

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

OGLÊNIA PEREIRA RAMOS

EFEITO DA RETENÇÃO DE PLACENTA E MASTITE CLÍNICA PÓS-PARTO NA
EFICIÊNCIA REPRODUTIVA E EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS E
RECEPTORES ESTEROIDOGÊNICOS NO ENDOMÉTRIO DE VACAS
LEITEIRAS MISTIÇAS

UBERLÂNDIA

2020

OGLÊNIA PEREIRA RAMOS

EFEITO DA RETENÇÃO DE PLACENTA E MASTITE CLÍNICA PÓS-PARTO NA
EFICIÊNCIA REPRODUTIVA E EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS E
RECEPTORES ESTEROIDOGÊNICOS NO ENDOMÉTRIO DE VACAS
LEITEIRAS MISTIÇAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Linha de Pesquisa: Biotécnicas e
Eficiência Reprodutiva

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Otávio
Decaria de Salles Rossi

UBERLÂNDIA

2020

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

R175 2020	<p>Ramos, Oglênia Pereira, 1990- Efeito da retenção de placenta e mastite clínica pós-parto na eficiência reprodutiva e expressão gênica de citocinas e receptores esteroideogênicos no endométrio de vacas leiteiras mestiças [recurso eletrônico] / Oglênia Pereira Ramos. - 2020.</p> <p>Orientador: João Paulo Elsen Saut. Coorientador: Rodrigo Otávio Decaria de Salles Rossi. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.599 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Veterinária. I. Saut, João Paulo Elsen, 1975-, (Orient.). II. Rossi, Rodrigo Otávio Decaria de Salles, 1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 619</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



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

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



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO Nº PPGCV/011/2020				
Data:	19 de agosto de 2020	Hora de início:	13:30	Hora de encerramento:	16:00
Matrícula do Discente:	11812MEV009				
Nome do Discente:	OGLÊNIA PEREIRA RAMOS				
Título do Trabalho:	Efeito da retenção de placenta e mastite clínica pós-parto na eficiência reprodutiva e expressão gênica de citocinas e receptores esteroideogênicos no endométrio de vacas leiteiras mestiças				
Área de concentração:	Produção Animal				
Linha de pesquisa:	Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Fatores que afetam a eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos				

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico) a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Ricarda Maria dos Santos - UFU; Nádia Simarro Fagundes - Faculdade Pitágoras; João Paulo Elsen Saut** orientador(a) do(a) candidato(a).

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

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

Aprovada.

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **João Paulo Elsen Saut, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/08/2020, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/08/2020, às 16:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nadia Simarro Fagundes, Usuário Externo**, em 19/08/2020, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2196852** e o código CRC **DB2F7F58**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus por me dar todas as oportunidades que Ele me deu e abençoar essa caminhada. Agradeço a minha querida família pelo apoio em minhas decisões. Agradeço as minhas amigas do Laboratório de Saúde em Grandes Animais (LASGRAN): Amanda, Carla e Paula. Sem vocês eu não teria conseguido terminar esse projeto, sem a disposição de vocês, sem as viagens divertidas, as madrugadas frias nas fazendas. Muito obrigada por tudo!

Agradeço as fazendas que contribuíram para o meu projeto abrindo as portas e autorizando a execução do mesmo, aos proprietários e aos funcionários também que sempre nos ajudaram com muita disposição: Fazenda Nosso Recanto, Fazenda Divisa, Fazenda Quilombo, Fazenda Limão, Fazenda Lagoa Dourada.

Agradeço aos colegas veterinários que me ajudaram com indicações de fazenda e tentando encontrar animais compatíveis para o projeto. Obrigada! Agradeço aos laboratórios da UFU e as (os) técnicas (os) e professores responsáveis por cederem o espaço para a análise das amostras.

Agradeço ao Professor Dr. João Paulo Elsen Saut por sempre aceitar me ajudar, pelos ensinamentos e por todas as oportunidades que me ofereceu. Muito obrigada!

Agradeço ao Professor Dr. Rodrigo Rossi por todos os ensinamentos, pela confiança em mim depositada desde o início e pelas oportunidades que me deu nesse mestrado. Muito obrigada!

Agradeço a Professora Dra. Ricarda Maria dos Santos pela oportunidade de execução deste projeto de sua coordenação, aprovado pela FAPEMIG, obrigada por ser tão solícita e por toda a ajuda oferecida!

Agradeço a Dra. Nádia Simarro Fagundes pelo auxílio técnico da equipe na execução do qRT-PCR.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia (NANO BIO), Laboratório de Osteoimunologia e Imunologia dos Tumores, Laboratório de Biotecnologia Animal (LABIO) e Laboratório de Reprodução animal da Universidade Federal de Uberlândia, por cederam o espaço e os equipamentos para realizarmos as análises.

Agradeço ao Gustavo S. Gonçalves, coordenador na Associação Brasileira de Criadores de Girolando, por me ajudar com boas indicações de fazendas para o projeto e ser tão prestativo, obrigada.

Agradeço aos animais por contribuírem para a pesquisa, tudo isso é por vocês. Agradeço aos amigos de longa data que sempre me deram palavras de conforto nas horas mais complicadas e sempre torcem por meu sucesso. Obrigada.

