Término: 30/04/16
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	<i>Bos taurus</i> (bovino).
Número de animais	50
Peso / Idade	Fêmeas: 400 / Machos: 600 Kg – 3 a 6 anos
Sexo	4 macho + 46 Fêmeas
Origem / Local	Fazenda Represa (Monte Alegre de Minas/MG) e Fazenda Bom Jardim (Uberlândia/MG)
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 10 de junho de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

ANEXO 2: Normas para a publicação da revista Theriogenology

AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018 www.elsevier.com/locate/theriogenology 1

THERIOGENOLOGY

An International Journal of Animal Reproduction

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

- **Description**
- **Audience**
- **Impact Factor**
- **Abstracting and Indexing**
- **Editorial Board**
- **Guide for Authors**

ISSN: 0093-691X

DESCRIPTION

Theriogenology provides an international forum for researchers, clinicians, and industry professionals in **animal reproductive biology**. This acclaimed journal publishes articles on a wide range of topics in **reproductive and developmental biology**, of domestic mammal, avian, and aquatic species as well as wild species which are the object of veterinary care in research or conservation programs.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discount on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Individuals involved in animal reproduction biology.

IMPACT FACTOR

2016: 1.986 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018 www.elsevier.com/locate/theriogenology 2

ABSTRACTING AND INDEXING

Focus on: Veterinary Science and Medicine

AGRICOLA

CAB Abstracts

Global Health (Index Veterinarius, Veterinary Bulletin)

MEDLINE®

BIOSIS

Chemical Abstracts

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

Elsevier BIOBASE

Science Citation Index

Derwent Biotechnology Abstracts

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

F. Gandolfi, DVM, Istituto di Anatomia degli Animali Domestici, Milan, Italy

Associate Editors

L. Brito, Madison, WI, USA

D.C. Sharp, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

Editorial Board

C. Aurich, Veterinarmedizinische Universität Wien, Vienna, Austria

M.R. Bakst, United States Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, USA

I. Barrier Battut, Ecole Nationale Professionnelle des Haras, Exmes, France

S.J. Bedford-Guaus, Center for Regenerative Medicine in Barcelona, Barcelona, Spain

S. Bilodeau-Goeseels, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Lethbridge, Alberta, Canada

R. Boni, University of Basilicata, Potenza, Italy

P. Comizzoli, Smithsonian's National Zoological Park, Washington, District of Columbia, USA

M-A. Driancourt, Astek Consult, Chateauneuf sur Sarthe, France

B. Gadella, Utrecht University, Utrecht, Netherlands

F.C. Gwazdauskas, Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg, Virginia, USA

K. Hinrichs, Texas A&M University, College Station, Texas, USA

S. Hochi, Shinshu University, Ueda, Japan

R. Kasimanickam, Washington State University, Washington, USA

K. Kikuchi, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan

H. Men, University of Missouri, Columbia, Missouri, USA

S. Nagy, Pannon Egyetem, Veszprém, Hungary

H. Niemann, Institute of Farm Animal Genetics, Neustadt, Germany

C.E. Pope, Audubon Center for Research of Endangered Species, New Orleans, Louisiana, USA

T. Rijsselaere, Universiteit Gent, Merelbeke, Belgium

N. Songsasen, Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, Virginia, USA

M. Thibier, Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche, Paris, France

J.C. Thundathil, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada

M. Yeste, Universitat de Girona, Girona, Spain

AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018 www.elsevier.com/locate/theriogenology 3

GUIDE FOR AUTHORS**Introduction**

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Aims and Scope

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of Articles

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to

the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018 www.elsevier.com/locate/theriogenology 4

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed. All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If

there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018 www.elsevier.com/locate/theriogenology 5
Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in

these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following

Creative Commons

user licenses:

AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018 www.elsevier.com/locate/theriogenology 6

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate

amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#). This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/therio/>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018 www.elsevier.com/locate/theriogenology 7

Pages and lines should be numbered.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering).

Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, nonstandard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018 www.elsevier.com/locate/theriogenology 9

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018
www.elsevier.com/locate/theriogenology 10

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style.

If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text. *Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. J Sci Commun 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [5] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018 www.elsevier.com/locate/theriogenology 11 text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project. Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of

these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#). For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect. In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online. For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018 www.elsevier.com/locate/theriogenology 12

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. [More information and examples](#). Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

Additional Style Notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oögonium: female gamete before meiosis
 - oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
 - oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
 - ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)
 - germinal vesicle: nucleus of the ovum
 - zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
 - embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
 - fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
 - conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018 www.elsevier.com/locate/theriogenology 13
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
 - premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
 - stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use

"section" or "hysterotomy." The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods): theriochart.jpgchart *Units of Measure*

cpm - counts per min

dpm - disintegrations per min

g - gram
 ga - gauge of hypodermic needle
 h - hour
 kg - kilogram
 L - liter
 mL - milliliter
 µL - microliter
 m - meter
 min - minute
 mo - month
 s - second
 v:v - volume ratio
 wk - week
 wt/vol - weight per volume
 y - year

Routes of treatment

id - intradermal
 im - intramuscular
 iu - intrauterine
 iv - intravenous
 sc - subcutaneous
 po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance
 CV - coefficient of variation
 df - degrees of freedom
 F - variance ratio
 NS - not significant
 P - probability
 SD - standard deviation
 SEM - standard error of the mean
 r - correlation coefficient
 r² - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition.
- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

AUTHOR INFORMATION PACK 30 Jan 2018 www.elsevier.com/locate/theriogenology 14

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to

authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

ANEXO 3: Normas da revista Animal Reproduction Science

Animal Reproduction Science An International Journal



Introduction

Types of Paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles

Original Research Papers should report the results of research that comprises one or a series of experiments. The paper should contribute to increasing our understanding of the biology and/or manipulation of reproduction in animals. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited. Invited reviews will normally be solicited by the Review's Editor, but suggestions for appropriate review topics may be sent to:

K.L. Macmillan
University of Melbourne
Veterinary Clinical Centre
250 Princess Highway
VIC 3030 Werribee, Australia
k.macmillan@unimelb.edu.au

Contact details for submission

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the [Elsevier Support Center](#). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).



Before You Begin

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Animal Reproduction Science*.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or

organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.evise.com/profile/api/navigate/ANIREP>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more

details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



Preparation

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

Article structure

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h $\times$ w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication,

etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/animal-reproduction-science>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March

2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1.
<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on

ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. [More information and examples](#). Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.



After Acceptance

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



Author Inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#)