

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

RAFAELA CARDOSO RIBEIRO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA UTERINA DE VACAS GIR  
OVARIECTOMIZADAS SOB INFLUÊNCIA DA PROGESTERONA

Uberlândia  
2018

RAFAELA CARDOSO RIBEIRO

A INFLUÊNCIA DA PROGESTERONA *IN VIVO* NA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
IMUNOMEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO ENDOMÉTRIO DE VACAS  
MISTIÇAS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como pré-requisito à obtenção do grau de Médico Veterinário, do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: João Paulo Elsen Saut

Co-orientadora: Layane Queiroz Magalhães

Uberlândia

2018

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA UTERINA DE VACAS GIR  
OVARIECTOMIZADAS SOB INFLUÊNCIA DA PROGESTERONA

Trabalho apresentado à banca examinadora  
como requisito à aprovação na disciplina  
Trabalho de Conclusão de Curso II da  
graduação em Medicina Veterinária da  
Universidade Federal de Uberlândia.

Aprovado em 11 de Julho de 2018

Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut  
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Geison Morel Nogueira  
Universidade Federal de Uberlândia

Dr. Raquel Satomi Komatsu  
Universidade Federal de Uberlândia

## Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, por me apoiar em minhas escolhas e por me dar todo auxílio necessário para tornar os meus sonhos possíveis e compartilhá-los comigo. À minha irmã, por sempre estar ao meu lado, dando todo o incentivo necessário para alcançar minhas metas. Ao meu namorado, que com muita paciência me auxilia no dia-a-dia e acredita no meu potencial, confiando em minhas escolhas. Aos meus avós, que são minha torcida fiel para tudo que idealizo. Aos meus amigos, aqueles que compartilharam esse momento comigo e também aos que mesmo longe torcem para que meu sucesso seja alcançado. Aos membros do PET Medicina Veterinária, pelo conhecimento compartilhado e aprendizado diário.

À equipe do LASGRAN e aos que auxiliaram na execução, sendo cruciais para a realização deste projeto, e em especial Amanda, Layane, Emílio, Marco Antônio, Paula, Sara e Willian. A todos os professores, residentes e técnicos, que fizeram parte da realização deste projeto. Ao meu orientador, Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut, pela confiança, oportunidades e ensinamentos no decorrer destes anos. À minha co-orientadora, Msc. Layane Magalhães Queiroz, pela dedicação, esforço e disposição em me ajudar a qualquer momento. E por fim, agradeço a Deus, por ser meu guia e porto seguro.

## Resumo

Estudos na área da imunidade uterina podem auxiliar no entendimento das infecções uterinas, pois o estabelecimento, a gravidade e a persistência dos diferentes tipos de infecção têm relação com as imunidades inata e adquirida, a condição do ambiente uterino e fatores genéticos. A hipótese deste trabalho foi de que a progesterona *in vivo* reduz a resposta imune inata uterina de vacas da raça Gir. O objetivo deste estudo foi verificar se vacas ovariectomizadas expostas à progesterona tem a resposta imune inata uterina reduzida, após 14 dias de exposição à mesma. Foram utilizadas oito vacas da raça Gir com média de idade de 30 meses, primíparas e peso médio de 408,7 kg, divididas aleatoriamente em dois grupos (n=4) e submetidas à cirurgia de ovariectomia. Após o intervalo de repouso e recuperação pós-cirúrgica, no denominado D-14 realizou-se o exame físico geral e específico do sistema genital feminino, coletas de sangue para hemograma, leucograma e proteinograma, fez-se a coleta de amostras para citologia e expressão gênica e introduziu-se os implantes de progesterona (P4), em ambos os grupos tratamento e controle. No D-7, após o exame físico geral, fez-se a substituição dos implantes de P4, permanecendo por mais sete dias. No momento D0 fez-se a retirada dos implantes, repetiu-se os procedimentos realizados no D-14 e infusão uterina de lipopolissacarídeos (LPS) no Grupo LPS (Gr-LPS) e solução fisiológica nos animais do Grupo Controle (Gr-C). No dia seguinte à infusão (D+1), todas as avaliações foram realizadas novamente. Todos os animais apresentaram-se clinicamente saudáveis. Em relação aos parâmetros vitais, a temperatura corporal foi menor ( $P=0,0004$ ) no momento D+1, mas manteve-se dentro dos parâmetros consultados. No leucograma, o Gr-LPS apresentou valores de segmentados e bastonetes acima dos padrões de referência no momento D+1 e superior ao Gr-C ( $P=0,028$ ), evidenciando neutrofilia com desvio à esquerda, além de redução da quantidade de monócitos ( $P=0,006$ ). Na citologia endometrial, observou-se aumento da quantidade de polimorfonucleares em ambos os grupos no momento D+1 ( $P=0,0006$ ). Na avaliação do sistema genital houve aumento do diâmetro do corno uterino direito no Gr-LPS (D+1) comparado ao Gr-C ( $P=0,026$ ). Concluiu-se que o endométrio de vacas Gir sob efeito da P4, quando desafiado com LPS gera uma resposta imune local e sistêmica. Fato que demonstra que o delineamento proposto pode ser um modelo para posteriores estudos a respeito da imunidade inata uterina de bovinos.

Palavras-chave: Gir, imunidade uterina, cytobrush, LPS, hematologia

### Abstract

Studies on uterine immunity may help in the understanding of uterine infections, since the establishment, severity, and persistence of different types of infection are related to innate and acquired immunity, uterine environment condition, and genetic factors. The hypothesis of the present study was that progesterone *in vivo* reduces the uterine innate immune response from Gir cows. The objective of this study was to verify if ovariectomized cows exposed to progesterone had a reduced uterine innate immune response after 14 days of exposure to it. Eight cows of the Gir breed with mean age of 30 months, primiparous and average weight of 408.7 kg, were randomly divided into two groups, with four animals each and submitted to ovariectomy surgery. After the rest period and post-surgical recovery, in the D-14 was performed the general physical examination and the specific to the female genital tract; blood samples were collected for hemogram, leukogram and proteinogram; samples were collected for cytology and gene expression, and intravaginal progesterone devices were introduced in both treatment and control groups. In D-7, after the general physical examination, the devices of P4 placed at the previous moment (D-14) were replaced in all the animals, remaining for another seven days. At the time LPS (D0), the implants were removed, the procedures performed in D-14 were repeated; LPS was administered to the animals of the LPS Group and NaCl 0.9% solution in the Control Group animals. On the day after the infusion (D+1), all evaluations were performed again. All animals were clinically healthy. Regarding vital parameters, body temperature was lower ( $P = 0.0004$ ) at time D+1, but remained within the parameters consulted. In the leukogram, the LPS group had values of segmented and bands above the reference standards at the D+1, evidencing neutrophilia with left shift, being that the LPS Group presented values higher than the Control Group at D+1 ( $P = 0.028$ ) and had a reduction in the amount of monocytes ( $P = 0.006$ ). In endometrial cytology, there was an increase in the number of polymorphonuclear cells in both groups at time D+1 ( $P = 0.0006$ ). During the assessment of the genital system, the right uterine horn diameter increased in the LPS Group after LPS infusion (D+1), compared to the Control Group ( $P = 0.026$ ). It was concluded that the endometrium of Gir cows, when exposed to LPS, being under the influence of progesterone undergoes changes, generating an immune response, which causes local and systemic response. This fact demonstrates that the methodology and concentration of LPS used may be a model for later studies regarding the uterine innate immunity of cattle.