Agradeço ao programa de Pós-graduação e a Universidade Federal de Uberlândia, por contribuir com a minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG ao apoio financeiro aprovado (Demanda Universal - 01/2016 processo APQ-01 199-16). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa produtividade dos colaboradores.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Gratidão!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	6
1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Imunidade Inata	10
2.2 Imunidade no periparto.....	13
2.3 Doenças do pós-parto e correlação com a subfertilidade e eficiência reprodutiva.....	14
2.3.1 Retenção de placenta	16
2.3.2 Metrite	17
2.3.3 Endometrite clínica	18
2.3.4 Endometrite subclínica	19
2.3.5 Mastite clínica	19
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 2: Efeito da retenção de placenta e mastite clínica pós-parto na eficiência reprodutiva e expressão gênica de citocinas e receptores esteroidogênicos no endométrio de vacas leiteiras mestiças.....	34
3 INTRODUÇÃO	37
4 METODOLOGIA	39
4.1 Experimento 1	39
4.2 Experimento 2	40
4.2.1 Exame físico geral e específico do sistema genital feminino	41
4.2.2 Técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR)	42
4.3 Análise Estatística	44
5 RESULTADOS.....	45
6 DISCUSSÃO.....	47
7 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS	53

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

A produção leiteira brasileira chegou em 2018 aos 16,36 milhões de animais ordenhados com uma produção de 33,84 bilhões de litros de leite (BRASIL, 2019). Para que ocorra maximização dessa produção e uma nova gestação anualmente, é necessário que haja uma rápida recuperação do ambiente uterino durante o período pós parto (SHELDON, 2015), resultando em um bom desempenho reprodutivo para que se tenha lucratividade na produção leiteira (STANGAFERRO; WIJMA; GIORDANO, 2019). O período periparto compreende as três semanas anteriores e as três semanas posteriores ao parto e é marcada pela redução no consumo de alimento e o aumento na demanda de nutrientes para crescimento do concepto e síntese de leite (GRUMMER, 1995). Sendo assim, o animal é submetido a situações de extremas exigências metabólicas (LEBLANC, 2020).

As infecções uterinas são responsáveis por perdas à longo prazo (CARVALHO et al., 2019), pois a eficiência reprodutiva do animal fica comprometida, havendo a necessidade de maior número de serviços por concepção, aumentando o número de inseminações (FOURICHON; SEEGERS; MALHER, 2000) e muitas vezes descarte dos animais acometidos (LEWIS, 1997). Infecções bacterianas uterinas são importantes porque interrompem a função do útero e ovários, assim como dos centros de controle no hipotálamo e pituitária (SHELDON; DOBSON, 2004), bloqueia a sinalização endócrina, interfere na capacidade do endométrio em suportar o desenvolvimento e implantação de embriões e desregula os ovários resultando em menor qualidade oocitária (BROMFIELD et al., 2015). Também alteram a expressão de genes relacionados à inflamação e imunidade no ambiente uterino, no istmo, ampola e nas células da granulosa por até três meses após a resolução da doença (HORLOCK et al., 2020), além de afetar na fertilização dos ovócitos e no desenvolvimento inicial do embrião por mais de quatro meses (RIBEIRO et al., 2016).

A granulosa de folículos dominantes apresentam alterações no transcriptoma após seis semanas da resolução de um caso de metrite (PIERSANTI et al., 2019) assim como também alterações no transcriptoma de oócitos 60 dias após a resolução de endometrite (PIERSANTI et al., 2020). Dickson et al. (2020) observaram em vacas com endometrite induzida oócitos com baixa capacidade de atingir o estágio de mórula após fertilização *in vitro* (FIV). Buso et al. (2018) relataram taxa de descarte de 19,4% para

as vacas com retenção de placenta (RP) e, estas apresentaram 46 dias a mais no período de serviço quando comparado a vacas saudáveis, além do aumento no número de inseminações para se tornarem gestantes. Além disso, a ocorrência de RP predispõe o animal a doenças como a metrite, (até 50% de chances) e a endometrite subclínica, (3,15 vezes mais chances) (KASIMANICKAM et al., 2004; LEBLANC, 2008).

Durante o parto, as barreiras físicas da cérvix, da vagina e da vulva ficam comprometidas, proporcionando a oportunidade para as bactérias ascenderem ao trato genital a partir do meio ambiente, bem como da pele e fezes do animal (SHELDON; DOBSON, 2004). Com isso, na involução uterina após o parto, o útero é contaminado por bactérias ambientais as quais são eliminadas no processo de involução uterina normal (MARQUES JÚNIOR; MARTINS; BORGES, 2011). Alterações nos mecanismos de defesa local e, por consequência, persistência, ou aderência, das bactérias patogênicas comprometem o ambiente uterino resultando em diferentes quadros de infecção uterina (SHELDON et al., 2009; SHELDON; DOBSON, 2004). O estabelecimento, a gravidade e a persistência dos diferentes tipos de infecção são influenciados pela condição do ambiente uterino, por fatores genéticos, além das imunidades inata e adquirida (WILLIAMS et al., 2007).

O sistema imune inato é o principal responsável por combater a contaminação bacteriana do útero por uma variedade de defesas anatômica, fisiológica e fagocítica. As barreiras fisiológicas incluem as grandes quantidades de muco secretado pela vagina, cérvix e, em particular, durante o estro. A barreira fagocitária é fornecida pela invasão de neutrófilos, em resposta ao desafio bacteriano, que são as células fagocíticas mais importantes a serem recrutadas a partir da circulação periférica para o lúmen do útero, internalizando e eliminando as bactérias, e contribuindo para a formação de pus quando os fagócitos morrem (SHELDON; DOBSON, 2004).

Após injúria tecidual os mediadores inflamatórios são liberados gerando os sinais de inflamação que são dor, calor, rubor, intumescência e perda de função. Dentre os mediadores inflamatórios incluem as citocinas como as interleucinas (IL) 1 β , IL6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), quimiocinas como IL8 e prostaglandina E2. Esses mediadores vão direcionar a resposta inflamatória, atrair e ativar células imunes, como neutrófilos e macrófagos para retirar as células hospedeiras danificadas e microorganismos. Várias citocinas estão envolvidas na inflamação, algumas com várias funções (SHELDON et al., 2014). Citocinas são moléculas de sinalização que regulam a inflamação, imunidade e hematopoiese. E as quimiocinas são proteínas que estimulam a

quimiotaxia, que é o deslocamento dos leucócitos aos locais de infecção (SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019).

