

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

CARLA CRISTIAN CAMPOS

**DESEMPENHO REPRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS LACTANTES
ACOMETIDAS PELA MASTITE CLÍNICA DE OCORRÊNCIA
ESPONTÂNEA OU INDUZIDA POR LPS DE *Escherichia coli***

UBERLÂNDIA
2017

CARLA CRISTIAN CAMPOS

**DESEMPENHO REPRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS LACTANTES
ACOMETIDAS PELA MASTITE CLÍNICA DE OCORRÊNCIA
ESPONTÂNEA OU INDUZIDA POR LPS DE *Escherichia coli***

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.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ricarda Maria dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Ronaldo Luís Aoki Cerri

UBERLÂNDIA

2017

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

C198d
2017

Campos, Carla Cristian, 1987

Desempenho reprodutivo de vacas leiteiras lactantes acometidas pela mastite clínica de ocorrência espontânea ou induzida por LPS de Escherichia coli / Carla Cristian Campos. - 2017.

120 p. : il.

Orientadora: Ricarda Maria dos Santos.

Coorientador: Ronaldo Luís Aoki Cerri.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.12>

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Bovino - Doenças - Teses. 3. Mastite bovina - Teses. 4. Bovino - Reprodução - Teses. I. Santos, Ricarda Maria dos. II. Cerri, Ronaldo Luís Aoki. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

**DESEMPENHO REPRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS LACTANTES
ACOMETIDAS PELA MASTITE CLÍNICA DE OCORRÊNCIA
ESPONTÂNEA OU INDUZIDA POR LPS DE *Escherichia coli***

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

Uberlândia, 05 de maio de 2017.

Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos (Orientadora) - FAMEV/UFU

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

Profa. Dra. Kele Amaral Alves - FAMEV/UFU

Profa. Dra. Letícia Zoccolaro Oliveira - UFF

Dra. Paula Regina Basso Silva - University of Minnesota

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CARLA CRISTIAN CAMPOS - Nascida em Uberlândia, Minas Gerais, em 04 de agosto de 1987, filha de Carlos Mendes Borges e Vonila Alves de Campos Borges. Médica veterinária graduada pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em agosto de 2010. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) no ano de 2008. Em 2011 iniciou o curso de Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias na UFU, na área de concentração em Produção Animal, durante o qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) de março de 2012 a fevereiro de 2013. Ainda em 2013 iniciou o curso de Doutorado pela mesma universidade. Durante o período de dezembro de 2014 a setembro de 2015, realizou o estágio de doutorado sanduíche no exterior (PDSE) financiado pela CAPES no Canadá, onde trabalhou com eficiência reprodutiva de bovinos leiteiros. A aluna foi bolsista de doutorado no período de julho de 2014 a fevereiro de 2017. Atua nas áreas de bovinocultura de corte e leite, inseminação artificial convencional e em tempo fixo (IATF), ultrassonografia.

Dedico esse trabalho à minha querida
avó Juracy Pina Ferreira (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela saúde, pela sabedoria e pela sua proteção divina ao longo desta caminhada.

Aos meus queridos pais Carlos e Vonila, que sempre me apoiaram incondicionalmente durante todas as etapas da minha vida, especialmente na minha carreira profissional. Obrigada pelo carinho, amor, paciência e auxílio de sempre...amo muito vocês!

À minha orientadora e amiga, Ricarda, por todos os ensinamentos, pelo apoio, pela paciência e principalmente pelo exemplo de disciplina, competência e amor à nossa profissão. Muito do que sei hoje devo à ela.

Ao meu noivo Mateus, que em momento algum se opôs às minhas mudanças de cidade que ocorreram em função do doutorado, pelo contrário, sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos e a trilhar novos caminhos. Obrigada pelo seu carinho, respeito e compreensão.

Às amizades que construí no Canadá, Gabriela e Águida, vocês foram o meu braço direito, o meu porto seguro e o meu ombro amigo perante as inúmeras dificuldades que a experiência de morar em outro país nos proporcionou. Palavras não são suficientes para expressar a imensa gratidão que sinto por Deus ter colocado vocês em meu caminho, obrigada por tudo.

Às minhas amigas da graduação, Fernanda e Paula, a ajuda de vocês foi imprescindível para a conclusão deste trabalho, além de todos os momentos divertidos que pudemos compartilhar, a vocês o meu muito obrigada! Contem comigo sempre.

Aos meus amigos da pós-graduação, Andreia, Flávia, Inês, Mayara, Renata e Estevão, que também escolheram trilhar esse caminho e compartilharam comigo diversas experiências ao longo desses últimos quatro anos. Desejo a vocês muito sucesso!

Ao meu co-orientador Ronaldo e à todos os colaboradores e alunos da UBC *Dairy Education and Research Centre*, pela acolhida e pelo aprendizado que tive durante a minha estadia no Canadá.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, em especial à secretária Célia Regina, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão das bolsas de estudo tanto no Brasil quanto no Canadá.

Aos professores que aceitaram participar como membros da banca de defesa, João Paulo, Kele, Letícia e Paula. Obrigada pelas contribuições em prol da melhoria deste trabalho.

Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa.”

Madre Tereza de Calcutá

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

José de Alencar

RESUMO

A elevada incidência de mastite clínica nos rebanhos leiteiros é responsável por prejuízos para a atividade, dentre os quais destaca-se a queda na produção e na qualidade do leite, além da baixa eficiência reprodutiva das vacas acometidas pela infecção. Esta tese foi subdividida em três capítulos. O primeiro capítulo aborda as considerações gerais do tema em questão. No capítulo II objetivou-se avaliar os efeitos da ocorrência de um ou mais casos de mastite clínica (MC), associados ou não à ocorrência de doenças reprodutivas puerperais (metrite e retenção de placenta), sobre os parâmetros reprodutivos, bem como verificar o efeito da relação temporal entre a MC e a inseminação artificial (IA) mais próxima sobre a taxa de concepção de vacas leiteiras das raças Girolando e Holandesa. Como resultado, a ocorrência de MC aumentou o número de serviços por concepção e o intervalo parto-concepção, sem alterar a concepção à primeira IA pós-parto. Os efeitos da MC sobre os parâmetros reprodutivos foram ainda mais pronunciados quando as vacas apresentaram dois ou mais casos de MC na mesma lactação. A ocorrência de MC dentro dos 42 dias antes ou 35 dias após a IA afetou de forma semelhante a taxa de concepção. A associação entre MC e doenças reprodutivas puerperais promoveu um efeito aditivo negativo sobre o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras das raças Girolando e Holandesa. Já no capítulo III objetivou-se avaliar os efeitos de duas infusões intramamárias de lipopolissacarídeo (LPS) feitas aos 5 e 10 dias após a IA sobre os parâmetros inflamatórios e reprodutivos, e sobre a expressão gênica do endométrio e do concepto durante a fase inicial da gestação de vacas leiteiras Holandesas. Dos parâmetros inflamatórios analisados, apenas a temperatura reticular e a contagem de células somáticas (CCS) foram alterados pelo desafio com LPS, enquanto a produção de leite e a concentração sérica de haptoglobina apresentaram uma tendência de redução e aumento, respectivamente, no grupo dos animais tratados em relação ao controle. Nenhum dos parâmetros reprodutivos avaliados, especialmente a concentração plasmática de progesterona, sofreu influência do desafio intramamário com LPS. Com relação à expressão gênica dos tecidos endometrial e embrionário, 13 dos 100 genes analisados foram diferentemente expressos, sendo 11 no endométrio e 2 no concepto. Conclui-se que os efeitos decorrentes da infecção e da inflamação da glândula mamária são capazes de alterar tanto o desempenho reprodutivo quanto o perfil da expressão gênica do útero e do concepto durante os primeiros quinze dias de gestação em vacas leiteiras.

Palavras-chave: bovinos, eficiência reprodutiva, gestação, inflamação

ABSTRACT

The high incidence of clinical mastitis in dairy herds is responsible for impairments to the dairy livestock, such as the decrease on milk production and quality, and poor reproductive efficiency of sick cows. This thesis was subdivided in three chapters. The first chapter approaches general considerations about the theme. On chapter II, the objective was to evaluate the effects of the occurrence of one or more clinical mastitis (CM) cases, associated or not with puerperal reproductive diseases (metritis and retained placenta), on reproductive parameters, as well as verify the temporal relation between CM and the nearest artificial insemination (AI) on the conception rate of Girolando and Holstein lactating cows. As a result, CM occurrence increased the number of services per conception and calving to conception interval, without altering the conception at first AI postpartum. The effects of CM on reproductive parameters were even more pronounced when cows had two or more CM cases in the same lactation. CM occurrence within 42 days before or 35 days after AI affected in the same way the conception rate. The association among CM and reproductive diseases promoted a negative addictive effect on reproductive performance of Girolando and Holstein lactating dairy cows. Objectives of the chapter III were to evaluate the effects of two intramammary infusions of lipopolysaccharide (LPS) performed on 5 and 10 days after AI on inflammatory and reproductive parameters, and its effects on endometrial and conceptus gene expression during early pregnancy of lactating Holstein cows. From inflammatory parameters analysed, only reticular temperature and somatic cell count (SCC) were altered by LPS challenge, while milk yield and serum haptoglobin concentration showed a tendency of reduction and increase respectively, on treated group compared with control. None of the evaluated reproductive parameters, especially plasmatic progesterone concentration, were influenced by LPS intramammary challenge. In relation to the endometrial and embryonic tissues gene expression, 13 from the 100 analysed genes were differently expressed, 11 from endometrium and 2 from conceptus. In summary, the effects due to infection and inflammation of the mammary gland are able to alter reproductive performance as well as gene expression profile of the uterus and conceptus during the first 15 days of gestation of lactating dairy cows.

Key words: bovine, inflammation, pregnancy, reproductive efficiency

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Principais características da inflamação aguda, um mecanismo inato composto por células e outros mecanismos de defesa. A inflamação aguda é desencadeada por invasão microbiana e lesão tissular.

Figura 2. Vias potenciais pelas quais a infecção da glândula mamária pode reduzir a sobrevivência embrionária. De acordo com esse modelo, o fenômeno central que leva à mortalidade embrionária associado à mastite é o aumento na secreção de citocinas (tanto produzidos na glândula mamária e drenados pelos linfonodos quanto secretados ou produzidos por outros tecidos em resposta aos sinais derivados da glândula mamária) que por sua vez, modulam a função reprodutiva em diferentes níveis.

Figura 3. Eventos iniciais da gestação em ovinos. Este esquema resume as mudanças no desenvolvimento do embrião/blastocisto após a fertilização em relação à posição no trato reprodutor feminino e aos níveis circulantes dos hormônios esteroides. Fertilização ocorre no oviduto e o embrião em estágio de mórula entra no útero nos dias 4-5. Forma de blastocisto no dia 6, eclode da zona pelúcida no dia 8, transição da forma esférica para tubular no dia 11 e depois elonga para concepto filamento entre os dias 12 e 16, com o início da implantação envolvendo aposição e anexo transiente (dias 12-15) e firme adesão no dia 16. Por volta do dia 17, o concepto filamento ocupa inteiramente o corno uterino ipsilateral e se alonga em direção ao corpo do útero dentro do corno contralateral.

CAPÍTULO III

Figure 1. Diagram of the study. Presynchronization protocol between days -29 and 20, ovulation synchronization between days -10 and 0 with two PGF2 α injections on day -3 and two inseminations, the first one immediately after the last GnRH injection (day -1) and the second \pm 12h after the first AI. The ovaries of the cows were scanned by ultrasound to evaluate the response to the hormonal treatment. On days 5 and 10 relative to the last AI, intramammary infusions were performed while on day 15 uterine

flushing and endometrial biopsies were performed. Blood and milk samples were taken at different times during the trial.

Figure 2. Daily average milk yield (kg of milk/cow/day) according to treatment and day relative to each intramammary infusion. Treatments: control = cows were infused twice with saline on days 5 and 10 relative to AI; LPS = cows were infused twice with 25 µg of LPS on days 5 and 10 relative to AI. Treatment - $P = 0.09$, day relative to each infusion - $P = 0.05$, and the interaction between treatment and day relative to each infusion - $P = 0.28$. Results are reported as LSM ± SEM.

Figure 3A and 3B. Somatic cell count (SCC) (*1000 cells/mL of milk) according to treatment and day relative to each intramammary infusion. First infusion (A) and second infusion (B). Treatments: control = cows were infused twice with saline on days 5 and 10 relative to AI; LPS = cows were infused twice with 25 µg of LPS on days 5 and 10 relative to AI. Treatment - $P < 0.01$, day relative to each infusion - $P > 0.10$, hour relative to each infusion - $P < 0.01$. The interactions between treatment and day relative to each infusion - $P > 0.10$, treatment and hour relative to each infusion - $P < 0.01$, and treatment, day and hour - $P > 0.10$. Results are reported as LSM ± SEM.

Figure 4. Haptoglobin serum concentration (OD @450nm) according to treatment and day relative to each intramammary infusion. Treatments: control = cows were infused twice with saline on days 5 and 10 relative to AI; LPS = cows were infused twice with 25 µg of LPS on days 5 and 10 relative to AI. Treatment - $P = 0.09$, day relative to each infusion - $P < 0.01$, and the interaction between treatment and day relative to each infusion - $P < 0.01$. Results are reported as LSM ± SEM.

Figure 5. Tumor necrose factor alpha (TNF- α) plasmatic concentration (ng/mL) according to treatment and day relative to each intramammary infusion. Treatments: control = cows were infused twice with saline on days 5 and 10 relative to AI; LPS = cows were infused twice with 25 µg of LPS on days 5 and 10 relative to AI. Treatment - $P = 0.42$, day relative to each infusion - $P = 0.12$, and the interaction between treatment and day relative to each infusion - $P = 0.28$. Results are reported as LSM ± SEM.

Figure 6A and 6B. Reticular temperature (RT) ($^{\circ}$ C) according to treatment, day and hour relative to each intramammary infusion. First infusion (A) and second infusion (B). Treatments: control = cows were infused twice with saline on days 5 and 10 relative to AI; LPS = cows were infused twice with 25 μ g of LPS on days 5 and 10 relative to AI. Treatment - $P < 0.01$, day relative to each infusion - $P = 0.46$, hour relative to each infusion - $P < 0.01$. The interactions between treatment and day relative to each infusion - $P = 0.46$, treatment and hour relative to each infusion - $P < 0.01$, and treatment, day and hour - $P = 0.83$. Results are reported as LSM \pm SEM.

Figure 7. Progesterone (P4) plasmatic concentration (ng/mL) according to treatment and day relative to each intramammary infusion. Treatments: control = cows were infused twice with saline on days 5 and 10 relative to AI; LPS = cows were infused twice with 25 μ g of LPS on days 5 and 10 relative to AI. Treatment - $P = 0.69$, day relative to each infusion - $P = 0.12$, and the interaction between treatment and day relative to each infusion - $P = 0.28$. Results are reported as LSM \pm SEM.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Quadro 1. Efeito da ocorrência de um ou mais casos clínicos de mastite sobre a taxa de concepção à primeira inseminação pós-parto, a duração do intervalo parto-concepção e o número de inseminações por concepção de vacas leiteiras de acordo com as fazendas analisadas.

Quadro 2. Efeito da ocorrência de mastite clínica \pm 42 dias antes ou \pm 35 dias após a inseminação sobre a taxa de concepção de vacas leiteiras de acordo com as fazendas analisadas.

Quadro 3. Efeito da ocorrência de mastite clínica, de doenças reprodutivas puerperais ou da associação entre essas doenças sobre a taxa de concepção à primeira inseminação pós-parto, a duração do intervalo parto-concepção e o número de inseminações por concepção de vacas leiteiras de acordo com as fazendas analisadas.

CAPÍTULO III

Table 1. Genes and accession numbers according to National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Table 2. Effect of treatment of lactating dairy cows with intramammary infusions of lipopolysaccharide (LPS) on plasmatic progesterone concentration according to pregnancy status.

Table 3. Effect of treatment¹ of lactating dairy cows with intramammary infusions of lipopolysaccharide (LPS) on endometrial and conceptus gene expression (mRNA \pm SEM) of genes related to cell adhesion molecules, growth and development, immune system, maternal recognition of pregnancy, morphogenesis, steroid biosynthesis, enzyme, protein and receptor.

LISTA DE ABREVIATURAS

AI - *Artificial insemination*

APP - *Acute phase proteins*

BCS - *Body condition score*

BEN - Balanço energético negativo

bST - Somatotropina bovina recombinante

°C - Graus Celsius

CCI - *Calving to conception interval*

CCS - Contagem de células somáticas

CD 14 - *Cluster of differentiation 14*

CIDR - *Controlled internal drug release*

CL - Corpo lúteo

cm - Centímetros

CM - *Clinical mastitis*

CMT - *California mastitis test*

COX - Cicloxygenase

CSV - *Comma-separated value*

DEL - Dias em lactação

DIM - Days in milk

DMI - *Dry matter intake*

DPP - Dias pós-parto

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

E₂ - Estradiol

FSH - Hormônio folículo estimulante

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

h - Hour

Hp - *Haptoglobin*

IA - Inseminação artificial

IATF - Inseminação artificial em tempo fixo

IFN-τ - Interferon tau

IGF-2 - Insulin-like growth factor type 2

IL-1α - Interleucina 1 alfa

IL-1β - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6
i.m. - Intramuscular
IMS - Ingestão de matéria seca
IPC - Intervalo parto-concepção
ISG - *Interferon stimulated genes*
kg - Quilograma
LBP - *Lipopolysaccharide binding protein*
LH - Hormônio luteinizante
LOX - Lipoxigenase
LPS - Lipopolissacarídeo
MC - Mastite clínica
mg - Miligrama
 μ g - Micrograma
mL - Mililitro
mm - Milímetro
mRNA - *Messenger ribonucleic acid*
NEB - *Negative energy balance*
NF- κ B - *Nuclear fator kappa beta*
ng - Nanograma
nm - Nanômetro
OD - *Optical density*
OXT - Ocitocina
 P_4 - Progesterona
PAMP - *Pathogen associated molecular pattern*
PCR - *Polymerase chain reaction*
PG - Prostaglandina
PGA₂ - Prostaglandina A₂
PGE₂ - Prostaglandina E₂
PGF_{2 α} - Prostaglandina F_{2 α}
PGI₂ - Prostaciclina I₂
pH - Potencial hidrogeniônico
PRR - *Pattern recognition receptor*
PVE - Período voluntário de espera
RLT - *Rare left teat*

RNA - *Ribonucleic acid*

RP - Retenção de placenta

RT - *Reticular temperature*

SCC - *Somatic cell count*

SEM - *Standard error of the mean*

TAI - *Timed artificial insemination*

TLR-4 - *Toll like receptor 4*

TMR - *Total mixed ration*

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

TNF-R1 - Receptor tipo 1 do Fator de necrose tumoral

TNF-R2 - Receptor tipo 2 do Fator de necrose tumoral

TxA₂ - Tromboxano A₂

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
1. Introdução.....	19
2. Revisão de literatura.....	21
2.1 Mastite bovina.....	21
2.2 Principais agentes causadores de mastite.....	22
2.2.1 Mastite causada por coliformes.....	23
2.2.1.1 Lipopolissacarídeo (LPS).....	26
2.3 Mecanismos de defesa da glândula mamária.....	27
2.3.1 Barreira física de proteção da glândula mamária.....	28
2.3.2 Respostas inflamatória e imunológica causadas pela mastite.....	29
2.3.2.1 Mediadores da inflamação.....	35
2.3.2.1.1 Citocinas.....	35
2.3.2.1.2 Proteínas de fase aguda.....	38
2.3.2.1.3 Prostaglandinas.....	39
2.4 Mastite clínica induzida.....	41
2.5 Mastite vs. reprodução.....	42
2.5.1 Influência dos mediadores da inflamação sobre os processos reprodutivos.....	44
2.6 Desenvolvimento embrionário inicial e reconhecimento materno da gestação.....	50
Referências.....	55
CAPÍTULO II - A mastite clínica, associada às doenças reprodutivas puerperais, compromete o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras Girolando e Holandesa.....	67
Abstract.....	68
Resumo.....	68
Introdução.....	69
Material e métodos.....	69
Resultados.....	70
Discussão.....	71
Conclusões.....	72
Referências.....	72

CAPÍTULO III - Intramammary infusions of lipopolysaccharide promotes slight inflammation and alters endometrial and conceptus gene expression in lactating Holstein cows.....	75
Interpretative summary.....	76
Abstract.....	77
Introduction.....	78
Material and methods.....	80
Results.....	87
Discussion.....	91
Conclusions.....	97
Acknowledgments.....	97
References.....	98
ANEXO A - Normas do periódico Pesquisa Veterinária Brasileira.....	121
ANEXO B - Normas do periódico <i>Journal of Dairy Science</i>	122

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

(Redigido de acordo com as normas da Biblioteca-UFU)

1. INTRODUÇÃO

O período de transição é marcado por diversas alterações fisiológicas e endócrinas que acometem as vacas leiteiras de alta produção, e como resultado dessas alterações há um aumento da susceptibilidade às infecções no pós-parto, devido à menor competência imunológica das vacas neste período (CAI et al., 1994). A deficiência na função imune está intimamente associada ao agravamento do balanço energético negativo (BEN), visto que no início da lactação a ingestão de alimentos ainda não é suficiente para atingir o requerimento energético necessário para a produção de leite (GRUMMER; MASHEK; HAYIRLI, 2004).

Cerca de 40 a 60% das vacas leiteiras são acometidas por pelo menos um ou mais distúrbios clínicos de saúde nos primeiros 60 dias pós-parto (DPP) (SANTOS et al., 2010) e mais de 50% delas vivenciam pelo menos um tipo de desordem subclínica nas primeiras semanas após o parto (BRADFORD et al., 2015). A alta incidência de doenças no período pós-parto surge como consequência da supressão da atividade imunológica, dos diversos desafios infecciosos aos quais as vacas estão expostas e das adaptações endócrinas e metabólicas requeridas pela lactação.

Dentre as principais doenças que acometem as vacas leiteiras no início da lactação destaca-se a mastite, caracterizada pela invasão e colonização da glândula mamária por microrganismos patogênicos, os quais promovem uma reação inflamatória no organismo do hospedeiro com graves consequências na sua capacidade produtiva. A ocorrência da mastite está associada principalmente às mudanças estruturais que ocorrem na glândula mamária durante a transição da condição não lactante para lactante após o parto, e a severidade do quadro clínico está relacionada ao atraso ou à ineficiência do sistema imune em combater a infecção (VANGROENWEGHE; LAMOTE; BURVENICH, 2005).

Além do comprometimento do desempenho produtivo em decorrência da mastite, a infecção da glândula mamária também influencia negativamente a eficiência reprodutiva dos rebanhos leiteiros, o que pode ser comprovado por meio de alguns índices reprodutivos tais como a queda na taxa de concepção ao primeiro serviço pós-parto, o aumento no número de serviços por concepção, o prolongamento do intervalo parto-concepção e o aumento na taxa de perda de gestação (BARKER et al., 1998; SCHRICK et al., 2001; SANTOS et al., 2004; HERTL et al., 2010; SANTOS et al., 2010). Contudo, devido às semelhanças entre os fatores de risco tanto para a mastite quanto para as disfunções reprodutivas, há uma certa dificuldade em determinar o efeito isolado da infecção sobre a fertilidade.

Embora o impacto negativo das doenças no pós-parto no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras já tenha sido demonstrado por diversos estudos, os mecanismos pelos quais os processos infecciosos e inflamatórios interferem direta e/ou indiretamente no funcionamento do trato reprodutivo das vacas leiteiras ainda não foram totalmente elucidados (BROMFIELD et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016). Acredita-se que o contato do hospedeiro com a endotoxina bacteriana liberada durante a infecção mamária, somado aos efeitos dos mediadores inflamatórios sintetizados pelo organismo como resposta à injúria possam atuar simultânea e conjuntamente sobre a fertilidade das fêmeas bovinas.

Dessa forma, sabe-se que as respostas inflamatória e imunológica frente à infecção podem influenciar diversos processos reprodutivos tais como a ovulação (SUZUKI et al., 2001; LAVON et al., 2008), a fertilização (RIBEIRO et al., 2016), o desenvolvimento embrionário (HANSEN; SOTO; NATZKE, 2004), a dinâmica folicular ovariana e a esteroidogênese (HERATH et al., 2007; MAGATA et al., 2014), a competência ovocitária (ROTH et al., 2013), entre outros. Diante dessa problemática, a hipótese principal dos experimentos apresentados nos capítulos II e III se baseia no fato de que a mastite clínica de ocorrência espontânea ou induzida pela endotoxina bacteriana pode alterar os parâmetros inflamatórios bem como prejudicar os processos reprodutivos relacionados à qualidade do ovócito, ao desenvolvimento embrionário inicial e à manutenção da gestação de vacas leiteiras.

Os estudos correspondentes aos capítulos II e III foram conduzidos com o objetivo de avaliar a influência da mastite clínica de ocorrência espontânea sobre os parâmetros reprodutivos de vacas leiteiras das raças Girolando e Holandesa, e os efeitos da mastite clínica induzida pela endotoxina da *Escherichia coli* sobre os parâmetros inflamatório e reprodutivos, assim como sobre a expressão gênica do endométrio e do conceito durante os primeiros 15 dias de gestação em vacas leiteiras Holandesas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mastite bovina

A mastite bovina é considerada a mais importante enfermidade que acomete os rebanhos leiteiros (SEEGERS; FOURICHON; BEAUDEAU, 2003; DA SILVA, 2006), sendo citada desde 1956 como a doença de maior custo para a atividade leiteira (MURPHY, 1956). Já se passaram 60 anos após este relato e a mastite continua sendo responsável por inúmeras perdas produtivas e econômicas na pecuária leiteira mundial.

As perdas relacionadas à mastite se devem ao descarte do leite contendo resíduos de antibióticos utilizados no tratamento, aos custos com medicamentos e mão de obra excedente despendida pelos animais doentes e ao descarte prematuro de vacas do rebanho (SEEGERS; FOURICHON; BEAUDEAU, 2003; BALLOU, 2016). Além disso, há uma queda significativa do volume de leite produzido, a qual pode variar de 10 a 12% em um único quarto infectado durante toda a lactação (AKERS; NICKERSON, 2011). A mastite também compromete o conforto e o bem-estar dos animais acometidos pela infecção (FERREIRA et al., 2013).

Em um estudo conduzido nos Estados Unidos em 2014, com o objetivo de avaliar os custos de produção associados à ocorrência de mastite clínica, verificou-se que o custo médio de uma vaca doente foi de US\$ 216,12, estando incluídos nesse custo os medicamentos, a mão de obra necessária para tratar os animais doentes e o descarte do leite durante todo o período de carência do antibiótico. Vale ressaltar que o custo da mastite variou de acordo com o tipo do agente causador da infecção (CHA et al., 2014).

Os prejuízos causados pela mastite afetam diretamente não apenas o produtor de leite como também a indústria de laticínios, devido ao menor rendimento, qualidade e tempo de prateleira dos produtos lácteos (SANTOS; FONSECA, 2007). Além disso, a alta incidência de mastite nos rebanhos leiteiros oferece riscos à saúde pública, uma vez que o leite contaminado pode veicular tanto microrganismos patogênicos ao homem quanto resíduos de antibióticos que comprometem a eficácia dessas drogas no tratamento de doenças humanas (BRADLEY, 2002; DA SILVA, 2006). Assim, para garantir a qualidade e a segurança alimentar para os consumidores, é preciso que o leite seja extraído de animais saudáveis e sob condições adequadas de higiene.

A mastite é definida pela inflamação da glândula mamária provocada por microrganismos patogênicos e uma vez que instalado o quadro clínico de mastite, o prognóstico e a evolução da doença dependem de diversos fatores tais como o agente infeccioso causador da infecção, o

estágio da lactação no qual a infecção ocorre, a composição genética, a idade, assim como os *status* imunológico e nutricional do animal (HARMON, 1994; DA SILVA, 2006). Os fatores determinantes da ocorrência de mastite estão relacionados à interação existente entre o hospedeiro, nesse caso a vaca leiteira, o agente patogênico causador da infecção e o ambiente onde o animal é criado (HURLEY et al., 2009).

A duração e a severidade do quadro clínico de mastite, além de influenciarem diretamente a quantidade e a qualidade do leite produzido durante a infecção (SORDILLO et al., 1987), alteram as características físico-químicas do leite devido à mudança na permeabilidade vascular em decorrência da inflamação, às lesões no epitélio secretor que sintetiza alguns componentes específicos do leite, à ação enzimática das células somáticas e à presença do agente patogênico na glândula (SANTOS; FONSECA, 2007). Além disso, a resistência ou a susceptibilidade do tecido mamário às infecções ao longo da lactação estão relacionadas às alterações nos teores de proteína e gordura, no pH, na permeabilidade glandular e nos componentes antibacterianos do leite (SORDILLO et al., 1987).

A mastite pode ser classificada quanto à sua forma de manifestação em clínica ou subclínica. Na forma clínica, os sinais clínicos da inflamação são evidentes, tais como edema, aumento de temperatura, rubor, dor e alterações das características do leite, como a presença de grumos, além do possível acometimento sistêmico em alguns casos, como perda de apetite, febre e desidratação. Já na mastite subclínica, não há alterações visíveis no leite ou no úbere, o que exige a necessidade da realização de testes auxiliares para diagnóstico. Embora os sinais da mastite subclínica não sejam evidentes, essa forma da doença possui maior prevalência do que a forma clínica. Desta forma, atenção deve ser dada à realização periódica de testes para detectar os casos de mastite subclínica existentes e às medidas de controle para minimizar os prejuízos causados pela redução no volume e na qualidade do leite produzido por vacas acometidas por esta forma de manifestação da mastite (SANTOS; FONSECA, 2007).

2.2 Principais agentes causadores de mastite

A mastite geralmente acomete cerca de 40 a 50% das vacas leiteiras dentro de um rebanho, podendo ser causada por uma ampla variedade de microrganismos, sendo as bactérias o grupo de maior destaque como principais causadoras de mastite (FERREIRA et al., 2013).

A mastite pode ser classificada de acordo com o agente causador em contagiosa ou ambiental. Na forma contagiosa, a principal fonte de contaminação é o úbere e sua transmissão geralmente está relacionada ao manejo de ordenha inadequado, já que o equipamento de

ordenha e as próprias mãos do ordenhador podem carrear o patógeno de um animal doente para um saudável. Dentre os principais agentes contagiosos pode-se citar as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma bovis*. Já a mastite ambiental normalmente tem início durante o intervalo entre as ordenhas quando a vaca, com o esfíncter do teto ainda aberto, se deita em local sujo, com acúmulo de matéria orgânica e altamente contaminado. Os agentes causadores da mastite ambiental estão amplamente distribuídos no ambiente das vacas e de maneira oportunista invadem a glândula, causando a doença. Dentre os principais agentes ambientais pode-se citar as bactérias *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Klebsiella pneumoniae* (BRADLEY, 2002; SANTOS; FONSECA, 2007). A maior incidência de mastite ambiental nos períodos inicial e final da lactação ocorre devido às alterações fisiológicas relacionadas ao metabolismo e à secreção de leite nestes períodos, já que há uma alta taxa de cura espontânea quando a infecção ocorre na lactação já estabelecida (BURVENICH et al., 1999).

Mesmo diante da alta exposição das vacas aos patógenos ambientais, Burvenich et al. (1999) relataram que a incidência de mastite causada por bactérias Gram-negativas é menor do que os casos provocados por Gram-positivas, devido a menor duração dos casos relacionados às Gram negativas, já que cerca de 41% dos casos de mastite por coliformes possuem duração inferior ou igual a sete dias (TODHUNTER et al., 1991). Entretanto, segundo Hogan e Smith (2003), as bactérias Gram negativas são isoladas com maior frequência nos casos de mastite aguda, principalmente os coliformes. Essa diferença nos resultados encontrados pode ser atribuída às características climáticas das diferentes regiões analisadas, e àquelas relacionadas as instalações, ao manejo e principalmente a higiene, já que todos esses fatores interferem conjuntamente sobre a carga bacteriana presente no ambiente onde as vacas são mantidas.

2.2.1 Mastite causada por coliformes

Erroneamente atribui-se à mastite causada por coliformes todas as bactérias classificadas como Gram-negativas, sendo que a classificação do grupo dos coliformes se aplica às bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Já as bactérias dos gêneros *Serratia*, *Pseudomonas* e *Proteus* também são Gram-negativas, mas não são consideradas coliformes (HOGAN; SMITH, 2003).

Os coliformes encontram-se amplamente distribuídos no ambiente de criação das vacas (SHELDON et al., 2010), principalmente quando os animais são alojados em galpões, onde o acúmulo de fezes e urina favorecem sua disseminação. A bactéria *Escherichia coli* faz parte da

microbiota do trato gastrointestinal das vacas e por isso é frequentemente eliminada nas fezes dos animais. Os coliformes podem ser também encontrados no material utilizado como cama para as vacas, nos grãos, no solo, na água e em outros tipos de matéria orgânica (JONES, 1986; HOGAN; SMITH, 2003). De maneira aleatória e oportunista, as cepas patogênicas de coliformes presentes no ambiente invadem o organismo dos bovinos e colonizam diversos órgãos, como por exemplo o úbere causando mastite, o intestino causando diarreia especialmente nos bezerros, o trato urinário, o endométrio, entre outros (SHELDON et al., 2010).

Hogan e Smith (2003) demonstraram algumas habilidades relacionadas à virulência dos coliformes. Como a lactose é o principal carboidrato presente no leite, os coliformes preferencialmente colonizam o úbere e a utilizam como fonte de energia. Devido à baixa tensão de oxigênio existente no interior da glândula mamária, essas bactérias conseguem sobreviver em condições semelhantes às de anaerobiose.

O período seco pode ser dividido em três fases, sendo a fase de involução ativa, a de involução constante e a colostrogênese, e para completar todo esse processo de involução o tecido mamário requer de três a quatro semanas. A fase de involução ativa coincide com as duas primeiras semanas do período seco, enquanto a glândula mamária continua produzindo e secretando leite sem que haja remoção mecânica através da ordenha. No entanto, o volume produzido se reduz gradativamente devido à ausência do estímulo de retirada. As bactérias já existentes dentro do úbere também não são mais eliminadas pela ordenha e ali permanecem, utilizando o leite acumulado como substrato para seu crescimento e multiplicação. Há também um aumento da pressão interna da glândula em decorrência do acúmulo de leite, que promove uma dilatação do canal do teto e consequente abertura do esfíncter, favorecendo a entrada de microrganismos. Além disso, a interrupção na desinfecção dos tetos (*pós-dipping*) permite a colonização da pele e do esfíncter do teto por patógenos. Os leucócitos nesta fase são recrutados para remover os componentes do leite, como a gordura e a caseína, e por isso não participamativamente da proteção imunológica da glândula (HURLEY, 2009).