Keywords: uterine immunity, progesterone, LPS

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1. A importância da produção leiteira no Brasil.....	5
2.2. Problemas reprodutivos em vacas leiteiras .....	5
2.3. O sistema imunológico e a imunidade inata uterina.....	6
2.4. O papel dos hormônios ovarianos: progesterona e estradiol.....	7
3. METODOLOGIA.....	9
3.3.1. Exame físico geral.....	12
3.3.2. Exame físico específico uterino das vacas.....	12
3.3.3. Processamento e análise ultrassonográfica .....	12
3.3.4. Coleta de sangue .....	12
3.3.5. Coleta de amostras de epitélio endometrial .....	12
4. RESULTADOS .....	13
5. DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÃO.....	20

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos na área da imunidade uterina podem auxiliar no entendimento das infecções uterinas, pois o estabelecimento, a gravidade e a persistência dos diferentes tipos de infecção têm relação com as imunidades inata e adquirida, a condição do ambiente uterino e fatores genéticos (WILLIAMS et al., 2007). As infecções uterinas são comuns no pós-parto de vacas leiteiras e levam ao aumento de morbidade e mortalidade nos rebanhos, prejudicam a eficiência reprodutiva e elevam os custos devido ao tratamento destas infecções e às perdas produtivas dos animais (MARQUES JÚNIOR; MARTINS; BORGES, 2011).

Dentre os problemas reprodutivos, destacam-se as infecções uterinas, que estão onipresentes no pós-parto de bovinos leiteiros com incidência de 2-5% de retenção de placenta, 25-40% de metrite, 20% de endometrite clínica, 15-40% de cervicite aos 30 DPP (dias pós-parto) e 10-30% de endometrite citológica, entre 30 e 60 DPP (DEGUILLAUME et al., 2012; LEBLANC, 2012; LEBLANC; OSAWA; DUBUC, 2011; SHELDON et al., 2008, 2009).

Pesquisas neste âmbito, relacionadas com infecções uterinas trazem informações para uma produção leiteira mais eficiente e lucrativa, pois os principais efeitos da infecção uterina estão associados ao atraso na involução uterina, aos altos gastos com tratamento, à diminuição da ingestão de alimentos, à redução na produção de leite e aos quadros secundários de subfertilidade, que podem levar ao descarte involuntário dos animais (BELL; ROBERTS, 2007; LEWIS, 1997; MARTINS et al., 2013).

As pesquisas na área de doenças uterinas, nos últimos anos, trouxeram informações sobre os mecanismos da imunidade inata e imunidade de mucosas (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; BEUTLER, 2004), sobre as principais bactérias (*Escherichia coli* e *Trueperella pyogenes*) e apresentaram estudos com modelos teciduais em bovinos, que permitiram melhor entendimento da resposta imune uterina (DAVIES et al., 2008; HERATH et al., 2006, 2009a, 2009b; SAUT et al., 2014; NOLETO; SAUT; SHELDON, 2017)

A hipótese do presente trabalho foi de que a progesterona *in vivo* reduz a resposta imune inata uterina de vacas. O objetivo deste estudo foi verificar se as vacas ovariectomizadas expostas à progesterona tem a resposta imune inata uterina reduzida, após 14 dias de exposição à mesma.



## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. A importância da produção leiteira no Brasil**

No contexto mundial, 800 milhões de pessoas sofrem com a escassez de alimentos e junto a esse fato, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS., 2009) informou sobre a necessidade de aumentar a produção mundial de alimentos em 70% até 2050, devido ao crescimento da população.

O Brasil segue firme no ramo alimentício e a exportação de leite cresce de forma animadora a cada ano, esse crescimento se relaciona diretamente com a implantação de tecnologias de gerenciamento, além dos diversos avanços da agroindústria (IBGE, 2017). Este país é o 5º maior produtor de leite em nível internacional, ficando apenas atrás da Índia, Estados Unidos, China e Paquistão, sendo que o leite representa 24% do valor bruto da produção gerado pela pecuária no país (FAO, 2016).

No Brasil, a maior parte do rebanho é constituída de animais híbridos (FACÓ, 2002) e, segundo o IBGE (2017), o estado de Minas Gerais produziu 24,2% da produção leiteira do Brasil no último trimestre do ano de 2017, tornando o estado um importante polo da agropecuária nacional.

Neste contexto, é importante ressaltar que a produção leiteira representa uma parcela significativa na composição da dieta alimentar humana e, conseqüentemente, na segurança alimentar mundial, já que o leite é um alimento nutricionalmente completo, sendo rico em nutrientes essenciais ao crescimento e à manutenção de uma vida saudável (VILELA, 2002).

Apesar dos avanços significativos na indústria de laticínios ao longo dos últimos 50 anos, com aumento de quase 70% na produtividade, a fecundidade animal ainda é um fator a ser enfrentado para melhorar a sustentabilidade e minimizar o impacto ambiental da indústria (HUME; WHITELAW; ARCHIBALD, 2011).

### **2.2. Problemas reprodutivos em vacas leiteiras**

De acordo com Scagion (2011), a função do útero é muitas vezes comprometida em bovinos por contaminação bacteriana do lúmen uterino após o parto e com isto as bactérias patogênicas frequentemente persistem, causando doenças uterinas. Por isto, pesquisas relativas à progesterona e a resposta imune trazem grandes informações sobre a ocorrência

de infecção uterina, que é, em parte, dependente do ambiente endócrino, em que a progesterona suprime o sistema imune uterino (LEWIS, 2003).

O período pós-parto é o período de maiores alterações no metabolismo de vacas leiteiras, constituindo um desafio para o organismo animal, pois 75% das doenças ocorrem nos primeiros 30 DPP. Isto é, em parte, atribuído à redução na função imune que ocorre, aproximadamente, de duas semanas antes até três semanas após a parição (LEBLANC, 2012; LEBLANC et al., 2006).

Essas doenças afetam cerca de 40% das vacas leiteiras no pós-parto e podem causar a infertilidade dos animais acometidos (COLEMAN; THAYNE; DAILEY, 1985; LEWIS, 1997). Portanto, a definição de critérios rigorosos para o diagnóstico, tratamento e prevenção destas enfermidades no pós-parto de vacas leiteiras continuam sendo um desafio (LEFEBVRE; STOCK, 2012).

### **2.3. O sistema imunológico e a imunidade inata uterina**

Os vertebrados são constantemente ameaçados pela invasão de microrganismos e desenvolveram sistemas de defesa imunológica para eliminar patógenos infecciosos no corpo. (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006). O sistema imune dos mamíferos é composto por dois ramos: imunidade inata e adquirida (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos e representa uma resposta rápida e estereotipada a um número grande, mas limitado, de estímulos (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; WILSON DE MELO CRUVINEL et al., 2010). É composto por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato (WILSON DE MELO CRUVINEL et al., 2010).

As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killer – NK, sendo que fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata (WILSON DE MELO CRUVINEL et al., 2010). Já a imunidade adquirida está envolvida na eliminação de patógenos na fase tardia da infecção, bem como na geração de memória imunológica (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

Há inúmeras pesquisas preocupadas com infecções e imunidade uterina e destacam-se na literatura mundial as revisões de Galvão et al. (2011), Cronin et al. (2012) e Swangchanuthai et al. (2012). Estes trabalhos trouxeram uma contribuição muito grande à ciência, no entanto, esses pesquisadores apenas trabalharam com vacas *B. taurus*, criadas em clima e manejo completamente diferentes das condições brasileiras e do Estado de Minas Gerais.

O potencial para a regulação da imunidade inata pelo sistema endócrino é uma característica do endométrio que talvez seja distante da maioria dos outros tecidos do corpo (SHELDON; OWENS; TURNER, 2017). Em particular, os esteroides ovarianos, estradiol e progesterona, modulam a susceptibilidade à infecção e a resposta inflamatória aos microorganismos (BEAGLEY; GOCKEL, 2003; WIRA et al., 2005).