Além disso, doenças não-uterinas também estão relacionadas a baixa eficiência reprodutiva como, por exemplo, a mastite. Ahmadzadeh et al. (2009) demonstraram aumento dos dias em aberto e do serviço por concepção em vacas acometidas por mastite. Resultados semelhantes aos encontrados por Santos et al. (2004) em que, vacas com mastite tiveram menores taxas de concepção na primeira IA, mais dias em aberto, maiores taxas de aborto e aumento de chances de abate por baixa eficiência. Mastite também reduz as taxas de crescimento do folículo ovariano (LAVON et al., 2011) e altera expressões de genes envolvidos na resposta imune endometrial, como moléculas de adesão celular e vias de sinalização (CAMPOS et al., 2018). A taxa de prenhez por inseminação também é afetada por doenças respiratórias, digestivas e metabólicas, como a hipocalcemia (RIBEIRO et al., 2013). Além disso, a fertilização dos ovócitos e desenvolvimento inicial do embrião também é afetado por doenças inflamatórias (RIBEIRO et al., 2016). Animais afetados por laminite e cetose também precisam de mais inseminações e apresentaram maior intervalo entre parto e concepção quando comparados com vacas saudáveis (MELLADO et al., 2018).

Com isso, a hipótese deste estudo foi que vacas com RP e mastite clínica no pós-parto apresentam piores índices reprodutivos por estas patologias interferirem na imunidade inata endometrial e expressão de receptores dos hormônios esteroidogênicos ao final do puerpério. Portanto, os objetivos com este estudo foram: a) avaliar o efeito da RP e mastite clínica pós-parto na eficiência reprodutiva de vacas mestiças leiteiras (experimento 1); b) avaliar o efeito destas doenças na imunidade inata endometrial e receptores dos hormônios esteroidogênicos (experimento 2). Justifica-se a escolha da RP como doença uterina por ela não estar mais presente ao final do puerpério e não provocar alterações clínicas evidentes por tempo mais prolongado como a endometrite clínica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Um sistema imunológico adequado protege as vacas de uma variedade de organismos patogênicos. Para que isso ocorra adequadamente há uma dinâmica de tecidos, células e moléculas que podem ser classificadas em imunidade inata e adaptativa ou adquirida. O sistema inato é a resposta rápida que acontece segundos após a exposição ao patógeno, respondendo a qualquer lesão tecidual e neutralizando uma ampla variedade de microrganismos. O sistema adaptativo é atrasado em relação a imunidade inata podendo levar dias para apresentar uma resposta, isso porque ela é mais específica a patógenos e pode ser aumentada pela repetição a exposição ao mesmo. Para que ocorra proteção ideal os dois sistemas devem trabalhar em sinergia (SORDILLO, 2016). Nessa dissertação será dada maior ênfase nas inflamações uterinas e na imunidade inata bovina.

2.1 Imunidade Inata

Nos animais existem barreiras que tentam impedir a entrada do patógeno que incluem pele, lágrima e muco e se eles violam essa barreira a resposta imune age tentando impedir o seu estabelecimento (SORDILLO, 2016). A imunidade inata consiste em resposta rápida por mecanismos celulares e químicos. Assim que o organismo percebe que existem componentes diferentes do habitual a imunidade inata é capaz de centralizar as células da inflamação para eliminar o microorganismo, por isso um animal não está sempre doente (TIZARD, 2019). Vários fatores causam a inflamação, como tecido lesado, invasão microbiana e geram sinais como vermelhidão, edema, calor, dor, perda de função do tecido. Isso vai aumentar a permeabilidade do tecido vascular (endotélio) que vai extravasar os componentes séricos e células imunes para finalizar a inflamação e reparar tecidos. Porém a produção exagerada de citocinas pode levar a problemas fatais, como doenças autoimunes (TAKEUCHI; AKIRA, 2010)

Fazem parte deste processo da imunidade inata células, como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, enzimas que formam o sistema complemento, moléculas antimicrobianas naturais, proteínas ligadoras de carboidratos, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; TIZARD, 2019). O sistema imune inato não apresenta memória, porém sempre que a invasão é detectada por meio de receptores preexistentes, ele responde imediatamente (FINLAY; HANCOCK, 2004).

Alguns sinais são alarmantes para que se inicie a inflamação como as células que estão mortas, ou quase mortas, e tecidos lesionados que liberam moléculas denominadas alarminas e estas apresentam fortes propriedades antimicrobianas e funções de recrutamento de células (BIANCHI, 2007). Os macrófagos, células dendríticas (DCs) e mastócitos, também denominados células sentinelas, apresentam em sua estrutura receptores que se ligam aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) expressos por bactérias, vírus ou fungos que ativam vias de sinalização e como consequência há a secreção de moléculas desencadeantes da inflamação (AKIRA; HEMMI, 2003). Além dos PAMPs, existem também os padrões moleculares associados a danos celulares (DAMPs), que são reconhecidos pelos mesmos receptores que os PAMPs sendo indicadores de lesão tecidual, pois são liberados após morte celular, tecido lesado e em lesões de matriz extracelular (CHEN; NUÑEZ, 2010). Assim que PAMPs e DAMPs são identificados, eles irão regulamentar a transcrição de genes envolvidos na inflamação que codificarão citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, interferon (IFN) do tipo I e várias outras (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Entre os produtos das células sentinelas temos as citocinas interleucinas, sendo as principais IL1 e TNF- α , assim como IL6, IL12 e IL18. Outro produto das células sentinelas são as quimiocinas, onde existem mais de 50 tipos diferentes (DESHMANE et al., 2009; MCDONALD; KUBES, 2011; MEDZHITOV, 2008). A febre e o mal estar é proveniente da produção da ciclooxygenase-2 (COX-2) pelas células sentinelas, que darão origem a lipídios inflamatórios, prostaglandinas e leucotrienos (LI et al., 2001).

Os receptores mais importantes que se ligam aos PAMPs denominam-se receptores tipo *Toll* (TLRs). Existem os receptores intracelulares e os de superfície celular, pois o invasor pode ser tanto extracelular quanto intracelular. Ao todo existem pelo menos 13 tipos de receptores diferentes para distintas moléculas microbianas, eles também podem se combinar para reconhecer outros agentes invasores. Os receptores de superfície reconhecem principalmente proteínas e lipopolissacarídeos (LPS) já os receptores intracelulares reconhecem ácidos nucleicos virais (TAKEDA; AKIRA, 2001, 2005, 2007, 2015).