Na fase de involução constante, a glândula encontra-se em um estado de equilíbrio, visto que o tecido mamário está completamente regenerado e altamente resistente à ocorrência de novas infecções, que podem se curar espontaneamente. Isto ocorre devido à reduzida quantidade de gordura e caseína do leite, que desfavorecem a multiplicação de bactérias e às altas concentrações de leucócitos, imunoglobulinas e proteínas séricas que possuem ação bacteriostática. Assim, a atividade inibitória da secreção mamária sobre o crescimento

bacteriano aumenta com a progressão da involução da glândula e diminui com a aproximação ao parto (SORDILLO et al., 1987; TODHUNTER et al., 1991; BURVENICH et al., 2007).

A lactoferrina é uma proteína sérica do leite produzida pelo epitélio mamário, encontrada em altas concentrações durante a involução e que permanece elevada até a colostrogênese. Essa proteína possui ação bacteriostática por se ligar ao ferro, sequestrando-o, já que este é um nutriente essencial para o metabolismo da maioria dos coliformes e sua baixa disponibilidade limita o crescimento e a multiplicação das bactérias (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; De ROSA, 1997; HOGAN; SMITH, 2003).

Já na fase da colostrogênese, novos fatores influenciam a predisposição à mastite. A pressão interna da glândula aumenta novamente e assim permite a entrada de patógenos pelo teto, a concentração de lactoferrina diminui e consequentemente sua ação bacteriostática também reduz, a alta concentração de imunoglobulinas presentes no colostro nesta fase não é eficaz em prevenir que novos casos de mastite ocorram e o antibiótico utilizado na terapia de secagem encontra-se em baixa concentração, sem promover qualquer efeito (HURLEY, 2009).

A taxa de novas infecções mamárias provocadas por coliformes é de três a quatro vezes maior durante o período seco em relação à lactação (EBERHART et al., 1979), além de ser maior também durante as duas primeiras semanas da involução ativa da glândula e nas duas semanas que antecedem o parto correspondentes à colostrogênese (SMITH; TODHUNTER; SCHOENBERGER, 1985). A predisposição à mastite por coliformes é maior durante o início do período seco e a colostrogênese, aumentando à medida em que o parto se aproxima, porém, a manifestação clínica da doença acontece somente após o parto com o início da lactação e com o avanço da lactação a taxa de novas infecções diminui (TODHUNTER et al., 1991; HOGAN; SMITH, 2003; BALLOU, 2016). Esses períodos coincidem com a diminuição da concentração da lactoferrina, com a presença de resíduos de gordura e caseína do leite e/ou colostro em maiores quantidades, servindo como nutrientes que favorecem o crescimento bacteriano e inibem a atividade imune dos fagócitos, além deste grupo celular estar em número reduzido no tecido mamário (BURVENICH et al., 2007).

Cerca de 61 a 65% das novas infecções causadas por coliformes que se manifestam dentro dos primeiros 60 DPP foram adquiridas durante o período seco (SMITH; TODHUNTER; SCHOENBERGER, 1985; TODHUNTER et al., 1991). Em torno de 85% das infecções mamárias provocadas por coliformes evoluem para a forma clínica da mastite, que geralmente apresenta sintomatologia aguda devido ao rápido crescimento e multiplicação das bactérias no tecido mamário, a qual por sua vez desencadeia uma forte reação inflamatória (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; De ROSA, 1997; HOGAN; SMITH, 2003). Embora a mastite causada

por coliformes possa causar graves consequências quando acomete as vacas no início da lactação, após o pico da lactação, em torno de oito semanas pós-parto, essa doença se torna menos severa, podendo até mesmo se curar espontaneamente (BURVENICH et al., 2004).

A mastite por coliformes se caracteriza por quadros clínicos de curta duração, já que cerca de 41% dos casos apresentam duração igual ou inferior a sete dias (TODHUNTER et al., 1991). Estes casos geralmente se manifestam clinicamente de forma aguda e severa, causando sinais que evidenciam o comprometimento sistêmico do animal, tais como perda de apetite, inapetência, desidratação, febre, toxemia, que pode evoluir para a morte do animal (SANTOS, 2015).

A capacidade produtiva da glândula mamária permanece comprometida mesmo após a cura clínica e bacteriológica da mastite causada por *Escherichia coli*. Blum, Elimelech e Leitner (2014) avaliaram vacas acometidas pela mastite clínica causada por *Escherichia coli* e concluíram que no grupo de vacas cujos casos tiveram curta duração (< 15% de redução na produção diária de leite e com duração < 30 dias), houve uma estimativa média de perda de 200 litros de leite por vaca, enquanto que no grupo dos casos de longa duração (>15% de redução na produção diária de leite e com duração > 30 dias) essa estimativa atingiu os 1500 litros de leite por animal. Para calcular a perda do volume de leite comercializável foram contabilizadas as perdas de leite contendo resíduos de antibióticos, o leite perdido devido à redução da produção e o leite contendo elevada contagem de células somáticas (CCS).

2.2.1.1 Lipopolissacárido - LPS

As bactérias causadoras de mastite podem ser classificadas em Gram-negativas e Gram-positivas, cuja diferenciação se deve à presença de um componente da parede celular das bactérias Gram-negativas denominado endotoxina ou lipopolissacárido (LPS) que se desprende da superfície bacteriana quando esta se replica ou morre e possui alta capacidade pró-inflamatória (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). O LPS contém em sua estrutura proteínas, lipídeos e polissacáideos, mas sua composição varia de acordo com a espécie bacteriana, sendo que algumas bactérias conseguem alterar a estrutura do seu LPS a fim de escapar do ataque do sistema imune do hospedeiro e manter íntegra sua membrana externa (BANNERMAN et al., 2003; HOGAN; SMITH, 2003; BURVENICH et al., 2007).

O LPS é considerado a endotoxina de maior potencial imunoestimulador dentre os componentes de parede celular conhecidos (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Mesmo

em baixas concentrações, o tecido mamário apresenta alta sensibilidade ao LPS e a infusão dessa substância pela via intramamária em vacas saudáveis é capaz de induzir um quadro clínico semelhante ao de mastite clínica (MATTILA; FROST, 1989; BANNERMAN et al., 2003).

Hakogi et al. (1989) detectaram a presença da endotoxina no plasma e no leite de vacas com mastite causadas por bactérias Gram-negativas. Essa evidência denota a habilidade do LPS em produzir efeitos deletérios não apenas no local da infecção, como também de forma sistêmica prejudicando todo o organismo do animal. O LPS promove efeito local direto sobre o fluxo sanguíneo para a glândula e indireto sobre as células secretórias do epitélio mamário, sendo que tanto os sinais locais quanto sistêmicos causados pela endotoxina vão agir conjuntamente sobre a redução do volume de leite produzido (HOGAN; SMITH, 2003).

Para que o sistema imune inato consiga responder de maneira efetiva à infecção é necessário que haja um rápido reconhecimento do patógeno invasor, sendo a detecção do LPS um evento chave que precede a ativação desse sistema (BANNERMAN et al., 2003; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). Assim, quando o LPS atinge a corrente circulatória, diversas reações inflamatórias são iniciadas. A liberação do LPS é responsável pela ativação dos macrófagos dando início à cascata de citocinas, as quais regulam a resposta inflamatória e podem ganhar a circulação sanguínea causando sinais sistêmicos (SORDILLO; PIGHETTI; DAVIS, 1995; TIZARD, 2002). Esses sinais, tais como febre, desidratação, diarreia, anorexia, dificuldade respiratória, redução da motilidade ruminal e da atividade motora, distúrbios metabólicos e até a morte do animal, estão direta ou indiretamente relacionados à liberação das proteínas de fase aguda (LOHUIS et al., 1990).

2.3 Mecanismos de defesa da glândula mamária

O organismo animal é capaz de se defender das invasões dos microrganismos por diversas maneiras. Os mecanismos de defesa devem estar preparados para serem mobilizados até o local da injúria e resolver prontamente a infecção, destruindo o corpo estranho. A primeira e mais óbvia forma de defesa do organismo animal contra as invasões microbianas são as barreiras físicas do corpo. Estas barreiras, embora sejam úteis, não conseguem ser completamente efetivas e acabam sendo vencidas pelo tempo e persistência do agente invasor (TIZARD, 2002).

A glândula mamária também possui vários mecanismos de defesa, dentre os quais destacam-se as barreiras anatômicas e histológicas do teto, as proteínas e enzimas com ações bactericidas e bacteriostáticas, além das respostas imune inata ou inespecífica e adquirida ou específica (VAZ, 2003; BRUCKMAIER e MEYER, 2005; CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ,

2009). No entanto, durante determinados estágios da lactação, esses mecanismos de defesa do tecido mamário não funcionam apropriadamente, tornando a vaca ainda mais suscetível às infecções (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; De ROSA, 1997).

Quando o hospedeiro tem suas barreiras físicas de proteção comprometidas devido problemas na funcionalidade do sistema imunológico, este encontra-se suscetível às infecções oportunistas (BURVENICH et al., 2007). Desta maneira, aumentar a habilidade natural da vaca em combater infecções na glândula mamária durante os períodos de maior suscetibilidade é uma das alternativas utilizadas para reduzir os impactos da mastite sobre a produção leiteira (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; De ROSA, 1997), a fim de impedir o desenvolvimento de novos casos, bem como eliminar os já existentes (SANTOS; FONSECA, 2007).

2.3.1 Barreira física de proteção da glândula mamária

O orifício externo do teto constitui a primeira barreira física de defesa da glândula mamária contra as infecções, o qual também representa a principal porta de entrada dos agentes infecciosos na glândula. A musculatura do esfíncter do teto se contrai na tentativa de manter o orifício fechado no intervalo entre as ordenhas e assim impedir a penetração de microrganismos. Já a camada de queratina que reveste o teto é uma cera derivada do epitélio estratificado escamoso composta por ácidos graxos que possuem ação bacteriostática, impedindo a migração das bactérias para o interior do teto (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; De ROSA, 1997; SANTOS; FONSECA, 2007). O tampão de queratina age também como uma barreira física que auxilia a ação do esfíncter do teto, no entanto durante a mamada ou a ordenha esse tampão é removido e há uma diminuição do tônus do esfíncter, que requer cerca de duas horas para retornar à normalidade e formar um novo tampão. Enquanto isso, o canal do teto encontra-se vulnerável à invasão pelos agentes patogênicos (VAZ, 2003).

O início do quadro de mastite se dá quando o agente patogênico, que pode ser bactérias, fungos, leveduras ou algas, penetra pelo canal do teto e uma vez no interior desse canal, se multiplica nas cisternas do teto e da glândula e se espalha pelo tecido glandular produtor de leite. Há diversas maneiras de penetração dos agentes patogênicos pelo canal do teto, dentre as quais pode-se citar a flutuação de vácuo durante a ordenha, a introdução de cânulas contaminadas durante os tratamentos intramamários e a colonização da pele que recobre o teto (SANTOS; FONSECA, 2007; AKERS; NICKERSON, 2011).

As bactérias Gram negativas, como a *Escherichia coli*, invadem a glândula mamária utilizando o canal do teto como porta de entrada, apesar dessa bactéria não ser capaz de

colonizar a pele do teto. Uma vez dentro da glândula, essas bactérias utilizam a secreção mamária como meio de crescimento para se multiplicarem, sem a necessidade de se aderirem à superfície epitelial da glândula (JONES, 1986; HOGAN; SMITH, 2003; BURVENICH et al., 2007).

Vacas com relaxamento do canal do teto ou orifício de largo diâmetro são ordenhadas mais rapidamente e apresentam maior predisposição à mastite do que vacas com esfíncter contraído e de menor diâmetro. Manter a integridade física dos tetos assume grande importância na proteção contra a mastite. Desta forma, faz-se necessário verificar atentamente o funcionamento da ordenha mecânica, como nível de vácuo e a pulsação do sistema, a fim de evitar tanto o excesso quanto à redução no tempo requerido pela ordenha, os quais podem lesar o canal do teto e propiciar a entrada de patógenos (SANTOS; FONSECA, 2007).

2.3.2 Respostas inflamatória e imunológica causadas pela mastite

As doenças de maior prevalência nos rebanhos leiteiros, como a mastite, geralmente são resultantes de uma infecção bacteriana ou de injúria tecidual, que primeiramente desencadeia uma inflamação tanto local quanto sistêmica, levando à produção de mediadores inflamatórios que promoverão uma resposta imunológica a fim de combater o agente causador da infecção (RIBEIRO et al., 2016). Assim, a imunidade inata e a inflamação são respostas do organismo frente à infecção que atuam de forma integrada e simultânea.

A inflamação é um mecanismo protetor vital do qual o organismo lança mão em resposta à presença de um corpo estranho ou de uma lesão tecidual. A partir do momento em que a reação inflamatória se inicia, podendo esta ocorrer em menos de uma hora após a injúria, várias alterações locais são desencadeadas, tais como vasodilatação para aumentar o fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular que induz a migração de proteínas e de leucócitos da circulação sanguínea para o tecido a fim de destruir o agente patogênico e reparar as lesões do tecido (TIZARD, 2002; TIZARD, 2014). A resposta à inflamação, mesmo nos tecidos distantes do local da injúria, desencadeia numerosas alterações comportamentais, fisiológicas, nutricionais e bioquímicas que envolvem vários órgãos simultaneamente (CECILIANI et al., 2012).

Cinco sinais cardinais da inflamação foram consagrados como características intrínsecas deste processo, sendo estes: 1) calor, que representa o aumento da temperatura local; 2) rubor ou hiperemia, indicado pela vermelhidão e que representa a vasodilatação e aumento do aporte sanguíneo local; 3) edema ou inchaço, que corresponde ao extravasamento de exsudato e

aumento de volume no local; 4) dor, por compressão das terminações nervosas e 5) perda de função do tecido, quando a injúria tende a se tornar crônica (BURVENICH et al., 1999; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

A resposta inflamatória frente aos quadros de mastite objetiva a eliminação do microrganismo causador da infecção, a neutralização de toxinas produzidas pelo agente patogênico, seguida pela regeneração do tecido mamário danificado, para que o volume de leite normalmente produzido seja rapidamente retomado pela glândula (SANTOS; FONSECA, 2007).

O sistema imune inato, o qual é composto por mecanismos químicos e celulares de proteção, compõe a primeira linha de defesa do organismo contra os agentes invasores da glândula mamária, além de ser o principal mecanismo de defesa do tecido mamário durante a lactação, e sua funcionalidade determinará a evolução do quadro clínico da infecção (TIZARD, 2002; UTHAISANGSOOK et al., 2002; AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; BURVENICH et al., 2007). A imunidade inata é ativada logo após a penetração de um microrganismo pelas barreiras epiteliais, devido ao fato de que o invasor é estrutural e quimicamente diferente do tecido animal (TIZARD, 2014). Esse sistema assume fundamental importância no que diz respeito às respostas produzidas pelo organismo do hospedeiro contra a ação dos microrganismos patogênicos (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006), uma vez que a invasão gera não apenas uma, mas diversas respostas que interagem entre si e envolvem muitos tipos celulares e órgãos diferentes, o que denota a complexidade do sistema imunológico e seu funcionamento adequado torna-se essencial para manutenção da vida (TIZARD, 2014).

A imunidade inespecífica ou inata é o mecanismo de defesa predominante nos estágios iniciais da infecção, o qual é rapidamente ativado no local da infecção por diversos estímulos, no entanto sua resposta não é aumentada proporcionalmente à medida que a exposição ao mesmo patógeno se repete. Esse tipo de resposta imune é mediada pelas barreiras de proteção física do teto, juntamente com a participação dos macrófagos, dos neutrófilos, das células *natural killer* e de alguns fatores solúveis. Essa variedade de tipos celulares constituem as células somáticas secretadas no leite, sendo os neutrófilos o tipo predominante no início da inflamação, representando cerca de 90% do aumento celular (SORDILLO; SHAFFER-WEAVER; De ROSA, 1997; SANTOS; FONSECA, 2007).

Já imunidade adquirida ou específica da glândula mamária apresenta algumas particularidades. Os linfócitos, que são as células de defesa responsáveis pela produção dos anticorpos, estão presentes em baixa quantidade na glândula mamária, por isso os anticorpos presentes durante a infecção são de origem sistêmica e passam da corrente circulatória para o

leite devido ao aumento da permeabilidade vascular da glândula em resposta à inflamação (VAZ, 2003).

As células de defesa que predominam nos casos de mastite bovina são os neutrófilos. Este grupo celular exerce papel importante na tentativa de combater a infecção, uma vez que esse grupo celular é responsável pela captura e destruição do agente patogênico, e sua migração da circulação sanguínea para o tecido afetado em resposta à infecção é considerado o principal mecanismo de defesa do hospedeiro, evento seguido pela fagocitose e por último pela morte das bactérias (PAAPE et al., 2000). Uma vez que a glândula mamária é invadida pelos microrganismos, a primeira linha de defesa celular dá início à fagocitose das bactérias pelos neutrófilos, sendo esse processo composto por quatro fases que são a quimiotaxia, adesão ou opsonização, ingestão e destruição do microrganismo (TIZARD, 2014).

A fagocitose representa o mecanismo de defesa mais eficaz no combate às infecções bacterianas da glândula mamária (CRAVEN; WILLIAMS, 1985), pois os neutrófilos presentes na circulação sanguínea respondem rapidamente à inflamação (BURVENICH et al., 2007). Desta forma, a severidade da infecção mamária está na dependência da velocidade do recrutamento dos neutrófilos e da eficiência da resposta desse grupo celular (BRADLEY, 2002).

De forma sucinta, após a ocorrência de uma infecção ou injúria tecidual, há liberação de mediadores inflamatórios que promovem migração e ativação de células do sistema imune, principalmente neutrófilos e macrófagos, para remover o patógeno e as células lesadas do hospedeiro e, posteriormente reparar o dano que foi causado ao tecido (SHELDON et al., 2014).

A presença da endotoxina na parede celular das bactérias Gram negativas é uma característica própria e comum a esse grupo, o que caracteriza a endotoxina como um padrão molecular associado ao patógeno (*pathogen associated molecular pattern* - PAMP). Os PAMP's nada mais são do que estruturas moleculares conservadas comuns a diversos tipos de invasores microbianos. Da mesma forma, o sistema imune também desenvolveu um mecanismo para identificar com rapidez a presença de um PAMP, por meio dos receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptor* - PRR) expressos nas células mononucleares (macrófagos, mastócitos e células dendríticas) localizadas em todo o corpo. O PRR específico para reconhecer a presença do LPS da *Escherichia coli* é do tipo *Toll-like receptor* 4 (TLR-4) e está presente na superfície celular das células mononucleares, e a partir da ligação da endotoxina ao seu receptor esses padrões iniciam toda a cascata de reações intracelulares que vão desencadear a resposta inflamatória (CECILIANI et al., 2012). O TLR-4 não é capaz de se ligar diretamente ao LPS, necessitando da participação de outras três

proteínas, o fator de diferenciação mieloide 2, a proteína ligante de LPS (*lipopolysaccharide binding protein* - LBP) e o CD 14. Quando ocorre a ligação de um PAMP ao seu respectivo receptor TLR, uma cascata de sinalização intracelular é ativada, que inclui a ativação do fator nuclear kappa-beta (NF- $\kappa\beta$), que induz a célula a sintetizar moléculas pró-inflamatórias, como as citocinas e as proteínas de fase aguda (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; CECILIANI et al., 2012; TIZARD, 2014).

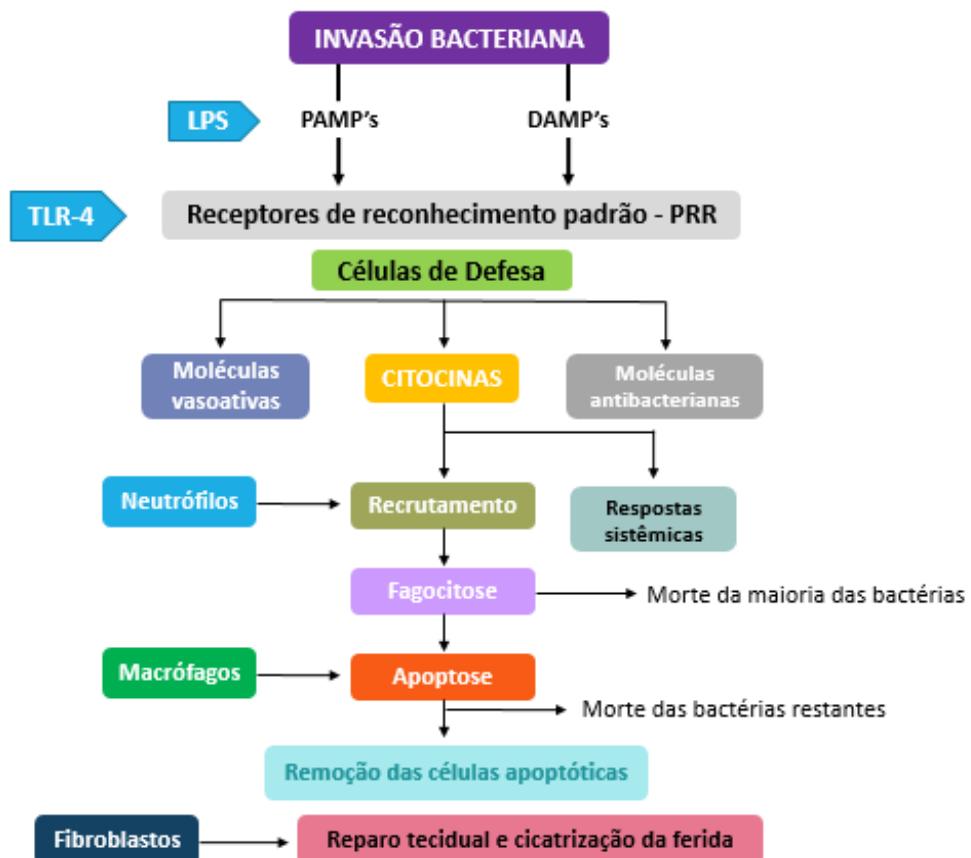


Figura 1. Principais características da inflamação aguda, um mecanismo inato composto por células e outros mecanismos de defesa. A inflamação aguda é desencadeada por invasão microbiana e lesão tissular. Fonte: adaptado de Tizard, 2014.

O início da resposta à inflamação se dá, primeiramente, pelo aumento na produção de citocinas e estas por sua vez estimulam a produção das proteínas de fase aguda (SUOJALA et al., 2008), que são denominados mediadores inflamatórios local e sistêmico, respectivamente. Em seguida tem-se a ocorrência de febre, mobilização de leucócitos e alterações hormonais e metabólicas nas quais o fígado desempenha papel de suma importância (GRUYNS et al., 2005). A febre, além de ser um sinal de que o organismo está tentando combater o agente agressor,

age estimulando a proliferação das células do sistema imunológico e limitando o crescimento e a multiplicação dos agentes patogênicos (PECCHI et al., 2009).

É pertinente ressaltar que a resposta inflamatória e os efeitos provocados pelos mediadores produzidos durante esse processo, embora sejam essenciais para ativar o sistema imune inato e dar início a toda a cascata de eventos envolvidos no processo de combate e eliminação do agente patogênico, podem comprometer significativamente o desempenho produtivo das vacas leiteiras acometidas pela mastite clínica (BALLOU, 2016).

A produção de mediadores inflamatórios pelo tecido inflamado resulta na perda de sua função, que no caso da mastite é evidenciado pela redução na produção de leite. Esta queda está associada tanto à infecção propriamente dita quanto aos efeitos da doença sistêmica sobre a funcionalidade do organismo animal como um todo (BURVENICH et al., 1999). Segundo Akers e Nickerson (2011) as infecções mamárias prejudicam o desenvolvimento do tecido alveolar e a diferenciação celular, resultando em comprometimento tanto da síntese quanto da secreção de leite, uma vez que os alvéolos são responsáveis pela conversão do sangue em leite. Ainda não se sabe se a síntese local dos mediadores inflamatórios na glândula mamária afeta diretamente a produção dos componentes do leite durante a mastite ou se esse efeito ocorre devido ao dano tecidual causado pela inflamação (BALLOU, 2016).

A liberação de produtos bacterianos e/ou de mediadores inflamatórios pelo tecido danificado funciona como um sinal para a migração dos neutrófilos. Os neutrófilos por sua vez, após desempenharem sua função, liberam quimiocinas durante o processo de morte que atraem macrófagos para o local da invasão, os quais irão remover os neutrófilos mortos e tentar combater a infecção, caso essa persista (TIZARD, 2002). Os neutrófilos participam do processo de eliminação tanto da bactéria quanto da endotoxina por ela liberada do interior do úbere (BURVENICH et al., 2007). Além disso, durante a morte intracelular dos microrganismos, os neutrófilos e macrófagos recrutados pelo processo inflamatório liberam diversas enzimas com ação proteolítica e lipolítica que agem reduzindo o teor de alguns constituintes do leite, como proteína e gordura, respectivamente (SANTOS; FONSECA, 2007).

A predisposição à mastite parece sofrer influência do número de células somáticas presentes na glândula mamária previamente à infecção, pois segundo Wellnitz e Bruckmaier (2012) a baixa contagem de células somáticas está associada ao aumento do risco e da severidade do quadro clínico da mastite. Suriyasathaporn et al. (2000) ao avaliarem diversos fatores de risco para a mastite, reportaram que a CCS é uma variável que pode predizer a severidade da resposta inflamatória do úbere e que a baixa CCS encontrada em glândulas no estudo não infectado está negativamente associada ao aumento do risco de mastite clínica. A

baixa CCS individual é um indicativo de que os leucócitos estão presentes no tecido mamário em pequena proporção, e com isso sua ação de combater a infecção é reduzida e a predisposição à mastite aumenta.

A duração e a severidade do quadro de mastite dependem da resposta migratória dos leucócitos e da ação bactericida das células somáticas no local da infecção (SORDILLO; SHAFFER-WEAVER; De ROSA, 1997). O atraso no recrutamento de neutrófilos para iniciar a resposta inflamatória em decorrência, por exemplo, da elevada demanda por neutrófilos pelo útero e pela glândula mamária no período de imunossupressão do periparto, favorece o estabelecimento de infecções causadas por *Escherichia coli*, devido à sua alta capacidade de proliferação. Em uma hora de atraso, a população de bactérias pode aumentar em até oito vezes, liberando maior quantidade de endotoxina e dificultando o combate à infecção pelos neutrófilos (BURVENICH et al., 2007; AKERS; NICKERSON, 2011).

A diapedese prolongada dos leucócitos acarreta danos ao tecido mamário, como a degeneração progressiva, diminuindo também a produção de leite (HARMON; HEALD, 1982). Isso se deve ao fato de que a morte dos neutrófilos, após a fagocitose, faz com que suas enzimas lisossomais sejam liberadas no local causando um dano tecidual severo. Porém, isso normalmente não ocorre, pois a morte celular programada dos neutrófilos é seguida pela fagocitose desse grupo de células pelos macrófagos, os quais não permitem que haja liberação do conteúdo celular tóxico dos neutrófilos nos tecidos (TIZARD, 2002).

Algumas cepas bacterianas conseguem escapar da fagocitose dos neutrófilos, por exemplo, por meio do encapsulamento da bactéria. Segundo Hogan et al. (1992) cepas de *Escherichia coli* mais resistentes à fagocitose foram encontradas no periparto em comparação às cepas isoladas no início do período seco ou durante a lactação. Assim, à medida em que a composição da secreção da glândula mamária se altera em função do estágio da lactação, os coliformes também alteram sua capacidade de escapar da fagocitose e então estabelecer o quadro clínico de mastite (HOGAN; SMITH, 2003).

Quando ocorre a invasão da glândula mamária por uma bactéria, uma pequena quantidade de células somáticas está ali presente para tentar combater a infecção o mais rápido possível. A partir de então, tanto os leucócitos quanto as bactérias liberam produtos que atraem mais leucócitos provenientes da circulação sanguínea, promovendo um aumento da CCS (AKERS; NICKERSON, 2011). Caso as células do hospedeiro consigam eliminar as bactérias, a migração de leucócitos cessa e a CCS diminui, retornando aos níveis normais (SANTOS; FONSECA, 2007). Do contrário, isto é, quando a bactéria sobrevive à resposta imediata do hospedeiro, o processo inflamatório persiste, as células somáticas continuam migrando em direção ao lúmen

alveolar e várias substâncias são produzidas, ocasionando os sinais clínicos locais da mastite (SORDILLO; SHAVER-WEAVER; De ROSA, 1997; SURIYASATHAPORN et al., 2000). Vale ressaltar que o leite proveniente de quartos mamários não infectados normalmente apresenta CCS inferior a 200.000 células/mL de leite (SANTOS; FONSECA, 2007; AKERS; NICKERSON, 2011).

2.3.2.1 Mediadores da inflamação

2.3.2.1.1 Citocinas

O termo citocina refere-se a um grupo heterogêneo de proteínas produzidas naturalmente que regulam as atividades celulares e imunológicas do hospedeiro, e são produzidas por diversos tipos celulares pertencentes ou não ao sistema imune (SORDILLO; SHAVER-WEAVER; De ROSA, 1997; TIZARD, 2002; CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular secretadas pelos leucócitos ativados após uma infecção, que podem ser classificadas em três diferentes grupos: 1) citocinas que atuam como fator de crescimento positivo ou negativo para diversos tipos celulares; 2) citocinas com propriedades pró-inflamatórias, e 3) citocinas com propriedades anti-inflamatórias (GRUYNS et al., 2005; DINARELLO, 2007). As interleucinas, os interferons e os fatores de necrose tumoral são substâncias classificadas como citocinas e diferem entre si de acordo com suas funções (TIZARD, 2002). Dentre as principais citocinas pró-inflamatórias destacam-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas 1 (IL-1 α e β) e 6 (IL-6), as quais coordenam conjuntamente as respostas inflamatórias local e sistêmica contra as substâncias agressoras dos patógenos (GRUYNS et al., 2005; PECCHI et al., 2009; TIZARD, 2014).

Algumas citocinas são consideradas fatores solúveis produzidos por uma célula que atua em outra célula-alvo a fim de alterar a função desta última, podendo esta ação ser autócrina, parácrina ou endócrina. Embora esta definição para o termo citocina se assemelhe à definição de hormônio, a diferença explica-se pelo fato de que as citocinas podem ser produzidas por diversos tipos celulares enquanto que os hormônios são os produtos primariamente produzidos por tecidos específicos. Com exceção às células sanguíneas da linhagem vermelha, toda célula é capaz de produzir bem como de responder à ação de uma citocina (TIZARD, 2002; DINARELLO, 2007).

As citocinas assim como outros mediadores inflamatórios, nos casos de mastite, são produzidas tanto pelas células epiteliais do tecido mamário quanto pelos leucócitos presentes

no local da infecção (PFAFFL et al., 2003; WENZ et al., 2010), no entanto o nível da expressão das citocinas varia consideravelmente de acordo com a fonte causadora da inflamação (BRUCKMAIER; MEYER, 2005). Na mastite, essas proteínas atuam como sinais de comunicação entre as células, os quais ditam diferentemente o rumo da resposta imune em úberes sadios e doentes (ALLUWAIMI, 2004).

A produção das citocinas é desencadeada por diversos estímulos (TIZARD, 2002). As citocinas geralmente são produzidas de forma transitória e, mesmo em baixas concentrações, possuem uma potente atividade biológica (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; De ROSA, 1997). Dentre as alterações promovidas pelas citocinas durante o processo inflamatório pode-se citar a alteração na permeabilidade vascular, o recrutamento de leucócitos, o estímulo à infiltração de neutrófilos no tecido mamário, bem como a ativação da capacidade fagocítica deste grupo celular (CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009). Além disso, as citocinas pró-inflamatórias agem no cérebro induzindo comportamento doentio nos animais frente aos quadros de inflamação, além de outros sinais tais como anorexia, febre, redução da atividade motora e isolamento social (PECCHI et al., 2009).

As citocinas também exercem função regulatória sobre a síntese hepática das proteínas de fase aguda, tais como o amiloide sérico A e a haptoglobina (Hp), por meio da ativação de receptores presentes nos hepatócitos (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Além disso, estas promovem aumento no catabolismo proteico da musculatura esquelética a fim de liberar aminoácidos que serão utilizados na síntese das proteínas de fase aguda (GRUYNS et al., 2005; BALLOU, 2016).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma potente citocina produzida principalmente pelos macrófagos, mas também pelos linfócitos T, mastócitos e pelas células *natural killers*. É uma proteína composta por uma cadeia de 233 aminoácidos e que possui diversas funções biológicas, além de ser uma das mais importantes citocinas pró-inflamatórias predominante na fase aguda da infecção (TARTAGLIA; GOEDDEL, 1992; CLUDTS et al., 1993). Existem dois tipos de receptores para o TNF- α , o TNF-R1 e o TNF-R2, os quais desempenham atividades distintas e que são expressos pela maioria dos tipos celulares. O TNF-R1 está relacionado com citotoxicidade, atividade antiviral e proliferação de fibroblastos, enquanto que o TNF-R2 é responsável pela proliferação das células do timo e dos linfócitos T citotóxicos (TARTAGLIA; GOEDDEL, 1992).

Os danos decorrentes do aumento na concentração sanguínea do TNF- α podem ser severos, uma vez que esta citocina promove diversas reações imunológicas e metabólicas prejudiciais ao hospedeiro, quando produzida em quantidades excessivas (BLUM et al., 2000;

CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009). Essa produção excessiva de TNF- α sinaliza o início ou o agravamento de certas condições patológicas, tais quais ocorrem em diversos casos de inflamação e, em casos mais graves, causa hipotensão arterial, lesões renais, hepáticas e pulmonares, sendo estes sinais que caracterizam o quadro de choque endotóxico e resulta na morte do animal (CLUDTS et al., 1993; TIZARD, 2002). O TNF- α causa perda de peso devido ao esgotamento das reservas corporais de gordura, anemia, hipoproteinemia, estimula os hepatócitos a produzirem e secretarem proteínas de fase aguda, potencializa a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos aumentando suas atividades fagocíticas e citotóxicas. Além disso, o TNF- α atua no centro termorregulador do cérebro induzindo a produção de prostaglandinas, as quais elevam o ponto de equilíbrio termostático e, consequentemente, a temperatura corporal (TIZARD, 2002).