De acordo com Herath et al.(2009b), na primeira semana pós-parto há expressão de genes que codificam mediadores pró-inflamatórios como as interleucinas (IL) 1A, IL1 $\beta$ , IL6 e o óxido nítrico sintase 2 (NOS2). Além disso, verificaram que animais inférteis têm maior expressão de IL1A e IL1 $\beta$  e, que vacas podem manter a fertilidade limitando a resposta inflamatória contra infecções bacterianas uterinas (HERATH et al., 2009b). Chapwanya et al. (2009) correlacionaram a intensidade da inflamação endometrial pós-parto com aumento da expressão de receptores tipo *toll* (TLR) 4, TRL6, TLR10, fator nuclear KappaB1 (NF- $\kappa$ B1), IL1, IL6, IL8, IL12 e interferon.

#### **2.4. O papel dos hormônios ovarianos: progesterona e estradiol**

O endométrio sofre mudanças sob o controle de hormônios ovarianos, como a progesterona e estradiol, variações nas concentrações destes esteroides, no período entre 18 e 24 dias, regulam funções e alterações estruturais no endométrio para criar um ambiente para fertilização, implantação e sobrevivência fetal (LEWIS, 2003; WIRA et al., 2005). Estudos realizados *in vivo* sugerem que estes esteroides têm impacto no surgimento de doenças, demonstrando que eles podem regular a imunidade inata ou adquirida contra infecções (ROWSON; LAMMING; FRY, 1953). Os resultados sugerem que o estradiol apresente um efeito protetor, enquanto a progesterona tenha um efeito imunossupressor (ROWSON, 1951; LEWIS, 2003; LEWIS, 2004).

No entanto, em uma pesquisa realizada por Saut et al. (2014) demonstrando estes efeitos dos hormônios ovarianos, em cultivos celulares do epitélio e estroma endometrial por meio de explantes endometriais, verificou-se que os resultados não foram parecidos com os encontrados anteriormente na literatura (LEWIS, 2004, 2003; ROWSON, 1951),ao se

avaliar a resposta de alguns mediadores inflamatórios e respectivas expressões gênicas, quando submetidos ao tratamento com lipopolissacarídeos e *Escherichia coli* viva.

### **3. METODOLOGIA**

#### ***3.1. Animais e local***

Foram utilizadas oito vacas da raça Gir com média de idade de 30 meses, híginas (vacinadas e vermifugadas), primíparas e peso médio de 408,75 kg ( $\pm$  33 kg). Estas vacas foram mantidas durante todo o experimento no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, com quatro animais cada, permaneceram em piquetes de chão batido, com sombra disponível, água a vontade e receberam silagem de milho duas vezes ao dia. Fez-se a adaptação dos animais ao ambiente, por meio de manejo diário com a passagem dos mesmos pelo tronco de contenção para bovinos.

#### ***3.2. Procedimento cirúrgico – ovariectomia***

Após a aquisição e prévia adaptação dos animais durante 15 dias, foi feita a avaliação do perfil hematológico deles e então realizada a cirurgia de ovariectomia. Após jejum de vinte e quatro horas, as vacas foram contidos em tronco de contenção para bovinos e submetidas ao protocolo anestésico, com medicação pré-anestésica para sedação com de cloridrato de xilazina 2%, 0,15 mg/Kg administrado por via intravenosa (IV) e para a indução anestésica administrou-se cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec)10%, 2 mg/Kg IV, em associação com diazepam 0,03 mg/Kg IV, já no centro cirúrgico foi feita a anestesia inalatória por meio de aparelho universal de manutenção anestésica utilizando-se o isoflurano 2%. Os animais foram colocados em decúbito lateral direito e uma ampla área cirúrgica foi tricotomizada na região da fossa paralombar esquerda, onde se procedeu a antisepsia com polivinil iodo pirrolidona (PVPI) degermante e utilizou-se 40 mL de lidocaína a 2% para bloqueio local em “L” invertido, na região média da fossa paralombar esquerda, infiltrando-se o tecido subcutâneo e a musculatura.

Feito isto, utilizou-se PVPI tóxico 10% e álcool 70% para antisepsia realizada pelo cirurgião, sendo que a técnica cirúrgica de ovariectomia foi feita de acordo com Peiró et al. (2009), em que os animais foram submetidos à laparotomia pelo flanco esquerdo e realizada a ovariectomia bilateral.

Todos os animais manipulados cirurgicamente foram submetidos ao

protocolo pós-operatório composto pela antibioticoterapia com Cefotiofur (Lactofur®, OurofinoSaúde Animal), na dose de 2,2 mg/Kg SID por via intramuscular (IM), durante 10 dias; Flunixin Meglumine (Flunixin®, UCB), na dose de 2,2mg/kg IM, SID, durante 3 dias. Os animais receberam acompanhamento diário durante dez dias após a cirurgia, nos quais realizou-se a limpeza diária da ferida cirúrgica com PVPI tópico 10% até o décimo dia pós-operatório, quando foram retirados os pontos.

### **3.3. Delineamento experimental**

Após cem dias da realização da cirurgia de ovariectomia as oito vacas foram utilizadas no experimento e expostas à progesterona (Sincrogest®, Ourofino Saúde Animal) por quatorze dias (D-14 a D0). Os procedimentos realizados com os animais foram executados com os mesmos contidos em tronco de contenção próprio para bovinos, no período da manhã. Em todos os momentos do experimento (D-14, D-7, D0 e D+1) imediatamente antes das coletas de sangue, amostras para citologia endometrial e expressão gênica, procedeu-se a avaliação da temperatura corporal e das frequências cardíaca e respiratória, de acordo com o recomendado por Feitosa (2014).

Após o exame físico geral (D-14), procedeu-se o exame específico do sistema genital feminino; a coleta de sangue por venopunção da veia caudal mediana (com sistema a vácuo) para realização de hemograma, leucograma e proteinograma; e a higienização da vulva com água e papel toalha para realizar a coleta de amostras de epitélio endometrial para a avaliação citológica e expressão gênica de mediadores inflamatórios pela técnica de escova endometrial (*cytobrush*). Neste momento, as vacas foram tratadas com dois implantes intra-vaginais de 1,9 g de progesterona (Sincrogest®, Ourofino Saúde Animal) por 14 dias, sendo que no sétimo dia (D-7) estes foram retirados e dois novos foram aplicados por via intra-vaginal.

Depois dos 14 dias de exposição à progesterona (D0) foram retirados os implantes e todos os procedimentos (exame físico geral e específico do sistema genital feminino e coleta das amostras) foram repetidos. Feito isto, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, cada um com quatro animais, sendo um grupo controle, que recebeu uma infusão intra-uterina de 20 mL de solução salina NaCl 0,9% (**Grupo Controle**) e um grupo de tratamento que recebeu 20 mL de infusão intra-uterina de solução estéril de Lipopolissacarídeos – LPS 12,5 ug/Kg *E.coli serotype*

055:B5 LPS (Sigma-Aldrich) (**Grupo LPS**) como demonstrado na Figura 1. No dia seguinte a este (D+1), ou seja, 24 horas após o tratamento, todas as avaliações foram realizadas novamente.

Caso os animais apresentassem alguma sintomatologia em consequência dos procedimentos realizados, seria cessada a realização destes e efetuaria o tratamento para reestabelecimento de suas condições prévias. No caso dos animais do grupo tratamento que receberam infusão intra-uterina de LPS, seria feita terapia anti-inflamatória com a administração de Flunixin Meglumine (Flunixin<sup>®</sup>, UCB), 0,5mg/kg.