Assim que ocorre a ligação de um PAMP a um TLRs há a produção do fator de transcrição denominado de fator nuclear kappa-B (NF- κ B) e este é responsável por ativar os genes que codificam as citocinas IL1, IL6 e TNF- α (CHEN; NUÑEZ, 2010) que são produzidas inicialmente como pró-moléculas sendo ativadas pela enzima caspase-1 e desencadeando a próxima fase da resposta à inflamação (GU et al., 1997). A

caspace-1 é produzida quando os PAMPs se ligam aos TLRs, pois há o estímulo por um complexo protéico denominado inflamassoma (CHEN; NUÑEZ, 2010; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; TIZARD, 2019). As bactérias ativam o inflamassoma, por meio dos PAMPs ou por seus poros, que são detectados pelo inflamassoma NALP3, também denominado criopirina e que é uma subfamília dos receptores tipo *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD) (PÉTRILLI et al., 2007).

As IL's apresentam várias funções na inflamação. A IL1 β recruta macrófagos e a IL1 α recruta neutrófilos (CHEN; NUÑEZ, 2010; RIDER, 2011). A IL1 β também regula fatores de crescimento e citocinas estimulando a neovascularização e atração de monócitos (ROSSI et al., 2005) e células inflamatórias (DINARELLO, 2002). Além disso, promove liberação de proteínas de fase aguda como haptoglobina e proteína amiloide sérica A (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990).

As IL's também são sinalizam a presença do concepto (HANSEN, 2011) como a IL6 na fase de alongamento dos embriões de animais de produção (vacas, porcas e ovelhas) (MATHIALAGAN; BIXBY; ROBERTS, 1992). Ela também tem funções nas células, como no crescimento, na diferenciação, na inflamação e na hematopoiese, sendo uma citocina com múltiplos efeitos (ALTUN et al., 2011) e propriedades anti-inflamatórias e pró-inflamatórias (SCHELLER et al., 2011).

Um estudo relata que a IL6 esteja presente em níveis mais elevados no pré-parto e níveis baixos associados à progesterona (P4) baixa em sangue periférico havia relação com RP e níveis mais altos no pré-parto de IL6 tendiam a afetar a função placentária normal (ISHIKAWA et al., 2004). A IL8 recruta neutrófilos e monócitos ao local de infecção para atrair e eliminar bactérias (SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019) e ativa neutrófilos nos processos inflamatórios bovinos (GALLIGAN; COOMBER, 2000).

A quimiocina CCL5 também conhecida como RANTES (Regulated on Activated Normal T-Cell Expressed and Secreted) induz migração e recrutamento *in vitro* de células T, células dendríticas, eosinófilos, células NK (natural killer), mastócitos e basófilos (MARQUES et al., 2013; SCHALL et al., 1990) e pode também ser angiogênica e aumentar o potencial metastático das células cancerígenas incentivando a migração de células para os locais de sua produção. Inicialmente pensava que esta quimiocina era uma proteína específica de célula T, porém estudos verificaram ser produzida por várias células do corpo como plaquetas, macrófagos,

eosinófilos e fibroblastos assim como células epiteliais, endometriais, e endotelial (APPAY; ROWLAND-JONES, 2001).

2.2 Imunidade no periparto

Vários trabalhos descrevem a imunossupressão durante o período periparto, que leva o animal a ser mais susceptível a outros problemas, como a mastite, em virtude de uma queda na blastogênese linfocitária e diminuição da capacidade migratória dos neutrófilos (KEHRLI; NONNECKE; ROTH, 1989a, 1989b; MALLARD et al., 1998) e também a doenças metabólicas, como hipocalcemia (MULLIGAN et al., 2006). Então a provável migração retardada dos neutrófilos vai gerar os distúrbios nas respostas inflamatórias junto a outros fatores imunes inatos durante a fase inicial da doença. Um exemplo dessa resposta inflamatória descontrolada é a gravidade e duração das mastites nas vacas em lactação (SORDILLO, 2016).

Após o parto temos um balanço energético negativo (BEN) associado a uma diminuição do escore de condição corporal (ECC). Ácidos graxos não esterificados (NEFA) e β – hidroxibutirato (BHB) estão elevados, indicativos de mobilização lipídica e oxidação de ácidos graxos (WATHES et al., 2007). Vacas que estão acima do ECC considerado normal no pré-parto podem prejudicar o fígado, comprometendo a produção de glicose e aumentando as respostas inflamatórias (DRACKLEY, 1999; FENWICK et al., 2008). A função imunológica é suprimida durante o período periparto e os níveis de neutrófilos caem drasticamente após o parto prejudicando sua função (KEHRLI; NONNECKE; ROTH, 1989b; MALLARD et al., 1998), que ainda é mais comprometido quando temos associado o BEN grave com altas concentrações de NEFA e diminuição do índice de massa corporal (IMC) do animal (HAMMON et al., 2006; WATHES et al., 2009).

O estado nutricional das vacas é ligado à manutenção da função imunológica e da saúde, sendo que dietas de baixa qualidade nutricional levará o animal a ter uma resposta alterada da imunidade e distúrbios de saúde (SORDILLO, 2016). A perda de ECC no período pós-parto ou baixo ECC no momento do parto são fatores que deixam a vaca menos propensa a ovular, podem sofrer interferência na taxa de concepção ao primeiro serviço, têm maiores probabilidades de sofrerem aborto e aumento do intervalo de parto até a concepção (ROCHE et al., 2009).

No periparto as vacas leiteiras sofrem muito estresse com a lactação, o parto, o baixo consumo voluntário de matéria seca, a alta demanda por energia e proteína, o BEN e, tudo isso associado ao estresse oxidativo pode gerar disfunção na resposta imune e inflamatória do animal (SORDILLO; AITKEN, 2009). O baixo consumo de matéria seca está relacionado com níveis elevados de NEFA que vão favorecer o surgimento de esteatose que estará relacionado com função neutrofílica prejudicada (ZERBE et al., 2000).