A produção de TNF- α pelas células do sistema imune ocorre devido à estimulação causada pelas endotoxinas bacterianas como o LPS nos quadros infecciosos causados por bactérias Gram negativas (TIZARD, 2002). Após a indução pelo LPS, a síntese de TNF- α é rapidamente estimulada, porém a produção dessa citocina em resposta ao estímulo do LPS parece ser limitada. Um estudo realizado *in vitro* para verificar a habilidade dos macrófagos de produzir TNF- α após a estimulação com LPS durante o parto de vacas leiteiras, Sordillo, Pighetti e Davis (1995) apontaram que as células extraídas do linfonodo mamário produziram essa citocina em maior concentração do que as células obtidas do sangue periférico.

O TNF- α é o principal mediador do choque endotóxico que ocorre nos casos de mastite superaguda causadas por coliformes. Sordillo e Peel (1992) reportaram uma alta concentração de TNF- α no soro e no leite de vacas no parto que desenvolveram sintomas clínicos severos e morreram por endotoxemia após o quadro de mastite causada por *Escherichia coli*. Nesses casos, o TNF- α induz a síntese e a liberação de Hp, além de participar do recrutamento e da ativação de neutrófilos na glândula mamária (BLUM et al., 2000).

Os casos mais severos de mastite causada por coliformes geralmente acometem as vacas nas semanas iniciais da lactação, com rara ocorrência nos terços médio e final da lactação. Este fato pode ser explicado pela maior expressão do TNF- α na fase periparturiente do que nos demais estágios da lactação (SORDILLO; PIGHETTI; DAVIS, 1995). Entretanto, Alluwaimi (2004) reportou que níveis elevados TNF- α foram detectados durante todos os estágios da lactação, no período de involução da glândula e no parto, porém há um curto período de tempo que antecede o parto no qual a concentração de TNF- α cai a níveis não detectáveis. Esse mesmo autor sugeriu que o monitoramento dos níveis de TNF- α no sangue e/ou no leite pode ser uma ferramenta útil para avaliar a severidade dos casos de mastite causadas por coliformes,

porém seu uso requer cautela devido aos elevados níveis que podem ser encontrados tanto em glândulas mamárias doentes quanto saudáveis.

2.3.2.1.2 Proteínas de fase aguda

Sob a influência de algumas citocinas produzidas no início da inflamação ou após uma injúria tecidual, os hepatócitos são estimulados a sintetizar e secretar proteínas por meio de um mecanismo coordenado, e as concentrações plasmáticas dessas proteínas se elevam rapidamente e por isso são denominadas proteínas de fase aguda (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001; TIZARD, 2002; GRUYS et al., 2005; SUOJALA et al., 2008; CECILIANI et al., 2012). De acordo com Gruys et al. (2005) dentro de poucas horas após o início da infecção já é possível verificar alterações no padrão da síntese de proteínas pelo fígado.

As proteínas de fase aguda assumem papel importante nos mecanismos de defesa e reparação tecidual, no reestabelecimento da homeostase e no combate aos agentes patogênicos, uma vez que essas proteínas estão envolvidas nos processos de opsonização, eliminação das toxinas e controle dos diferentes estágios da inflamação (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004; CECILIANI et al., 2012). Assim, essas proteínas conseguem interagir tanto com os patógenos quanto com as células de defesa do hospedeiro.

Nos bovinos, a Hp, o amiloide A sérico e a proteína C reativa destacam-se como as principais proteínas de fase aguda, podendo atingir até 100 vezes mais esse aumento na concentração dessas proteínas (ECKERSALL et al., 2001). Por isso, estas são chamadas de proteínas de fase aguda positivas, já que suas concentrações no sangue aumentam drasticamente em relação ao nível basal frente a diversos estímulos infeccioso, inflamatório, cancerígeno e relacionados à lesão tecidual (JACOBSEN et al., 2004; GRUYS et al., 2005). Segundo Wenz et al. (2010), nos casos de mastite, as proteínas de fase aguda são produzidas principalmente pelos hepatócitos, embora Eckersall et al. (2001) e Ceciliani et al. (2012) tenham citado que tecidos extra-hepáticos também podem produzir essas proteínas durante a fase aguda da inflamação.

A Hp é uma glicoproteína conjugadora de metais, sendo o ferro sua molécula de eleição, tornando-o indisponível para utilização pelas bactérias invasoras e inibindo assim a proliferação bacteriana (TIZARD, 2002). Assim, a Hp possui ação bacteriostática por tornar o ferro indisponível para o crescimento bacteriano de algumas espécies bacterianas dependentes desse metal (EATON et al., 1982). Essa proteína especificamente se conjuga à hemoglobina formando um complexo estável (MAKIMURA; SUZUKI, 1982) e grande parte de suas

atividades estão relacionadas às ações desse complexo (CECILIANI et al., 2012). Já com relação à função biológica, a Hp é uma proteína transportadora com atividade antioxidante, protegendo o tecido inflamado dos metabólitos de oxigênio que são formados durante a fagocitose (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001).

De acordo com Martínez-Subielas et al. (2001) não há relatos na literatura sobre o valor de referência para o nível sérico normal de Hp nos bovinos, já que essa proteína atinge níveis não detectáveis em animais saudáveis e sua concentração sanguínea se eleva abruptamente quando o quadro de infecção ou de inflamação aguda se instala. Com relação a mastite clínica, a dosagem da Hp é uma ferramenta útil para detectar a ocorrência e a severidade da resposta inflamatória frente a essa doença (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004; SUOJALA et al., 2008).

A aplicação prática da dosagem de Hp sérica fundamenta-se sobre o diagnóstico precoce dos processos infecciosos e/ou inflamatórios, tanto na fase clínica quanto subclínica das doenças (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001). A interpretação dos resultados de Hp deve ser criteriosa, pois dosagens sequenciais e repetidas se fazem necessárias para monitorar a evolução da doença e a resposta aos tratamentos utilizados, além da variação individual existente (JACOBSEN et al., 2004).

Em um estudo *in vitro*, Alsemgeest et al. (1996) estimularam hepatócitos bovinos com as citocinas IL-6 e TNF- α e verificaram seus efeitos sobre a síntese de Hp. Quando as citocinas foram incubadas separadamente não houve alteração na concentração de Hp, porém conjuntamente essas citocinas foram capazes de elevar a concentração de Hp, demonstrando a provável necessidade dessas duas citocinas serem liberadas simultaneamente *in vivo* para iniciar a síntese dessa proteína de fase aguda em específico.

2.3.2.1.3 Prostaglandinas

As prostaglandinas (PG) são substâncias endógenas denominadas eicosanoides. Sua produção dá-se através do ciclo do ácido araquidônico, o qual é um ácido graxo derivado do ácido linolênico (Ômega 3) de origem alimentar que permanece no organismo na forma esterificada para constituir os fosfolipídeos da parede celular. Após estímulos químicos, físicos ou mecânicos, o ácido araquidônico é liberado pela ação de enzimas denominadas fosfolipases, principalmente pela Fosfolipase A₂, e em seguida é metabolizado por duas vias principais, sendo a via da cicloxigenase (COX) que resulta na síntese de PGs, prostaciclinas e tromboxanos, e a via da lipoxigenase (LOX) que estimula a síntese de leucotrienos, sendo os

metabólitos resultantes deste processo coletivamente chamados de eicosanoides (TIZARD, 2002; PECCHI et al., 2009; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

As PG possuem funções diversificadas que variam de acordo com o tecido-alvo, ao passo que estas podem estimular uma reação em um determinado tecido e inibir esta mesma reação em outro tecido, sendo esta variação associada ao tipo de receptor ao qual a PG se liga. Apesar das ações parácrina e autócrina das PG, essas se diferenciam dos hormônios por não serem produzidas em órgãos específicos, mas sim por todo o corpo do animal. Embora sejam potentes mediadores, as PG são substâncias que possuem meia-vida curta.

Uma das principais ações da PG está relacionada ao processo inflamatório, visto que várias PG podem ser liberadas ao mesmo tempo nos tecidos inflamados. Existem quatro grupos de PG pró-inflamatórias: a PGE₂, a PGF₂, os tromboxanos (PGA₂ e TXA₂) e as prostaciclinas (PGI₂), as quais podem ser sintetizadas pela maioria das células nucleadas e por isso suas funções biológicas são variadas (TIZARD, 2014).

Durante a inflamação há produção e liberação de diferentes prostaglandinas pelos tecidos inflamados, denotando a complexidade dos seus efeitos. Por exemplo, a prostaglandina F_{2alpha} (PGF_{2alpha}) promove contração da musculatura lisa, vasoconstricção, inibição da agregação plaquetária e a liberação de histamina pelos mastócitos, enquanto que a prostaglandina E₂ (PGE₂) possui exatamente a função oposta à descrita anteriormente (TIZARD, 2002; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Com relação à reprodução dos bovinos, as PG também exercem funções importantes. No endométrio das vacas, a PGE₂ é sintetizada pelas células estromais enquanto que a PGF_{2alpha} é produzida pelas células epiteliais, as quais possuem ação luteotrófica e luteolítica, respectivamente (ASSELIN et al., 1996; McCracken; CUSTER; LANSAN, 1999). A ação luteolítica da PGF_{2alpha} consiste na degradação irreversível do corpo lúteo (CL) durante na fase final do diestro denominada de luteólise, a qual é acompanhada pela redução da concentração sanguínea de progesterona (P₄) (SENGERS, 2005).

Segundo Knickerbocker, Wiltbank e Niswender (1988) em ruminantes há uma interação entre os hormônios estradiol (E₂), P₄ e ocitocina (OXT) no endométrio a fim de regular a síntese e o momento da liberação de PGF_{2alpha} durante o ciclo estral. Durante o início do diestro, a P₄ é produzida pelo CL formado após a ovulação e este hormônio se liga aos seus receptores localizados no endométrio. Essa ligação impede que haja produção endometrial de PGF_{2alpha} por meio da supressão da formação dos receptores para E₂ e OXT durante cerca de oito a dez dias. A exposição contínua do endométrio a P₄ promove *downregulation* dos receptores de P₄ em torno do 11º dia do ciclo estral, e a partir de então a P₄ perde seu efeito inibitório sobre a síntese

dos receptores para E₂ e OXT, levando ao aumento da expressão desses receptores. A expressão dos receptores para OXT é facilitada pela secreção de E₂ pelos folículos ovarianos, já que primeiramente há um aumento da expressão dos receptores de E₂, seguido pelo aumento da expressão dos receptores de OXT. À medida em que a OXT é liberada pela hipófise e pelo CL, esse hormônio liga aos seus receptores agora presentes no endométrio e ativa a produção e liberação de PGF_{2α}, que aumenta em amplitude e frequência resultando em luteólise (SPENCER et al., 2004; SENGERS, 2005).

Uma vez produzida pelo endométrio, a PGF_{2α} precisa se ligar ao seu receptor para assim dar início à luteólise, estando esses receptores localizados nas células grandes do CL onde são expressos em grandes quantidades (SAKAMOTO et al., 1994). Desta forma, a PGF_{2α} atinge o CL por meio de um mecanismo vascular contracorrente existente entre o útero e o ovário, que permite que a PGF_{2α} produzida seja transportada do endométrio até o CL ipsilateral, onde desencadeará a luteólise. O transporte da PGF_{2α} da veia uterina para a artéria ovariana ocorre por meio de difusão passiva, sem haver transporte via circulação sistêmica (SENGER, 2005). Após a luteólise, normalmente há o início de um novo ciclo estral, além de ser um processo essencial para a ocorrência do parto na fase final da gestação (TREVISOL et al., 2013).

2.4 Mastite clínica induzida

Segundo Wenz et al. (2010) grande parte do conhecimento sobre a resposta imunológica frente aos casos de mastite clínica foi adquirido por meio dos estudos que utilizavam modelos experimentais de infecção. Por meio desses modelos, é possível conhecer a quantidade de bactéria ou de endotoxina inoculada na glândula e a duração do quadro infeccioso e inflamatório, além de avaliar o padrão de resposta ao longo do tempo de acordo com cada agente patogênico utilizado no desafio. Porém, normalmente os estudos de indução de mastite apresentam unidades experimentais reduzidas, o que dificulta avaliar os reais efeitos associados à ordem de partos, ao estágio da lactação, entre outros parâmetros relacionados ao animal. Em contrapartida, os casos de mastite clínica de ocorrência natural e espontânea possuem inúmeras limitações para as pesquisas, tais como a definição do momento exato do início da infecção, a mensuração da carga bacteriana total que de fato invadiu a glândula, se há ou não associação entre diferentes patógenos causando o mesmo episódio de infecção, a ocorrência de uma reinfeção, entre outros.

Vários protocolos de indução de mastite foram desenvolvidos com o intuito de mimetizar os casos clínicos de mastite que ocorrem natural e espontaneamente. No caso das

mastites causadas por bactérias Gram-negativas, os protocolos de indução de mastite se baseiam na infusão intramamária da endotoxina, já que esta substância é responsável pela patogenicidade da bactéria. Os sorotipos O111:B4 (BLUM et al., 2000; BANNERMAN et al., 2003; KAUF; VINYARD; BANNERMAN, 2007; CYPLES et al., 2012; FITZPATRICK et al., 2013) e O55:B5 (SHUSTER et al., 1991; NUGENT; HATLER; SILVIA, 2002; SOTO; NATZKE; HANSEN, 2003a; LAVON et al., 2008) da bactéria *Escherichia coli* são os mais utilizados nas pesquisas relacionadas à indução de respostas inflamatórias utilizando sua endotoxina. Com relação ao volume de leite produzido pelos quartos mamários infectados, tanto na mastite clínica de ocorrência espontânea quanto na induzida pela endotoxina bacteriana observa-se uma redução significativa na produção leiteira (SHUSTER et al., 1991; SUOJALA et al., 2008).

2.5 Mastite vs. reprodução

Diante da queda no desempenho reprodutivo de vacas provenientes de rebanhos leiteiros com alta incidência de mastite clínica, algumas pesquisas foram realizadas com o objetivo de investigar o dano severo da mastite sobre os índices reprodutivos. Com o intuito de correlacionar cronologicamente o momento da ocorrência da mastite com o momento da inseminação artificial (IA), Barker et al. (1998) concluíram que as vacas leiteiras da raça Jersey que desenvolveram mastite no período entre a IA e o diagnóstico de gestação apresentaram intervalo parto-concepção mais longo, além de necessitarem de um maior número de inseminações para se tornarem gestantes, quando comparadas às vacas que contraíram mastite clínica após a confirmação da gestação ou às vacas sem mastite. Já Santos et al. (2004) reportaram que vacas Holandesas que desenvolveram mastite clínica antes da primeira IA pós-parto ou no intervalo entre a primeira IA e o diagnóstico de gestação apresentaram menores taxas de concepção ao primeiro serviço e de prenhez aos 320 dias em lactação (DEL), quando comparadas às vacas que tiveram mastite após o diagnóstico e vacas sem mastite. Além disso, as vacas com mastite apresentaram maiores taxa de descarte e incidência de aborto do que as fêmeas sadias, o que denota a queda significativa da eficiência reprodutiva das vacas leiteiras acometidas pela mastite. É pertinente ressaltar que os efeitos da mastite sobre os parâmetros reprodutivos podem ser comparados entre as raças Jersey e Holandesa, visto que Bannerman et al. (2008) reportaram que ambas as raças apresentaram respostas imunológicas semelhantes quando submetidas ao desafio intramamário com a endotoxina de *Escherichia coli*.

Uma meta-análise realizada por Fourichon, Seegers e Malher (2000) revelou que a mastite clínica não alterou nenhum dos índices reprodutivos avaliados nos rebanhos de vacas Holandesas, sendo a concepção ao primeiro serviço e o intervalo parto-concepção os principais índices analisados. Leite, Moraes e Pimentel (2001), trabalhando com vacas Holandesas no Rio Grande do Sul, também reportaram que a ocorrência de mastite no puerpério não alterou a duração do intervalo parto-concepção e do intervalo entre partos quando comparadas com vacas sadias.

Vacas acometidas pela mastite no início do período pós-parto, entre os primeiros 15 e 28 DEL, independente do agente causador da mastite ser uma bactéria Gram-positiva ou Gram-negativa, apresentaram atraso no retorno à ciclicidade ovariana em relação às vacas sadias (HUSZENICZA et al., 2005). Em contrapartida, Santos et al. (2010), ao analisarem mais de 5 mil vacas, reportaram que a retomada da atividade ovariana até os 65 dias pós-parto (taxa de ciclicidade = 81,5%), assim como a taxa de prenhez à primeira IA pós-parto (39,4%) não foram influenciadas pela ocorrência de mastite clínica. No entanto, houve um aumento expressivo na taxa de perda de gestação nos primeiros 60 dias pós-IA (19,8%) em consequência da mastite. Segundo Chebel et al. (2004) e Moore et al. (2005), a ocorrência de mastite clínica pode ser considerada um fator de risco para a perda embrionária em bovinos.

Hertl et al. (2010) analisaram a probabilidade de concepção de mais de 14 mil vacas em sete diferentes fazendas no estado de Nova Iorque (EUA) diagnosticadas com mastite, causadas tanto por bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Como resultado, os autores reportaram que vacas com mastite apresentaram baixa probabilidade de conceberem ao primeiro serviço e à medida que os serviços aumentaram (até a quarta IA) essa probabilidade reduziu. Além disso, vacas com mastite causada por bactérias Gram-negativas, cujo caso tenha ocorrido dentro dos primeiros sete dias após a IA, tiveram redução de 80% na probabilidade de concepção. Em resumo, a ocorrência de mastite clínica próximo à IA reflete em queda na probabilidade de concepção, denotando a interferência negativa dessa doença sobre a eficiência reprodutiva dos rebanhos leiteiros.

Com relação à forma de manifestação da doença, tanto a mastite clínica quanto a subclínica podem impactar negativamente sobre os parâmetros reprodutivos (HUDSON et al., 2012). Schrick et al. (2001) reportaram que vacas acometidas pela mastite antes do primeiro serviço pós-parto, tanto pela forma clínica ou subclínica da doença, apresentaram período de serviço e intervalo parto-primeiro serviço prolongados, e necessitaram de um maior número de serviços por concepção quando comparadas com vacas sem mastite. Ainda segundo esses

autores, quando a mastite subclínica evolui para a forma clínica da doença o impacto negativo sobre a reprodução é ainda maior.

Já com relação ao agente causador da mastite, Hertl et al. (2010) observaram que o impacto da mastite sobre a reprodução foi maior quando os casos eram provocados por bactérias Gram-negativas em relação às Gram-positivas e outros microrganismos. Hertl et al. (2014) concluíram que a probabilidade de concepção foi drasticamente reduzida quando os casos de mastite foram causados pela *Escherichia coli* ou pela *Klebsiella spp.*, ambas bactérias Gram-negativas. Entretanto, Schirck et al. (2001) e Santos et al. (2004) reportaram os mesmos efeitos deletérios da mastite independente do agente causador ser uma bactéria Gram-positiva ou Gram-negativa.

2.5.1 Influência dos mediadores da inflamação sobre os processos reprodutivos

Em 1972, Skarnes e Harper demonstraram inicialmente a evidência de que a endotoxina bacteriana foi capaz de induzir aborto em ratas gestantes. Segundo os autores, essa ação abortiva da endotoxina foi mediada pela PGF_{2α}, já que houve síntese generalizada deste hormônio em resposta à administração parenteral da endotoxina, constatado pela sua alta concentração na urina das ratas gestantes. Posteriormente, em 1976, Baird et al. comprovaram a ação luteolítica da PGF_{2α} em ruminantes, uma vez que a PGF_{2α} foi capaz de promover luteólise estrutural irreversível em ovelhas, com consequente redução gradativa da concentração de P₄.

Em 1991, Moore et al. reportaram que vacas com mastite causada por bactérias Gram negativas, sendo a *Escherichia coli* responsável por 61,8% dos casos, apresentaram 1,6 vezes mais chances de ter o intervalo interestro alterado do que vacas sadias. Este fato pode ser explicado pela ação estimulante do LPS liberado pelas bactérias sobre a síntese de PGF_{2α}, a qual estimula a luteólise prematura, comprometendo tanto a concepção quanto a sobrevivência embrionária (FREDRIKSSON, 1984; GIRI et al., 1990; NUGENT; HATLER; SILVIA, 2002). A irregularidade dos ciclos estrais indica que a luteólise ocorreu antes do reconhecimento materno da gestação, o que consequentemente desencadeia a perda embrionária (SANTOS et al., 2004).

Risco, Donovan e Hernandez (1999) reportaram que vacas que foram acometidas pela mastite clínica nos primeiros 45 DPP apresentaram risco 2,7 vezes maior de aborto dentro dos próximos 90 dias em relação às vacas que nunca contraíram mastite, o que demonstra o

envolvimento do processo inflamatório ocasionado pela mastite com a manutenção da gestação em bovinos.

De acordo com os trabalhos acima citados, inicialmente as hipóteses que relacionavam a ocorrência de doenças aos baixos índices reprodutivos dos rebanhos leiteiros eram fundamentadas na liberação prematura de PGF_{2α}, que desencadearia uma luteólise seguida de morte embrionária (GIRI et al., 1990; JACKSON et al., 1990; MOORE et al., 1991; NUGENT; HATLER; SILVIA, 2002). Porém, resultados de estudos recentes apontaram que o efeito prejudicial da inflamação sobre a reprodução é de origem multifatorial e envolve diferentes e complexos mecanismos ainda não completamente elucidados.

Em novilhas e vacas leiteiras de produção moderada à alta, utilizando sêmen de fertilidade conhecida, a taxa de fertilização pode variar de 90 a 100% (DISKIN e MORRIS, 2008), o que indica que a perda de gestação geralmente está associada a outras etapas do desenvolvimento embrionário que não a fertilização. Entretanto, Hansen, Soto e Natzke (2004) sugeriram que as respostas inflamatória e imune que ocorrem frente a uma infecção que pode acometer ou não o trato reprodutivo, podem estar associadas a ocorrência de anovulação após o estro, de falhas na fertilização ou ainda à mortalidade embrionária. Ribeiro et al. (2016) destacaram que a ocorrência de doenças inflamatórias nas primeiras semanas pós-parto pode estar relacionada às falhas na fertilização em bovinos.

Acredita-se que a presença tanto da endotoxina bacteriana durante a infecção quanto dos mediadores inflamatórios sintetizados pelo organismo do hospedeiro atuam conjunta e concomitantemente, promovendo efeitos deletérios sobre a reprodução. Segundo Burvenich et al. (1999) as endotoxinas bacterianas juntamente com os mediadores inflamatórios podem alterar a atividade de neurotransmissores presentes no cérebro, e assim podem também afetar a liberação hormonal feita pela hipófise e por outras glândulas endócrinas. Assim, a ação conjunta dessas substâncias pode comprometer, por exemplo, a funcionalidade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e consequentemente a atividade reprodutiva das fêmeas bovinas (DOBSON; SMITH, 2000). Recentemente, Bromfield et al. (2015) apontaram a falha na sinalização endócrina desse eixo como um dos possíveis fatores relacionados aos efeitos da inflamação sobre a fertilidade de vacas leiteiras.

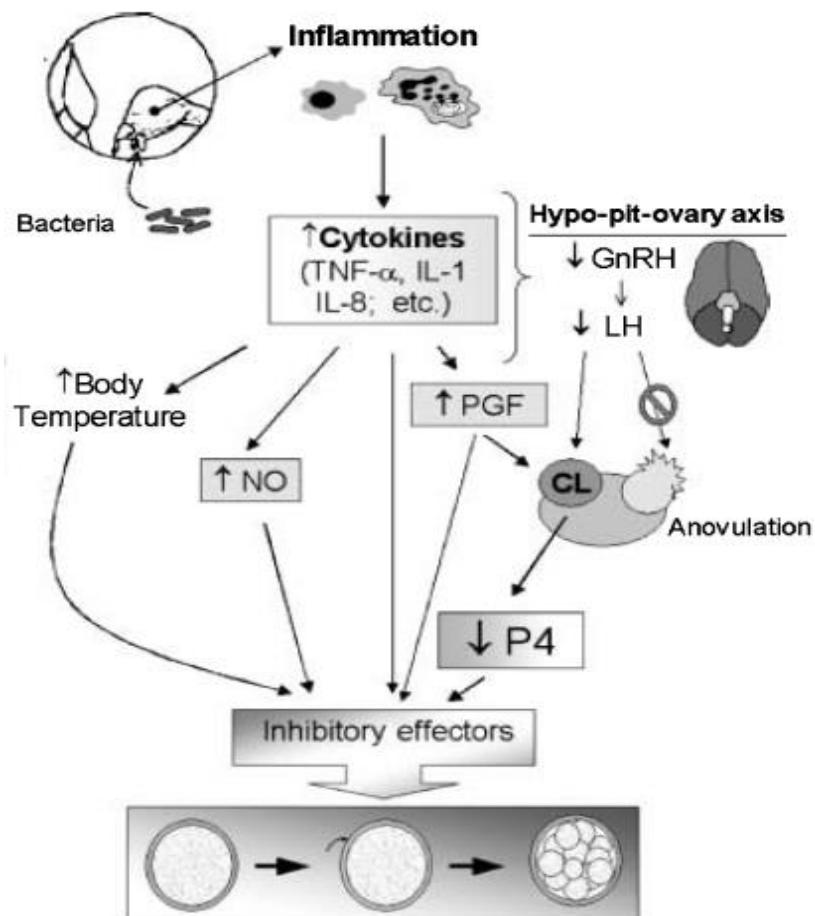


Figura 2. Vias potenciais pelas quais a infecção da glândula mamária pode reduzir a sobrevivência embrionária. De acordo com esse modelo, o fenômeno central que leva à mortalidade embrionária associado à mastite é o aumento na secreção de citocinas (tanto produzidos na glândula mamária e drenados pelos linfonodos quanto secretados ou produzidos por outros tecidos em resposta aos sinais derivados da glândula mamária) que por sua vez, modulam a função reprodutiva em diferentes níveis.
Fonte: Hansen et al., 2004.

Diante da alta incidência de mastite ambiental causada por bactérias Gram-negativas, as quais possuem sua patogenicidade associada à ação da endotoxina, vários estudos avaliaram os efeitos do LPS sobre a fertilidade de vacas leiteiras. Giri et al. (1984) constataram um aumento dose-dependente da concentração de PGF_{2 α} no leite após a infusão intramamária de LPS, sendo este aumento em torno de 17 vezes dentro das primeiras quatro horas e de oito vezes nas primeiras oito horas pós-infusão, enquanto que a concentração de PGE₂ no leite permaneceu inalterada. Jackson et al. (1990) infundiram LPS pelas vias intramamária e intravenosa, e constataram que a concentração sérica de PGF_{2 α} elevou-se apenas em resposta ao tratamento

intravenoso. Diante disso, esses autores afirmaram que para que o LPS estimule a síntese de PGF_{2α} aparentemente é necessário que a endotoxina alcance a circulação sistêmica.

A ação abortiva da liberação de LPS é dependente da fase da gestação na qual a infecção por bactérias Gram-negativas ocorre, sendo o terço inicial da gestação o mais sensível aos efeitos da endotoxina, período no qual a fonte extra-luteal de P₄ (placenta) ainda não sintetiza esse hormônio. Segundo Giri et al. (1990) este mecanismo está relacionado a liberação prolongada de PGF_{2α} pelo endométrio com subsequente redução da atividade luteal marcada pela queda gradativa da concentração de P₄, tornando seus níveis incompatíveis com a manutenção da gestação.

A resposta inflamatória da mastite clínica é capaz de alterar a secreção das gonadotrofinas. Em ovelhas em anestro, o LPS administrado pela via intravenosa promoveu uma disfunção do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, visto que a endotoxina bacteriana estimulou a liberação de cortisol e reduziu a concentração plasmática do hormônio luteinizante (LH) sem, no entanto, alterar o padrão de liberação do hormônio folículo-estimulante (FSH) (HERMAN; ROMANOWICZ; TOMASZEWSKA-ZAREMBA, 2010). Peter et al. (1990) também reportaram que a elevação dos níveis de cortisol estimulada pelo LPS em novilhas pode ter sido responsável tanto pelo bloqueio na síntese de estradiol quanto pela falha no pico pré-ovulatório de LH. Também em ovelhas, a endotoxina interferiu negativamente sobre os eventos endócrinos que precedem a ovulação, tais como no pico pré-ovulatório de estradiol e subsequente de LH, causando atraso ou bloqueio deste último (BATTAGLIA et al., 2000).

De acordo com Lavon et al. (2008) a exposição de vacas à endotoxina de *Escherichia coli* no início do estro prolongou o intervalo entre o estro e a ovulação em 30% das vacas, quando a substância foi administrada próximo ao momento do pico de LH. Este fato pode ser explicado pela depressão na liberação pulsátil de LH pela hipófise devido à ação da endotoxina, que resulta em queda na secreção pré-ovulatória de estradiol, o que pode consequentemente reduzir a manifestação do estro, a secreção pré-ovulatória de LH e atrasar ou ainda impedir a ocorrência da ovulação (SUZUKI et al., 2001). Em um estudo semelhante, Hockett et al. (2005) induziram mastite utilizando *Streptococcus uberis* com o intuito de verificar os efeitos da infecção sobre o comportamento de estro e ovulação. Como resultado, apenas 33% das vacas que desenvolveram um quadro clínico de mastite apresentaram estro e ovulação, enquanto que esses eventos ocorreram em 100% dos animais do grupo controle. A partir desses resultados, é possível afirmar que a mastite causada tanto por bactérias Gram-negativas quanto por Gram-positivas pode interferir negativamente sobre o funcionamento endócrino relacionado ao sistema reprodutivo.

A indução de mastite clínica utilizando endotoxina de *Escherichia coli* durante o período próximo à ovulação não afetou a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH, porém a magnitude do pico de LH foi reduzida em mais de 50% nos animais desafiados em comparação aos animais controle (NUGENT; HATLER; SILVIA, 2002). Ainda de acordo com esses autores, a infusão intramamária de endotoxina não foi capaz de impedir a ovulação e que provavelmente sua ação deletéria seja mais evidente durante a fase luteal do ciclo estral de bovinos. Roth et al. (2013) evidenciaram o efeito negativo da mastite clínica de ocorrência natural e espontânea sobre o desenvolvimento da competência ovocitária de fêmeas bovinas. Contudo, mesmo que as doenças potencialmente interfiram em algumas etapas do desenvolvimento folicular e ovocitário, a ocorrência dessas, no entanto, não impede que o folículo dominante atinja seu crescimento máximo e ovule (BROMFIELD et al., 2015).

O desafio inflamatório promovido pelo LPS parece afetar diretamente o funcionamento do hipotálamo e da hipófise. No hipotálamo foi verificado o efeito do LPS sobre a regulação da ação dos neurônios responsáveis pela síntese do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Já na adeno-hipófise, seus efeitos podem ocorrer tanto pela inibição da liberação de LH, comprovada pela redução da concentração plasmática de LH em ovelhas em anestro, quanto pela diminuição da responsividade das células hipofisárias que possuem receptores para GnRH ao estímulo desse hormônio, visto que a expressão dos receptores de GnRH na adeno-hipófise também foi reduzida (HERMAN; TOMASZEWSKA-ZAREMBA, 2010). Assim, todo o controle endócrino responsável pela retomada da ciclicidade ovariana em ovelhas em anestro pode ser comprometido pela ocorrência dos processos infecciosos.

Herath et al. (2007) fizeram exposição das células da granulosa de folículos ovarianos ao LPS *in vivo* e depois cultivaram essas células *in vitro* na ausência de células do sistema imune e constataram que há uma expressão dos receptores do tipo TLR-4 nas células da granulosa e que o LPS promove uma ação direta sobre a síntese de estradiol, resultando em menores concentrações desse hormônio. Assim, esse pode ser um dos mecanismos pelos quais a infecção bacteriana afeta direta e negativamente crescimento folicular ovariano, e consequentemente a fertilidade de vacas leiteiras acometidas pela mastite. Da mesma forma, Williams et al. (2008) verificaram que a infusão de LPS no lúmen uterino de vacas, mimetizando uma metrite, também afetou diretamente a produção de estradiol pelas células da granulosa isoladas de folículos de pequeno (< 4 mm), médio (4-8 mm) e grande diâmetro (> 8 mm). Magata et al. (2014) também reportaram que a esteroidogênese sofre influência do LPS, mesmo presente em baixas concentrações no fluido folicular. Estes resultados demonstram que há uma influência negativa do LPS na atividade ovariana durante o processo infeccioso, independentemente do local onde

a infecção teve início. Além do comprometimento da esteroidogênese em decorrência do LPS, Bromfield e Sheldon (2013) constataram que a exposição do córtex ovariano ao LPS *in vitro* resultou em queda no *pool* de folículos ovarianos primordiais em bovinos.

Soto, Natzke e Hansen (2003a) reportaram que a adição de LPS ou de PGF_{2α} ao meio de maturação ovocitária reduziu o número de ovócitos bovinos que se desenvolveram até a fase de blastocisto oito dias após a fertilização. Quando essas substâncias foram adicionadas ao meio somente após a fertilização, não foi detectado efeito sobre o início do desenvolvimento embrionário, demonstrando que tanto a endotoxina bacteriana quanto um mediador da inflamação podem reduzir as taxas de concepção pelo seu efeito direto sobre a qualidade e a competência ovocitária (SOTO; NATZKE; HANSEN, 2003a; ROTH et al., 2013).

Recentemente, Lüttgenau et al. (2016) verificaram que repetidas infusões intrauterinas de LPS, como forma de mimetizar um quadro de endometrite subclínica causada por bactérias Gram-negativas, durante os primeiros nove dias do ciclo estral foram capazes de induzir luteólise prematura, devido ao aumento da concentração plasmática de PGF_{2α}, e redução da P₄, além da diminuição do tamanho do CL e da sua vascularização. Estes autores também verificaram um aumento na expressão gênica endometrial de algumas citocinas pró-inflamatórias e alteração dos transcritos expressos pelo tecido luteal em virtude do desafio. Em contrapartida, Herath et al. (2009) verificaram que vacas acometidas por infecções uterinas causadas pela *Escherichia coli* apresentaram maior concentração plasmática de PGE₂ em relação à PGF_{2α}, o que foi comprovado *in vitro* pelo acúmulo predominante de PGE₂ em explantes endometriais após o estímulo do LPS, sendo este o provável mecanismo associado ao prolongamento da fase luteal em fêmeas bovinas frente às infecções do trato reprodutivo.