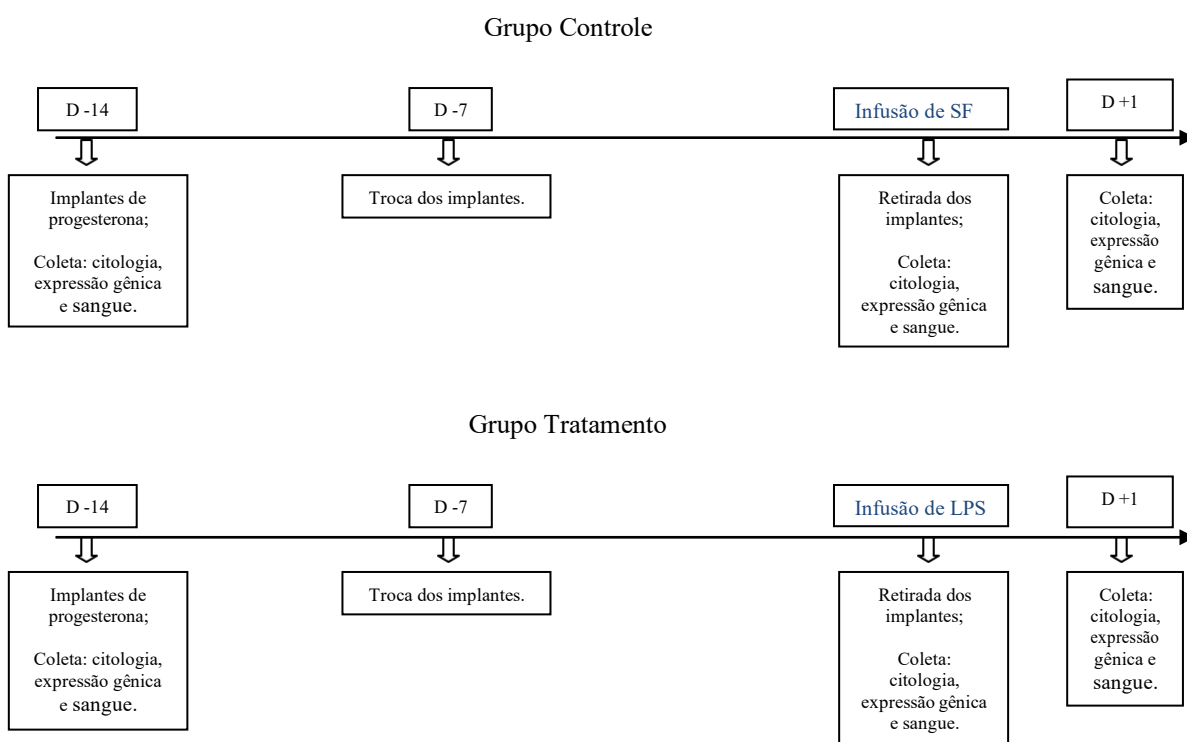


Figura 1. Representação gráfica dos momentos do experimento. No D-14, realizou-se o exame físico geral, específico do sistema genital feminino, coletas de sangue para hemograma, leucograma e proteinograma, fez-se a coleta de amostras para citologia e expressão gênica e introduziu-se os implantes de progesterona, em ambos os grupos tratamento e controle. No D-7, após o exame físico geral, fez-se a substituição dos implantes de P4 colocados no momento anterior (D-14) em todos os animais, permanecendo por mais sete dias. No LPS (D0), fez-se a retirada dos implantes, o exame físico geral, exame específico do sistema genital feminino das vacas, coletas de sangue para hemograma, leucograma e proteinograma, e coletou-se amostras para a avaliação citológica endometrial e da expressão gênica; fez-se a administração de LPS

nos animais do **Grupo LPS** e Solução Fisiológica nos animais do **Grupo Controle**. Após um dia da infusão (D+1), todas as avaliações foram realizadas novamente.

### **3.3.1. Exame físico geral**

O exame físico geral dos animais foi realizado de acordo com o recomendado por Feitosa (2014), no qual se avaliou: mucosas aparentes e os parâmetros vitais: temperatura retal (T°C); frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR).

### **3.3.2. Exame físico específico uterino das vacas**

O exame físico específico do útero foi composto pela análise do mesmo por meio da palpação retal, inferindo localização e consistência do mesmo.

### **3.3.3. Processamento e análise ultrassonográfica**

Realizou-se a ultrassonografia transretal (DP2200®, Mindray), em que foram coletadas informações de diâmetro dos cornos uterinos direito e esquerdo, obtidas pela média de duas mensurações perpendiculares ao diâmetro de cada corno, conforme Gómez et al.(2017), bem como presença ou não do fluido intrauterino (FIU).

### **3.3.4. Coleta de sangue**

A coleta de sangue foi realizada por venopunção da veia caudal mediana, com sistema a vácuo. Duas amostras de sangue foram coletadas e acondicionadas, uma em tubo com EDTA K<sub>3</sub> (BD Vacutainer®, Brasil) outra com gel separador e ativador de coágulo (BD Vacutainer®, Brasil), encaminhadas resfriadas ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) para realização do hemograma, leucograma e proteinograma.

### **3.3.5. Coleta de amostras de epitélio endometrial**

Para a realização da coleta de amostras de epitélio endometrial, duas escovas cervicais estéreis (Labor Import®) foram adaptadas e inseridas em um aplicador universal de sêmen para a passagem através da cérvix, sendo que a vulva foi higienizada previamente com água e papel toalha.

As amostras de citologia endometrial foram colhidas pela técnica de escova



endometrial (*cytobrush*) conforme Kaufmann et al.(2009), sendo realizado o esfregaço em lâmina de microscopia, posteriormente coradas com Panótico Rápido (Renylab®) e analisadas por meio da contagem de neutrófilos, em que valores superiores a 10% foram indicativos de endometrite citológica (GILBERT et al., 2005; KASIMANICKAM et al., 2005). As amostras colhidas para expressão gênica foram imediatamente inseridas em microtubos contendo 500 microlitros de RNA later e encaminhadas refrigeradas ao laboratório e congeladas para posterior processamento.

### **3.4. Processamento e análise das amostras de sangue**

No laboratório, realizou-se o hemograma em analisador automático de hematologia veterinário pocH-100iV Diff® (Sysmex do Brasil, São José do Rio Preto/SP) para determinar as concentrações de hemoglobina, volume globular, hematimetria, volume corpuscular médio (VCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetometria e leucometria. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por microscopia óptica, em extensões sanguíneas coradas pelo May Grünwald Giemsa (Ferreira Neto *et al.*, 1982).

Para análise bioquímica do proteinograma as amostras foram centrifugadas em centrífuga sorológica INBRAS® e o soro armazenado a -20°C em microtubos do tipo eppendorf para posterior análise. Utilizou-se o analisador automático multicanal ChemWell® (Awareness Technology Inc) a 37°C previamente calibrado (Calibra H) e aferido com soro controle (Qualitrol 1). Proteínas totais e albumina foram analisados por meio do kit diagnóstico comercial Labtest®. Posteriormente, por cálculos matemáticos simples, foram calculadas as concentrações séricas das globulinas.

### **3.5. Análise Estatística**

Para análise estatística e confecção dos gráficos foi utilizado o programa estatístico GraphPadPrism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram tabulados em planilhas do programa Microsoft Excel e a estatística descritiva apresentada em média, mediana, desvio-padrão, erro padrão da média, os quais foram submetidos à análise de variância (Two-way ANOVA), enquanto que a presença ou não de FIU foi analisada pelo Teste Exato de Fischer. Todos os testes com nível de significância de 5% ( $P=0<0,05$ ).