Estudos relatam a influência do aumento dos esteroides durante o parto na função alterada dos neutrófilos por meio de interações específicas receptor-ligante (BURTON et al., 2005) e também que as alterações nas concentrações de estradiol e P4 pré-parto apresentam efeitos diretos e indiretos nas capacidades funcionais de linfócitos além de neutrófilos (LAMOTE et al., 2006), citocinas e outras moléculas imunostimulatórias no útero como prostaglandina F₂alfa (PGF₂α), óxido nítrico (LEWIS; WULSTER-RADCLIFFE, 2006; SEALS; WULSTER-RADCLIFFE; LEWIS, 2002; WULSTER-RADCLIFFE; SEALS; LEWIS, 2003). Por outro lado, Saut et al. (2014) verificaram que não há influência da fase do ciclo estral na expressão de citocinas endometriais *in vitro*. Acredita-se que haja outros hormônios homeoréticos associados na disfunção imune e inflamatória, já que as alterações desses hormônios esteroides não se sobrepõem a todo o período de transição (SORDILLO, 2016). Toda essa disfunção dos neutrófilos durante esse período está associada à ocorrência dos problemas pós-parto, incluindo a RP, metrite (HAMMON et al., 2006; KIMURA et al., 2002) e dermatite interdigital (CATALANI et al., 2013).

2.3 Doenças do pós-parto e correlação com a subfertilidade e eficiência reprodutiva

A doença uterina clínica causa impacto na eficiência reprodutiva dos bovinos gerando como consequência a subfertilidade e a infertilidade (SHELDON; OWENS, 2017). As doenças inflamatórias são identificadas como uma das principais causas de falhas reprodutivas em vacas, por isso manter uma boa saúde do animal é fundamental para uma eficiência reprodutiva ideal em bovinos (RIBEIRO; CARVALHO, 2017).

Estudos evidenciam que o útero não seja estéril, sendo colonizado por várias espécies como *Trueperella pyogenes* (KARSTRUP et al., 2017; MOORE et al., 2017), além disso, há evidências de que essas bactérias possam invadir o útero por meio da

circulação sanguínea, por exemplo, do intestino (JEON et al., 2017) ou por via ascendente, da vagina ou ambiente (GALVÃO; BICALHO; JEON, 2019).

Após o parto o útero se apresenta aumentado de volume, preenchido com restos de placenta e lóquios. E o desenvolvimento da doença, ou não, depende do equilíbrio entre a imunidade do animal, patogenicidade dos microorganismos, fatores ambientais e genéticos (SHELDON et al., 2009; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019). Para que ocorra a infecção pós-parto, os patógenos devem aderir à mucosa, colonizar ou penetrar o epitélio e liberar as toxinas que vão levar ao estabelecimento da doença (SHELDON et al., 2006). Antigamente, as vacas toleravam essa invasão de bactérias após o parto sendo que, alguns animais desenvolviam a doença, mas atualmente até 40% dos bovinos desenvolvem a doença pós-parto, variando de metrite a endometrite (SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019) devido à intensificação da produção leiteira que ainda está projetada para dobrar futuramente (BRITT et al., 2018).

As infecções do trato reprodutivo trazem como consequência disfunções no ovário (SHELDON et al., 2002), fertilidade comprometida, atraso no retorno a ciclicidade e diminuição das taxas de concepção por inseminação artificial, além disso, há evidências de menores níveis de cálcio no soro dessas vacas que apresentaram doença (RIBEIRO et al., 2013). As infecções uterinas interferem na progressão meiótica do oócito *in vitro* aumentando as taxas de parada meiótica e interferindo na quebra da vesícula germinativa, então as células da granulosa bovina desencadeiam uma resposta ao LPS bacteriano gerando inflamação (BROMFIELD; SHELDON, 2012).

Um caso de tratamento de metrite foi avaliado, em média, em um custo de 292 euros (DRILLICH et al., 2001) e anualmente esses casos podem chegar a um custo estimado de 1,4 bilhões de euros na União Europeia e 650 milhões de dólares nos Estados Unidos (SHELDON et al., 2009). O impacto econômico das doenças uterinas, além dos custos com o tratamento, inclui redução da produção de leite, infertilidade, falha na concepção, aumento dos dias em aberto e descarte do leite (LEBLANC, 2008; SHELDON et al., 2009).

Um histórico de doença uterina é associado ao atraso no retorno da atividade cíclica ovariana, ovário cístico e com fases lúteas prolongadas (OPSOMER et al., 2000). Um possível motivo que relaciona a doença uterina e disfunção ovariana é que citocinas e PAMPS prejudicam a função endócrina do hipotálamo e da hipófise reduzindo assim a liberação de GnRH e pulsatilidade do LH afetando a função ovariana e também gerando mudanças na síntese endometrial de PGF2 α para PGE2

(BROMFIELD et al., 2015; KARSCH et al., 2002). Outro motivo seria que as citocinas que estão envolvidas na resposta de defesa no útero podem prejudicar o ovário (SHELDON, 2019), como exemplo a IL6 e a TNF- α perturbam a esteroidogênese das células foliculares dos ovários de vacas (ALPIZAR; SPICER, 1994; SPICER, 1998). A IL- 1 β infundida intracerebroventricular por 4 a 6 dias causou interrupção total do ciclo estral além da diminuição e até bloqueio das concentrações de LH e FSH (KALRA; SAHU; KALRA, 1990; RIVESTT et al., 1993), além disso, essa interleucina pode inibir a ativação de neurônios GnRH em ratos (RIVEST; RIVIER, 1993) o que pode ser indicativo de envolvimento na inibição central da secreção pulsátil de LH (BATTAGLIA et al., 2000). E outro fator é que PAMPs podem atingir o ovário a partir do útero, pois os líquidos aspirados dos folículos dominantes tem as concentrações de endotoxina relacionadas com a gravidade da doença (HERATH et al., 2007).

2.3.1 Retenção de placenta

Após a expulsão do feto a placenta é eliminada geralmente dentro de 6 horas, mas se ela ainda estiver presente dentro de 12 a 24 horas após o parto, denomina-se essa situação de RP (FERREIRA, 2010; SHELDON, 2019; SHELDON et al., 2008). As contrações miométriais após 36 horas pós-parto cessam e, se elas não forem expulsas até esse momento, a liberação ocorrerá eventualmente como resultado da putrefação bacteriana (SHELDON, 2019). A incidência de RP pode variar de 2 a 5% dentro de um rebanho, podendo se tornar maior em casos de distocias, partos gemelares e na presença de agentes infecciosos (SHELDON et al., 2008). Alguns estudos apresentam incidências ainda maiores variando de 8,9% até 13,75% (FERNANDES et al., 2000; LAVEN; PETERS, 1996; NOBRE et al., 2012; REZENDE; CAMPOS; SANTOS, 2013).