Nas respostas do organismo em decorrência de uma doença infecciosa cujo órgão alvo não é o útero, como por exemplo nos casos de mastite, as citocinas parecem desempenhar um papel importante na ativação da perda embrionária precoce. A ação deletéria das citocinas sobre a reprodução estão relacionadas a hipertermia, aos efeitos tóxicos sobre o CL, ao estímulo a síntese de PGF_{2α}, a redução da proliferação das células endometriais e a interferência tanto na maturação ovocitária quanto no desenvolvimento embrionário (HANSEN; SOTO; NATZKE, 2004).

Segundo Pecchi et al. (2009) a administração sistêmica de LPS induz a síntese de citocinas que atuam em áreas específicas do cérebro, e as células dessas regiões podem expressar receptores para o LPS e sofrer também pela ação direta da resposta inflamatória. Em roedores e primatas foi demonstrado o efeito do TNF-α sobre a liberação de PGF_{2α} pelo endométrio (ROBY; HUNT, 1994). Miyamoto, Skarzynski e Okuda (2000) investigaram esse

efeito *in vitro* utilizando tecido endometrial de bovinos, e como resultado encontraram que essa citocina é capaz de estimular a síntese e a liberação de PGF_{2α} ao longo de todo o ciclo estral, estando essa síntese na dependência do tempo e da dose de TNF-α a qual o endométrio foi exposto.

Spicer (1998) verificou que o TNF-α também é capaz de inibir a síntese de estradiol pelas células da granulosa e de androstenediona, substância precursora da testosterona, pelas células da teca, por meio da ligação dessa citocina ao seu próprio receptor, o que evidencia o envolvimento das citocinas pró-inflamatórias na disfunção da esteroidogênese. Assim, o LPS age indiretamente, por meio do estímulo à produção de citocinas pelo hospedeiro em resposta à uma infecção, sobre a síntese de estradiol pelas células da granulosa (MEHTA et al., 2015).

A produção de PGF_{2α} em decorrência do estímulo provocado pelo TNF-α é mediada pela ativação da enzima fosfolipase A₂ e pela conversão do ácido araquistônico em prostaglandina (SKARZYNNSKI; MIYAMOTO; OKUDA, 2000). Esses autores também verificaram que as células epiteliais e estromais do endométrio se comportaram de forma diferente frente ao estímulo, visto que as células-alvo do TNF-α foram as células do estroma, as quais foram responsáveis pela síntese de PGF_{2α}. No entanto, normalmente essa PG é produzida pelas células epiteliais, enquanto que as células estromais sintetizam PGE₂ (ASSELIN et al., 1996).

A perda da viabilidade das células luteais bovinas foi demonstrada por Petroff, Petroff e Pate. (2001) após o cultivo *in vitro* de células do CL na presença das citocinas TNF-α e interferon gamma (IFN-γ), o que evidencia a citotoxicidade das citocinas e seu envolvimento na luteólise.

A adição da citocina TNF-α ao meio de maturação ovocitária não alterou a taxa de clivagem, no entanto promoveu uma redução no número de ovócitos bovinos que se desenvolveram até a fase de blastocisto oito dias após a fertilização em todas as concentrações testadas. Quando o TNF-α foi adicionado ao meio somente após a fertilização, a proporção de ovócitos bovinos que se desenvolveram até a fase de blastocisto não foi alterada, porém foi verificada a ocorrência de apoptose em maior proporção nos embriões acima de nove células aos quatro dias de desenvolvimento (SOTO; NATZKE; HANSEN, 2003b).

2.6 Desenvolvimento embrionário inicial e reconhecimento materno da gestação

A baixa eficiência reprodutiva observada nos rebanhos leiteiros, a qual reflete a queda marcante nas taxas de concepção e elevação significativa nas taxas de perda gestacional, não pode ser atribuída apenas à elevação do nível de produção de leite das vacas, mas também às

mudanças relacionadas a fisiologia, genética e manejo desses animais (LUCY, 2001). O complexo processo que envolve o estabelecimento e a manutenção da gestação em vacas leiteiras pode ser influenciado por diversos fatores, especialmente os ambientais, fisiológicos, genéticos e de manejo (SANTOS et al., 2010).

As primeiras semanas de gestação são consideradas críticas para o desenvolvimento embrionário. Wiltbank et al. (2016) reportaram elevada taxa de perda de gestação nos primeiros sete dias do ciclo estral, especialmente nas vacas leiteiras de alta produção, a qual varia em torno de 20 a 50%. Segundo esses autores, vacas mais produtivas ovulam folículos de maior diâmetro que contém ovócitos envelhecidos, assim como a redução na concentração de P₄ durante o período pré-ovulatório ou o atraso na elevação da sua concentração após a ovulação comprometem o desenvolvimento subsequente do embrião (DISKIN; MURPHY; SREENAN, 2006; SPENCER et al., 2008; WILTBANK et al., 2016). Dentre outros fatores, os autores também atribuíram como possíveis causas da alta mortalidade embrionária em bovinos o estresse térmico, as doenças inflamatórias e a perda de condição corporal (WILTBANK et al., 2016). De acordo com Berg et al. (2010) na primeira semana da gestação, a ativação do genoma e a diferenciação das células embrionárias também são eventos críticos necessários para o adequado desenvolvimento do embrião bovino nesta fase.

No período compreendido entre o 8º e o 27º dia de gestação, segundo a classificação de Wiltbank et al. (2016), as perdas gestacionais estão associadas às falhas na comunicação entre o embrião, o útero e o ovário, que consequentemente leva à manutenção inadequada do CL e à queda da concentração de P₄, tornando-a incompatível com a prenhez. A não sinalização da presença do conceito para a mãe, quer seja por atraso ou por alguma falha durante o seu crescimento, altera significativamente os padrões secretórios dos hormônios reprodutivos envolvidos no processo, tais como o E₂, P₄, OXT e PGF_{2α}, culminando com a luteólise. As perdas embrionárias nesse período podem variar cerca de 30% entre fazendas leiteiras, entretanto Diskin, Murphy e Sreenan (2006) reportaram que, do 8º ao 16º dia de gestação, essa taxa pode variar de 70 a 80%.

O estágio inicial do desenvolvimento embrionário de bovinos é constituído por diversas divisões celulares que precisam ocorrer no momento apropriado e de forma sincronizada. Após a fecundação, o zigoto é transportado pelo oviduto até atingir o útero dentro de quatro a seis dias. No útero, o embrião na fase de mórula sofre diversas divisões mitóticas que promovem o aumento no número de suas células, o qual passa para o estágio de blastocisto, ainda contido dentro dos limites da zona pelúcida. O blastocisto inicial passa por um processo de diferenciação celular formando duas regiões distintas, sendo a massa celular interna que

originará o indivíduo propriamente dito, e o trofoblasto que formará os anexos embrionários. Há também a formação de uma cavidade repleta de fluido denominada blastocele. Até a fase de blastocisto, o desenvolvimento embrionário parece não depender diretamente da participação do útero, podendo ser replicado em laboratório. À medida em que o blastocisto cresce, há um acúmulo de fluido na blastocele e o trofoblasto passa a sintetizar enzimas proteolíticas, sendo que esses eventos ocorrem concomitantemente afim de romper a zona pelúcida, fato que ocorre entre o nono e décimo dia de gestação (SCHLAFER, FISHER e DAVIS, 2000; SENGERS, 2005; FORDE; LONERGAN, 2012).

Uma vez fora da zona pelúcida, o blastocisto passa a ser dependente do ambiente uterino e de suas secreções para sobreviver. O termo histotrofo se refere a uma substância embriotrófica composta por proteínas, lipídeos, aminoácidos, açúcares e íons secretado pelas glândulas endometriais e encontrado no líquido luminal uterino, cuja função é nutrir o embrião antes da implantação e da placentação. Os nutrientes presentes no histotrofo são transportados até as células do trofoblasto e do embrião para servirem de combustível para os processos de crescimento e diferenciação celular. Entre o 12º e o 14º dia da gestação, o embrião muda sua conformação esférica para a forma filamentosa, iniciando o processo de elongação/alongamento devido a rápida proliferação das células do trofoblasto. Assim, o alongamento do conceito requer a sua exposição ao ambiente uterino (FORDE; LONERGAN, 2012; WILTBANK et al., 2016).

O estabelecimento da gestação nas fêmeas bovinas é dependente da produção de sinais luteotróficos pelo conceito antes que haja o desencadeamento dos mecanismos luteolíticos de origem materna. Para isso, é necessário que o embrião sinalize para a mãe a sua presença no interior do útero. Essa sinalização ocorre por meio da síntese da proteína trofoblástica bovina denominada de interferon-tau (IFN- τ), a qual, como o nome já diz, é produzida em grande quantidade nessa fase pelas células embrionárias do trofoblasto. Além do papel essencial do IFN- τ no reconhecimento materno da gestação, essa proteína possui função de estimular a produção de proteínas pelas glândulas endometriais que irão suprir a demanda do embrião para seu crescimento, além de estimular determinados genes relacionados à receptividade uterina. Em bovinos, a fase de alongamento do conceito coincide com a máxima produção de IFN- τ (SENGERS, 2005; SPENCER et al., 2008; ANTONIAZZI et al., 2011).

De acordo com Mann e Lanning (2001) para que o reconhecimento materno da gestação ocorra de forma bem sucedida, é necessário que o conceito produza IFN- τ em quantidade suficiente para impedir a cascata de eventos que culminam com a luteólise. Além disso, uma vez estabelecida a gestação da fêmea bovina, as PGE₁ e PGE₂ evitam a queda na concentração

de P₄ por meio da manutenção do CL, visto que este grupo das PG também possui ação luteotrófica (ASSELIN et al., 1996; TREVISOL et al., 2013).

A P₄ e o IFN-τ são os principais moduladores dos mecanismos relacionados ao estabelecimento da gestação, além do fato de haver uma correlação positiva entre a concentração plasmática de P₄ da vaca e a produção de IFN-τ pelo conceito (KERBLER et al., 1997). Após a ovulação, a elevação gradativa e crescente na concentração sanguínea de P₄ está associada ao maior alongamento do conceito, e consequentemente maior produção de IFN-τ, o que favorece o sucesso da manutenção da gestação (GARRETT et al., 1988; MANN; LAMMING 2001). Isso se deve ao fato de que a P₄ promove mudanças no ambiente uterino que regulam sua receptividade e favorecem a sobrevivência e o crescimento do embrião, já que esse hormônio exerce papel importante sobre a produção e secreção de substâncias endometriais envolvidas no desenvolvimento embrionário (FORDE; LONERGAN, 2012). Assim, sugere-se que a P₄ parece influenciar indiretamente o crescimento do conceito por meio da alteração na expressão gênica endometrial a qual também altera a composição do histotrofo, e não pelo efeito direto sobre o próprio embrião (LONERGAN; FORDE; SPENCER, 2016). A concentração reduzida de P₄ durante o início da fase luteal pode diminuir a taxa de crescimento embrionário, devido ao seu efeito negativo sobre a qualidade do histotrofo (WILTBANK et al., 2016).

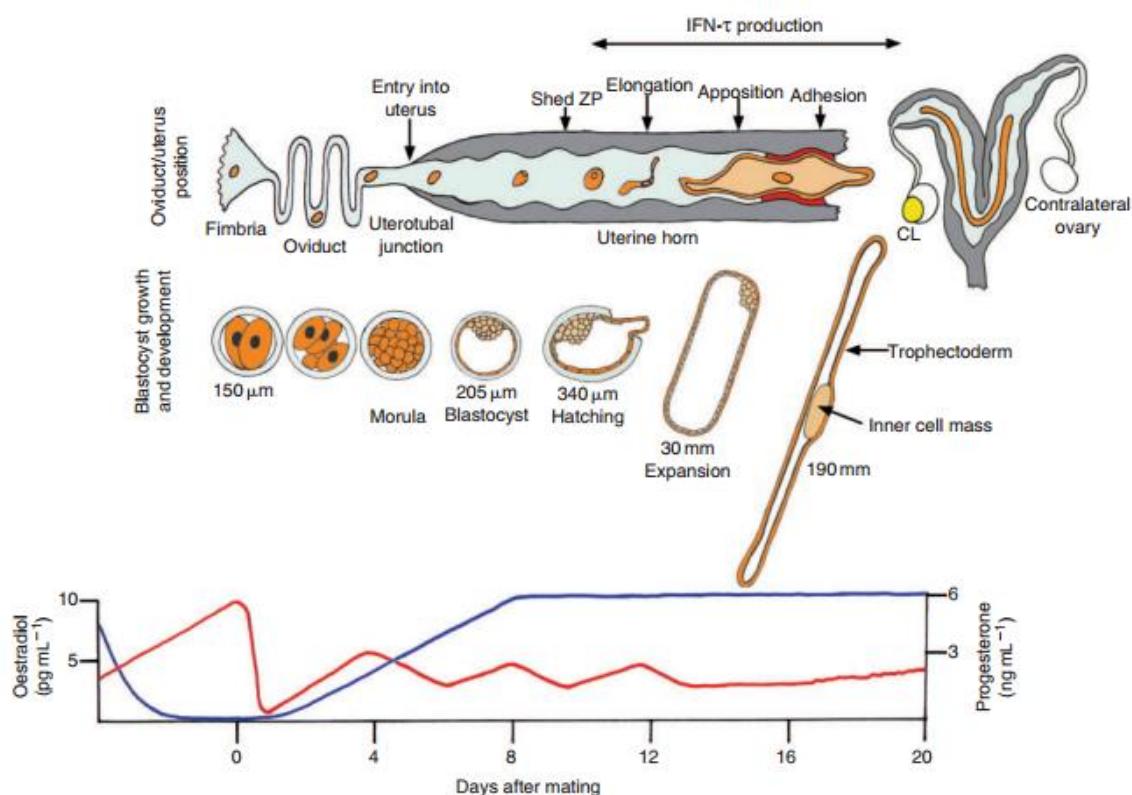


Figura 3. Eventos iniciais da gestação em ovinos. Este esquema resume as mudanças no desenvolvimento do embrião/blastocisto após a fertilização em relação à posição no trato reprodutor feminino e aos níveis circulantes dos hormônios esteroides. Fertilização ocorre no oviduto e o embrião em estágio de mórula entra no útero nos dias 4-5. Forma de blastocisto no dia 6, eclode da zona pelúcida no dia 8, transição da forma esférica para tubular no dia 11 e depois elonga para concepto filamentoso entre os dias 12 e 16, com o início da implantação envolvendo aposição e anexo transitório (dias 12-15) e firme adesão no dia 16. Por volta do dia 17, o concepto filamentoso ocupa inteiramente o corno uterino ipsilateral e se alonga em direção ao corpo do útero dentro do corno contralateral. Fonte: SPENCER et al., 2007.

Diversas alterações espaciais e temporais na expressão gênica do tecido endometrial acontecem em função da interação entre o útero e o concepto (SPENCER et al., 2008). Inicialmente, essas mudanças parecem ser independentes da presença do concepto propriamente dito e mediadas pelo E₂ e pela P₄, bem como pela expressão de seus receptores (FORDE et al., 2011). De acordo com esses autores, os transcritos expressos nos dias cinco, sete e treze de gestação não diferiram entre novilhas gestantes e não gestantes ou cíclicas. No entanto, durante a fase do reconhecimento materno da gestação (16º dia de gestação) mais de 700 transcritos foram diferentemente expressos no endométrio de novilhas gestantes em relação às cíclicas, o que demonstra que a partir desse período o endométrio passa a ser responsável à sinalização do concepto. O útero, sob a influência dos hormônios esteroides, também participa da regulação do transporte e/ou da secreção local de nutrientes e de alguns fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 2 (IGF-2) que irão compor o histotrofo e estimular o crescimento do concepto (GEISERT et al., 1991).

Da mesma forma que a mãe precisa reconhecer a presença do embrião para dar continuidade ao desenvolvimento da gestação, também é necessário que o sistema imunológico materno não reconheça o tecido embrionário como sendo não pertencente ao seu próprio organismo. Para isso, o embrião é capaz de regular uma supressão temporária ou uma tolerância para que o sistema imune da mãe não ative mecanismos de combate e eliminação do corpo estranho, o que resultaria em perda embrionária. Isto possivelmente se deve a imaturidade antigênica do concepto e/ou pela inércia ou imuno-tolerância materna na fase inicial da gestação (WALKER et al., 2010). Ainda de acordo com estes autores, vários genes relacionados à função imune do endométrio foram diferentemente expressos em vacas gestantes quando comparadas com as vacas cíclicas no 17º dia da gestação. Ao mesmo tempo, para que a susceptibilidade uterina às infecções não aumente, genes associados a imunidade inata tem sua expressão aumentada durante esse período de imunossupressão.

REFERÊNCIAS

- AKERS, R.M.; NICKERSON, S.C. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v.16, n.4, p.275-289, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9231-3>
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, Cambridge, v.124, n.4, p. 783-801, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- ALLUWAIMI, A.M. The cytokines of the bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. **Research in Veterinary Science**, London, v.77, n.3, p.211-222, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.04.006>
- ALSEMGEEST, S.P.M.; VAN'T KLOOSTER, G.A.E.; VAN MIERT, A.S.J.P.A.M.; HULSKAMP-KOCH, C.K.; GRUYNS, E. Primary bovine hepatocytes in the study of cytokine induced acute-phase protein secretion in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.53, n.1-2, p.179-184, 1996. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(96\)05602-4](https://doi.org/10.1016/0165-2427(96)05602-4)
- ANTONIAZZI, A.Q.; HENKES, L.E.; OLIVEIRA, J.F.C.; HANSEN, T.R. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.1, p.176-185, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000100029>
- ASSELIN, E.; GOFF, A.K.; BERGERON, H.; FORTIER, M.A. Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2a and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.54, n.2, p.371-379, 1996. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.2.371>
- BAIRD, D.T.; LAND, R.B.; SCARAMUZZI, R.J.; WHEELER, A.G. Endocrine changes associated with luteal regression in the ewe; The secretion of ovarian oestradiol, progesterone and androstenedione and uterine prostaglandin F_{2α} throughout the oestrus cycle. **Journal of Endocrinology**, v. 69, n. 2, p. 275-286, 1976. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0690275>
- BALLOU, M.A. The impacts of disease on nutritional requirements and performance of lactating cows. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 20., 2016, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, MG, p.1-12.
- BANNERMAN, D.D.; KAUF, A.C.W; PAAPE, M.J.; SPRINGER, H.R.; GOOF, J.P. Comparison of Holstein and Jersey innate immune responses to *Escherichia coli* intramammary infection. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.6, p.2225-2235, 2008. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1013>
- BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; HARE, W.R.; SOHN, E.J. Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.10, p.3128-3137, 2003. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73914-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73914-9)
- BARKER, A.R.; SCHRICK, F.N.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.5, p.1285-1290, 1998. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75690-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75690-5)

BATTAGLIA, D.F.; KRASA, H.B.; PADMANABHAN, V.; VIGUIÉ, C.; KARSCH, F.J. Endocrine alterations that underlie endotoxin-induced disruption of the follicular phase in ewes. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, p. 45-53, 2000.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.45>

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**, Stoneham, v.73, n.2, p.250-260, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.005>

BLUM, J.W.; DOSOGNE, H.; HOEBEN, D.; VANGROENWEGHE, F.; HAMMON, H.M.; BRUCKMAIER, R.M.; BURVENICH, C. Tumor necrosis factor- α and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.19, n.4, p.223-235, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(00\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(00)00079-5)

BLUM, S.E.; ELIMELECH, D.H.; LEITNER, G. Long term effects of *Escherichia coli* mastitis. **The Veterinary Journal**, London, v.201, n.1, p.72-77, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.008>

BRADFORD, B.J.; YUAN, K.; FARNEY, J.K.; MAMEDOVA, L.K.; CARPENTER, A.J. Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.98, n.10, p.6631-6650, 2015. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9683>

BRADLEY, A.J. Bovine Mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, London, v.164, n.2, p.116-128, 2002. <https://doi.org/10.1053/tvjl.2002.0724>

BROMFIELD, J.J.; SANTOS, J.E.P.; BLOCK, J.; WILLIAMS, R.S.; SHELDON, I.M. Physiology and Endocrinology Symposium: Uterine infection: Linking infection and innate immunity with infertility in the high-producing dairy cow. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.93, n.5, p.2021-2033, 2015. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8496>

BROMFIELD, J.J.; SHELDON, I.M. Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.88, n.4, p.1-9, 2013.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106914>

BRUCKMAIER, R.M.; MEYER, H.H.D. Immunomediator and milk protein gene expression in mammary tissue during endotoxin-induced mastitis. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v.98, n.1-2, p.81-87, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.10.006>

BURVENICH, C.; PAAPE, M.J.; HOEBEN, D.; DOSOGNE, H.; MASSART-LEËN, A.M.; BLUM, J.W. Modulation of the inflammatory reaction and neutrophil defense of the bovine lactating mammary gland by growth hormone. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.17, n.2-3, p.149-159, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(99\)00032-6](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(99)00032-6)

BURVENICH, C.; MONFARDINI, E.; MEHRZAD, J.; CAPUCO, A.V.; PAAPE, M.J. Role of neutrophil polymorphonuclear leukocytes during bovine coliform mastitis: physiology or pathology? **Verhandelingen - Koninklijke Academie Voor Geneeskunde van Belgie**, v.66, n.2, p.97-150, 2004.

BURVENICH, C.; BANNERMAN, D.D.; LIPPOLIS, J.D.; PEELMAN, L.; NONNECKE, B.J.; KEHRLI JR., M.E.; PAAPE, M.J. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, Supplement, p. E39-E54, 2007. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-696>

CAI, T.Q.; WESTON, P.G.; LUND, L.A.; BRODIE, B.; McKENNA, D.J.; WAGNER, W.C. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.55, n.7, p.934-943, 1994.

CARNEIRO, D.M.V.F.; DOMINGUES, P.F.; VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.6, p.1934-1943, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000106>

CECILIANI, F.; CERON, J.J.; ECKERSALL, P.D.; SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v.75, n.14, p.4207-4231, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.004>

CHA, E.; KRISTENSEN, A.R.; HERTL, J.A.; SCHUKKEN, Y.H.; TAUER, L.W.; WELCOME, F.L.; GRÖHN, Y.T. Optimal insemination and replacement decisions to minimize the cost of pathogen-specific clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.97, n.4, p.2101-2117, 2014. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7067>

CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.E.P.; REYNOLDS, J.P. CERRI, R.L.A.; JUCHEM, S.O.; OVERTON, M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.84, n.3-4, p.239-255, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.012>

CLUDTS, I.; CLEUTER, Y.; KETTMANN, R.; BURNY, A.; DROOGMANS, L. Cloning and characterization of the tandemly arranged bovine lymphotoxin and tumour necrosis factor-alpha genes. **Cytokine**, v.5, n.4, p.336-341, 1993. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(93\)90065-D](https://doi.org/10.1016/1043-4666(93)90065-D)

CRAVEN, N.; WILLIAMS, M.R. Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.10, n.1, p.71-127, 1985. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(85\)90039-X](https://doi.org/10.1016/0165-2427(85)90039-X)

CYPLES, J.A.; FITZPATRICK, C.E.; LESLIE, K.E.; DeVRIES, T.J.; HALEY, D.B.; CHAPINAL, N. Short communication: The effects of experimentally induced *Escherichia coli* clinical mastitis on lying behavior of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.95, n.9, p.2571-2575, 2012. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5135>

DA SILVA, N. **Criação de bovinos**. Colaboração de Marques, D.C. 7. ed. Belo Horizonte: CVP Consultoria veterinária e publicações, 2006. 586 p.

DINARELLO, C.A. Historical insights into cytokines. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.37, n.1 (Supplement), p.S34-S45, 2007. <https://doi.org/10.1002/eji.200737772>

DISKIN, M.G.; MURPHY, J.J.; SREENAN, J.M. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.96, n.3-4, p.297-311, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.008>

DISKIN, M.G. & MORRIS, D.G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.43, n.2, p.261-268, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x>

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 743-752, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00080-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00080-4)

EATON, J.W.; BRANDT, P.; MAHONEY, J.R.; LEE JR, J.T. Haptoglobin: a natural bacteriostat. **Science**, New York, v.215, n.4533, p.691-693, 1982. <https://doi.org/10.1126/science.7036344>

EBERHART, R.J.; NATZKE, R.P.; NEWBOULD, F.S.H.; NONNECKE, B.; THOMPSON, P. Coliform mastitis - a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.62, n.1, p.01-22, 1979.

ECKERSALL, P.D.; YOUNG, F.J.; McCOMB, C.; HOGARTH, C.J.; SAFI, S.; WEBER, A.; McDONALD, T.; NOLAN, A.M.; FITZPATRICK, J.L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, London, v.148, n.2, p.35-41, 2001. <https://doi.org/10.1136/vr.148.2.35>

FERREIRA, A.M.; BISLEV, S.L.; BENDIXEN, E.; ALMEIDA, A.M. The mammary gland in domestic ruminants: A systems biology perspective. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Amsterdam, v.94, p.100-123, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.09.012>

FITZPATRICK, C.E.; CHAPINAL, N.; PETERSSON-WOLFE, C.S.; DeVRIES, T.J.; KELTON, D.F.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E. The effect of meloxicam on pain sensitivity, rumination time, and clinical signs in dairy cows with endotoxin-induced clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, n.5, p.2847-2856, 2013. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5855>

FORDE, N.; CARTER, F.; SPENCER, T.E.; BAZER, F.W.; SANDRA, O.; MANSOURI-ATTIA, N.; OKUMU, L.A.; McGETTIGAN, P.A.; MEHTA, J.P.; McBRIDE, R.; O'GAORA, P.; ROCHE, J.F.; LONERGAN, P. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? **Biology of Reproduction**, Champaign, v.85, n.1, p.144-156, 2011. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.090019>

FORDE, N.; LONERGAN, P. Transcriptomic analysis of the bovine endometrium: what is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle? **Journal of Reproduction and Development**, v.58, n.2, p.189-195, 2012. <https://doi.org/10.1262/jrd.2011-021>

FOURICHON, C.; SEEGERS, H.; MALHER, X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. **Theriogenology**, Stoneham, v.53, n.9, p.1729-1759, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00311-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00311-3)

FREDRIKSSON, G.H. Some reproductive and clinical aspects of endotoxins in cows with special emphasis on the role of prostaglandins. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v.25, n.3, p. 365-377, 1984.

GARRETT, J.E.; GEISERT, R.D.; ZAVY, M.T.; MORGAN, G.L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.84, n.1, p.437-446, 1988.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0840437>

GEISERT, R.D.; LEE, C.Y.; SIMMEN, F.A.; ZAVY, M.T.; FLISS, A.E.; BAZER, F.W.; SIMMEN, R.C.M. Expression of messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I, -II, and insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.45, n.6, p.975-983, 1991. <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.6.975>

GIRI, S.N.; CHEN, Z.; CARROLL, E.J.; MUELLER, R.; SCHIEDT, M.J.; PANICO, L. Role of prostaglandins in pathogenesis of bovine mastitis induced by Escherichia coli endotoxin. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.45, n.3, p.586-591, 1984.

GIRI, S.N.; EMAU, P.; CULLOR, J.S.; STABENFELDT, G.H.; BRUSS, M.L.; BONDURANT, R.H.; OSBURN, B.I. Effects of endotoxin infusion on circulating levels of eicosanoids, progesterone, cortisol, glucose and lactic acid, and abortion in pregnant cows. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.21, n.3, p.211-231, 1990.
[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(90\)90033-R](https://doi.org/10.1016/0378-1135(90)90033-R)

GRUMMER, R.R.; MASHEK, D.G.; HAYIRLI, A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. **The Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, Philadelphia, v.20, n.3, p.447-470, 2004.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; NIEWOLD, T.A.; KOOPMANS, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University Science**, v.6B, n.11, p.1045-1056, 2005. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B1045>

HAKOGI, E.; TAMURA, H.; TANAKA, S.; KOHATA, A.; SHIMADA, Y.; TABUCHI, K. Endotoxin levels in milk and plasma of mastites-affected cows measured with a chromogenic limulus test. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.20, n.3, p.267-274, 1989.
[https://doi.org/10.1016/0378-1135\(89\)90050-3](https://doi.org/10.1016/0378-1135(89)90050-3)

HANSEN, P.J.; SOTO, P.; NATZKE, R.P. Mastitis and fertility in cattle – possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. **American Journal of Reproductive Immunology**, Nova York, v.51, n.4, p.294-301, 2004.

HARMON, R.J.; HEALD, C.W. Migration of polymorphonuclear leukocytes into the bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.43, n.6, p.992-998, 1982.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.7, p.2103-2112, 1994. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77153-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77153-8)

HERATH, S.; WILLIAMS, E.J.; LILLY, S.T.; GILBERT, R.O.; DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. **Reproduction**, Cambridge, v.134, n.5, p.683-693, 2007.
<https://doi.org/10.1530/REP-07-0229>

HERATH, S.; LILLY, S.T.; FISCHER, D.P.; WILLIAMS, E.J.; DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin $F_{2\alpha}$ to prostaglandin E_2 in bovine endometrium. **Endocrinology**, Baltimore, v.150, n.4, p.1912-1920, 2009. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1379>

HERMAN, A.P.; ROMANOWICZ, K.; TOMASZEWSKA-ZAREMBA, D. Effect of LPS on reproductive system at the level of the pituitary of anestrous ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.45, n.6, p. e351-e359, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01577.x>

HERMAN, A.P.; TOMASZEWSKA-ZAREMBA, D. Effect of endotoxin on the expression of GnRH and GnRHR genes in the hypothalamus and anterior pituitary gland of anestrous ewes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.120, n.1-4, p.105-111, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.03.011>

HERTL, J.A.; GRÖHN, Y.T.; LEACH, J.D.G.; BAR, D.; BENNETT, G.J.; GONZÁLEZ, R.N.; RAUCH, B.J.; WELCOME, F.L.; TAUER, L.W.; SCHUKKEN, Y.H. Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.93, n.4, p.1551-1560, 2010. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2599>

HERTL, J.A.; SCHUKKEN, Y.H.; WELCOME, F.L.; TAUER, L.W.; GRÖHN, Y.T. Effects of pathogen-specific clinical mastitis on probability of conception in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.97, n.11, p.6942-6954, 2014.
<https://doi.org/10.3168/jds.2014-8203>

HOCKETT, M.E.; ALMEIDA, R.A.; ROHRBACH, N.R.; OLIVER, S.P.; DOWLEN, H.H.; SCHRICK, F.N. Effects of induced clinical mastitis during preovulation on endocrine and follicular function. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, n.7, p.2422-2431, 2005.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72920-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72920-9)

HOGAN, J.; SMITH, K.L. Coliform mastitis. **Veterinary Research**, BioMed Central, Les Ulis, v.34, n.5, p.507-519, 2003.

HOGAN, J.S.; TODHUNTER, D.A.; SMITH, K.L.; SCHOENBERGER, P.S. Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from intramammary infections to phagocytosis by bovine neutrophils. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, n.12, p.3324-3329, 1992.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78108-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78108-9)

HUDSON, C.D.; BRADLEY, A.J.; BREEN, J.E.; GREEN, M.J. Associations between udder health and reproductive performance in United Kingdom dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.95, n.7, p.3683-3697, 2012. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4629>

HURLEY, W.L. Dry period and mastitis. 2009. Disponível em:
<http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/Mastitis/dryperiod.html>. Acesso em: 09/02/2017.

HUSZENICZA, G.; JANOSI, S.; KULCSAR, M.; KORODI, P.; REICZIGEL, J.; KATAI, L.; PETERS, A.R.; DE RENSIS, F. Effects of clinical mastitis on ovarian function in post-partum dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.40, n.3, p.199-204, 2005.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00571.x>

JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P.H.; TOELBOELL, T.; HEEGAARD, P.M.H. Dose dependency and individual variability of the lipopolysaccharide-induced bovine acute phase protein response. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, n.10, p.3330-3339, 2004.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73469-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73469-4)

JACKSON, J.A.; SHUSTER, D.E.; SILVIA, W.J.; HARMON, R.J. Physiological responses to intramammary or intravenous treatment with endotoxin in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 3, p. 627-632, 1990. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78713-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78713-9)

JONES, T.O. A review of teat factors in bovine *E. coli* mastitis. **Veterinary Record**, London, v.118, n.18, p.507-509, 1986. <https://doi.org/10.1136/vr.118.18.507>

KAUF, A.C.W.; VINYARD, B.T.; BANNERMAN, D.D. Effect of intramammary infusion of bacterial lipopolysaccharide on experimentally induced *Staphylococcus aureus* intramammary infection. **Research in Veterinary Science**, London, v.82, n.1, p.39-46, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.05.006>

KERBLER, T.L.; BUHR, M.M.; JORDAN, L.T.; LESLIE, K.E.; WALTON, J.S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v.47, n.3, p.703-714, 1997.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00028-9)

KNICKERBOCKER, J.J.; WILTBANK, M.C.; NISWENDER, G.D. Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.5, n.2, p.91-107, 1988. [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(88\)90011-2](https://doi.org/10.1016/0739-7240(88)90011-2)

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins: patología básica.** 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013, 928p.

LAVON, Y.; LEITNER, G.; GOSHEN, T.; BRAW-TAL, R.; JACOBY, S.; WOLFENSON, D. Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. **Theriogenology**, Stoneham, v.70, n.6, p.956-967, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.058>

LEITE, T.E.; MORAES, J.C.F.; PIMENTEL, C.A. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.3, p.467-472, 2001.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000300017>

LOHUIS, J.A.C.M.; SCHUKKEN, Y.H.; HENRICKS, P.A.J.; HEYNEMAN, R.; BURVENICH, C.; VERHEIJDEN, J.H.M.; VAN MIERT, A.S.J.P.A.M.; BRAND, A. Preinfection functions of blood polymorphonuclear leukocytes and the outcome of experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.73, n.2, p.342-350, 1990. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78679-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78679-1)

LONERGAN, P.; FORDE, N.; SPENCER, T.E. A importância da progesterona e de fatores derivados do conceito para a sobrevivência e desenvolvimento do conceito. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES - SBTE, 30., 2016, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, PR: SBTE, 2016. p.46-55

LUCY, M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, n.6, p.1277-1293, 2001. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70158-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70158-0)

LÜTTGENAU, J.; LINGMANN, B.; WELLNITZ, O.; HANKELE, A.K.; ESCHMICKE, M.; ULRICH, S.E.; BRUCKMAIER, R.M. BOLLWEIN, H. Repeated intrauterine infusions of lipopolysaccharide alter gene expression and lifespan of the bovine corpus luteum, **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 8, p. 6639-6653, 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10806>

MAGATA, F.; HORIUCHI, M.; ECHIZENYA, R.; MIURA, R.; CHIBA, S.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A.; KOBAYASHI, Y.; SHIMIZU, T. Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid production in large follicles of dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.144, n.1-2, p.06-13, 2014.