## **4. RESULTADOS**

Todos os animais apresentaram-se clinicamente saudáveis, estando alertas, em estação e com as mucosas aparentes (ocular e vaginal) róseas em todos os momentos. Durante o pós-operatório, não foram observadas complicações, apresentando recuperação conforme o esperado, sendo que tiveram um intervalo de aproximadamente 100 dias de repouso e recuperação até o momento de exposição à progesterona e realização das coletas (D-14).

Os animais apresentaram média de peso inicial de  $408 \pm 33$  Kg e final de  $427 \pm 34$  Kg, mas deve-se levar em conta que houve uma mudança na dieta alimentar destes, que antes de serem alocados nas dependências do Hospital Veterinário da UFU era a pasto e no momento que foram introduzidos no experimento passou a ser composta por silagem de milho, sal mineral e Forrage® (Topnutri).

Em todos os momentos em que eram contidos para os procedimentos experimentais, os animais apresentaram-se agitados e reativos, dificultando o manejo.

#### Exame físico geral

Em relação aos parâmetros vitais, a temperatura corporal foi menor ( $P=0,0004$ ) no momento D+1 (Figura 2C), mas manteve-se dentro dos parâmetros sugeridos pela literatura (FEITOSA, 2014). As frequências cardíaca e respiratória oscilaram em valores acima dos limites superiores de referência (FEITOSA, 2014), sendo que a frequência respiratória esteve a maior parte dos momentos acima do estipulado em literatura (FEITOSA, 2014), com valores próximos aos determinados, apenas no D+1 (Figura 2A e 2B).

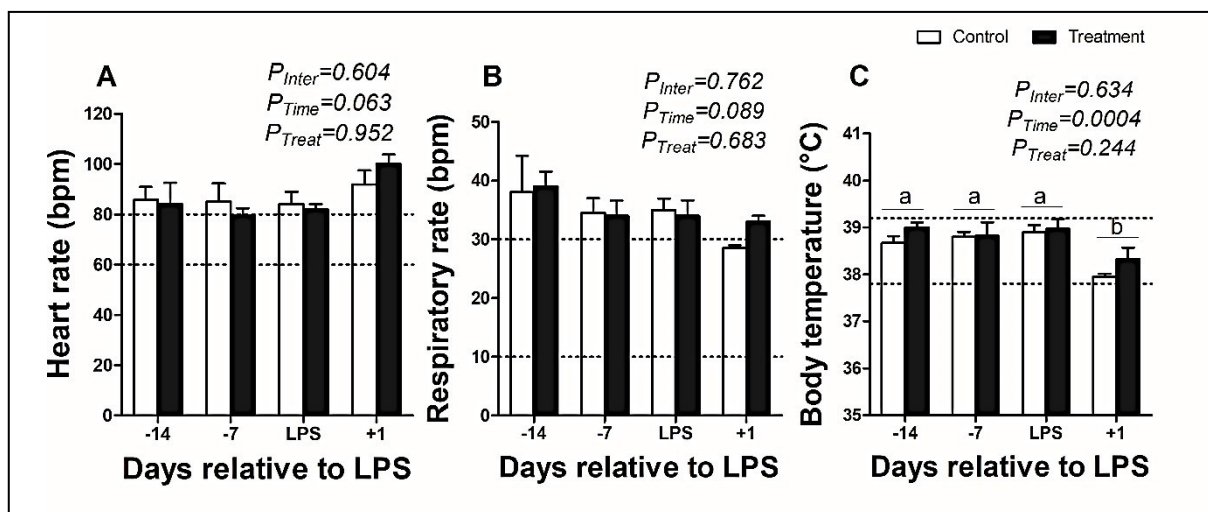


Figura 2. Médias, desvios padrão e intervalo de referência dos parâmetros vitais avaliados por meio de exame físico em vacas Gir leiteiras submetidas ao experimento, Uberlândia, MG, 2017.

Nota: Valores de referência de acordo com Feitosa(2014), sendo os limites superiores e inferiores de Frequência Cardíaca: 60 a 80 bpm; Frequência Respiratória: 10 a 30 mpm; Temperatura Corporal: 37,8 °C a 39,2 °C.

#### *Avaliação ultrassonográfica do útero*

Observou-se, durante a avaliação do sistema genital aumento do diâmetro dos cornos uterinos direitos no **Grupo LPS** após a infusão de LPS (D+1), em relação ao **Grupo Controle** ( $P=0,026$ ) (Figura 7B). O tratamento não interferiu na presença e alteração do fluido intra-uteino (FIU) ( $P=0,50$ ).



Imagem obtida durante a realização de ultrassonografia transretal (DP2200®, Mindray), sendo realizada a mensuração do diâmetro dos cornos uterinos direito e esquerdo por meio das medidas vertical e horizontal dos mesmos.

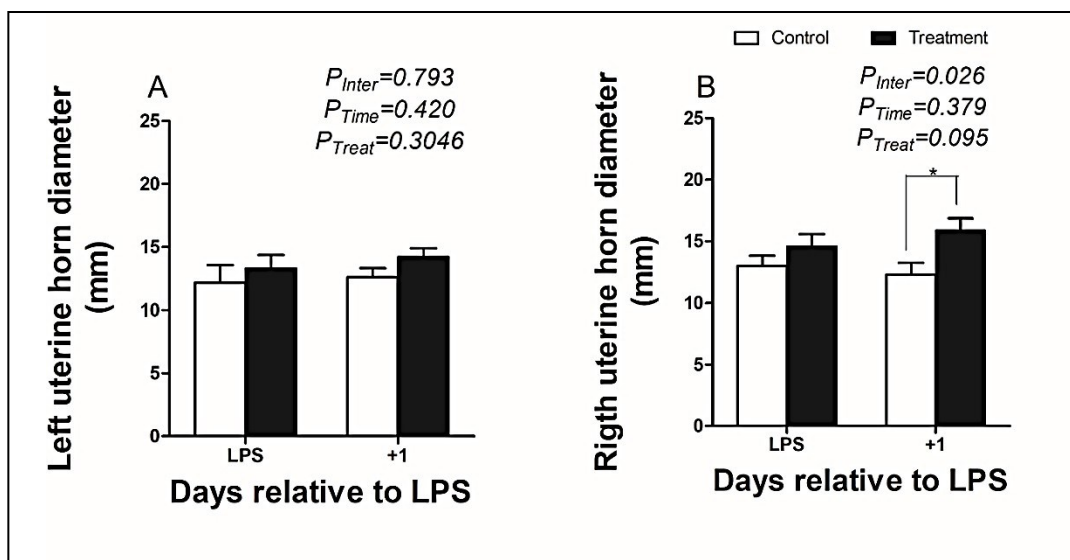


Figura 7. Médias, desvios padrão e intervalos de referência dos diâmetros dos cornos uterinos de vacas Gir leiteiras submetidas ao experimento, Uberlândia, MG, 2017.

### Eritrograma

Quanto aos exames complementares, o eritrograma, manteve-se com a maioria dos parâmetros dentro dos limites estabelecidos por Smith (2014) (Figura 3).