A RP ocorre por uma falha na rápida quebra da ligação cotilédone-carúncula uterina após o parto e esse insucesso no descolamento da placenta parece ser relacionado com falha da imunidade em degradar os placentomas (HEUWIESER; GRUNERT, 1987; LEBLANC, 2008; PETERS; LAVEN, 1996). Além disso, para que haja a separação e expulsão correta da placenta parece que existem fatores relacionados a maturação da placenta envolvendo substâncias bioquímicas: 1) a exsanguinação da placenta, na parte fetal, no rompimento do umbigo que irá causar colapso e retração das vilosidades do trofocotoderma e sua separação física das criptas maternas; 2) as contrações uterinas que vão auxiliar a exsanguinação e a separação física facilitando a

distorção do placentoma e o “desabotoamento” do cotilédone da carúncula (SHELDON, 2019).

Os fatores que predisõem a ocorrência da RP são abortos, tempo de gestação fora do normal, distocias, cesarianas, esteatose hepática provavelmente por predispor a atonia uterina, deficiência de selênio / vitamina E ou possivelmente vitamina A e falhas na maturação placentária (parto prematuro, gêmeos, partos induzidos e anormalidades da relação estrógeno / progesterona ao final da gestação) (SHELDON, 2019), estresse térmico por calor (DUBOIS; WILLIAMS, 1980), ECC (NOBRE et al., 2012) e estação do ano (BUSO et al., 2018; FERNANDES et al., 2012). Vacas em maior grau de BEN pré parto, com menor vitamina E circulantes, deficientes de cálcio ferro e zinco apresentam maiores riscos para a ocorrência de RP (LEBLANC et al., 2004; SHEETAL; CHOUDHARY; SENGUPTA, 2014).

Há relato de animais que tiveram RP teriam menor atividade neutrofílica e menor quimiotaxia da IL8, que seria um quimioatratador presente no cotilédone (KIMURA et al., 2002). A RP foi associada a um aumento de dois a três dias do primeiro serviço e uma taxa de concepção menor, de 4 a 10%, resultando em mais 6 a 12 dias para a concepção (FOURICHON; SEEGERS; MALHER, 2000).

Em torno de 25% a 50 % das vacas que apresentam a RP podem desenvolver metrite (LEBLANC, 2008) e a ocorrência de endometrite clínica nesses animais que apresentaram RP pode chegar a 3,5 vezes mais chances (KASIMANICKAM et al., 2004). A RP está associada a uma queda significativa na produção de leite (DUBUC et al., 2011), mesmo após a resolução do problema, dados chegam a 355 litros a menos durante os primeiros 60 dias de lactação, além do maior risco da ocorrência de metrite (SHELDON, 2019; SHELDON; RYCROFT; ZHOU, 2004).

2.3.2 Metrite

A metrite pode ocorrer em até 21 dias pós-parto, sendo mais comum nos primeiros 10 dias pós-parto (SHELDON, 2019; SHELDON et al., 2006). A caracterização dessa doença é dada como útero aumentado de volume com líquido aquoso vermelho-marrom a esbranquiçado viscoso, secreção uterina purulenta e geralmente de odor fétido (SHELDON et al., 2008). Segundo Sheldon, Cronin e Bromfield (2019), a doença apresenta graus que variam de acordo com a apresentação de sinais clínicos. Na metrite de grau 1 as vacas têm o útero aumentado de volume,

descarga uterina purulenta e sem sinais sistêmicos. Já no grau 2, os animais apresentam também os sinais sistêmicos, como baixa produção de leite e febre. A metrite de grau 3, denominada também metrite puerperal ou metrite tóxica, os animais apresentam sinais de toxemia, como inapetência, extremidades frias, fraqueza e depressão, sendo o prognóstico ruim.

Após o parto, em até uma semana, de 25% a 40% das vacas leiteiras são acometidas por metrite (SHELDON et al., 2008, 2009). Vacas acometidas por metrite severa passam menos tempo se alimentando nas semanas que antecedem a doença, de 2 a 6 Kg a menos de matéria seca, em comparação a vacas saudáveis (HUZZEY et al., 2007). O maior fator de risco para a ocorrência de metrite é a RP, de 25 a 50% de vacas com RP desenvolvem metrite (LEBLANC, 2008). Uma meta-análise constatou que a metrite foi relacionado a sete dias a mais para a primeira inseminação, taxas de concepção até 20% menores, o que gerava 19 dias a mais para o intervalo entre o parto e a concepção (FOURICHON; SEEGERS; MALHER, 2000). Também foi associada a uma redução na produção leiteira, Giuliadori et al. (2013) demonstraram maiores produções em 90 dias de lactação das vacas saudáveis comparado com vacas com metrite clínica e metrite puerperal sendo as médias na produção de 2.646,56 kg, 2.235,62 kg e 2.367,20 kg, respectivamente.

2.3.3 Endometrite clínica

Endometrite clínica é uma patologia que tem efeitos negativos na fertilidade de vacas que são acometidas (GILBERT et al., 2005) prejudicando a função endometrial, gerando um ambiente hostil para o embrião no trato genital feminino, alterando as funções dos folículos ovarianos e a saúde dos ovócitos (SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019). A causa inicial mais comum é o crescimento polimicrobiano de bactérias uterinas durante o pós-parto em especial patógenos como *T. pyogenes* associado ou não com *F. necrophorum* e/ou espécies de *Prevotella* (SHELDON, 2019).