MAKIMURA, S.; SUZUKI, N. Quantitative determination of bovine sérum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v.44, n.1, p.15-21, 1982. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.44.15>

MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, Cambridge, v.121, n.1, p.175-180, 2001. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210175>

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; PARRA, M.D.; CERÓN, J.J. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. **Anales de Veterinaria de Murcia**, Murcia, v.17, p.97-114, 2001.

MATTILA, T.; FROST, A.J. Induction by endotoxin of the inflammatory response in the lactating and dry bovine mammary gland. **Research in Veterinary Science**, London, v.46, n.2, p.238-240, 1989.

McCRACKEN, J.A.; CUSTER, E.E.; LAMSA, J.C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, Baltimore, v.79, n.2, p.263-324, 1999. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.2.263>

MEHTA, A.; RAVINDER; ONTERU, S.K.; SINGH, D. HDAC inhibitor prevents LPS mediated inhibition of CYP19A1 expression and 17 β -estradiol production in granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.414, p.73-81, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.07.002>

MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D.J.; OKUDA, K. Is Tumor Necrosis Factor α a trigger for the initiation of endometrial Prostaglandin F2 α release at luteolysis in cattle? **Biology of Reproduction**, Champaign, v.62, n.5, p.1109-1115, 2000. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1109>

MOORE, D.A.; CULLOR, J.S.; BONDURANT, R.H.; SISCHO, W.M. Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with altered interestrus intervals in dairy cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v.36, n.2, p.257-265, 1991. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90384-P](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90384-P)

MOORE, D.A.; OVERTON, M.W.; CHEBEL, R.C.; TRUSCOTT, M.L.; BONDURANT, R.H. Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle.

Journal of the American Veterinary Medical Association, Schaumburg, v.226, n.7, p.1112-1118, 2005.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, London, v.168, n.1, p.28-40, 2004. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00119-9](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00119-9)

MURPHY, J.M. Mastitis – The struggle for understanding. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.39, n.12, p. 1768–1773, 1956. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(56\)94925-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(56)94925-6)

NUGENT, A.M.; HATLER, T.B.; SILVIA, W.J. The effect of the intramammary infusion of *Escherichia coli* endotoxin on ovulation in lactating dairy cows. **Reproductive Biology**, v.2, n.3, p.295-309, 2002.

PAAPE, M.J., SHAFFER-WEAVER, K., CAPUCO, A.V.; VAN OOSTVELDT, K.; BURVENICH, C. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v.480, p.259-277, 2000.

PECCHI, E.; DALLAPORTA, M.; JEAN, A.; THIRION, S.; TROADEC, J.D. Prostaglandins and sickness behavior: Old story, new insights. **Physiology & Behavior**, Elmsford, v.97, n.3-4, v.279-292, 2009.

PETER, A.T.; SIMON, J.E.; LUKER, C.W.; BOSU, W.T.K. Site of action for endotoxin-induced cortisol release in the suppression of preovulatory luteinizing hormone surges. **Theriogenology**, Stoneham, v.33, n.3, p.637-643, 1990. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90540-A](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90540-A)

PETROFF, M.G.; PETROFF, B.K.; PATE, J.L. Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p.753-760, 2001. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210753>

PFAFFL, M.W.; WITTMANN, S.L.; MEYER, H.H.D.; BRUCKMAIER, R.M. Gene expression of immunologically important factors in blood cells, milk cells, and mammary tissue of cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.2, p.538-545, 2003. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73632-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73632-7)

RIBEIRO, E.S.; GOMES, G.; GRECO, L.F.; CERRI, R.L.A.; VIEIRA-NETO, A.; MONTEIRO JR., P.L.J.; LIMA, F.S.; BISINOTTO, R.S.; THATCHER, W.W.; SANTOS, J.E.P. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.99, n.3, p.2201-2220, 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10337>

RISCO, C.A.; DONOVAN, G.A.; HERNANDEZ, J. Clinical mastitis associated with abortion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, n.8, p.1684-1689, 1999. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75397-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75397-X)

ROBY, K.F.; HUNT, J.S. Mouse endometrial tumor necrosis factor- α mRNA and protein: localization and regulation by estradiol and progesterone. **Endocrinology**, Baltimore, v.135, n.6, p.2780–2789, 1994. <https://doi.org/10.1210/endo.135.6.7988471>

ROTH, Z.; DVIR, A.; KALO, D.; LAVON, Y.; KRIFUCKS, O.; WOLFENSON, D.; LEITNER, G. Naturally occurring mastitis disrupts developmental competence of bovine oocytes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, n.10, p.6499-6505, 2013. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6903>

SAKAMOTO, K.; EZASHI, T.; MIWA, K.; OKUDA-ASHITAKA, E.; HOUTANI, T.; SUGIMOTO, T.; ITO, S.; HAYASHI, O. Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F2 alpha receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.269, n.5, p.3881-3886, 1994.

SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; BALLOU, M.A.; HIGGINBOTHAM, G.E.; KIRK, J.H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.80, n.1-2, p.31-45, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00133-7)

SANTOS, J.E.P.; BISINOTTO, R.S.; RIBEIRO, E.S.; LIMA, F.S.; GRECO, L.F.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. **Society of Reproduction and Fertility**, Londres, n.67, (supplement), p.387-403, 2010.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. 1. ed. Pirassununga: Editora Manole, 2007, 314p.

SANTOS, M.V. Vacinação contra mastite causada por coliformes. 2015. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/mypoint/6239/p_vacinacao_contra_mastite_causada_por_coliformes_5797.aspx>. Acesso em: 02/03/2017.

SCHLAFER, D.H.; FISHER, P.J.; DAVIES, C.J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.145-160, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00132-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00132-9)

SCHRICK, F.N.; HOCKETT, M.E.; SAXTON, A.M.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.84, n.6, p.1407-1412, 2001. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70172-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70172-5)

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, v.34, n.5, p.475-491, 2003. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003027>

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. revised ed. Pullman: Current Conceptions Inc., 2005. 373 p.

SHELDON, I.M.; RYCROFT, A.N.; DOGAN, B.; CRAVEN, M.; BROMFIELD, J.J.; CHANDLER, A.; ROBERTS, M.H.; PRICE, S.B.; GILBERT, R.O.; SIMPSON, K.W. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. **PLoS ONE**, v.5, n.2, p.1-14, 2010.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009192>

SHELDON, I.M.; CRONIN, J.G.; HEALEY, G.D.; GABLER, C.; HEUWIESER, W.; STREYL, D.; BROMFIELD, J.J.; MIYAMOTO, A.; FERGANI, C.; DOBSON, H. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. **Reproduction**, Cambridge, v.148, p.R41-R51, 2014. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0163>

SHUSTER, D.E.; HARMON, R.J.; JACKSON, J.A.; HEMKEN, R.W. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, n.11, p.3763-3774, 1991. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78568-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78568-8)

SKARNES, R.C.; HARPER, M.J.K. Relationship between endotoxin-induced abortion and the synthesis of prostaglandin F. Prostaglandins, Los Altos, v.1, n.3, p.191-203, 1972.
[https://doi.org/10.1016/0090-6980\(72\)90004-4](https://doi.org/10.1016/0090-6980(72)90004-4)

SKARZYNISKI, D.J.; MIYAMOTO, Y.; OKUDA, K. Production of prostaglandin F2a by cultured bovine endometrial cells in response to Tumor Necrosis Factor α : cell type specificity and intracellular mechanisms. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.62, n.5, p.1116-1120, 2000. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1116>

SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHÖENBERGER, P.S. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, n.6, p.1531-1553, 1985.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80993-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80993-0)

SORDILLO, L.M.; NICKERSON, S.C.; AKERS, R.M.; OLIVER, S.P. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. **International Journal of Biochemistry**, Oxford, v.19, n.12, p.1165-1172, 1987.
[https://doi.org/10.1016/0020-711X\(87\)90098-X](https://doi.org/10.1016/0020-711X(87)90098-X)

SORDILLO, L.M.; PEEL, J.E. Effect of interferon- γ on the production of tumor necrosis factor during acute *Escherichia coli* mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, n.8, p.2119-2125, 1992. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77971-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77971-5)

SORDILLO, L.M.; PIGHETTI, G.M.; DAVIS, M.R. Enhanced production of bovine tumor necrosis factor-a during the periparturient period. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.49, n.3, p.263-270, 1995. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05465-0](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05465-0)

SORDILLO, L.M.; SHAFFER-WEAVER, K.; DeROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, n.8, p.1851-1865, 1997.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76121-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76121-6)

SOTO, P.; NATZKE, R.P.; HANSEN, P.J. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F2 α , and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dehydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. **American Journal of Reproductive Immunology**, Nova York, v.50, n.3, p.263-272, 2003a. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2003.00085.x>

SOTO, P.; NATZKE, R.P.; HANSEN, P.J. Actions of tumor necrosis factor- α on oocyte maturation and embryonic development in cattle. **American Journal of Reproductive Immunology**, Nova York, v.50, n.5, p.380-388, 2003b.

SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; BAZER, F.W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.71, n.1, p.02-10, 2004.

SPENCER, T.E.; SANDRA, O.; WOLF, E. Genes involved in conceptus- endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches, v. 135, n. 2, p. 165-179, 2008.

SPICER, L.J. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) inhibits steroidogenesis of bovine ovarian granulosa and thecal cells in vitro. **Endocrine**, v.8, n.2, p. 109-115, 1998.

<https://doi.org/10.1385/ENDO:8:2:109>

SUOJALA, L.; ORRO, T.; JÄRVINEN, H.; SAATSI, J.; PYÖRÄLÄ, S. Acute phase response in two experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v. 50, n.18, 2008. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-18>

SURIYASATHAPORN, W.; SCHUKKEN, Y.H.; NIELEN, M.; BRAND, A. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, n.6, p.1248-1255, 2000. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74991-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74991-5)

SUZUKI, C.; YOSHIOKA, K.; IWAMURA, S.; HIROSE, H. Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.20, n.4, p.267-278, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(01\)00098-4](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(01)00098-4)

TARTAGLIA, L.A.; GOEDDEL, D.V. Two TNF receptors. **Immunology Today**, Cambridge, v.13, n.5, p.151-153, 1992. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90116-O](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90116-O)

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Editora Roca, 2002, 532p.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2014, 551p.

TODHUNTER, D.A.; SMITH, K.L.; HOGAN, J.S.; SCHOENBERGER, P.S. Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.52, n.2, p.184-188, 1991.

TREVISOL, E.; FERREIRA, J.C.P.; ACKERMANN, C.L.; DESTRO, F.C.; AMARAL, J.B. Luteólise em bovinos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.29-36, 2013.

UTHAISANGSOOK, S.; NOORBIBI, K.D.; BAHNA, S.L.; GOOD, R.A.; HARAGUCHI, S. Innate immunity and its role against infections. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, Arlington, v.88, n.3, p.253-265, 2002.

VANGROENWEGHE, F.; LAMOTE, I.; BURVENICH, C. Physiology of the periparturient period and its relation to severity of clinical mastitis. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v.29, n.2, p.283-293, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.016>

VAZ, A.K. Imunidade na glândula mamária. 2003. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/imunidade-na-glandula-mamaria-17062n.aspx>>. Acesso em: 07/03/2017.

WALKER, C.G.; MEIER, S.; LITTLEJOHN, M.D.; LEHNERT, K.; ROCHE, J.R.; MITCHELL, M.D. Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. **BMC Genomics**, v.11, n.474, p.1471-2164, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-474>

WELLNITZ, O.; BRUCKMAIER, R.M. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. **The Veterinary Journal**, London, v.192, n.2, p.148-152, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.09.013>

WENZ, J.R.; FOX, L.K.; MULLER, F.J.; RINALDI, M.; ZENG, R.; BANNERMAN, D.D. Factors associated with concentrations of select cytokine and acute phase proteins in dairy cows with naturally occurring clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.93, n.6, p.2458-2470, 2010. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2819>

WILLIAMS, E.J.; SIBLEY, K.; MILLER, A.N.; LANE, E.A.; FISHWICK, J.; NASH, D.M.; HERATH, S.; ENGLAND, G.C.W.; DOBSON, H.; SHELDON, I.M. The effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. **American Journal of Reproductive Immunology**, Nova York, v.60, n.5, p.462-473, 2008.

WILTBANK, M.C.; BAEZ, G.M.; GARCIA-GUERRA, A.; TOLEDO, M.Z.; MONTEIRO, P.L.J.; MELO, L.F.; OCHOA, J.C.; SANTOS, J.E.P.; SARTORI, R. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, Stoneham, v.86, n.1, p.239-253, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.037>

CAPÍTULO II

(Redigido de acordo com as normas do periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)

A mastite clínica, associada às doenças reprodutivas puerperais, compromete o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras Girolando e Holandesa¹

Carla C. Campos^{2*}, Francisco L. Prado³, João P. Justos⁴, Paula R. B. Silva⁵, Ricarda M. Santos⁶

ABSTRACT - Campos C.C., Prado, F.L., Justos, J.P., Silva, P.R.B. & Santos, R.M. 2017 [Clinical mastitis associated with puerperal reproductive diseases compromises reproductive performance of dairy Girolando and Holstein cows]. A mastite clínica, associada às doenças reprodutivas puerperais, compromete o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras Girolando e Holandesa. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00 Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará s/nº Bloco 2D Sala 03, Campus Umuarama, Uberlândia, MG, 38400-902, Brasil. E-mail: carlacristian_vet@yahoo.com.br

The objective was to evaluate the effects of clinical mastitis (CM), associated or not with puerperal reproductive diseases (metritis and retained placenta - RP) on reproductive parameters, and the temporal relation between CM and artificial insemination (AI) on conception rate of dairy cows. During one year, mastitis and reproductive data from two dairy farms located in South region of Minas Gerais state were collected. Herds were composed by Girolando (farm 1) and Holstein (farm 2) dairy cows, which were submitted to similar managements. After the voluntary waiting period (\pm 40 days), all cows were examined by ultrasonography and submitted to a timed AI protocol. Cases of CM were defined by presence of clots in milk and inflammation signs, such as edema and redness and its information were registered by farmers, while reproductive data were registered in a herd management software. Data were analysed by logistic regression and analysis of variance on Minitab program ($P < 0.05$). The CM occurrence rate was 22.11% (42/190) at farm 1 and 42.78% (77/180) at farm 2. The occurrence of CM increased the number of AI/conception and prolonged calving to conception interval (CCI) without compromise conception rate at first AI. The effects of CM on reproductive parameters were even more pronounced when cows had two or more CM cases in the same lactation. When mastitis episode occurred within 42 days before or 35 days after AI, the conception rate of this AI was not compromised by the inflammation of the mammary gland. The association between CM and puerperal reproductive diseases also increased the number of AI/conception and prolonged CCI, although this association did not influence conception rate at first AI. In summary, clinical mastitis associated or not with puerperal reproductive diseases increased the number of AI per conception and extend calving to conception interval of Girolando and Holstein lactating dairy cows.

INDEX TERMS: bovine, conception, inflammation, reproductive efficiency

RESUMO - Objetivou-se avaliar os efeitos da mastite clínica (MC), associada ou não à ocorrência de doenças reprodutivas puerperais (metrite e retenção de placenta - RP), nos parâmetros reprodutivos e da relação temporal entre MC e a inseminação artificial (IA) sobre a taxa de concepção de vacas leiteiras. Durante um ano, dados de mastite e de reprodução de duas fazendas leiteiras localizadas na região Sul do estado de Minas Gerais foram coletados. Os rebanhos eram compostos por vacas das raças Girolando (fazenda 1) e Holandesa (fazenda 2), os quais eram submetidos a manejos similares. Após o período voluntário de espera (\pm 40 dias), todas as vacas foram examinadas por ultrassonografia e depois submetidas à IA em tempo fixo (IATF). Os casos de MC foram definidos pela presença de grumos no leite e dos sinais de inflamação como inchaço e vermelhidão, e essas informações foram anotadas pelos ordenhadores, enquanto os dados reprodutivos foram salvos em um software de gerenciamento de rebanho. Os dados foram analisados por regressão logística e análise de variância no programa Minitab ($P < 0,05$). A ocorrência de MC obtida foi de 22,11% (42/190) na fazenda 1 e de 42,78% (77/180) na fazenda 2. A ocorrência de MC aumentou o número de IA/concepção e prolongou a duração do intervalo parto-concepção (IPC), sem comprometer a taxa de concepção à primeira IA. Os efeitos da MC sobre os parâmetros reprodutivos foram ainda mais pronunciados quando as vacas apresentaram dois ou mais casos de MC na mesma lactação. Quando o episódio de mastite ocorreu dentro dos 42 dias antes ou 35 dias depois da IA, a taxa de concepção desta IA não foi comprometida pela inflamação da glândula mamária. A associação entre a MC e as doenças reprodutivas puerperais também aumentou o número de IA/concepção e prolongou o IPC, embora a concepção à primeira IA não tenha sido influenciada por essa associação. Conclui-se que a mastite clínica, associada ou não às doenças reprodutivas puerperais, aumenta o número de IA requeridas por concepção e estende o intervalo parto-concepção de vacas leiteiras das raças Girolando e Holandesa.

¹ Recebido em...

Aceito para publicação em...

² Discente de Doutorado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Rua Ceará s/nº Bloco 2D sala 03, Campus Umuarama, Uberlândia, MG, Brasil. *Autora para correspondência: carlacristian_vet@yahoo.com.br

³ Médico veterinário, Rua Costa Rica nº 321 apto 21, Poços de Caldas, MG, Brasil. E-mail: fp_suporte@hotmail.com

⁴ Discente de Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Rua Ceará s/nº Bloco 2D sala 02, Campus Umuarama, Uberlândia, MG, Brasil. E-mail: ipjustos@hotmail.com

⁵ Doutora pela Universidade de Minnesota, Minneapolis, EUA. E-mail: prbsilva@mn.edu

⁶ Professora Doutora da Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Rua Ceará s/nº Bloco 2D sala 03, Campus Umuarama, Uberlândia, MG, Brasil. E-mail: ricasantos@ufu.br

TERMOS DE INDEXAÇÃO: bovinos, concepção, eficiência reprodutiva, inflamação

INTRODUÇÃO

Há mais de 60 anos a mastite bovina é considerada a doença de maior impacto sobre a lucratividade da pecuária leiteira mundial (Murphy, 1956; Da Silva, 2006) devido aos elevados custos associados ao tratamento, ao descarte de leite contendo resíduos de antibióticos, à mão de obra excedente despendida com os animais doentes, à reposição de vacas no rebanho como consequência do descarte prematuro e, principalmente, à redução da produção de leite das vacas, sendo esse o efeito mais acentuado da doença, especialmente quando a mastite se manifesta sob a forma subclínica (Bradley, 2002; Seegers et al., 2003; Akers & Nickerson, 2011). Os prejuízos da mastite não se restringem apenas aos produtores de leite, os laticínios também são afetados em decorrência da doença, já que os produtos lácteos apresentam menores rendimento, qualidade e tempo de prateleira quando produzidos utilizando matéria prima de baixa qualidade (Santos & Fonseca, 2007).

Além da queda no desempenho produtivo como consequência da mastite clínica (MC), a inflamação da glândula mamária também promove um efeito negativo sobre a eficiência reprodutiva dos rebanhos leiteiros, o qual é evidenciado pela diminuição na taxa de concepção ao primeiro serviço pós-parto, pelo aumento do número de inseminações artificiais (IA) requeridas por concepção e pelo prolongamento do intervalo parto-concepção (IPC) em vacas leiteiras das raças Jersey (Barker et al., 1998; Schrick et al., 2001) e Holandesa (Santos et al., 2004; Hertl et al., 2010). A ocorrência de MC também é considerada um fator de risco para o aumento das taxas de perda embrionária (Risco et al., 1999; Chebel et al., 2004; Moore et al., 2005).

A associação entre a ocorrência de mastite e a queda no desempenho reprodutivo de vacas leiteiras pode ser verificada tanto nos casos clínicos quanto subclínicos da doença (Hudson et al., 2012), sendo essa queda ainda mais acentuada quando o quadro subclínico evolui para clínico (Schrick et al., 2001). Com relação ao agente causador da infecção, os mesmos efeitos deletérios da MC foram observados independente da mastite ter sido provocada por uma bactéria Gram-positiva ou Gram-negativa (Schrick et al., 2001; Santos et al., 2004), embora Hertl et al. (2010) e (2014) verificaram um impacto negativo ainda maior da MC sobre a reprodução quando as bactérias Gram-negativas foram isoladas como agentes causadores da infecção.

A relação temporal existente entre a ocorrência da MC e o momento da IA é um fator crítico que determina a maneira pela qual a resposta inflamatória influenciará a funcionalidade do trato reprodutivo da fêmea bovina. Caso a inflamação preceda a IA, seus efeitos podem comprometer o crescimento folicular, a esteroidogênese (Herath et al., 2007) e o desenvolvimento da competência ovocitária (Roth et al., 2013). Já se a inflamação ocorrer posteriormente à IA, os processos reprodutivos tais como a ovulação (Lavon et al., 2008), a fertilização (Ribeiro et al., 2016), bem como o estabelecimento da gestação e o desenvolvimento embrionário inicial podem ser prejudicados (Soto et al., 2003). Hansen et al. (2004) sugeriram que as respostas imunológica e inflamatória decorrentes das infecções podem estar relacionadas à anovulação, às falhas na fertilização ou à morte embrionária, as quais refletem em queda nos índices reprodutivos de vacas leiteiras. Possivelmente, todas as alterações desencadeadas pela inflamação da glândula mamária parecem ser promovidas pela ação tanto dos mediadores inflamatórios quanto dos produtos bacterianos liberados durante a infecção. Diante disso, o efeito prejudicial da MC sobre a reprodução parece possuir origem multifatorial e envolver diferentes e complexos mecanismos que ainda não foram completamente elucidados (Bromfield et al., 2015; Ribeiro et al., 2016).

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da MC, associada ou não à ocorrência de doenças reprodutivas puerperais (metrite e retenção de placenta - RP), na taxa de concepção à primeira IA, no número de serviços por concepção e na duração do IPC, bem como verificar o efeito da relação temporal entre a ocorrência da MC e da IA mais próxima sobre a taxa de concepção de vacas leiteiras das raças Girolando e Holandesa.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas fazendas comerciais leiteiras localizadas na região Sul do estado de Minas Gerais, próximas à Poços de Caldas. O clima desta região é classificado como tropical, com temperaturas variando entre 15° e 21°C, com média anual de 17°C. O período chuvoso geralmente ocorre entre os meses de outubro a março, com índice pluviométrico anual médio de 1745 mm.

O rebanho da fazenda 1 era composto por animais da raça Girolando com composição genética variando entre 1/2 a 3/4 Holandês x Gir, com média de 170 vacas em lactação e produção média diária de 22 Kg de leite/vaca. Já o rebanho da fazenda 2 era composto por animais da raça Holandesa, com média de 150 vacas em lactação e produção média diária de 29 Kg de leite/vaca. A ordem de lactação das vacas variava de uma a sete lactações. Nas duas fazendas, o manejo nutricional adotado era semelhante. Os animais eram mantidos em confinamento, e a dieta era fornecida no cocho duas vezes ao dia, composta à base de silagem de milho, concentrado e mineral. Os animais tinham acesso *ad libitum* à água. O ambiente no qual as vacas eram mantidas não dispunha de nenhum método de controle da temperatura e umidade, já que as características climáticas da região favoreciam o conforto térmico dos animais.

Os dados foram coletados no período de janeiro a dezembro de 2016. Os dados referentes aos casos de MC eram registrados pelos ordenhadores em uma planilha específica, onde constavam a identificação do animal, a data do diagnóstico da MC, o (s) teto (s) acometido (s), os medicamentos utilizados para tratamento e a ordenha na qual o tratamento foi iniciado (manhã ou tarde). Já os dados referentes ao manejo reprodutivo eram registrados por meio de um software de gerenciamento de rebanho (Ideagri®). Nas duas fazendas as vacas eram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia sem bezerro ao pé. Eram adotados como procedimentos de rotina de ordenha o teste da caneca telada, o pré e pós *dipping*, a secagem dos tetos, além da implementação da linha de ordenha com segregação dos animais doentes. O tratamento da MC com antibióticos intramamários era iniciado imediatamente após a detecção do caso pelos ordenhadores, e o descarte do leite com resíduos obedecia rigorosamente o período de carência de cada produto. As fazendas também realizavam a terapia de secagem em torno dos 60 dias antes da data prevista para o parto. Mensalmente, amostras de leite eram coletadas para análise individual da contagem de células somáticas (CCS).

Com relação ao manejo sanitário, as vacinações obrigatórias contra febre aftosa e brucelose, e as vacinas reprodutivas contra rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina e leptospirose eram realizadas em ambas fazendas, bem como a vermiculação dos animais duas vezes ao ano com alternância dos princípios ativos. As vacas eram tratadas com somatotropina bovina (bST - Lactotropin®, Elanco) a partir dos 60 dias pós-parto (DPP) a cada 14 dias, até atingirem 200 dias de gestação.

A ocorrência das doenças reprodutivas puerperais, tais como a RP e a metrite puerperal aguda, foram diagnosticadas e registradas pelos funcionários das fazendas nas primeiras semanas após o parto. A ocorrência de RP foi definida pela eliminação incompleta da placenta, permanecendo retida por mais de 12 horas após a expulsão do feto. Já a ocorrência de metrite foi estabelecida pela presença de corrimento vaginal de odor fétido e de coloração sanguinolenta detectada a partir da primeira semana pós- parto. Aos ± 28 dias pós-parto (DPP), as vacas eram submetidas ao exame ginecológico por ultrassonografia (DP3300vet®, Mindray), feito pelo mesmo médico veterinário nas duas fazendas. As vacas diagnosticadas com algum tipo de infecção uterina, inclusive aquelas previamente diagnosticadas com metrite, eram tratadas com infusão uterina e reexaminadas quinze dias depois, sendo incluídas no manejo reprodutivo somente após a cura do quadro clínico.

O período voluntário de espera (PVE) das fazendas tinha duração aproximada de 40 dias. A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foi o método preconizado para a primeira inseminação pós-parto de todas as vacas nos dois rebanhos. Assim, as vacas saudáveis aptas à reprodução eram submetidas ao seguinte protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF): Dia zero (D0) - inserção do dispositivo intravaginal contendo 1,9 g de progesterona (CIDR®, Zoetis), aplicação intramuscular de 2 mg (2 mL) de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ouro Fino) e de 0,01 mg (2,5 mL) de acetato de buserelina (Sincroforte®, Ouro Fino), uma substância análoga do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH); dia 7 (D7) - aplicação intramuscular de 25 mg (5 mL) de PGF_{2α} (Lutalyse®, Zoetis); dia 9 (D9) - remoção do dispositivo, aplicação da segunda dose de PGF_{2α} e de 1,2 mg (0,6 mL) de cipionato de estradiol (ECP®, Zoetis); dia 11 (D11) - inseminação de todos os animais submetidos ao protocolo. As doses de sêmen utilizadas eram de touros da raça Holandesa provenientes de centrais de inseminação idôneas. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia ± 35 dias após a IA.

As variáveis relacionadas ao desempenho reprodutivo avaliadas no presente estudo foram a taxa de concepção à primeira IA, o número de IA por concepção e a duração do IPC. Estas variáveis foram correlacionadas à ocorrência de nenhum, um ou mais de um caso de MC, assim como a associação entre MC e as doenças reprodutivas puerperais (metrite e RP). É importante ressaltar que apenas os casos de MC ocorridos ao longo do período de serviço até a confirmação da gestação foram considerados nesta análise. Para o cálculo da relação temporal entre o momento da ocorrência de mastite em relação à IA, foi estabelecido o intervalo de 42 dias antes e de 35 dias após a IA, com base nos resultados de Hertl et al. (2010), os quais reportaram que a probabilidade de concepção de vacas Holandesas diagnosticadas com MC foi influenciada apenas pelos casos ocorridos ± 42 dias em relação à IA. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e à regressão logística utilizando o programa Minitab. A significância estatística foi estabelecida como $P \leq 0,05$ e a tendência estatística como $0,05 < P \leq 0,10$.

RESULTADOS

Do total de 370 observações realizadas nas duas fazendas foram registrados 119 casos de MC (32,16%), sendo que na fazenda 1 a ocorrência de MC foi de 22,11% (42/190) e na fazenda 2 de 42,78% (77/180). Embora não tenha sido detectada diferença significativa entre as fazendas na taxa de concepção à primeira IA e no número de IA/concepção ($P > 0,05$), houve uma tendência das vacas da fazenda 2 apresentarem IPC mais longo do que as vacas da fazenda 1 ($P = 0,057$) (Quadro 1).

A ocorrência de MC influenciou os parâmetros reprodutivos das vacas leiteiras avaliadas no presente estudo. Apesar da taxa de concepção à primeira IA ($P = 0,331$) não ter sido influenciada pela MC, as vacas acometidas pela MC necessitaram de um maior número de inseminações para se tornarem gestantes e apresentaram IPC prolongado em relação às vacas que não apresentaram nenhum caso de MC ($P < 0,001$). Os efeitos da MC foram ainda mais pronunciados quando as vacas apresentaram dois ou mais casos de MC na mesma

lactação. Foi verificada uma tendência de efeito da interação entre fazenda e ocorrência de MC sobre a taxa de concepção a primeira IA ($P = 0,094$), no entanto o número de IA/concepção e o IPC não foram afetados por essa interação ($P > 0,05$) (Quadro 1).

A relação temporal estabelecida entre o acontecimento dos eventos MC e IA (MC 42 dias antes até 35 dias depois da IA) não afetou a taxa de concepção da referida IA ($P = 0,743$). Esta relação também não diferiu entre fazendas ($P = 0,918$) e não foi verificada interação entre fazenda e momento da ocorrência da MC ($P = 0,382$) (Quadro 2).

A associação entre a MC e as doenças reprodutivas puerperais promoveu um efeito aditivo negativo sobre o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. Apesar dessa associação não ter interferido na taxa de concepção à primeira IA ($P = 0,762$), as vacas acometidas pelas infecções na glândula mamária e no trato reprodutivo na mesma lactação apresentaram aumento no número de IA/concepção e na duração do IPC ($P < 0,001$). Não foi detectado efeito de fazenda sobre as variáveis taxa de concepção à primeira IA, número de IA/concepção e IPC ($P > 0,05$). Também não foi verificada interação entre fazenda e associação das doenças sobre os parâmetros reprodutivos analisados ($P > 0,05$) (Quadro 3).

DISCUSSÃO

A elevada ocorrência de MC pode ser uma das causas atribuídas à queda no desempenho tanto produtivo quanto reprodutivo dos rebanhos leiteiros, conforme reportado por diversos estudos que avaliaram o impacto negativo dessa doença nos parâmetros reprodutivos de vacas leiteiras das raças Holandesa e Jersey (Barker et al., 1998; Schrick et al., 2001; Santos et al., 2004; Hertl et al., 2010; Hudson et al., 2012). Também foi possível verificar com base nos resultados do presente estudo que, vacas acometidas pela MC requerem mais inseminações e mais tempo durante a lactação para se tornarem gestantes, o que prejudica a rentabilidade da atividade leiteira à curto, médio e longo prazo.

A ocorrência de mastite na fazenda 2 foi cerca de 20% superior em relação à fazenda 1 (42,78 vs. 22,11%, respectivamente). Esse resultado pode ser explicado pelo fato das vacas Holandesas, raça predominante na fazenda 2, serem mais produtivas e também mais suscetíveis à MC do que as vacas mestiças. Segundo Oliveira et al. (2015), vacas Holandesas apresentam 1,45 vezes mais chance de desenvolverem mastite do que vacas zebuínas.

De acordo com os resultados do presente estudo, o número de IA/concepção e o intervalo parto-concepção foram fortemente influenciados pela ocorrência de MC (Quadro 1), especialmente quando a MC foi associada às doenças reprodutivas puerperais (Quadro 3). A ocorrência simultânea de dois processos infeciosos em um animal, mesmo que em órgãos-alvo distintos, faz com que a resposta inflamatória seja potencializada, o que reduz ainda mais a eficiência do sistema imunológico em combater ambas infecções. Essa resposta exacerbada é capaz de promover efeitos sistêmicos tais como hipertermia, síntese e liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias responsáveis por desencadear o comportamento doentio dos animais (Pecchi et al., 2009) e por agravar determinadas condições patológicas (Tizard, 2002), como é o caso do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

A ocorrência de MC dentro dos 42 dias antes ou 35 dias após a IA afetou negativamente de forma semelhante a taxa de concepção (Quadro 2). Hertl et al. (2010) reportaram que quando a MC ocorreu no intervalo compreendido entre 14 dias antes até 35 dias depois da IA houve uma redução significativa na probabilidade de concepção de vacas Holandesas, sendo esse efeito ainda mais pronunciado quando a MC aconteceu em torno do momento da IA. Barker et al. (1998) reportaram que vacas Jersey acometidas pela MC entre a primeira IA pós-parto e o diagnóstico de gestação apresentaram maior IPC e necessitaram de mais inseminações para conceberem do que as vacas cuja MC ocorreu antes da primeira IA, após a confirmação da gestação ou àquelas sem MC. Já Santos et al. (2004) verificaram que tanto a taxa de concepção à primeira IA quanto a taxa de prenhez de vacas Holandesas ao final do estudo foram reduzidas devido à ocorrência de MC, podendo a infecção da glândula mamária ter ocorrido antes da primeira IA pós-parto ou no intervalo entre a primeira IA pós-parto e o diagnóstico de gestação. Diante dos resultados obtidos no presente estudo, verificou-se que os parâmetros reprodutivos de vacas da raça Girolando também são negativamente afetados pela ocorrência de MC. Para avaliar os efeitos da ocorrência de doenças de origem não uterina sobre a fertilidade de vacas leiteiras Holandesas, Ribeiro et al. (2016) classificaram o momento da ocorrência da doença em relação à primeira IA pós-parto em duas categorias, sendo a antral (-42 dias), que corresponde ao desenvolvimento do folículo ovulatório e a pós-IA (+42 dias), que corresponde ao desenvolvimento inicial do embrião. Como resultado, os autores verificaram que vacas acometidas pelas doenças no período antral apresentaram concepção aos 45 dias inferior à das vacas saudáveis, enquanto que a concepção das vacas que ficaram doentes no período pós-IA foi semelhante à das vacas saudáveis. No presente estudo, independente se a MC ocorreu antes ou depois da IA mais próxima, não foi possível verificar diferença na taxa de concepção em decorrência da inflamação da glândula mamária. Acredita-se que seja necessária a realização de novas pesquisas que correlacionem um maior número de casos de MC com as IA para que seja possível identificar com exatidão quando a ocorrência da MC produz efeitos deletérios sobre a concepção.