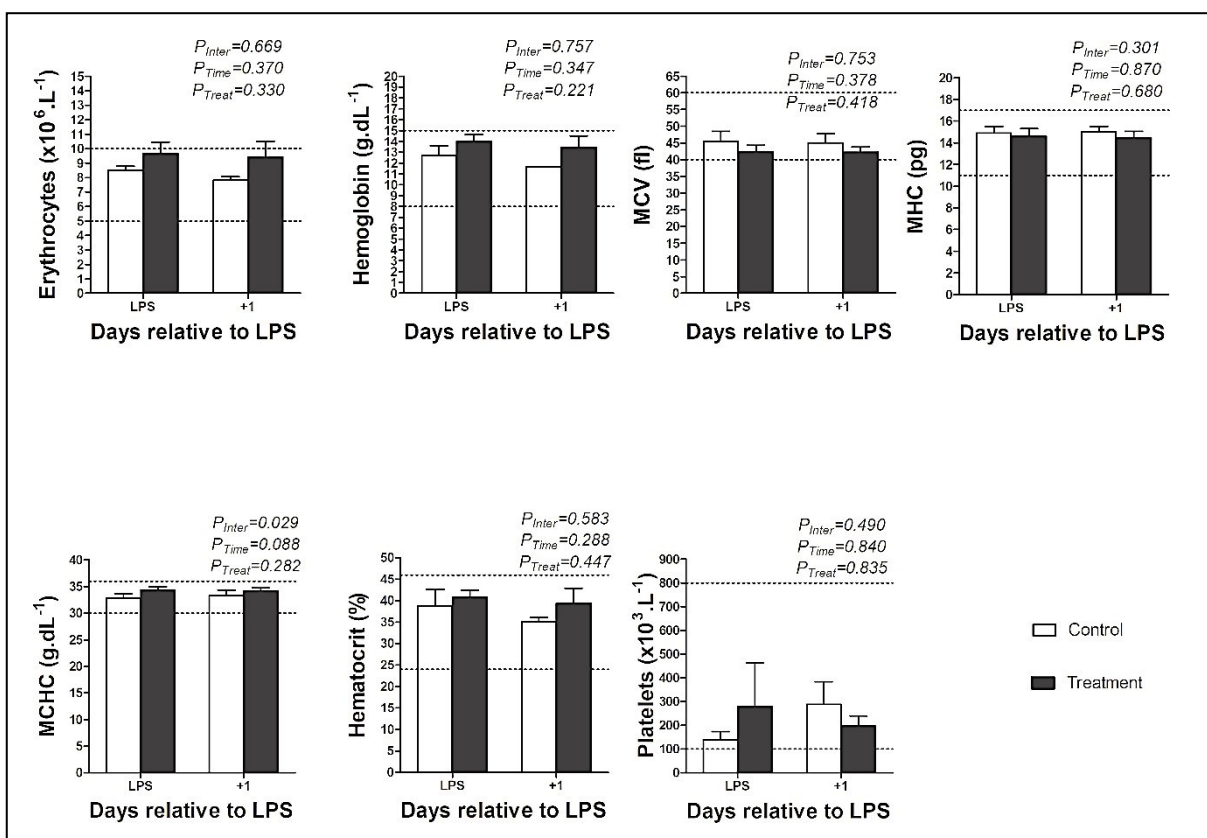


Figura 3. Médias, desvios padrão e intervalo de referência dos elementos do eritrograma e plaquetograma de vacas Gir leiteiras submetidas ao experimento, Uberlândia, MG, 2017.

Nota: Valores de referência de acordo com Smith, 2014.

VCM, volume celular médio; CHCM, concentração de hemoglobina celular média; HCM, hemoglobina celular média.

### Leucograma

O leucograma (Figura 4) apresentou valores de leucócitos totais dentro dos limites (Figura 4A), no entanto, o **Grupo LPS** apresentou valores de segmentados e bastonetes acima dos padrões de referência no momento D+1 (Figura 4C e 4D), evidenciando neutrofilia com desvio à esquerda nestes animais, sendo que o **Grupo LPS** apresentou valores superiores ao **Grupo Controle** no D+1 ( $P=0,028$ ) e teve redução da quantidade de monócitos (Figura 4F) ( $P=0,006$ ). Já o **Grupo Controle** apresentou-se dentro destes padrões de referência, tendo apenas seu valor de monócitos inferior ( $P=0,006$ ) no D+1 (Figura 4F). O mesmo ocorrendo com os eosinófilos ( $P=0,001$ ) (Figura 4H).

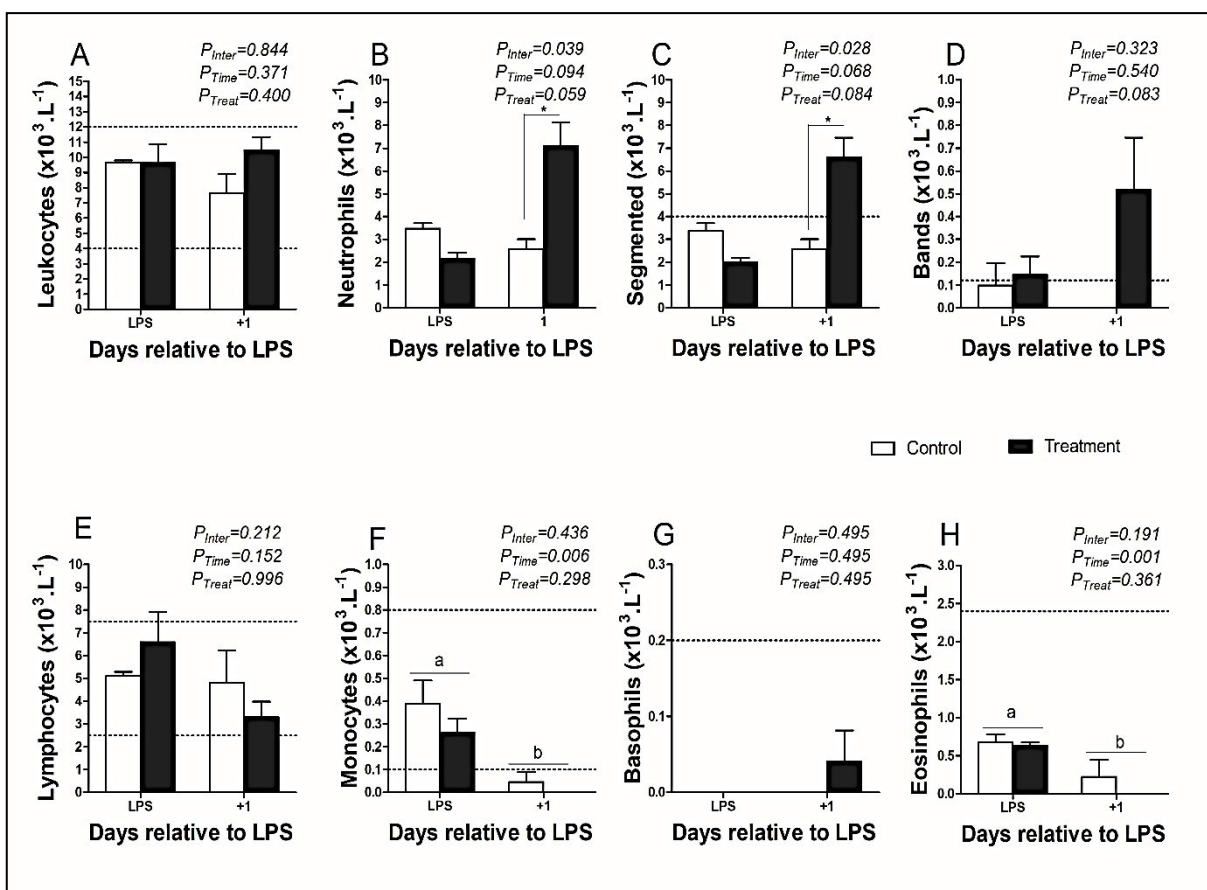


Figura 4. Médias, desvios padrão e intervalo de referência dos elementos do leucograma de vacas Gir leiteiras submetidas ao experimento, Uberlândia, MG, 2017.