A endometrite clínica em vacas é definida por presença de secreção uterina purulenta na vagina 21 dias após o parto ou também secreção mucopurulenta na vagina 26 dias após o parto (SHELDON et al., 2006). Existe uma classificação de acordo com o muco vaginal observado que pode variar de 0 a 3, onde 0 é uma secreção clara e translúcida, 1 é uma secreção contendo flocos de pus, 2 é uma secreção contendo até 50% de conteúdo mucopurulento e 3 é onde ultrapassa 50% de material purulento

(SHELDON et al., 2009). Até 20% do total de animais que tiveram metrite persistem apresentando a doença como endometrite clínica (SHELDON et al., 2008). Vacas com endometrite clínica entre 20 a 33 dias pós-parto tiveram 1,7 mais chances de serem descartadas por terem falha reprodutiva do que vacas sem endometrite (LEBLANC et al., 2002). Vacas com endometrite clínica tiveram um aumento de 88 dias no período de serviço e redução de 26% na taxa de prenhez aos 300 dias de lactação (GILBERT et al., 2005).

Manimaran et al. (2019) encontraram níveis periféricos significativamente aumentados em vacas com endometrite clínica de proteínas de fase aguda como haptoglobina, amilóide sérica, alfa-1 glicoproteína ácida e de citocinas como $IL1\beta$, $TNF-\alpha$ e $IL-6$ comparadas com vacas saudáveis.

2.3.4 Endometrite subclínica

Endometrite subclínica tem como característica a inflamação do endométrio com ausência de sinais clínicos, sendo detectado geralmente por citologia da superfície endometrial, na contagem dos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) (SHELDON et al., 2009) e redução do desempenho reprodutivo do animal (SHELDON, 2019). A prevalência pode variar de 37% a 74% de acordo com o estudo realizado por Gilbert et al. (2005) e, segundo o mesmo autor, uma proporção maior ou igual a 5% de neutrófilos na citologia de animais com 40 a 60 dias pós-parto já é considerado endometrite subclínica. E para animais entre 21 a 33 dias pós-parto, segundo Kasimanickam et al. (2004), essa porcentagem é maior de 18% de neutrófilos.

Vacas com endometrite subclínica apresentam maiores expressões gênicas endometriais de citocinas pró-inflamatórias e vários trabalhos mostram isso. Ghasemi et al. (2012) encontraram expressão de $TNF-\alpha$ 20 vezes maior, de $IL6$ 30 vezes maior e de $IL8$ superior a 50 vezes mais o nível de expressão em comparação com vacas saudáveis. Wagener et al. (2017) encontraram expressões abundantes de $IL1A$ e $IL1B$ em vacas com endometrite subclínica. Fischer et al. (2010) observaram expressões significativamente maiores de $CXCL5$, $IL1B$, $IL8$ e TNF em vacas com endometrite subclínica. Gabler et al. (2009) observaram expressões aumentadas em vacas com endometrite subclínica incluindo de $IL1\alpha$ e prostaglandina citosólica E sintase (cPGES).

2.3.5 Mastite clínica

A mastite é uma infecção da glândula mamária causada em vacas principalmente por bactérias. Pode acontecer sem sinais clínicos evidentes (mastite subclínica) ou com sinais que vão de diminuição da produção leiteira, leucócitos aumentados no leite, alterações na sua composição, febre, quarto mamário edemaciado e febril (HANSEN; SOTO; NATZKE, 2004). Segundo Jamali et al. (2018) em uma meta-análise a taxa de incidência de mastite clínica varia de 13 a 40 casos a cada 100 vacas/ano.

Roberson (2012) classifica a mastite de acordo com a gravidade da doença. Segundo o autor, casos leves consistem em leite anormal onde a vaca não é afetada sistemicamente e o úbere, visivelmente, não está edemaciado ou firme. Nesse caso, por ser leve, há tempo para se realizar o exame de cultura para o tratamento correto. O quadro moderado, além de apresentar o leite anormal, há a presença de sinais sistêmicos como desidratação, temperatura elevada, frequência cardíaca ou respiratória elevada e pelo menos um dos quartos edemaciado e firme. Esse caso requer tratamento imediato pelo menos até sair o resultado do exame de cultura. Já o caso grave a vaca apresenta o leite anormal, pode, ou não, ter edema no úbere e apresenta dois ou mais sinais sistêmicos, precisando de tratamento imediato. Em todos os casos acima citados há a recomendação do exame de cultura para identificação e tratamento corretos.

O aparecimento de mastite nos primeiros 28 dias pós-parto mostrou um atraso no aparecimento da ciclicidade normal do ovário e do estro (HUSZENICZA et al., 2005). Essa inflamação na glândula mamária também alterou a expressão gênica das células da teca e granulosa, reduziu a taxa de crescimento do folículo ovariano (LAVON et al., 2011), aumentou o número de inseminações, diminuiu as chances de prenhez na primeira inseminação, aumentou dias em aberto, alterou a manifestação do estro e diminuiu produção de leite (CAMPOS et al., 2020; DAHL et al., 2017; DALANEZI et al., 2020; HUDSON et al., 2012; REMNANT et al., 2019; SANTOS et al., 2004). Além disso, provocou alterações na expressão endometrial de genes envolvidos na resposta imune, em moléculas de adesão celular e em vias de sinalização (CAMPOS et al., 2018). Perdas gestacionais podem ocorrer em função das endotoxinas ou respostas inflamatórias e imunológicas que ocorrem na mastite (DAHL et al., 2017), como, por exemplo, as citocinas que vão levar a níveis estabelecidos de NO e PGF₂ α (KUMAR et al., 2017). E o aumento do número de serviços por concepção em vacas com mastite pode se dar pela alta concentração das citocinas que vão modular a função reprodutiva, inibindo a secreção das gonadotrofinas que são responsáveis pela ovulação, maturação de oócitos, foliculogênese e função luteal (HANSEN; SOTO; NATZKE,

2004). Além do mais, certas citocinas podem diminuir a liberação de LH (MCCANN et al., 2000), sendo que IFN - α mostrou ter essa ação (BARROS et al., 1992), assim como IL6 bloqueou a secreção de estradiol induzida pelo hormônio folículo estimulante (FSH) de células da granulosa bovina (ALPIZAR; SPICER, 1994).