De acordo com os resultados do presente estudo, quando as vacas foram acometidas pela MC e também pelas doenças reprodutivas puerperais, houve um efeito aditivo negativo da associação entre as doenças sobre o desempenho reprodutivo (Quadro 3). Já quando o efeito de cada uma dessas doenças foi avaliado isoladamente, isto é, nas vacas acometidas somente pela MC ou somente pelas doenças puerperais (RP, metrite ou RP e metrite), as respostas sobre a reprodução se assemelharam entre as duas fazendas. Santos et al. (2010) reportaram que quando as vacas são acometidas por mais de uma doença clínica a taxa de concepção à primeira IA reduz cerca de 16% em relação às vacas saudáveis. Contudo, mesmo que a concepção à primeira IA não tenha sido afetada pela associação entre as doenças, foi possível detectar, por meio do número de IA/concepção e do IPC, que houve uma interferência negativa dessa associação sobre a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras das raças Girolando e Holandesa. Quando um animal desenvolve mais de uma doença clínica, há redução no apetite e alteração na partição de nutrientes, visto que o metabolismo desse animal é mobilizado para o combate às infecções em detrimento às atividades produtiva e reprodutiva, as quais possuem alto custo energético (Gifford et al., 2012).

Para minimizar o impacto negativo das doenças infecciosas sobre o desempenho tanto produtivo quanto reprodutivo dos rebanhos leiteiros, faz-se necessário definir medidas de controle e prevenção de doenças, utilizar ferramentas práticas e economicamente viáveis para o diagnóstico precoce dessas doenças, e opções de tratamento que produzam respostas eficientes no combate às infecções que se adequem às condições de cada propriedade leiteira. Garantir um manejo adequado para a vaca leiteira durante o período de transição, especialmente no aspecto nutricional, também é uma importante estratégia para reduzir o risco de infecções após o parto. Essas estratégias aplicadas conjuntamente contribuirão de forma positiva para se alcançar a eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos leiteiros.

CONCLUSÕES

A ocorrência de mastite clínica durante o período de serviço até a confirmação da gestação, associada ou não à ocorrência de doenças reprodutivas puerperais, aumenta o número de inseminações por concepção e a duração do intervalo parto-concepção de vacas leiteiras das raças Girolando e Holandesa.

Agradecimentos: à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, bolsa de Demanda Social e PDSE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, bolsa Produtividade em Pesquisa).

REFERÊNCIAS

- Akers R.M. & Nickerson S.C. 2011. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. *J. Mammary Gland Biol.* 16(4):275-289.
- Barker, A.R., Schrick, F.N., Lewis, M.J., Dowlen, H.H. & Oliver, S.P. 1998. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 81(5):1285-1290.
- Bradley, A.J. 2002. Bovine Mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* 164(2):116-128.
- Bromfield J.J., Santos J.E.P., Block J., Williams R.S. & Sheldon I.M. 2015. Uterine infection: Linking infection and innate immunity with infertility in the high-producing dairy cow. *J. Anim. Sci.* 93(5):2021-2033.
- Cai, T.Q., Weston, P.G., Lund, L.A., Brodie, B., McKenna, D.J. & Wagner, W.C. 1994. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am. J. Vet. Res.* 55(7):934-943.
- Chebel, R.C., Santos, J.E.P., Reynolds, J.P., Cerri, R.L.A., Juchem, S.O. & Overton, M. 2004. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 84(3-4):239-255.
- Da Silva, N. 2006. Criação de bovinos. 7. ed. Belo Horizonte: CVP Consultoria veterinária e publicações, 586 p.
- Gifford, C.A., Holland, B.P., Mills, R.L., Maxwell, C.L., Farney, J.K., Terrill, S.J., Step, D.L., Richards, C.J., Burciaga-Robles, L.O. & Krehbiel, C.R. 2012. Growth and development symposium: Impacts of inflammation on cattle growth and carcass merit. *J. Anim. Sci.* 90(5):1438-1451.
- Grummer, R.R., Mashek, D.G. & Hayirli, A. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin. N. Am. Food A.* 20(3):447-470.
- Hansen P.J., Soto P. & Natzke R.P. 2004. Mastitis and fertility in cattle – possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am. J. Reprod. Immunol.* 51(4):294-301.
- Herath, S., Williams, E.J., Lilly, S.T., Gilbert, R.O., Dobson, H., Bryant, C.E. & Sheldon, I.M. 2007. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction* 134(5):683-693.
- Hertl, J.A., Gröhn, Y.T., Leach, J.D.G., Bar, D., Bennett, G.J., González, R.N., Rauch, B.J., Welcome, F.L., Tauer, L.W. & Schukken, Y.H. 2010. Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(4):1551-1560.
- Hertl, J.A., Schukken, Y.H., Welcome, F.L., Tauer, L.W. & Gröhn, Y.T. 2014. Effects of pathogen-specific clinical mastitis on probability of conception in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97(11):6942-6954.

- Hudson, C.D., Bradley, A.J., Breen, J.E. & Green, M.J. 2012. Associations between udder health and reproductive performance in United Kingdom dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95(7):3683-3697.
- Lavon Y., Leitner G., Goshen T., Braw-Tal R., Jacoby S. & Wolfenson D. 2008. Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. *Theriogenology*, 70(6):956-967.
- Moore D.A., Overton, M.W., Chebel, R.C., Truscott, M.L. & Bondurant R.H. 2005. Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226(7):1112-1118.
- Murphy J.M. 1956. Mastitis - The struggle for understanding. *J. Dairy Sci.* 39(12):1768-1773.
- Oliveira C.S.F., Hogeveen H., Botelho A.M., Maia P.V., Coelho S.G. & Haddad J.P.A. 2015. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 121(3-4):297-305.
- Pecchi E., Dallaporta M., Jean A., Thirion S. & Troadec J.D. 2009. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. *Physiol. Behav.* 97(3):279-292.
- Ribeiro E.S., Gomes G., Greco L.F., Cerri R.L.A., Vieira-Neto A., Monteiro Jr. P.L.J., Lima F.S., Bisinotto R.S., Thatcher W.W. & Santos J.E.P. 2016. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99(3):2201-2220.
- Risco, C.A., Donovan, G.A. & Hernandez, J. 1999. Clinical mastitis associated with abortion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82(8):1684-1689.
- Roth, Z., Dvir, A., Kalo, D., Lavon, Y., Krifucks, O., Wolfenson, D. & Leitner, G. 2013. Naturally occurring mastitis disrupts developmental competence of bovine oocytes. *J. Dairy Sci.* 96(10):6499-6505.
- Santos J.E.P., Cerri R.L.A., Ballou M.A., Higginbotham G.E. & Kirk J.H. 2004. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 80(1-2):31-45.
- Santos, J.E.P., Bisinotto, R.S., Ribeiro, E.S., Lima, F.S., Greco, L.F., Staples, C.R. & Thatcher, W.W. 2010. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. Society of Reproduction and Fertility', v.67, p.387-403, 2010.
- Santos, M.V. & Fonseca, L.F.L. 2007. Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite. 1. ed. Pirassununga: Editora Manole, 314p.
- Schrick, F.N., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Lewis, M.J., Dowlen, H.H. & Oliver, S.P. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84(6):1407-1412.
- Seegers, H., Fourichon, C. & Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34(5):475-491.
- Soto, P., Natzke, R.P. & Hansen, P.J. 2003. Actions of tumor necrosis factor- α on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50(5):380-388.
- Tizard I.R. 2002. Imunologia veterinária: uma introdução. 6. ed. Editora Roca. 532p.

QUADROS

Quadro 1. Efeito da ocorrência de um ou mais casos clínicos de mastite sobre a taxa de concepção à primeira inseminação pós-parto, o número de inseminações por concepção e a duração do intervalo parto-concepção de vacas leiteiras de acordo com as fazendas analisadas.

Ocorrência de mastite (n)	Taxa de concepção à 1 ^a IA (%)	Nº IA/concepção (n ± EPM)	Intervalo parto-concepção (dias ± EPM)
Fazenda 1			
Nenhum caso de mastite clínica (148)	47,3	2,35 ± 0,15	96,5 ± 5,07
1 caso de mastite clínica (24)	41,7	2,63 ± 0,35	99,3 ± 11,2
≥ 2 casos de mastite clínica (18)	50,0	3,72 ± 0,90	128,9 ± 27,1
Fazenda 2			
Nenhum caso de mastite clínica (103)	44,7	2,21 ± 0,187	94,2 ± 8,2
1 caso de mastite clínica (36)	30,6	3,14 ± 0,372	122,3 ± 16,5
≥ 2 casos de mastite clínica (41)	22,0	3,93 ± 0,403	167,9 ± 15,4
Fazenda			
Ocorrência de mastite clínica	0,673	0,460	0,057
Interação Fazenda x Mastite	0,331	< 0,001	< 0,001
	0,094	0,506	0,162

Quadro 2. Efeito da ocorrência de mastite clínica \pm 42 dias antes ou \pm 35 dias após a inseminação sobre a taxa de concepção de vacas leiteiras de acordo com as fazendas analisadas.

Ocorrência de mastite	N	Taxa de concepção (%)
Fazenda 1		
Mastite clínica antes da IA	22	59,1
Mastite clínica depois da IA	20	65,0
Fazenda 2		
Mastite clínica antes da IA	38	28,95
Mastite clínica depois da IA	39	51,28
Fazenda		
Momento da mastite clínica		0,918
Interação fazenda x momento mastite		0,743
		0,382

Quadro 3. Efeito da ocorrência de mastite clínica, de doenças reprodutivas puerperais ou da associação entre essas doenças sobre a taxa de concepção à primeira inseminação pós-parto, o número de inseminações por concepção e a duração do intervalo parto-concepção de vacas leiteiras de acordo com as fazendas analisadas.

Estado de saúde (n)	Taxa de concepção à 1ª IA (%)	Nº IA/concepção (n \pm EPM)	Intervalo parto- concepção (dias \pm EPM)
Fazenda 1			
Saudável (130)	50,0	2,28 \pm 0,172	91,4 \pm 5,44
Mastite clínica (37)	46,0	2,84 \pm 0,390	107,3 \pm 13,8
Doenças reprodutivas puerperais ¹ (18)	35,3	2,71 \pm 0,391	124,3 \pm 17,0
Mastite + doença reprodutiva ² (5)	40,0	5,00 \pm 2,28	145,8 \pm 26,5
Fazenda 2			
Saudável (71)	49,30	2,09 \pm 0,221	85,14 \pm 9,01
Mastite clínica (62)	27,42	3,37 \pm 0,311	141,4 \pm 12,1
Doenças reprodutivas puerperais ¹ (23)	26,09	2,87 \pm 0,459	132,9 \pm 23,7
Mastite + doença reprodutiva ² (24)	33,33	3,29 \pm 0,472	138,5 \pm 22,3
Fazenda	0,356	0,381	0,588
Associação entre as doenças	0,762	0,001	0,001
Interação fazenda x doenças	0,721	0,217	0,250

¹ Retenção de placenta (RP) e metrite, ocorrência isolada ou associada.

² Mastite + RP, mastite + metrite, associação entre as três doenças.

CAPÍTULO III

(Redigido de acordo com as normas do periódico *Journal of Dairy Science*)

1 INTERPRETIVE SUMMARY

2 **Intramammary infusions of lipopolysaccharide promotes slight inflammation and alters**
3 **endometrial and conceptus gene expression in lactating Holstein cows.** *Campos et al.* The
4 current experiment evaluated the effects of two intramammary infusions of LPS on
5 inflammatory and reproductive parameters, and endometrial and conceptus gene expression of
6 lactating Holstein cows. LPS was able to trigger a slight inflammatory response, although some
7 of the evaluated inflammatory mediators had their levels unaltered by treatment. The challenge
8 did not affect early embryonic development and progesterone concentration during the first 15
9 days of gestation. However, LPS upregulated the expression of 13 key target genes in the
10 endometrium and conceptus.

11 Running head: DAIRY COW, GESTATION, IMMUNITY, AND MASTITIS

12

13 **Intramammary infusions of lipopolysaccharide promotes slight inflammation and alters**
14 **endometrial and conceptus gene expression in lactating Holstein cows.**

15

16 **C. C. Campos,^{*} I. Hartling,[†] P. R. B. Silva,[‡] R. M. Santos,^{*} and R. L. A. Cerri^{†,1}**

17

18 ^{*}School of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlandia, Uberlandia 38400-902

19 [†]Faculty of Land and Food Systems, University of British Columbia, Vancouver V6T 1Z4

20 [‡]Department of Animal Science, University of Minnesota, Saint Paul 55108

21

22

23

24

25 ¹Corresponding author: ronaldo.cerri@ubc.ca

26 **ABSTRACT**

27 Objectives of the current study were to evaluate the effects of two intramammary
28 infusions of lipopolysaccharide (LPS) on inflammatory and reproductive parameters, and
29 endometrial and conceptus gene expression of lactating Holstein cows. At 35 ± 7 d in milk (n
30 = 20) cows were submitted to a Double-Ovsynch program and randomly assigned to Control (n
31 = 11) and LPS (n = 9) treatments. Cows from LPS treatment received two intramammary
32 infusions of 25 µg of LPS after morning milkings on days 5 and 10 post-AI, while control cows
33 were infused with only saline. Blood samples were taken to determine haptoglobin, tumoral
34 necrosis factor alpha (TNF- α) and progesterone concentrations. Milk yield was evaluated and
35 samples were taken for somatic cell count (SCC) at 0, 10, 24, 34 and 96 hours relative to each
36 infusion. Reticular temperature was recorded using a rumen-reticular bolus logger and
37 summarized hourly. On day 15 post-AI uterine flushing for conceptus recover and endometrial
38 biopsies were performed. Samples were submitted to mRNA extraction and quantitative reverse
39 transcription-PCR analysis of 100 target genes. Haptoglobin tended to be higher for LPS
40 treatment (control = 1.98 ± 0.24 , LPS = 2.61 ± 0.27 OD) and TNF- α was similar (control = 0.58
41 ± 0.09 , LPS = 0.47 ± 0.10 ng/mL) between treatments. LPS tended to reduce milk yield after
42 treatment (control = 36.85 ± 2.23 , LPS = 30.97 ± 2.46 kg/d), whereas SCC was higher in LPS
43 treated cows until 34 h after infusions (control = 1228.16 ± 421.18 , LPS = 10489.0 ± 461.81
44 * 10^3 cells/mL of milk). Reticular temperature of LPS cows was elevated between 5 and 10h
45 after each infusion (control = 39.53 ± 0.11 , LPS = $40.0 \pm 0.11^\circ\text{C}$). Progesterone after ovulation
46 was unaffected by treatment and by pregnancy status, as well as corpus luteum diameter and
47 conceptus length on day 15. LPS upregulated the expression of 13 key genes (*CADM3*,
48 *EMMPRIN*, *MMP19*, *SERPING1*, *IGF2*, *AXIN1*, *PTX3*, *SLC27A6*, *SGK*, *TCN1*, *CYP3A4*,
49 *FTH1* and *GPX4*) in the endometrium and in the conceptus. In summary, intramammary
50 infusions of LPS were able to trigger a slight inflammatory response without compromising

51 reproductive performance and altered gene expression of endometrium and conceptus during
52 the onset of embryonic development of Holstein dairy cows.

53 **Key words:** embryonic development, immune response, LPS, and mastitis

54

55 INTRODUCTION

56 Many physiologic and endocrine changes that occurs during the transition period of
57 dairy cows contribute to increase the risk of postpartum diseases (Cai et al., 1994). After
58 calving, feed intake remains low and unable to supply energy for milk production resulting in
59 negative energy balance (**NEB**), which decreases immunological competence (Grummer et al.,
60 2004). It is known that postpartum diseases occurrence, such as mastitis, impairs productive
61 and reproductive performance of dairy cows (Schrick et al., 2001; Santos et al., 2004; Hertl et
62 al., 2010). However, the biological pathways by which inflammation affects fertility are
63 multifactorial and involves different and complex mechanisms that are not yet fully understood
64 (Bromfield et al., 2015; Ribeiro et al., 2016).

65 Acute clinical mastitis are often caused by Gram-negative bacteria, which are widely
66 spread at dairy cows environment (Hogan and Smith, 2003; Sheldon et al., 2010). During
67 bacterial replication or death, lipopolysaccharide (**LPS**) is released from outer membrane of
68 Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, being responsible for its pathogenicity. The endotoxin
69 has a high potential to induce an inflammatory response by the host (Akira et al., 2006), which
70 leads to production of a variety of acute phase proteins, cytokines and tissue damage. Skarnes
71 and Harper (1972) first showed an evidence of endometrial prostaglandin F_{2α} (**PGF_{2α}**) release
72 after LPS parenteral administration in rodents. Jackson et al. (1990) demonstrated that
73 intravenous infusion of LPS resulted in an increase of serum concentration of PGF_{2α} in lactating
74 dairy cows. Bacterial endotoxin release associated to inflammatory mediators produced by host
75 may cause local and systemic effects that reduces reproductive performance of dairy cows. As

76 an example, TNF- α is an important cytokine synthetized during a Gram-negative mastitis case
77 (Sordillo et al., 1995; Tizard, 2014). TNF- α induces endometrial PGF_{2 α} premature release
78 (Miyamoto et al., 2000) resulting in luteolysis and gradual decrease of progesterone levels that
79 are incompatible with gestation (Giri et al., 1990; Skarzynski et al., 2000; Hansen et al. 2004).
80 Recently, Lüttgenau et al. (2016) reported that repeated intra-uterine infusions of LPS at the
81 onset of estrus cycle promoted premature luteolysis and altered endometrial and corpus luteum
82 (**CL**) gene expression. Therefore, negative impact of infection on reproductive tract
83 functionality is probably due to a direct effect of endotoxin added to indirect effects of
84 inflammatory mediators.

85 Infectious diseases, even if it happens outside the reproductive tract, promotes immune
86 and inflammatory responses that may compromise ovulation (Suzuki et al., 2001; Lavon et al.,
87 2008), fertilization (Ribeiro et al., 2016), embryonic development and survival (Soto et al.,
88 2003; Hansen et al., 2004), hypothalamic-pituitary-gonadal axis functionality (Herman et al.,
89 2010), ovarian follicular growth and steroidogenesis (Herath et al., 2007), oocyte competence
90 (Roth et al., 2013) and uterine environment for pregnancy maintenance (Bromfield et al., 2015).
91 LPS also reduces primordial follicular pool in ovary cortex (Bromfield and Sheldon, 2013) and
92 causes atresia when it is present in the follicular fluid, even in low concentrations (Magata et
93 al., 2014).

94 High producing dairy cows experiments higher pregnancy loss rates (30-50%) during
95 pre-implantation period (Hansen et al., 2004; Wiltbank et al., 2016) and are highly susceptible
96 to infectious diseases after parturition. We hypothesized that LPS intramammary challenge
97 might alter gene expression of endometrium and conceptus during the onset of embryonic
98 development. Objectives of the current study were to evaluate the effects of two intramammary
99 infusions of LPS on inflammatory and reproductive parameters, and endometrial and conceptus
100 gene expression during the first 15 days of gestation in lactating Holstein cows.

101

102 **MATERIALS AND METHODS**

103 The Canadian Council of Animal Care from the University of British Columbia
104 (protocol #A15-0089) approved all animal procedures conducted during this experiment. This
105 experiment was performed between April and September of 2015 at the University of British
106 Columbia's Dairy Education and Research Centre in Agassiz, Canada (49°14'35"N,
107 121°45'37"W).

108

109 ***Animals, Housing and Nutrition***

110 Twenty-four multiparous (lactation = 2 to 8; n = 13) and primiparous (n = 11) Holstein
111 lactating dairy cows with daily average of 37.0 kg of milk per cow and body condition score
112 (**BCS**) varying between 2.5 and 3.25 (scale 1 to 5 proposed by Edmonson et al., 1989) were
113 enrolled in the experiment at 35 ± 7 days in milk (**DIM**). Cows were housed in sand-bedded
114 freestalls with concrete flooring and without cooling methods and milked twice daily at 0500
115 and 1500 h. Water and total mixed ration (**TMR**) were available for ad libitum intake and fresh
116 TMR was placed on trough twice daily around 0700 and 1600 h. The diet was composed with
117 corn and ryegrass silages, formulated in accordance to the National Research Council's
118 recommendations (NRC, 2001).

119

120 ***Ovulation Synchronization***

121 Before the initiation of the synchronization protocols, all cows were checked for health
122 and reproductive disorders during postpartum period and only clinically healthy cows were
123 included in the study. A modified Double-Ovsynch program (Souza et al., 2008) was used to
124 synchronize the ovulation of the cows. Presynchronization with the first Ovsynch protocol was
125 initiated (d -29) with an i.m. injection of GnRH (100 µg of Gonadorelin Acetate, Fertiline®,

126 Vétoquinol, Lavaltrie, QC, Canada) at 35 ± 7 d after parturition, followed 7 d later (d -22) by
127 an i.m. injection of PGF_{2 α} (500 μ g of Cloprostenol, Estrumate[®]; Merck, Kirkland, QC, Canada).
128 Two days after PGF_{2 α} injection (d -20) another GnRH i.m. injection (100 μ g) was administered.
129 At 10 d after the second GnRH (d -10), the second Ovsynch protocol for ovulation
130 synchronization was initiated by administering 100 μ g of GnRH i.m. and an intravaginal insert
131 containing 1.38 g of progesterone (CIDR[®]1380; Easi-Breed, Zoetis Animal Health, Kirkland,
132 QC, Canada) for 7 days. Cows received an injection of PGF_{2 α} (500 μ g) at the time of CIDR
133 withdrawal (d -3) and another PGF_{2 α} (500 μ g) i.m. injection 12 h later. Finally, GnRH (100 μ g)
134 was injected 56 h after the PGF_{2 α} injection (d -1) and cows underwent timed artificial
135 insemination (TAI) 12 h later (d 0; Figure 1). Semen from two different Holstein bulls were
136 used to inseminate all cows. Ovarian follicular dynamic in response to hormonal treatments
137 was followed by transrectal real time ultrasonography (Ibex Pro; E.I. Medical Imaging,
138 Loveland, CO) equipped with a 7.5 MHz linear transducer (Figure 1).

139

140 **Treatments**

141 The rare left teat (**RLT**) was established as a pattern for all infusions and milk samples
142 collection. Before treatment onset (d 0), milk samples from each cow were collected for
143 microbiological analysis and somatic cell count (**SCC**) to ensure that cows with clinical or
144 subclinical mastitis and treated with intramammary antibiotics for at least past 30 days were not
145 enrolled in the experiment. As a criterion, milk samples for culture should not have any type of
146 bacterial growth and the threshold for SCC was lower than 200.000 cells/mL of milk.
147 Furthermore, to ensure that the other teats were also free of inflammation the California Mastitis
148 Test (**CMT**) was performed one day before first infusion (d 5).

149 Animals were randomly assigned in two treatments: LPS (n = 9): cows received two
150 intramammary infusions of LPS on d 5 and 10; Control (n = 11): cows were infused twice on d

151 5 and 10 with saline. Infusions for the LPS treatment were prepared diluting 25 µg of LPS from
152 *Escherichia coli* strain 0111:B4 (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO) in 10 mL of saline solution
153 and for the Control treatment infusions were prepared with 10 mL saline solution. The infusions
154 were homogenized using a digital vortex mixer (Fisher Scientific®) for one minute then
155 transferred to syringes identified with the cow's identification numbers on the day before
156 treatments and kept at 4°C until administration.

157 Infusions were performed during the morning milkings, immediately after automatic
158 extraction of milking machine. The RLT was cleaned with 70% alcohol swabs and the solution
159 was slowly injected into teat using a cannula attached to the syringe. Then, a massage to spread
160 the liquid inside the gland was performed while the teat was held closed to avoid reflux. At the
161 end of infusion, post-dipping was performed as a milking routine pattern procedure. The
162 infusion process was performed twice, at day 5 and 10 (Figure 1).

163

164 ***Milk Sampling for SCC***

165 Milk samples from RLT were collected at 0, 10, 24, 34 and 96 h relative to each infusion
166 for SCC analysis. The samples were collected after milking routine procedures (pre-dipping
167 and teat dry with paper towel). Milk was stored in recipients with preservative Bronopol and
168 transported to the laboratory in the same collection day. Daily milk yield was recorded during
169 the experiment for further analysis.

170

171 ***Blood Sampling for Haptoglobin (Hp), TNF- α , and Progesterone Analysis***

172 Blood samples were collected immediately before every hormonal treatment during
173 synchronization protocols and at TAI (D -29, -22, -20, -10, -3, -1, and 0). Samples were also
174 taken at days before infusions (d 4 and 9), at infusions days (d 5 and 10), one day after
175 treatments (d 6 and 11), one day before endometrial biopsy (d 14) and at endometrial biopsy (d

176 15). Blood samples were harvested by puncture of the median coccygeal vein or artery using
177 heparinized and non-heparinized Vacutainer® tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).
178 Tubes were placed on ice immediately after collection, transported to the laboratory and
179 centrifuged at 2,000 x g for 15 minutes at 4°C. Plasma and serum were stored at -80°C until
180 subsequent analysis.

181 Haptoglobin concentrations were analyzed based on a methodology described by
182 Makimura and Suzuki (1982), which quantifies the formation of hemoglobin-haptoglobin
183 complex by estimating the difference of peroxidase activity in serum and read at 450 nm wave
184 length. Commercial ELISA kits were used to determine plasmatic concentrations of TNF- α
185 (RayBio® Bovine TNF-alpha ELISA Kit, RayBiotech Inc., Norcross, GA) and progesterone
186 (Ovucheck Plasma®, Biovet, Saint-Hyacinthe, QC, Canada). A microplate reader (Gemini™
187 EM Fluorescence Microplate Reader, Molecular Devices) was used to evaluate all the
188 colorimetric reactions.

189

190 ***Reticular Temperature (RT)***

191 Body temperature were monitored during the entire experimental period. In the first
192 week postpartum cows received a temperature-sensing reticular bolus (TempTrack®, DVM
193 Systems, Greeley, CO) administered orally using appropriate gun. The bolus is a cylinder
194 measuring 95 mm x 23 mm and it rests inside reticulum of the cows. Some stationary panel
195 readers were installed in the freestall and one at the exit of the milking parlor, which serves to
196 power the bolus and obtain a reticular temperature reading every time a cow pass the reader.
197 These readings were sent to the farm computer for further analysis.

198 The electronic system used to measure RT in this study replaced the conventional
199 method of rectal temperature measurement with a digital thermometer. According to Bewley et

200 al. (2008) there is a significant correlation between reticular and rectal temperatures ($r = 0.645$),
201 which shows that RT is $0.45 \pm 0.33^{\circ}\text{C}$ higher than rectal temperature.

202

203 ***Conceptus Collection and Endometrial Biopsy***

204 On day 15 post-AI (d 15) uterine flushing for embryo recover was performed, and one
205 day before (d 14) the ovaries of the cows were scanned to check CL presence and its side. Cows
206 received an epidural anesthesia with 2 mL of lidocaine hydrochloride 2% (Bimeda Animal
207 Health Inc., Ontario, CA) and external genitalia was cleaned using water, paper towel and 70%
208 alcohol. For collection procedure, a foley catheter was inserted into the vagina through the
209 cervix and then into the uterus in direction of the ipsilateral horn to the CL. With an empty
210 syringe the catheter balloon was inflated with air to avoid reflux of the injected solution. In one
211 arm of the Y-tube a commercial flush solution bag (Bioniche Life Sciences Inc., Ontario, CA)
212 was attached to flush the horn. The embryo collection filter was attached in the second arm of
213 the Y-tube and holded below cow level, thus the solution flowed to the filter by gravity. Once
214 the presence of an embryo was detected inside the filter, flush procedure was concluded,
215 otherwise, the procedure was repeated. At the end of flushing, filters were capped, placed on
216 ice, transported to the laboratory and washed with 0.85% sodium chloride and their contend
217 transferred to a Petri dish. Embryos were measured inside the Petri dish using a ruler. The ovoid
218 embryos were measured using a stereomicroscope (Nikon® SMZ-745T). Embryos were placed
219 in identified sterile cryvials (DNase and RNase free) containing 1.8 mL of RNA stabilization
220 reagent (RNAlater; QIAGEN, Ontario, CA) and stored at -80°C until further analysis.

221 After uterine flushing procedure, endometrial biopsies were performed. The
222 endometrial biopsy forceps (Kevorkian-Younge, Fine Surgicals, 3.5 mm x 8 mm bite and 50.8
223 cm shaft) covered with a plastic sheath was inserted into the vagina through the cervix and into
224 the uterus in direction of the ipsilateral horn to the CL. Inside the uterus, the first endometrial

225 tissue sample was collected from the caudal portion of the ipsilateral uterine horn. The forceps
226 was removed from the cow with the sample in the clamp and the tissue fragment was collected
227 using tweezers. The same procedure was repeated to collect the second endometrium tissue
228 sample from the cranial portion of the same uterine horn. Approximately 100-200 mg of
229 endometrial tissue was collected from each cow. The two endometrial samples of each cow
230 were placed in the same cryovial with RNAlater. The tubes were frozen in a -80°C freezer.

231

232 ***RNA Extraction***

233 Total RNA from conceptus and endometrial samples were extracted using TRIzol Plus
234 RNA Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's
235 recommendations. The tissue:trizol ratio (mg:mL) was 100:1 for all samples (1-mL TRIzol per
236 50- to 100-mg tissue). Quantity and quality of extracted RNA were estimated using a NanoDrop
237 spectrophotometer (ND-2000, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE) at 260 nm
238 absorbance wave and 260:280-nm absorbance ratio, respectively. Total RNA extracted was
239 stored at -80°C until further processing.

240

241 ***Gene Expression Analysis***

242 For gene expression tests, only endometrial samples from pregnant cows were
243 considered into the analysis. Endometrial and conceptus mRNA expression were assessed by
244 single-molecule imaging of targeted mRNA molecules hybridized with color-coded probe pairs
245 and molecular barcodes using the NanoString nCounter System (NanoString® Technologies,
246 Seattle, WA), which were custom designed for 96 target and 4 reference genes. The target
247 mRNA was mixed in solution with a large excess of the reporter and capture probe pairs, so
248 that each targeted transcript found its corresponding probe pair. After hybridization, excess
249 unbound probes were washed away and the tripartite complexes, comprising target mRNA

250 bound to specific reporter-capture probe pairs, were isolated. The biotin label at the 3' end of
251 the capture probes was used to attach the complexes to streptavidin-coated slides. An electric
252 field was applied to orient and extend the tripartite complexes on the surface of the slide to
253 facilitate imaging and detection of the color-coded molecules. A microscope objective and a
254 charge-coupled device camera were then used to image the immobilized complexes using four
255 different excitation wavelengths (480, 545, 580, and 622 nm) corresponding to the four
256 fluorescent dyes. The different combinations of the four distinct colors allows for a large
257 diversity of color-based barcodes, each designating a different gene transcript. The expression
258 level of a gene was measured by counting the number of times the specific barcode is detected,
259 and the barcode counts were tabulated in a comma-separated value format. A total of 100 target
260 genes were analysed (Table 1).

261

262 ***Statistical Analysis***

263 All statistical analyses were conducted using SAS version 9.4 (SAS/STAT, SAS Inst.
264 Inc., Cary, NC). In all models, cows were used as the experimental unit.

265 Continuous data without repeated measurements (i.e. days in milk, lactation number,
266 BCS, milk yield and SCC at enrollment, progesterone concentration according to pregnancy
267 status, and CL diameter and embryo length at day 15 of gestation) were analyzed by ANOVA
268 using the MIXED procedure of SAS and treatment was included in the model as the fixed effect.
269 For progesterone concentration according to pregnancy status treatment, pregnancy status, and
270 the interaction between treatment and pregnancy status were included as fixed effects. The
271 MIXED procedure of SAS was used to analyze continuous data with repeated measurements
272 (i.e. milk yield, SCC, Hp, TNF- α , RT, and BCS). For analyses of repeated measurements the
273 repeated statement was used and treatment, infusion (first vs. second), day, hour, and the
274 interactions between treatment with infusion, day, and hour after infusions were included in the

275 model as fixed effects. The structure of covariance (auto-regressive, unstructured, or compound
276 symmetry) was chosen according to the Bayesian information criteria. Treatment was included
277 as the random effect and cows were nested within treatment.

278 Analysis of variance was used to analyze the effects of treatment on endometrium and
279 conceptus gene expression using MIXED procedure of SAS with treatment as a fixed effect.
280 Statistical significance of the contrast analysis was defined as $P \leq 0.05$ and tendency was
281 defined as $0.05 < P \leq 0.10$.

282

283 RESULTS

284 *Descriptive Parameters*

285 Four cows (Control = 1, and LPS = 3) were removed from the experiment: 1 cow did
286 not answer to the synchronization protocol and 3 cows were not able to collect uterine
287 flushing/biopsies samples of conceptuses and endometrium for gene expression analysis at day
288 15.

289 At enrollment, average DIM (control = 32.55 ± 1.62 , LPS = 35.67 ± 1.79 ; $P = 0.21$),
290 lactation number (control = 2.36 ± 0.55 , LPS = 2.33 ± 0.61 ; $P = 0.97$), and BCS (control = 2.91 ± 0.05 ,
291 LPS = 2.89 ± 0.05 ; $P = 0.83$) were similar between treatments. After ovulation
292 synchronization and TAI but before onset of treatments, milk yield from d -29 to 4 (control =
293 39.53 ± 2.15 , LPS = 35.76 ± 2.38 kg/d; $P = 0.26$) and SCC on day 0 (control = $34.18 \pm 9.41 \times 10^3$,
294 LPS = $145.30 \pm 50.2 \times 10^3$ cells/mL of milk; $P = 0.95$) were similar between treatments.
295 All cows had negative bacterial growth on milk cultures.

296

297 *Milk Yield and SCC after Treatment*

298 All cows treated with LPS demonstrated an acute mastitis signals, such as udder edema
299 in the infused teat and presence of milk clots at subsequent milkings. LPS cows tended to have

300 lower milk yield after treatment from day 5 to 15 (control = 36.85 ± 2.23 , LPS = 30.97 ± 2.46
301 kg/d; $P = 0.09$) than control cows, a difference of almost 6 kg less per cow per day. Milk yield
302 was also influenced by day ($P = 0.05$), but an interaction between treatment and day ($P = 0.28$)
303 was not verified (Figure 2).