Nota: Valores de referência de acordo com (SMITH, 2014).

### Proteínas totais, albumina e globulinas

Foi identificada hipoproteinemia, com hipoalbuminemia e globulinas oscilando

no decorrer de todo o experimento (Figura 5).

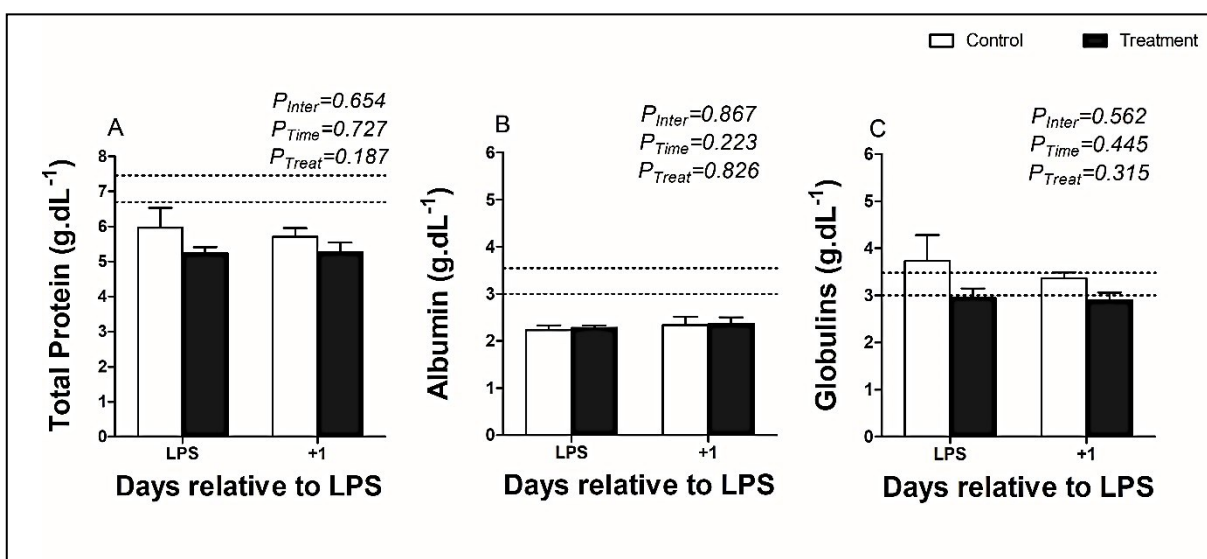


Figura 5. Médias, desvios padrão e intervalos de referência das Proteínas Totais, Albumina e Globulinas de vacas Gir leiteiras submetidas ao experimento, Uberlândia, MG, 2017.

Nota: Valores de referência de acordo com Smith, 2014. Letras distintas indicam diferença estatística entre os dias do protocolo de indução da lactação por meio do Teste de Análise de Variância (Two-Way ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. Todos os testes com significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

#### Citologia Endometrial

O epitélio endometrial foi avaliado por meio da citologia endometrial, e observou-se um aumento da quantidade de polimorfonucleares em ambos os grupos no momento D+1 ( $P = 0,0006$ ) (Figura 6).

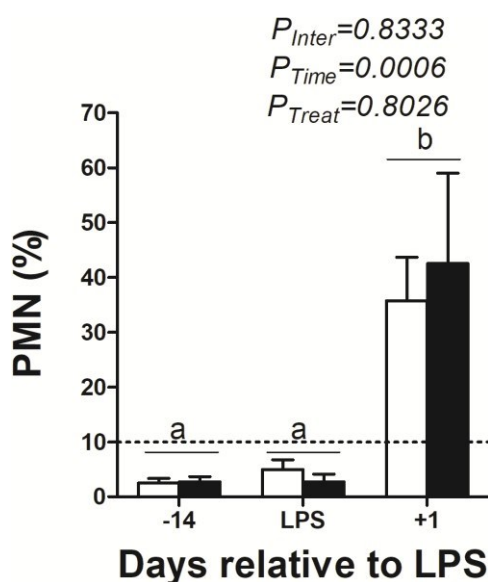


Figura 6. Médias, desvios padrão e intervalos de referência dos elementos polimorfonucleares (PMN) de vacas Gir leiteiras submetidas ao experimento, Uberlândia, MG, 2017.

Nota: Valores de referência de acordo com Gilbert et al. (2005) e Kasimanickam et al. (2005).

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo, não houveram alterações clínicas dos animais submetidos ao tratamento com implante de progesterona e infusão intra-uterina com LPS, estando os parâmetros vitais próximos dos limites estabelecidos por Feitosa(2014), levando em conta que zebuínos podem apresentar maiores frequências devido ao manejo e estresse, já que são animais mais ativos (SANCHEZ et al., 2016).

O perfil hematológico permaneceu com os parâmetros dentro dos limites estabelecidos (SMITH, 2014). O leucograma do grupo tratamento revelou a existência de um processo inflamatório agudo vigente, com efeitos sistêmicos observados pela presença da neutrofilia com desvio à esquerda.

O resultado da avaliação da citologia endometrial demonstra que houve uma inflamação local, pois foi considerada contagem de neutrófilos superior a 10% como indicativo de endometrite citológica (GILBERT et al., 2005; KASIMANICKAM et al., 2005). No entanto, ambos os grupos, controle e LPS, manifestaram esta alteração e tiveram valores próximos um do outro, resultante da manipulação da região de coleta durante o procedimento realizado, que levou a uma resposta inflamatória local.

A avaliação do trato reprodutivo sugere que houve o aumento do diâmetro dos cornos uterinos do grupo tratamento, o que indica a ativação do sistema imune inato, em que ocorre: reconhecimento molecular do agente agressor (LPS); ativação de vias bioquímicas intracelulares que resultam em modificações vasculares e teciduais; produção de uma grande quantidade de mediadores com efeitos locais e sistêmicos no âmbito da ativação e proliferação celulares, síntese de novos produtos envolvidos na quimioatração e migração de células especializadas na destruição e remoção do agente (CRUVINEL et al., 2010).

A concentração de LPS utilizada foi 12,5 µg/kg, levando-se em conta uma média de peso corporal dos animais de ± 400 kg, tem-se a dose de 5mg de LPS a ser aplicada por animal, valor superior ao utilizado por Moraes et al. (2017) em seu experimento, em que foram utilizados 300 µg/Kg de *E. coli* LPS. Acredita-se que a concentração utilizada neste experimento foi um fator determinante para os resultados encontrados, já que a dose utilizada foi capaz de desencadear a resposta imune local e sistêmica.

É importante ressaltar que este experimento faz parte de um trabalho ainda

maior, o qual ainda está na fase laboratorial de processamento das amostras coletadas, e que irá abranger os achados a respeito da influência da progesterona na expressão gênica de imunomediadores inflamatórios no endométrio destes animais e também a reação do sistema imune no endométrio uterino, quando exposto ao estradiol.

## **6. CONCLUSÃO**

Concluiu-se que o endométrio de vacas Gir, quando exposto ao LPS, estando sobre a influência da progesterona sofre alterações gerando uma resposta imune, a qual provoca resposta local e sistêmica. Fato que demonstra que a metodologia e concentração de LPS utilizadas podem ser um modelo para posteriores estudos a respeito da imunidade inata uterina de bovinos



## REFERÊNCIAS

- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 24 fev. 2006.
- BEAGLEY, K. W.; GOCKEL, C. M. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 13–22, ago. 2003.
- BELL, M. J.; ROBERTS, D. J. The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. **Theriogenology**, v. 68, n. 7, p. 1074–1079, 15 out. 2007.
- BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 257–263, 8 jul. 2004.
- CHAPWANYA, A. et al. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1396–407, 1 jun. 2009.
- COLEMAN, D. A.; THAYNE, W. V.; DAILEY, R. A. Factors Affecting Reproductive Performance of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 7, p. 1793–1803, 1 jul. 1985.
- CRONIN, J. G. et al. Toll-Like Receptor 4 and MYD88-Dependent Signaling Mechanisms of the Innate Immune System Are Essential for the Response to Lipopolysaccharide by Epithelial and Stromal Cells of the Bovine Endometrium1. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 2, 1 fev. 2012.
- DAVIES, D. et al. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, n. 1, p. 53, 18 nov. 2008.
- DEGUILLAUME, L. et al. Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 4, p. 1776–83, 1 abr. 2012.
- FACÓ, O. Analysis of productive performance of different Holstein x Gir genetic groups in Brazil Molecular markers of fertility in mammals. View project Sperm genetic and epigenetic mechanisms regulating male fertility View project. 2002.
- FAO. **Dairy Production and Products – Milk Production**, 2016. Disponível em: <[http://www.fao.org/ag/portal/aga-index/en/?no\\_cache=1](http://www.fao.org/ag/portal/aga-index/en/?no_cache=1)>
- FEITOSA, F. L. F. Exame físico geral ou de rotina. In: FEITOSA, F. L. F. (Ed.). . **Semiologia Veterinária - A arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2014. p. 51–67.
- FERREIRA NETO, J. M.; VIANA, E. S.; MAGALHÃES, L. M. **Patologia clínica veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo, 1982.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of food insecurity in the world 2009 : economic crises - impacts and lessons learned.** [s.l.] FAO, 2009.

GALVÃO, K. N. et al. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 290–9, 15 jul. 2011.

GILBERT, R. O. et al. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p. 1879–1888, 1 dez. 2005.

GÓMEZ-L, V. et al. Metodologia para avaliação ultrassonográfica da biometria uterina na fêmea bovina. **Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA**, v. 9, n. 2, p. 122, 1 jul. 2017.

HERATH, S. et al. Expression and Function of Toll-Like Receptor 4 in the Endometrial Cells of the Uterus. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 562–570, 1 jan. 2006.

HERATH, S. et al. Bacterial Lipopolysaccharide Induces an Endocrine Switch from Prostaglandin F<sub>2α</sub> to Prostaglandin E<sub>2</sub> in Bovine Endometrium. **Endocrinology**, v. 150, n. 4, p. 1912–1920, 1 abr. 2009a.

HERATH, S. et al. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 55, 29 maio 2009b.

HUME, D. A.; WHITELOW, C. B. A.; ARCHIBALD, A. L. The future of animal production: improving productivity and sustainability. **The Journal of Agricultural Science**, v. 149, n. S1, p. 9–16, 14 fev. 2011.

IBGE. INDICADORES DA PECUÁRIA - 2017.IV E ACUMULADO DE 2017\_final. 2017.

KASIMANICKAM, R. et al. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. **The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne**, v. 46, n. 3, p. 255–9, mar. 2005.

KAUFMANN, T. B. et al. Prevalence of bovine subclinical endometritis 4h after insemination and its effects on first service conception rate. **Theriogenology**, v. 71, n. 2, p. 385–391, jan. 2009.

LEBLANC, S. Interactions of Metabolism, Inflammation, and Reproductive Tract Health in the Postpartum Period in Dairy Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 18–30, ago. 2012.

- LEBLANC, S. J. et al. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 4, p. 1267–79, 1 abr. 2006.
- LEBLANC, S. J.; OSAWA, T.; DUBUC, J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1610–1618, dez. 2011.
- LEFEBVRE, R. C.; STOCK, A. E. Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in postpartum dairy cows with clinical endometritis: an evidence-based evaluation. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 28, n. 1, p. 79–96, ix, 1 mar. 2012.
- LEWIS, G. . Steroidal regulation of uterine immune defenses. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 281–294, 1 jul. 2004.
- LEWIS, G. S. Uterine Health and Disorders. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 984–994, 1 maio 1997.
- LEWIS, G. S. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 117, 28 nov. 2003.
- MARQUES JÚNIOR, A. P.; MARTINS, T. M.; BORGES, Á. M. Abordagem diagnóstica e de tratamento da infecção uterina em vacas Diagnosis and treatment of uterine infection in cows. v. 35, n. 2, p. 293–298, 2011.
- MARTINS, T. M. et al. Aspectos reprodutivos e produtivos de vacas da raça Holandesa com puerpério normal ou patológico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1348–1356, out. 2013.
- MORAES, J. G. N. et al. Effects of intrauterine infusion of Escherichia coli lipopolysaccharide on uterine mRNA gene expression and peripheral polymorphonuclear leukocytes in Jersey cows diagnosed with purulent vaginal discharge. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 6, p. 4784–4796, 1 jun. 2017.
- NOLETO, P. G.; SAUT, J. P. E.; SHELDON, I. M. Short communication: Glutamine modulates inflammatory responses to lipopolysaccharide in ex vivo bovine endometrium. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 2207–2212, 2017.
- PEIRÓ, J. R. et al. Ovariectomy by left flank approach in prepubertal Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire**, v. 73, n. 3, p. 237–40, jul. 2009.
- RAHMAN, M. et al. **Evolution of disease and potential biocontrol activity of Trichoderma sp. against Rhizoctonia solani on potato**. [s.l.] Federal University of Uberlandia, 2014. v. 34
- ROWSON, L. E. Methods of inducing multiple ovulation in cattle. **The Journal of**

**endocrinology**, v. 7, n. 3, p. 260–70, 1 ago. 1951.

ROWSON, L. E.; LAMMING, G. E.; FRY, R. M. Influence of Ovarian Hormones on Uterine Infection. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 749–750, 25 abr. 1953.

SANCHEZ, N. C. et al. Cattle temperament influences metabolism: metabolic response to glucose tolerance and insulin sensitivity tests in beef steers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 56, p. 85–95, 2016.

SAUT, J. P. E. et al. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS in vitro. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 148, n. 6, p. 593–606, 1 dez. 2014.

SCAGION, L. F. S. [UNESP]. Sanidade Uterina Pós Parto: Aspectos Imunológicos e Terapêuticos. **Aleph**, 2011.

SHELDON, I. M. et al. Uterine diseases in cattle after parturition. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 115–121, 1 abr. 2008.

SHELDON, I. M. et al. Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle1. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 6, p. 1025–1032, 1 dez. 2009.

SHELDON, I. M.; OWENS, S.-E.; TURNER, M. L. Innate immunity and the sensing of infection, damage and danger in the female genital tract. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 119, p. 67–73, 1 fev. 2017.

SMITH, B. P. **Large Animal Internal Medicine**. 5. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2014.

SWANGCHAN-UTHAI, T. et al. Time Course of Defense Mechanisms in Bovine Endometrium in Response to Lipopolysaccharide1. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 6, 1 dez. 2012.

VILELA, D.; EM, P.; ANIMAL, N. **A importância econômica, social e nutricional do leite**. Disponível em: <<http://www.nupel.uem.br/importancia.pdf>>. Acesso em: 30 maio. 2018.

WILLIAMS, E. J. et al. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, v. 68, n. 4, p. 549–59, 1 set. 2007.

WILSON DE MELO CRUVINEL et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 434–61, 2010.

WIRA, C. R. et al. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular

responses and interactions. **Immunological Reviews**, v. 206, n. 1, p. 306–335, ago. 2005.