304 LPS infusions stimulated the migration of a large amount of leucocytes to the challenged
305 quarter, which was responsible for an increase of SCC from RLT. SCC started to rise during
306 the first hours after each challenge, persisted high from 10 to 34h after treatment and return to
307 normality level until 96h after each challenge. The average SCC was altered by treatment
308 (control = 1228.16 ± 421.18 , LPS = $10489.0 \pm 461.81 *10^3$ cells/mL of milk; $P < 0.01$) and by
309 hours relative to infusion ($P < 0.01$), but was not affected by infusion ($P > 0.10$). Interactions
310 between treatment and infusion and among treatment, infusion and hours ($P > 0.10$) were not
311 detected, but an interaction between treatment and hours was verified ($P < 0.01$; Figure 3A and
312 3B).

313

314 ***Inflammatory Parameters***

315 Serum concentration of Hp was tended to be altered by treatment (control = 1.98 ± 0.24 ,
316 LPS = 2.61 ± 0.27 OD; $P = 0.09$). At the day after each infusion, Hp concentration was greater
317 ($P < 0.01$) for LPS compared with control cows on days 6 (control = 1.38 ± 0.43 , LPS = $3.40 \pm$
318 0.48 OD) and 11 (control = 2.25 ± 0.43 , LPS = 4.48 ± 0.48 OD). Hp tended to be higher for
319 LPS cows (control = 2.50 ± 0.43 , LPS = 3.66 ± 0.48 OD; $P = 0.07$) than control cows on day
320 14. An interaction between treatment and day on Hp serum concentration was verified ($P <$
321 0.01; Figure 4).

322 The intramammary challenge with LPS was not able to induce TNF- α production by
323 host defence cells, once this cytokine plasmatic concentration was not affected by treatment
324 (control = 0.58 ± 0.09 , LPS = 0.47 ± 0.09 ng/mL; $P = 0.42$), nor by day ($P = 0.12$). There was

325 no interaction between treatment and infusion on TNF- α plasmatic concentration ($P = 0.28$;
326 Figure 5).

327 Reticular temperature from LPS cows started to rise at 5h after each infusion and
328 remained high until 10h after infusion, reaching a peak of 40.86°C 8h after the first challenge.
329 RT was altered by treatment (control = 39.53 ± 0.11 ; LPS = $40.00 \pm 0.11^\circ\text{C}$; $P < 0.01$) and by
330 hours relative to infusion ($P < 0.01$), but was not affected by infusion ($P = 0.46$). Interactions
331 between treatment and infusion ($P = 0.46$), and treatment, infusion and hours ($P = 0.83$) were
332 not detected, but an interaction between treatment and hours was verified ($P < 0.01$; Figure 6).

333

334 ***Reproductive parameters***

335 Average progesterone plasmatic concentration during the entire experimental period
336 was not different between treatments (control = 3.56 ± 0.33 , LPS = $3.11 \pm 0.36 \text{ ng/mL}$; $P =$
337 0.37). From the beginning of pre-synchronization until the end of ovulation synchronization
338 protocol (days -29 to -1), all cows responded similarly to hormonal treatments and thus
339 progesterone concentration raised and fell following the same expected pattern during TAI in
340 both treatments (control = 4.04 ± 0.42 , LPS = $3.21 \pm 0.46 \text{ ng/mL}$; $P = 0.20$), with differences
341 among days during synchronization protocols ($P < 0.01$). Progesterone plasmatic concentration
342 after ovulation from day 0 to 15 was not affected by treatment (control = 3.28 ± 0.36 , LPS =
343 $3.06 \pm 0.40 \text{ ng/mL}$; $P = 0.69$). There was an effect of day ($P < 0.01$) although an interaction
344 between treatment and day ($P = 0.77$) on progesterone concentration was not observed (Figure
345 7).

346 When pregnancy status was included in the analysis of progesterone concentration from
347 day 0 to 15 there was no effect of treatment (control = 3.29 ± 0.38 , LPS = $3.06 \pm 0.44 \text{ ng/mL}$;
348 $P = 0.70$). Regardless of treatment influence, pregnancy status also did not alter progesterone

349 concentration (pregnant = 3.24 ± 0.38 , open = 3.11 ± 0.44 ng/mL; $P = 0.81$) and there was no
350 interaction between treatment and pregnancy ($P = 0.78$; Table 2).

351 Overall embryo recovery rate was 55% (11/20), which was 66.67% (6/9) for LPS group
352 and 45.45% (5/11) for control group. There was no effect of treatment on CL diameter (control
353 = 27.45 ± 0.87 , LPS = 25.50 ± 1.02 mm; $P = 0.17$) and embryo length on day 15 of gestation
354 (control = 6.37 ± 2.08 , LPS = 2.47 ± 1.47 cm; $P = 0.17$).

355

356 ***Gene Expression***

357 From the 100 target genes analyzed (Table 1), 13 genes were upregulated ($P < 0.01$) by LPS
358 challenge, 11 genes were from endometrial tissue and two from conceptus tissue. A tendency
359 of treatment effect ($0.05 \geq P < 0.10$) was observed in 19 genes (Table 3). From the cell adhesion
360 category, the levels of *CADM3*, *EMMPRIN*, *MMP19*, and *SERPING1* transcripts were
361 upregulated with 1.9, 1.2, 1.5 and 1.3 fold increases, respectively, in LPS challenged cows. The
362 *IGF2* and *AXIN1*, both transcripts that belong to growth and development group, were also
363 different between LPS and control cows with a 1.4 and 1.2-fold difference, respectively. For
364 *PTX3* gene, from immune system group, was observed a 2.3- fold increase in endometrium
365 collected from LPS cows. The *SLC27A6* gene that encodes a member of the fatty acid transport
366 protein family was 0.35-fold more expressed in LPS than control cows. Endometrial gene
367 transcription analysis showed that genes related to enzyme (*SGK*, 3.5-fold increase), receptor
368 (*TCN1*, 2.5-fold increase) and steroid biosynthesis (*CYP3A4*, 1.7-fold increase) had significant
369 differences between control and LPS cows in their mRNA levels ($P < 0.05$). Transcript levels
370 of two genes related to morphogenesis (*FTH1* and *GPX4*) measured in the conceptuses were
371 affected by treatment ($P \leq 0.05$) with a same fold increase of 1.2 for both. In relation to maternal
372 recognition of pregnancy-related genes, *IFN- τ* expression on conceptus tissue was not affected

373 by treatment ($P \geq 0.10$), whereas *IGS15* expression on endometrium tended to be 4.3-fold
374 increased by LPS ($P = 0.10$).

375

376 DISCUSSION

377 Reproductive performance of dairy cows can be affected by several factors, and one
378 important factor is the disease occurrence during postpartum period. The mastitis-induced
379 protocol using Gram-negative endotoxin was able to trigger a slight inflammatory response
380 without causing an infection itself. LPS did not compromise any of the reproductive parameters
381 analysed, especially progesterone concentration and conceptus length. Otherwise, 13 target
382 genes from endometrium and conceptus at day 15 of gestation were upregulated by the
383 endotoxin challenge, which may interfere on early embryo development and its cross talk with
384 endometrium during this critical period.

385 Clinical signs from endotoxemia caused by LPS can be observed from 30 minutes after
386 infusion and some of these signs may persist for days (Jacobsen et al., 2004). Fever, one of the
387 five cardinal signs of inflammation, can be induced by endotoxins and cytokines (Andersen,
388 2003). As an example, TNF- α induces prostaglandins production and release, which acts in the
389 brain and increases body temperature (Tizard, 2014) and also play an important role in
390 promoting luteolysis. In the current study, hyperthermia started around 5h after each infusion
391 and remained high until 10h later in LPS challenged cows (Figure 6A and 6B), similar to the
392 pattern reported by Jackson et al. (1990). Other authors verified a rectal temperature increase
393 in cows after intramammary infusion of LPS (Jacobsen et al. 2004; Suojala et al. 2008; Zimov
394 et al. 2011; Fogsgaard et al. 2012). Nevertheless, this increase in cow's body temperature may
395 also impairs early embryonic development of lactating dairy cows (Hansen and Arechiga,
396 1999).

397 As a consequence of hyperthermia, some behaviour changes may occurs in sick animals,
398 especially the reduction in dry matter intake (**DMI**), and thus nutrients partitioning is redirected
399 for maintenance and thermoregulation. Under this condition, nutrient requirement by the
400 immune system, to avoid the progression of infection, increases and there are less substrate
401 availability for milk synthesis (Ballou, 2016). Although DMI was not evaluated in our study,
402 we suggested that the lower food intake associated with sickness behaviour stimulated by pain
403 and fever may contributed for tendency of lower milk yield found in LPS group. In contrast,
404 Zimov et al. (2011) reported a reduction on milk yield following the next two days after LPS
405 challenge, without a decrease in DMI. According to the authors, this could be related with an
406 injury at mammary gland epithelium caused by inflammatory mediator and prolonged
407 diapedesis of neutrophils associated with higher permeability of udder blood vessels, which
408 lead an escape of substrate required for milk synthesis.

409 The SCC elevation observed at the subsequent milking after infusion ($\pm 10\text{h}$) denotes
410 that immune system of the dairy cow is efficient in rapidly recognize and respond to an infection
411 by leucocyte recruitment to the mammary gland. At onset of inflammatory response, many local
412 changes happen, such as vasodilation and increase of vascular permeability, which allow greater
413 blood flow to the site of injury and migration of cells from blood to tissue to fight against
414 pathogens, respectively (Tizard, 2014). As faster as it occurs, more effective the immune
415 response will be, once these cells function is to capture and eliminate both bacteria and
416 endotoxin from the host organism (Burvenich et al. 2007).

417 LPS release during bacteria replication induces cytokines synthesis by some cell types,
418 which starts the inflammatory response (Sordillo et al. 1997; Hogan and Smith, 2003). In the
419 current experiment, TNF- α concentrations were similar between treatments, therefore the
420 bacterial endotoxin may not have been able to promote this specific cytokine production and
421 release. Since the cytokines can be synthetized by a variety of cellular types, whether or not

422 belonging to immune system (Carneiro et al. 2009), it is possible that LPS may stimulated the
423 production of cytokines other than TNF- α that also participated in the inflammatory response
424 in the same way of those involved in clinical mastitis cases. The cytokines are also responsible
425 for acute phase proteins (**APP**) production by hepatocytes, which acts as nonspecific
426 inflammation markers. APP elevated concentration in blood can be verified during many
427 inflammatory conditions, and thus the measurement of these proteins serves as a diagnostic tool
428 to early detect sick cows, since the healthy animals commonly shows non detectable levels of
429 APP (Martínez-Subiela et al. 2001). Dairy cows with clinical mastitis had higher concentrations
430 of Hp in blood and milk compared to healthy cows (Eckersall et al., 2001, Nielsen et al. 2004,
431 Suojala et al. 2008). In agreement with other results, Hp concentration tended to be higher in
432 LPS treated cows. APP concentration after LPS challenge may indicates the severity of
433 endotoxin exposure and the individual ability of the cow to answer quickly to the acute stimuli
434 (Jacobsen et al., 2004).

435 Once LPS challenge was not able to increase TNF- α concentration, this may explain the
436 lack of difference in progesterone concentrations between treatments. These findings
437 contradicts the initial hypothesis of the current study, that LPS intramammary challenge would
438 be able to induce TNF- α synthesis therefore stimulate an increase in PGF_{2 α} secretion by
439 endometrium, resulting in premature luteolysis with a decrease in progesterone levels followed
440 by pregnancy loss. Giri et al. (1990) reported an increase on PGF_{2 α} synthesis after a LPS
441 challenge that caused reduction in progesterone concentration regardless to used dose and
442 pregnancy stage in cows.

443 Progesterone plays a crucial role on early embryonic development and is involved in
444 many endometrial functions required for conceptus growth, implantation, placentation and
445 development until birth (Dorniak et al., 2013). In addition to prepare the uterine environment
446 to receive an embryo, this hormone seems to indirectly affect embryo growth by inducing some

447 changes on endometrial gene expression at this stage. The uterus is responsible to produce and
448 secrete the histrotroph that contains essential proteins and other nutrients required for
449 embryonic development, and this secretion happens under progesterone regulation (Lonergan
450 et al., 2016). In the current study, LPS intramammary challenge may not have been severe
451 enough to disrupt progesterone production by the CL. Ribeiro et al. (2016) evaluated the effects
452 of uterine and non-uterine diseases occurrence during the postpartum period on early embryonic
453 development. As a result, less progesterone was synthetized by the CL of sick cows from the
454 ovulation to the next 15 days of the estrous cycle. In the current experiment, regardless to
455 treatment, progesterone concentrations were also similar between pregnant and non-pregnant
456 cows, in accordance to the results found by Ribeiro et al. (2016). However, Lukaszewska and
457 Hansel (1980) reported that pregnant cows had higher progesterone levels than cyclic cows
458 from days 10 to 18 of gestation, and according to the authors, this increase may be related to
459 the capacity of the embryo to produce luteotropic substances and avoid luteolysis.

460 The LPS-induced inflammatory response did not affect embryonic development until
461 day 15 of gestation, once the recovered conceptuses were similar in length between treatments.
462 At this period, the maternal recognition of pregnancy coincides with conceptus elongation from
463 a spherical to a filamentous form and production of interferon tau (**IFN- τ**) from trophoblast. A
464 signal is send from the conceptus to his dam by this protein secretion with the aim to block
465 endometrial luteolytic mechanism (Spencer et al., 2004; Lonergan et al. 2016). The conceptus
466 elongation and IFN- τ secretion are enhanced by high levels of progesterone after ovulation in
467 dairy cows (Mann et al., 2006). Despite of uterine and non-uterine diseases occurrence had no
468 effect on conception rate of Holstein cows at 15 days post-AI, the sick cows had shorter
469 conceptuses whose consequently produced less IFN- τ and impaired maternal recognition of
470 pregnancy and embryo survival (Ribeiro et al., 2016). The gene expression profile between long
471 and short conceptuses showed difference in 348 genes and this difference in conceptuses length

472 from the same age of gestation may be explained by a lack of development competence or an
473 asynchrony between embryo and maternal uterine environment (Barnwell et al., 2016).

474 The *IFN-τ* conceptus gene expression seems to occur due to a genetic programming
475 regardless to uterine environment influence (Antoniazzi et al., 2011), and its expression ends
476 with conceptus implantation around day 19 of gestation (Demmers et al., 2001; Forde et al.,
477 2011). Although IFN-τ concentration in uterine flushing on day 15 was not measured in our
478 study, *IFN-τ* expression from conceptus tissue did not differ between treatments. From eight
479 genes analysed in conceptus tissue, two were upregulated by LPS treatment, *FTH1* and *GPX4*
480 both related to conceptus morphogenesis. *FTH1* gene encodes ferritin protein that has as a major
481 function the intracellular iron storage. *GPX4* in mice is essential for embryo development and
482 cell survival (Ran et al., 2007) due to its protection against oxidative stress (Hamdi et al., 2015).
483 While the conceptus releases IFN-τ during maternal recognition, this protein induces the
484 expression of many interferons-stimulated genes (*ISGs*) in the uterus. One of these *ISGs* is the
485 interferon-stimulated gene 15 (*ISG15*) whose expression increases by pregnancy in the
486 endometrium of ruminants (Austin et al., 1996). Forde et al. (2011) reported an 8-fold increase
487 in *ISG15* expression in endometrium of pregnant heifers. In our study, *ISG15* expression on
488 endometrial tissue tended to be higher in LPS compared with control cows.

489 The upregulation of cell adhesion-related genes (*EMMPRIN* and *MMP19*) involved in
490 endometrial tissue remodeling during pre-implantation period and then in regulation of
491 conceptus attachment in bovine endometrium is in accordance with previous studies
492 (Bauersachs et al., 2008; Mishra et al., 2012). The *SERPING1* and *PTX3* genes plays an
493 important role in embryo-maternal immune modulation, once it has immunosuppressive and
494 anti-proliferative properties that prevent rejection of the conceptus by complement system
495 (Klein et al., 2006; Ulbrich et al., 2009; Walker et al., 2010). Serpins proteins are secreted by
496 glandular epithelium during bovine pregnancy, when it reaches high levels, and its expression

497 is regulated by progesterone and also by estrus (Ulbrich et al., 2009; Dorniak et al., 2013). In
498 agreement with our findings, Klein et al. (2006) verified an upregulation of *SERPING1* until 18
499 days of gestation in cows with similar progesterone concentration. *PTX3* upregulation in
500 pregnant cows prevents complement system cascade and excessive inflammatory reactions,
501 once it inhibits the classical complement pathway (Walker et al., 2010; Cerri et al., 2012).
502 *MUC1* gene is involved in both cell adhesion and immune functions, although this gene was
503 not differently expressed among LPS and control cows. An unregulation of this gene was
504 verified after in vitro endometrial cells treatment with LPS (Davies et al., 2008) and in cows
505 with uterine infections (Kasimanickam et al., 2014).

506 The mechanisms related with transport and metabolism are increased during the luteal
507 phase due to nutrients secretion required for embryonic development (Bauersachs et al., 2008).
508 *IGF2* is a growth promoting hormone during gestation once it is envolved in regulation of cell
509 growth and differentiation. Upregulation of *IGF2* reported in the current study coorborates with
510 Geisert et al. (1991), who found high levels of *IGF2* mRNA between 15 and 18 days of the
511 estrous cycle in pregnant cows compared with cyclic cows, period that corresponds to a rapidly
512 conceptus growth. According to the authors, this result may be due to conceptus presence
513 stimulatory effect rather than progesterone regulation. *TCN1* gene encodes a vitamin B-12
514 carrier protein, which delivers this vitamin into cells and it is a major compound of secondary
515 granules in neutrophils. *SLC27A6* gene encodes a fatty acid transport protein and these acids
516 acts as an energy source for cells, especially for growing cells of the conceptus. The high levels
517 of *TCN1* and *SLC27A6* mRNA in LPS cows may be due to an increase in nutrient requirement
518 for the growing conceptus, once more pregnant cows were found in this group.

519 The relationship between dry matter intake, liver blood flow, and circulating
520 concentrations of progesterone in lactating dairy cows is well-established (Wiltbank et al.,
521 2006). *CYP3A4* is a steroid biosynthesis related gene that participates in progesterone

Campos et al.

metabolism in liver tissues. Wiltbank et al. (2012) described progesterone metabolism in two phases, and the first phase was characterized by hydroxylation of this hormone in multiple positions using *CYP3A4* enzyme and other CYP enzymes.

Research about bovine endometrial transcriptome may have important implications for all areas within dairy industry. Further studies are required to identify marked genes that can be influenced by inflammatory conditions and use the knowledge about their role under disease cases as genetic selection tool to ensure early embryonic development and pregnancy successes of lactating dairy cows.

530

531 CONCLUSIONS

532 LPS intramammary infusions on days 5 and 10 after AI promoted a slight inflammatory response and upregulated the gene expression profile of 13 genes in endometrial and conceptus tissues without compromising progesterone concentration and embryonic development during the first 15 days of gestation in Holstein lactating dairy cows.

536

537 ACKNOWLEDGMENTS

538 The authors thank the staff of the UBC Dairy and Research Centre from the University
539 of British Columbia (UBC), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
540 (CAPES, Social Demand and PDSE) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento
541 Científico e Tecnológico (CNPq, Research Productivity) for the financial support.

542

543 REFERENCES

544 Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell
545 124:783-801.

- 546 Andersen, P.H. 2003. Bovine endotoxicosis – some aspects of relevance to production diseases.
547 A review. *Acta Vet. Scand.* 98(Suppl.):141-155.
- 548 Antoniazzi, A.Q., L.E. Henkes, J.F.C. Oliveira, and T.R. Hansen. 2011. Função do interferon-
549 tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. *Ciênc. Rural.*
550 41:176-185.
- 551 Austin, K.J., S.K. Ward, M.G. Teixeira, V.C. Dean, D.W. Moore, T.R. Hansen. 1996. Ubiquitin
552 cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during
553 early pregnancy. *Biol. Reprod.* 54:600-606.
- 554 Ballou, M. 2016. The impacts of disease on nutritional requirements and performance of
555 lactating cows. Page 4 in Proc. 20st Novos Enfoques na Produção e Reprodução de
556 Bovinos. Uberlândia, MG.
- 557 Barnwell, C.V., P.W. Farin, C.M. Ashwell, W.T. Farmer, S.P. Galphin Jr., and C.E. Farin. 2016.
558 Differences in mRNA populations of short and long bovine conceptuses on day 15 of
559 gestation. *Mol. Reprod. Dev.* 83:424-441.
- 560 Bauersachs, S., K. Mirtko, S.E. Ulbrich, H. Blum, and E. Wolf. 2008. Transcriptome studies of
561 bovine endometrium reveal molecular profiles characteristic for specific stages of
562 estrous cycle and early pregnancy. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 116:01-14.
- 563 Bewley, J.M., M.E. Einstein, M.W. Grott, and M.M. Schutz. 2008. Comparison of reticular and
564 rectal core body temperature in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:4661–4672.
- 565 Bromfield, J.J., and I.M. Sheldon. 2013. Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle
566 pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. *Biol. Reprod.*
567 88:01-09.

- 568 Bromfield, J.J., J.E.P. Santos., J. Block, R.S. Williams, and I.M. Sheldon. 2015. Uterine
569 infection: Linking infection and innate immunity with infertility in the high-producing
570 dairy cow. *J. Anim. Sci.* 93:2021-2033.
- 571 Burvenich, C., D.D. Bannerman, J.D. Lippolis, L. Peelman, B.J. Nonnecke, M.E. Kehrli Jr. and
572 M.J. Paape. 2007. Cumulative physiological events influence the inflammatory
573 response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period.
574 *J. Dairy Sci.* 90(Suppl.):E39-E54.
- 575 Cai, T.Q., P.G. Weston, L.A. Lund, B. Brodie, D.J. McKenna, and W.C. Wagner. 1994.
576 Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am. J.*
577 *Vet. Res.* 55:934-943.
- 578 Carneiro, D.M.V.F., P.F. Domingues, and A.K. Vaz. 2009. Imunidade inata da glândula
579 mamária bovina: resposta à infecção. *Ciênc. Rural* 39:1934-1943.
- 580 Cerri, R.L.A., I.M. Thompson, I.H. Kim, A.D. Ealy, P.J. Hansen, C.R. Staples, J.L. Li, J.E.P.
581 Santos, and W.W. Thatcher. 2012. Effects of lactation and pregnancy on gene
582 expression of endometrium of Holstein cows at day 17 of the estrous cycle or pregnancy.
583 *J. Dairy Sci.* 95:5657-5675.
- 584 Davies, D., K.G. Meade, S. Herath, P.D. Eckersall, D. Gonzalez, J.O. White, R.S. Conlan, C.
585 O'Farrelly, and I.M. Sheldon. 2008. Toll-like receptor and antimicrobial peptide
586 expression in the bovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6:53.
- 587 Demmers, K.J., K. Derecka, and A. Flint. 2001. Trophoblast interferon and pregnancy.
588 *Reproduction* 121:41-49.
- 589 Dorniak, P., F.W. Bazer, and T.E. Spencer. 2013. Biological role of interferon tau in
590 endometrial function and conceptus elongation. *J. Anim. Sci.* 91:1627-1638.

- 591 Eckersall, P.D., F.J. Young, C. McComb, C.J. Hogarth, S. Safi, A. Weber, T. McDonald, A.M.
592 Nolan, and J.L. Fitzpatrick. 2001. Acute phase proteins in serum and milk from dairy
593 cows with clinical mastitis. *Vet. Rec.* 148:35-41.
- 594 Edmonson, A.J., I.J. Lean, L.D. Weaver, T. Farver, and G. Webster. 1989. A Body condition
595 scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:68-78.
- 596 Fogsgaard, K.K., C.M. Røntved, P. Sørensen, and M.S. Herskin. 2012. Sickness behavior in
597 dairy cows during *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Sci.* 95:630-638.
- 598 Forde, N., F. Carter, T.E. Spencer, F.W. Bazer, O. Sandra, N. Mansouri-Attia, L.A. Okumu,
599 P.A. McGettigan, J.P. Mehta, R. McBride, P. O'Gaora, J.F. Roche, and P. Lonergan.
600 2011. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the
601 cow know she is pregnant? *Biol. Reprod.* 85:144-156.
- 602 Geisert, R.D., C.Y. Lee, F.A. Simmen, M.T. Zavy, A.E. Fliss, F.W. Bazer, R.C.M. Simmen.
603 1991. Expression of messenger RNAs encoding insulin-like growth factor-I, -II, and
604 insulin-like growth factor binding protein-2 in bovine endometrium during the estrous
605 cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 45:975-983.
- 606 Giri, S.N., P. Emau, J.S. Cullor, G.H. Stabenfeldt, M.L. Bruss, R.H. Bondurant., and B.I.
607 Osburn. 1990. Effects of endotoxin infusion on circulating levels of eicosanoids,
608 progesterone, cortisol, glucose and lactic acid, and abortion in pregnant cows. *Vet.*
609 *Microbiol.* 21:211-231.
- 610 Grummer, R.R., D.G. Mashek, and A. Hayirli. 2004. Dry matter intake and energy balance in
611 the transition period. *Vet. Clin N Am. Food Anim.* 20:447-470.
- 612 Hamdi, M., R. Lopera, V. Maillo, C. Núñez, A. Gutiérrez-Ádán, P. Lonergan, P. Bermejo-
613 Álvarez, and D. Rizos. Bovine oviduct epithelial cells: an in vitro model to study early

- 614 embryo-maternal communication. Page 798 in Proc. 29st Annu. Mtg. Brazilian Society
615 of Embryo Tecnology, Gramado, RS.
- 616 Hansen, P.J., and Arechiga, C.F. 1999. Strategies for managing reproduction in the heat-
617 stressed dairy cow. *J. Anim. Sci.* 77:37-50.
- 618 Hansen, P.J., P. Soto, and R.P. Natzke. 2004. Mastitis and fertility in cattle – possible
619 involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am. J.
620 Reprod. Immunol.* 51:294-301.
- 621 Herath, S., E. J. Williams, S.T. Lilly, R.O. Gilbert, H. Dobson, C.E. Bryant, and I.M. Sheldon.
622 2007. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their
623 endocrine function. *Reproduction.* 134:683-693.
- 624 Herman, A.P., K. Romanowicz, and D. Tomaszewska-Zaremba. 2010. Effect of LPS on
625 reproductive system at the level of the pituitary of anestrous ewes. *Reprod. Domest.
626 Anim.* 45: e351-e359.
- 627 Hertl, J.A., Y.T. Gröhn, J.D.G. Leach, D. Bar, G.J. Bennett, R.N. González, B.J. Rauch, F.L.
628 Welcome, L.W. Tauer, and Y.H. Schukken. 2010. Effects of clinical mastitis caused by
629 gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of
630 conception in New York State Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:1551-1560.
- 631 Hogan, J., and K.L. Smith. 2003. Coliform mastitis. *Vet. Res.* 34:507-519.
- 632 Jackson, J.A., D.E. Shuster, W.J. Silvia, and R.J. Harmon. 1990. Physiological responses to
633 intramammary or intravenous treatment with endotoxin in lactating dairy cows. *J. Dairy
634 Sci.* 73:627-632.
- 635 Jacobsen, S., P.H. Andersen, T. Toelboell, and P.M.H. Heegaard. 2004. Dose dependency and
636 individual variability of the lipopolysaccharide-induced bovine acute phase protein
637 response. *J. Dairy Sci.* 87(10):3330-3339.

- 638 Kasimanickam, R., V. Kasimanickam, and J.P. Kastelic. 2014. Mucin 1 and cytokines mRNA
639 in endometrium of dairy cows with postpartum uterine disease or repeat breeding.
640 Theriogenology. 81:952-958.
- 641 Klein, C., S. Bauersachs, S.E. Ulbrich, R. Einspanier, H.H.D. Meyer, S.E.M. Schmidt, H.D.
642 Reichenbach, M. Vermehren, F. Sinowitz, H. Blum, and E. Wolf. 2006. Monozygotic
643 twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine
644 endometrium in the preattachment period. Biol. Reprod. 74:253-264.
- 645 Lavon, Y., G. Leitner, T. Goshen, R. Braw-Tal, S. Jacoby and D. Wolfenson. 2008. Exposure
646 to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations
647 in cows. Theriogenology. 70:956-967.
- 648 Lonergan, P., N. Forde, and T.E. Spencer. 2016. The importance of progesterone and conceptus
649 derived factors for survival and development of the conceptus. Page 46 in Proc. 30st
650 Annu. Mtg. Brazilian Society of Embryo Tecnology, Foz do Iguaçu, PR.
- 651 Lukaszewska, J., and W. Hansel. 1980. Corpus luteum maintenance during early pregnancy in
652 the cow. Reproduction. 59: 485-493.
- 653 Lüttgenau, J., B. Lingemann, O. Wellnitz, A.K. Hankele, M. Schmicke, S.E. Ulbrich, R.M.
654 Bruckmaier, and H. Bollwein. 2008. Repeated intrauterine infusions of
655 lipopolysaccharide alter gene expression and lifespan of the bovine corpus luteum. J.
656 Dairy Sci. 99:6639-6653.
- 657 Magata, F., M. Horiuchi, R. Echizenya, R. Miura, S. Chiba, M. Matsui, A. Miyamoto, Y.
658 Kobayashi, and T. Shimizu. 2014. Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid
659 influences the steroid production in large follicles of dairy cows. Anim. Reprod. Sci.
660 144:06-13.

- 661 Makimura, S., and N. Suzuki. 1982. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin
662 and its elevation in some inflammatory diseases. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44:15-21.
- 663 Mann, G.E., M.D. Fray, and G.E. Lamming. 2006. Effects of time of progesterone
664 supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. *Vet.*
665 *J.* 171:500-503.
- 666 Martínez-Subiela, S., F. Tecles, M.D. Parra, and J.J. Céron. 2001. Proteínas de fase aguda:
667 conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. *An. Vet.*
668 17:97-114.
- 669 Mishra, B., K. Kizaki, K. Koshi, K. Ushizawa, T. Takahashi, M. Hosoe, T. Sato, A. Ito, and K.
670 Hashizume. 2012. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer
671 (EMMPRIN) and its expected roles in the bovine endometrium during gestation.
672 *Domest. Anim. Endocrin.* 42: 63-73.
- 673 Miyamoto, Y., D.J. Skarzynski, and K. Okuda. 2000. Is tumor necrosis factor a trigger for the
674 initiation of endometrial prostaglandin F_{2 α} release at luteolysis in cattle? *Biol. Reprod.*
675 62:1109-1115.
- 676 NRC. 2001. Nutrient Requirements for Dairy Cattle. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
- 677 Nielsen, B.H., S. Jacobsen, P.H. Andersen, T.A Niewold, and P.M.H. Heegaard. 2004. Acute
678 phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical
679 mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. *Vet. Rec.* 154:361-
680 365.
- 681 Ran, Q., H. Liang, Y. Ikeno, W. Qi, T.A. Prolla, L.J. Roberts, N. Wolf, H. Van Remmen, H.
682 VanRemmen, and A. Richardson. 2007. Reduction in glutathione peroxidase 4 increases
683 life span through increased sensitivity to apoptosis. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*
684 62: 932-942.

- 685 Ribeiro, E.S., G. Gomes, L.F. Greco, R.L.A. Cerri, A. Vieira-Neto, P.L.J. Monteiro Jr., F.S.
686 Lima, R.S. Bisinotto, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos. 2016. Carryover effect of
687 postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating
688 dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:2201-2220.
- 689 Roth, Z., A. Dvir, D. Kalo, Y. Lavon, O. Krifucks, D. Wolfenson, and G. Leitner. 2013.
690 Naturally occurring mastitis disrupts developmental competence of bovine oocytes. *J.*
691 *Dairy Sci.* 96:6499-6505.
- 692 Santos, J.E.P., R.L.A. Cerri, M.A. Ballou, G.E. Higginbotham, and J.H. Kirk. 2004. Effect of
693 timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance
694 of Holstein dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 80:31-45.
- 695 Schrick, F.N., M.E. Hockett, A.M. Saxton, M.J. Lewis, H.H. Dowlen, and S.P. Oliver. 2001.
696 Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J.*
697 *Dairy Sci.* 84:1407-1412.
- 698 Sheldon, I.M., A.N. Rycroft, B. Dogan, M. Craven, J.J. Bromfield, A. Chandler, M.H. Roberts,
699 S.B. Price, R.O. Gilbert, and K.W. Simpson. 2010. Specific strains of *Escherichia coli*
700 are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in
701 cattle and mice. *PLoS ONE* 5:01-14.
- 702 Skarnes, R.C., and M.J.K. Harper. 1972. Relationship between endotoxin-induced abortion and
703 the synthesis of prostaglandin F. *Prostaglandins*, 1:191-203.
- 704 Skarzynski, D.J., Y. Miyamoto, and K. Okuda. 2000. Production of prostaglandin F2a by
705 cultured bovine endometrial cells in response to Tumor Necrosis Factor α : cell type
706 specificity and intracellular mechanisms. *Biol Reprod* 62:1116-1120.
- 707 Sordillo, L.M., G.M. Pighetti, and M.R. Davis. 1995. Enhanced production of bovine tumor
708 necrosis factor-a during the periparturient period. *Vet Immunol Immunop*, 49:263-270.

- 709 Sordillo, L.M., K. Shafer-Weaver, and D. DeRosa. 1997. Immunobiology of the mammary
710 gland. *J. Dairy Sci.* 80:1851-1865.
- 711 Soto, P., R.P. Natzke, and P.J. Hansen. 2003. Actions of tumor necrosis factor- α on oocyte
712 maturation and embryonic development in cattle. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50:380-388.
- 713 Souza, A.H., H. Ayres, R.M. Ferreira, and M.C. Wiltbank. 2008. A new presynchronization
714 system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating
715 dairy cows. *Theriogenology*, 70:208-215.
- 716 Spencer, T.E., G.A. Johnson, R.C. Burghardt, and F.W. Bazer. 2004. Progesterone and
717 placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol. Reprod.*
718 71:02-10.
- 719 Suojala, L., T. Orro, H. Järvinen, J. Saatsi, and S. Pyörälä. 2008. Acute phase response in two
720 consecutive experimentally induced *E.coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta
721 Vet. Scand.* 50:1-10.
- 722 Suzuki, C., K. Yoshioka, S. Iwamura, and H. Hirose. 2001. Endotoxin induces delayed
723 ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein
724 heifers. *Domest Anim Endocrin* 20:267-278.
- 725 Tizard, I.R. 2014. Imunologia veterinária. 9. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 549p.
- 726 Ulbrich, S.E., T. Frohlich, K. Schulke, E. Englberger, N. Waldschmidtt, G.J. Arnold, H.D.
727 Reichenbach, M. Reichenbach, E. Wolf, H.H.D. Meyer, and S. Bauersachs. 2009. *Biol.
728 Reprod.* 81:795-805.
- 729 Walker, C.G., S. Meier, M.D. Littlejohn, K. Lehnert, J.R. Roche, M.D. Mitchell. 2010.
730 Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. *BMC
731 Genomics* 11:474-487.

- 732 Wiltbank, M., H. Lopez, R. Sartori, S. Sangsritavong, and A. Gumen. 2006. Changes in
733 reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism.
734 Theriogenology. 65:17-29.
- 735 Wiltbank, M.C., A.H. Souza, J.O. Giordano, A.B. Nascimento, J.M. Vasconcelos, M.H.C.
736 Pereira, P.M. Fricke, R.S. Surjus, F.C.S. Zinsly, P.D. Carvalho, R.W. Bender, and R.
737 Sartori. 2012. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols
738 in lactating dairy cattle. Anim. Reprod. 9:231-241.
- 739 Wiltbank, M.C., G.M. Baez, A. Garcia-Guerra, M.Z. Toledo, P.L.J. Monteiro, L.F. Melo, J. C.
740 Ochoa, J.E.P. Santos, and R. Sartori. 2016. Pivotal periods for pregnancy loss during
741 the first trimester of gestation in lactating dairy cows. Theriogenology, 86:239-253.
- 742 Zimov, J.L., N.A. Botheras, W.P. Weiss, and J.S. Hogan. 2011. Associations among behavioral
743 and acute physiologic responses to lipopolysaccharide induced clinical mastitis in
744 lactating dairy cows. Am. J. Vet. Res. 72:620-627.
- 745
- 746
- 747
- 748
- 749
- 750
- 751
- 752
- 753
- 754

755

Table 1. Genes and accession numbers according to National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Gene symbol	Gene description	Accession number
Cell adhesion molecules		
<i>CADM3</i>	Cell adhesion molecule 3	NM_001075946.1
<i>CDH1</i>	Cadherin 1	NM_001002763.1
<i>CLDN4</i>	Claudin 4	NM_001014391.2
<i>EMMPRIN</i>	Extracellular matrix metalloproteinase inducer	NM_001075371.2
<i>GLYCAM1</i>	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1	NM_174828.2
<i>LGALS3BP</i>	Lectin galactoside soluble 3 binding protein	NM_001046316.2
<i>MMP19</i>	Matrix metallopeptidase 19	NM_001075983.1
<i>MUC4</i>	Mucin 4	XM_015471614.1
<i>MUC5B</i>	Mucin 5B	XM_015461377.1
<i>MYH9</i>	Myosin, heavy chain 9, non-muscle	NM_001192762.1
<i>MYH10</i>	Myosin, heavy chain 10	NM_174834.1
<i>MYL12A</i>	Myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric	NM_001015640.2
<i>SELL</i>	Selectin L	NM_174182.1
<i>SERPING1</i>	Serpin peptidase inhibitor, family G member 1	NM_174821.2
<i>SPPI</i>	Secreted phosphoprotein 1	NM_174187.2
<i>TIMP2</i>	TIMP metallopeptidase inhibitor 2	NM_174472.4
Enzyme		
<i>DGKA</i>	Diacylglycerol kinase alpha	NM_001077860.1
<i>HPGD</i>	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	NM_001034419.2
<i>MOGAT1</i>	Monoacylglycerol O-acyltransferase 1	NM_001001153.2
<i>PFKFB2</i>	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2	NM_174812.4
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	NM_174445.2
<i>SGK1</i>	Serum/glucocorticoid regulated kinase 1	NM_001102033.1
Growth and development		
<i>AGPAT1</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1	NM_177518.1
<i>APC</i>	Adenomatous polyposis coli	NM_001075986.2
<i>AXIN1</i>	Axin 1	NM_001191398.1
<i>AXIN2</i>	Axin 2	NM_001192299.1
<i>CAPN6</i>	Calpain 6	NM_001192231.1
<i>CTNNA2</i>	Catenin alpha 2	NM_001102110.1
<i>CTNNB1</i>	Catenin beta 1	NM_001076141.1
<i>CXXC4</i>	CXXC finger protein 4	XM_019962359.1
<i>DKKI</i>	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	NM_001205544.1
<i>FZD4</i>	Frizzled class receptor 4	NM_001206269.1
<i>FZD7</i>	Frizzled class receptor 7	NM_001144091.1
<i>FZD8</i>	Frizzled class receptor 8	XM_005214320.3
<i>GSK3β</i>	Glycogen synthase kinase 3 beta	NM_001101310.1
<i>IGF1</i>	Insulin like growth factor 1	NM_001077828.1
<i>IGF2</i>	Insulin like growth factor 2	NM_174087.3
<i>MSX1</i>	Msh homeobox 1	NM_174798.2
<i>PRKCG</i>	Protein kinase C gamma	NM_001166502.2
<i>RELN</i>	Reelin-like	NM_001206458.1
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A variant 1	NM_174216.2
<i>WNT2</i>	Wnt family member 2	NM_001013001.1
<i>WNT3</i>	Wingless-type MMTV integration site family member 3	NM_001206024.1

WNT3A	Wingless-type MMTV integration site family member 3 A	XM_015471858.1
Immune system		
<i>B3GAT1</i>	Beta-1,3-glucuronyltransferase 1	NM_001014393.1
<i>CXCL10</i>	C-X-C motif chemokine ligand 10	NM_001046551.2
<i>DEFB1</i>	Beta-defensin 1	NM_001324544.1
<i>IDO1</i>	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1	NM_001101866.2
<i>IGHG1</i>	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	DQ452014.1
<i>IGLL1</i>	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1	NM_001083800.1
<i>IL-1β</i>	Interleukin 1 beta	NM_174093.1
<i>IL-8</i>	Interleukin 8	NM_173925.2
<i>IL-10</i>	Interleukin 10	NM_174088.1
<i>LIFR</i>	Leukemia inhibitory factor receptor alpha	NM_001192263.1
<i>LYZ2</i>	Lysozyme C-2	NM_180999.1
<i>MUC1</i>	Mucin 1, cell surface associated	NM_174115.2
<i>MX1</i>	MX dynamin like GTPase 1	NM_173940.2
<i>MX2</i>	MX dynamin like GTPase 2	NM_173941.2
<i>NF-κβ1</i>	Nuclear factor kappa beta subunit 1	NM_001076409.1
<i>PTX3</i>	Pentraxin 3	NM_001076259.2
<i>SCGB3A1</i>	Secretoglobin, family 3A, member 1	NM_001013180.1
<i>SLPI</i>	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	NM_001098865.2
<i>TNF-α</i>	Tumor necrosis factor alpha	NM_173966.2
<i>TRD</i>	T cell receptor, delta	XM_603355.3
<i>UHRF1</i>	Ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1	NM_001103098.1
Maternal recognition of pregnancy		
<i>IFN-τ</i> (conceptus)	Interferon tau	NM_001015511.3
<i>ISG15</i> (endometrium)	Interferon-stimulated gene 15	NM_174366.1
Morphogenesis		
<i>BMP15</i>	Bone morphogenetic protein 15	NM_001031752.1
<i>EEF1A1</i>	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	NM_174535.2
<i>FTH1</i>	Ferritin heavy chain 1	NM_174062.3
<i>GPX4</i>	Glutathione peroxidase 4	NM_174770.4
<i>HOXB7</i>	Homeobox B7	NM_174342.2
<i>IL-6</i>	Interleukin 6	NM_173923.2
<i>PLAU</i>	Plasminogen activator, urokinase	NM_174147.2
Protein		
<i>CALB2</i>	Calbindin 2	NM_001035288.1
<i>HOXA10</i>	Homeobox A10	NM_001105017.1
<i>IGFBP1</i>	Insulin-like growth factor binding protein 1	NM_174554.3
<i>IGFBP2</i>	Insulin-like growth factor binding protein 2	NM_174555.1
<i>IGFBP3</i>	Insulin-like growth factor binding protein 3	NM_174556.1
<i>NNMT</i>	Nicotinamide N-methyltransferase	XM_015474625.1
<i>NR1I2</i>	Nuclear receptor subfamily 1 group I member 2	NM_001103226.1
<i>SLC2A5</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter),member 5	NM_001101042.2
<i>SLC27A6</i>	Solute carrier family 27 member 6	NM_001101169.1
<i>SLC5A6</i>	Solute carrier family 5 member 6	NM_001046219.2
<i>SLC7A10</i>	Solute carrier family 7 member 10	NM_001104989.1
Receptor		

<i>ERα</i>	Estrogen receptor alpha	NM_001001443.1
<i>ERβ</i>	Estrogen receptor beta	NM_174051.3
<i>FOLR1</i>	Folate receptor 1 (adult)	NM_001206532.1
<i>IGF1R</i>	Insulin like growth factor 1 receptor	NM_001244612.1
<i>OXTR</i>	Oxytocin receptor	NM_174134.2
<i>PGRMC1</i>	Progesterone receptor membrane component 1	NM_001075133.1
<i>PGRMC2</i>	Progesterone receptor membrane component 2	NM_001099060.1
<i>TCN1</i>	Transcobalamin I (vitamin B12 binding protein)	NM_001193105.1
Steroid biosynthesis		
<i>COX-2</i>	Cytochrome C oxidase, subunit II	NM_174445.2
<i>CYP3A4</i>	Cytochrome P450, subfamily IIIA, polypeptide 4	NM_001099367.1
<i>CYP4F2</i>	Cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide12	NM_001035042.1
<i>CYP4X1</i>	Cytochrome P450 family 4 subfamily X member 1	XM_003585903.4
<i>OXT</i>	Oxytocin/neurophysin I prepropeptide	NM_176855.1
<i>PTGES</i>	Prostaglandin E synthase	NM_174443.2
<i>WISP2</i>	Wnt1 inducible signaling pathway protein 2	NM_001102176.1

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767

768

769

770 **Table 2.** Effect of treatment¹ of lactating dairy cows with intramammary infusions of lipopolysaccharide
 771 (LPS) on plasmatic progesterone concentration according to pregnancy status
 772

Treatment	Progesterone concentration (ng/mL of plasma)		<i>P</i> -value		
	Pregnant (n)	Non-pregnant (n)	Trt	Preg	Trt x Preg
Control	3.44 ± 0.56 (5)	3.14 ± 0.51 (6)		0.70	0.81
LPS	3.05 ± 0.51 (6)	3.07 ± 0.72 (3)			0.78

773 ¹Treatments: Control = 10 mL saline, LPS = 25 µg of LPS diluted in 10 mL of saline.

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

796 **Table 3.** Effect of treatment¹ of lactating dairy cows with intramammary infusions of lipopolysaccharide
 797 (LPS) on endometrial and conceptus gene expression (mRNA ± SEM) of genes related to cell adhesion
 798 molecules, growth and development, immune system, maternal recognition of pregnancy,
 799 morphogenesis, steroid biosynthesis, enzyme, protein and receptor
 800

Gene	Treatment ¹		<i>P</i> -value ²	Fold change ³
	Control	LPS		
Endometrium				
<i>CADM3</i>	273.99 ± 1.17	526.93 ± 1.15	0.01	1.93
<i>EMMPRIN</i>	2070.95 ± 101.88	2480.06 ± 93.00	0.02	1.20
<i>MMP19</i>	621.90 ± 1.12	926.15 ± 1.10	0.02	1.49
<i>MYH9</i>	4638.64 ± 359.98	5461.32 ± 328.61	0.13	1.18
<i>SELL</i>	69.09 ± 1.27	132.15 ± 1.24	0.07	1.91
<i>SERPINA14</i>	6012.09 ± 449.41	7695.76 ± 410.26	0.02	1.28
<i>SGK1</i>	577.65 ± 241.62	2049.63 ± 220.57	< 0.001	3.55
<i>AGPAT</i>	1132.76 ± 1.08	1415.43 ± 1.08	0.07	1.25
<i>AXIN1</i>	508.36 ± 32.30	625.40 ± 29.48	0.03	1.23
<i>AXIN2</i>	223.14 ± 27.88	290.69 ± 25.45	0.10	1.30
<i>FZD4</i>	429.99 ± 64.15	600.50 ± 58.56	0.08	1.40
<i>FZD7</i>	658.39 ± 53.38	779.35 ± 48.73	0.10	1.18
<i>IGF2</i>	4422.24 ± 609.57	6301.77 ± 556.46	0.05	1.43
<i>VEGFA</i>	570.43 ± 59.79	719.75 ± 54.58	0.10	1.26
<i>WNT2</i>	259.71 ± 35.11	348.26 ± 32.05	0.10	1.34
<i>MX2</i>	913.29 ± 1.98	4740.59 ± 1.86	0.11	5.19
<i>NF- κβ</i>	940.93 ± 65.01	1134.49 ± 59.34	0.06	1.21
<i>PTX3</i>	55.71 ± 1.22	130.08 ± 1.20	0.01	2.34
<i>ISG15</i>	3471.72 ± 1.80	14799.05 ± 1.71	0.10	4.26
<i>HOXA10</i>	2092.69 ± 243.21	2710.67 ± 222.02	0.09	1.30
<i>SLC27A6</i>	637.57 ± 131.85	221.70 ± 120.36	0.04	0.35
<i>SLC7A10</i>	1.32 ± 1.42	3.55 ± 1.37	0.07	2.68
<i>TC1</i>	60.54 ± 22.95	153.11 ± 20.95	0.02	2.53
<i>CYP3A4</i>	23.58 ± 1.16	39.05 ± 1.15	0.03	1.66
<i>PTGES</i>	61.29 ± 12.38	91.90 ± 11.30	0.10	1.50
Conceptus				
<i>BMP15</i>	2.51 ± 1.39	1.21 ± 1.35	0.06	0.48
<i>FTH1</i>	4869.41 ± 412.31	6154.33 ± 376.39	0.05	1.26
<i>GPX4</i>	2343.26 ± 84.50	2700.08 ± 77.14	0.01	1.15
<i>IL-6</i>	1.32 ± 1.57	4.53 ± 1.51	0.08	3.42
<i>PLAU</i>	176.28 ± 1.16	253.75 ± 1.14	0.10	1.44

801 ¹Treatments: Control = 10 mL saline, LPS = 25 µg of LPS diluted in 10 mL of saline.

802 ²Difference when *P* ≤ 0.05 and tendency when 0.05 < *P* ≤ 0.10.

803 ³Fold change: LPS in relation to Control.

804 **Figure 1.** Diagram of the study. Presynchronization protocol between days -29 and 20,
805 ovulation synchronization between days -10 and 0 with two PGF_{2α} injections on day -3 and two
806 inseminations, the first one immediately after the last GnRH injection (day -1) and the second
807 ±12h after the first AI. The ovaries of the cows were scanned by ultrasound to evaluate the
808 response to the hormonal treatment. On days 5 and 10 relative to the last AI, intramammary
809 infusions were performed while on day 15 uterine flushing and endometrial biopsies were
810 performed. Blood and milk samples were taken at different times during the trial.

811 **Figure 2.** Daily average milk yield (kg of milk/cow/day) according to treatment and day relative
812 to each intramammary infusion. Treatments: control = cows were infused twice with saline on
813 days 5 and 10 relative to AI, LPS = cows were infused twice with 25 µg of LPS on days 5 and
814 10 relative to AI. Treatment - $P = 0.09$, day relative to each infusion - $P = 0.05$, and the
815 interaction between treatment and day relative to each infusion - $P = 0.28$. Results are reported
816 as LSM ± SEM.

817 **Figure 3A and 3B.** Somatic cell count (SCC) (*1000 cells/mL of milk) according to treatment
818 and day relative to each intramammary infusion. First infusion (A) and second infusion (B).
819 Treatments: control = cows were infused twice with saline on days 5 and 10 relative to AI, LPS
820 = cows were infused twice with 25 µg of LPS on days 5 and 10 relative to AI. Treatment - $P <$
821 0.01, day relative to each infusion - $P > 0.10$, hour relative to each infusion - $P < 0.01$. The
822 interactions between treatment and day relative to each infusion - $P > 0.10$, treatment and hour
823 relative to each infusion - $P < 0.01$, and treatment, day and hour - $P > 0.10$. Results are reported
824 as LSM ± SEM.

825 **Figure 4.** Haptoglobin serum concentration (OD @450nm) according to treatment and day
826 relative to each intramammary infusion. Treatments: control = cows were infused twice with
827 saline on days 5 and 10 relative to AI, LPS = cows were infused twice with 25 µg of LPS on
828 days 5 and 10 relative to AI. Treatment - $P = 0.09$, day relative to each infusion - $P < 0.01$, and

829 the interaction between treatment and day relative to each infusion - $P < 0.01$. Results are
830 reported as LSM \pm SEM.

831 **Figure 5.** Tumor necrose factor alpha (TNF- α) plasmatic concentration (ng/mL) according to
832 treatment and day relative to each intramammary infusion. Treatments: control = cows were
833 infused twice with saline on days 5 and 10 relative to AI, LPS = cows were infused twice with
834 25 μ g of LPS on days 5 and 10 relative to AI. Treatment - $P = 0.42$, day relative to each infusion
835 - $P = 0.12$, and the interaction between treatment and day relative to each infusion - $P = 0.28$.
836 Results are reported as LSM \pm SEM.

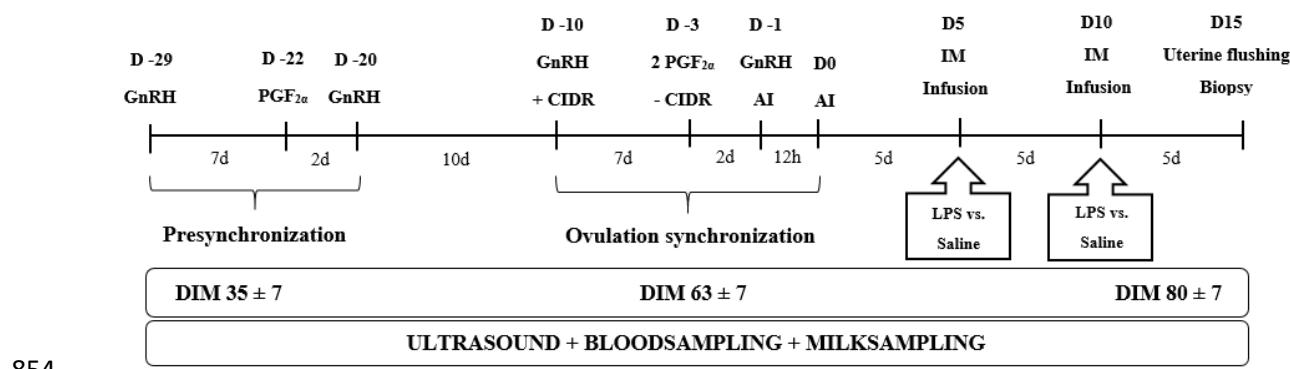
837 **Figure 6A and 6B.** Reticular temperature (RT) ($^{\circ}$ C) according to treatment, day and hour
838 relative to each intramammary infusion. First infusion (A) and second infusion (B). Treatments:
839 control = cows were infused twice with saline on days 5 and 10 relative to AI, LPS = cows were
840 infused twice with 25 μ g of LPS on days 5 and 10 relative to AI. Treatment - $P < 0.01$, day
841 relative to each infusion - $P = 0.46$, hour relative to each infusion - $P < 0.01$. The interactions
842 between treatment and day relative to each infusion - $P = 0.46$, treatment and hour relative to
843 each infusion - $P < 0.01$, and treatment, day and hour - $P = 0.83$. Results are reported as LSM
844 \pm SEM.

845 **Figure 7.** Progesterone (P₄) plasmatic concentration (ng/mL) according to treatment and day
846 relative to each intramammary infusion. Treatments: control = cows were infused twice with
847 saline on days 5 and 10 relative to AI, LPS = cows were infused twice with 25 μ g of LPS on
848 days 5 and 10 relative to AI. Treatment - $P = 0.69$, day relative to each infusion - $P = 0.12$, and
849 the interaction between treatment and day relative to each infusion - $P = 0.28$. Results are
850 reported as LSM \pm SEM.

851

852

853



854

855 **Figure 1.** Campos et al.

856

857

858

859

860

861

862

863

864

865

866

867

868

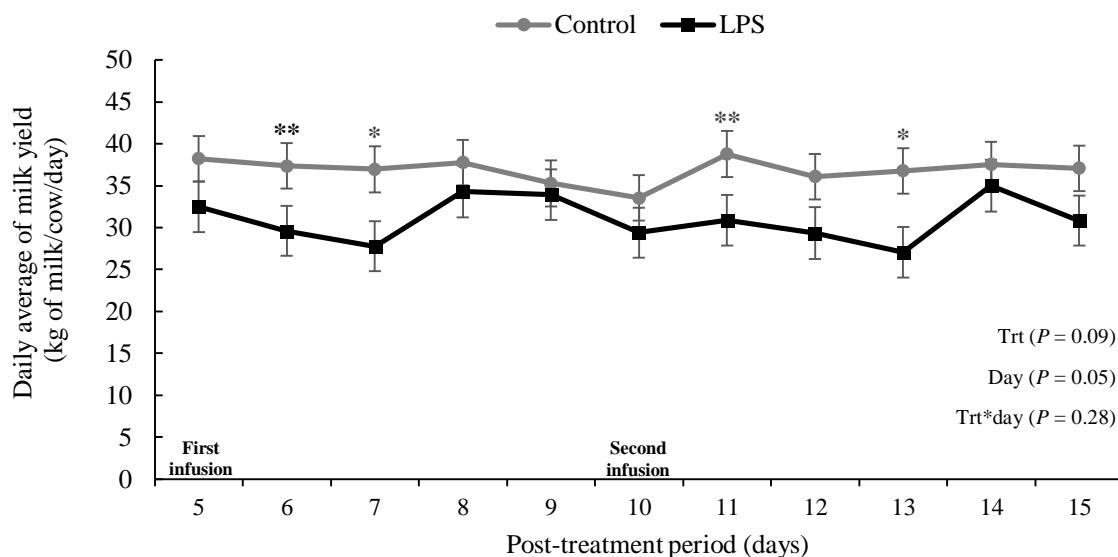
869

870

871

872

873



874

875 **Figure 2.** Campos et al.

876

877

878

879

880

881

882

883

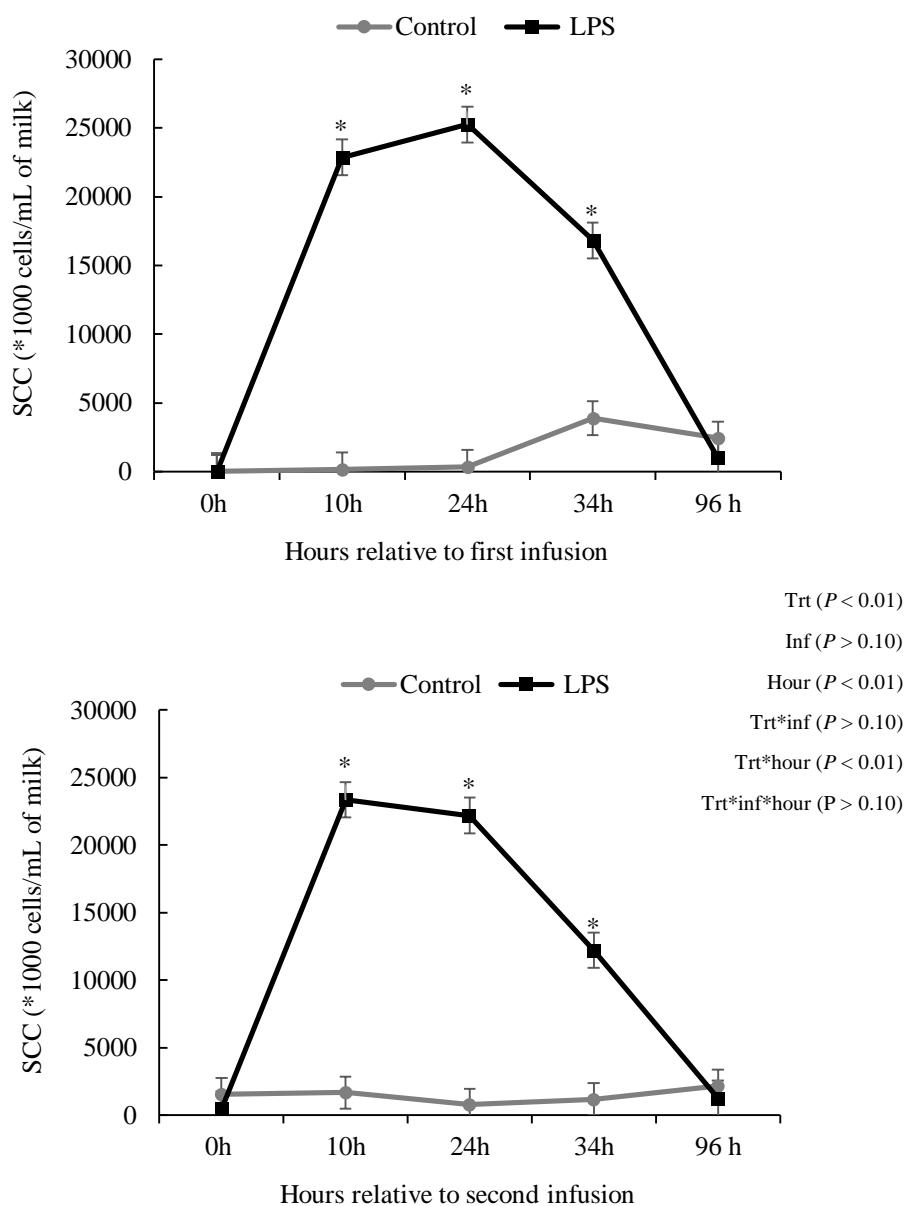
884

885

886

887

888

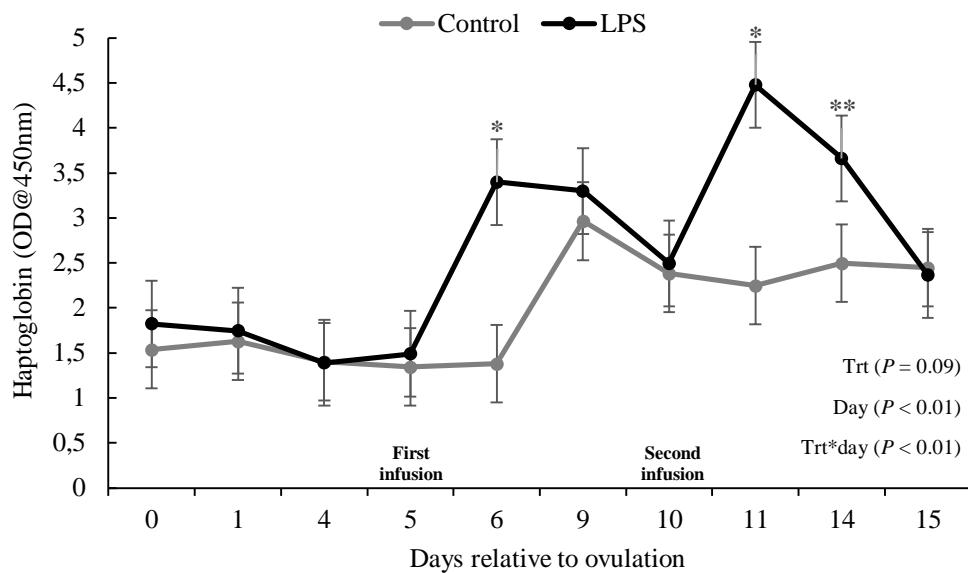
889 **Figure 3A and 3B.** Campos et al.

890

891

892

893



894

895 **Figure 4.** Campos et al.

896

897

898

899

900

901

902

903

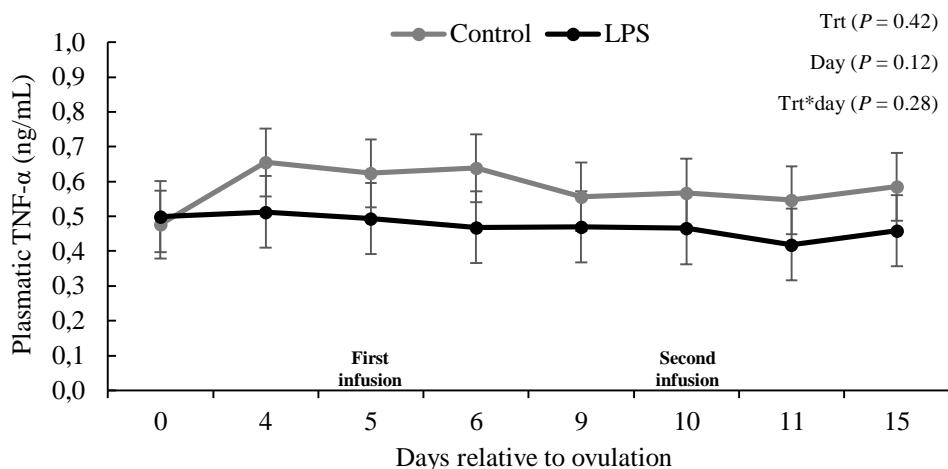
904

905

906

907

908



909

910 **Figure 5.** Campos et al.

911

912

913

914

915

916

917

918

919

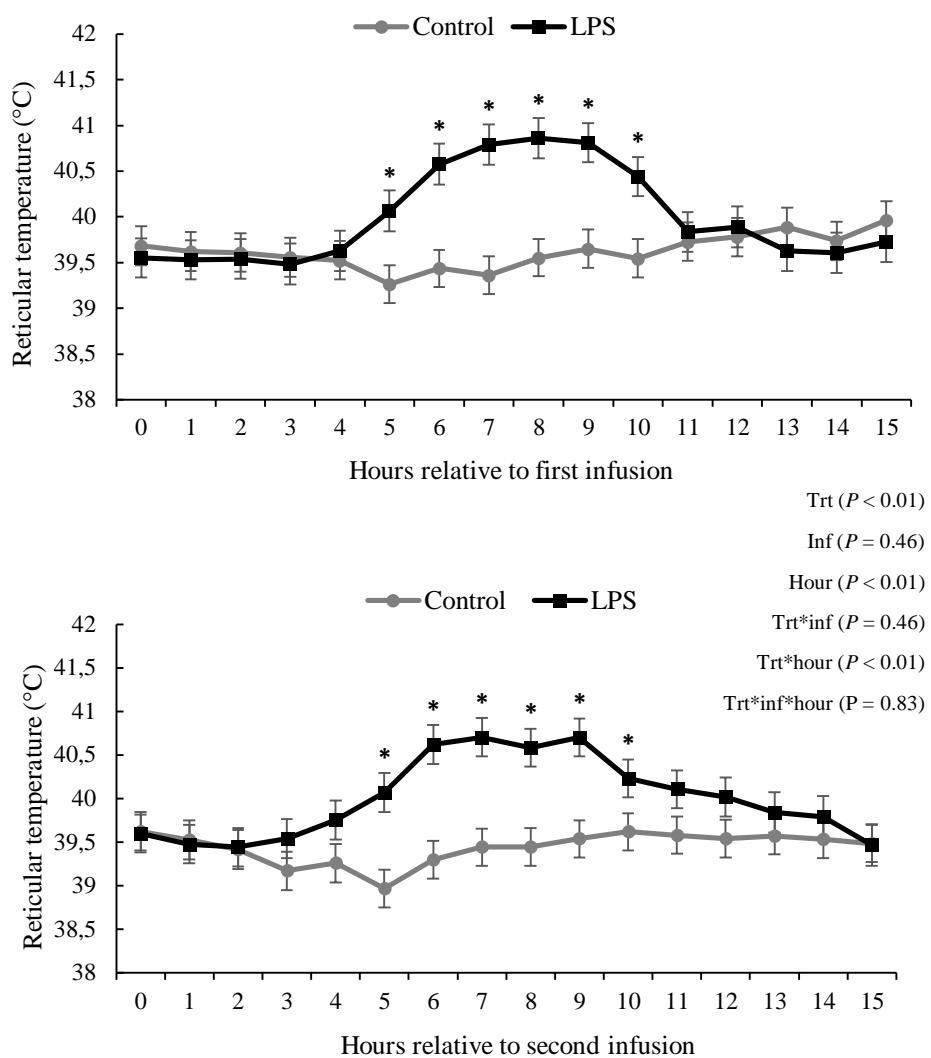
920

921

922

923

924

925 **Figure 6A and 6B.** Campos et al.

926

927

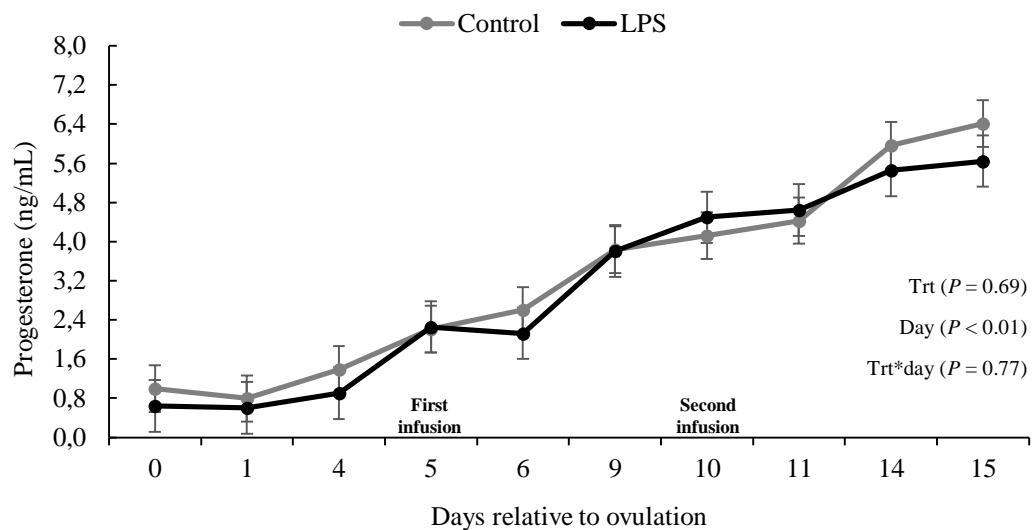
928

929

930

931

932



933

934 **Figure 7.** Campos et al.