REFERÊNCIAS

AHMADZADEH, A. et al. Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive performance of Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 112, n. 3–4, p. 273–282, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.024>

AKIRA, S.; HEMMI, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. **Immunology Letters**, v. 85, n. 2, p. 85–95, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(02\)00228-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(02)00228-6)

ALPIZAR, E.; SPICER, L. J. Effects of Interleukin-6 on Proliferation and Follicle-Stimulating Hormone-Induced Estradiol Production by Bovine Granulosa Cells in Vitro: Dependence on Size of Follicle1. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 1, p. 38–43, 1994. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.1.38>

ALTUN, T. et al. Low follicular fluid IL-6 levels in IVF patients are associated with increased likelihood of clinical pregnancy. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 3, p. 245–251, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9502-8>

APPAY, V.; ROWLAND-JONES, S. L. RANTES: A versatile and controversial chemokine. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 2, p. 83–87, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(00\)01812-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(00)01812-3)

BARROS, C. M. et al. Possible mechanisms for reduction of circulating concentrations of progesterone by interferon- α in cows: Effects on hyperthermia, luteal cells, metabolism of progesterone and secretion of LH. **Journal of endocrinology**, v. 133, n. 2, p. 175–182, 1992. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1330175>

BATTAGLIA, D. F. et al. Endocrine alterations that underlie endotoxin-induced disruption of the follicular phase in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 45–53, 2000. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.45>

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 1–5, 2007. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/9130d7d3e67662a2277b97bde61a52d0.pdf. Acesso em: 02 04 2020

BRITT, J. H. et al. Invited review: Learning from the future—A vision for dairy farms and cows in 2067. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3722–3741, 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14025>

BROMFIELD, J. J. et al. Physiology and endocrinology symposium: Uterine infection: Linking infection and innate immunity with infertility in the high-producing dairy cow. **Journal Animal Science**, v. 93, n. 5, p. 2021–2033, 2015. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8496>

BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I. M. Europe PMC Funders Group Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. **Endocrinology**, v. 152, n. 12, p. 5029–5040, 2012. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1124>

BURTON, J. L. et al. Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: A new paradigm to help explain “neutrophil dysfunction” in parturient dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 105, n. 3–4, p. 197–219, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.02.012>

BUSO, R. R. et al. Retenção de placenta e endometrite subclínica: prevalência e relação com o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras mestiças. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 1–5, 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4707>

CAMPOS, C. C. et al. Intramammary infusion of lipopolysaccharide promotes inflammation and alters endometrial gene expression in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 10440–10455, 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14393>

CAMPOS, C. C. et al. Effects of clinical mastitis and puerperal diseases on reproductive efficiency of dairy cows. **Tropical Animal Health and Production**, p. 1–8, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02326-2>

CARVALHO, M. R. et al. Long-term effects of postpartum clinical disease on milk production, reproduction, and culling of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 11701–11717, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17025>

CATALANI, E. et al. Short communication: Lymphoproliferative response to lipopolysaccharide and incidence of infections in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 11, p. 7077–7081, 2013. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6854>

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826–837, 2010. <https://doi.org/10.1038/nri2873>

DAHL, M. O. et al. Evidence that mastitis can cause pregnancy loss in dairy cows: A systematic review of observational studies. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 8322–8329, 2017. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12711>

DALANEZI, F. M. et al. Influence of pathogens causing clinical mastitis on reproductive variables of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 4, p. 3648–3655, 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16841>

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–325, 2009. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>

DICKSON, M. J. et al. Experimentally induced endometritis impairs the developmental capacity of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, 2020.

<https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa129>

DINARELLO, C. A. The IL-1 family and inflammatory diseases. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 20, n. 5 SUPPL. 27, p. 1–13, 2002.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2259–2273, 1999.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75474-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75474-3)

DRILLICH, M. et al. Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2010–2017, 2001.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74644-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74644-9)

DUBOIS, P. R.; WILLIAMS, D. J. Increased incidence of retained placenta associated with heat stress in dairy cows. **Theriogenology**, v. 13, n. 2, p. 115–121, 1980.
[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(80\)90120-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(80)90120-X)

DUBUC, J. et al. Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1339–1346, 2011.
<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3758>

FENWICK, M. A. et al. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 1, p. 31–44, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2006.10.002>

FERNANDES, C. A. DE C. et al. Variação sazonal da incidência de retenção de placenta em rebanhos leiteiros no sul do Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 179–181, 2000.
<https://doi.org/10.4322/rbcv.2015.209>

FERNANDES, C. A. DE C. et al. Associação entre oxitetraciclina e cloprostenol no tratamento de vacas leiteiras com retenção de placenta. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 178–182, 2012. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2014.107>

FERREIRA, A. M. **Reprodução da fêmea bovina: fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. 1ª ed. Juiz de Fora, MG: Edição do Autor, 2010.

FINLAY, B. B.; HANCOCK, R. E. W. Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 497–504, 2004.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro908>

FISCHER, C. et al. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 5, p. 818–829, 2010. <https://doi.org/10.1071/RD09120>

FOURICHON, C.; SEEGER, H.; MALHER, X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. **Theriogenology**, 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)

GABLER, C. et al. Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 993–1004, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.009>

GALLIGAN, C. L.; COOMBER, B. L. Effects of human IL-8 isoforms on bovine neutrophil function in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 74, n. 1–2, p. 71–85, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(00\)00162-8](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(00)00162-8)

GALVÃO, K. N.; BICALHO, R. C.; JEON, S. J. Symposium review: The uterine microbiome associated with the development of uterine disease in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 11786–11797, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17106>

GHASEMI, F. et al. Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1538–1547, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.022>

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, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.022>

GIULIODORI, M. J. et al. Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 6, p. 3621–3631, 2013. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5922>

GRUMMER, R. R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal of animal science**, v. 73, n. 9, p. 2820–2833, 1995. <https://doi.org/10.2527/1995.7392820x>

GU, Y. et al. Activation of interferon- γ inducing factor mediated by interleukin-1 β converting enzyme. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 206–209, 1997. <https://doi.org/10.1126/science.275.5297.206>

HAMMON, D. S. et al. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 1–2, p. 21–29, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.022>

HANSEN, P. J. The Immunology of Early Pregnancy in Farm Animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. SUPPL. 3, p. 18–30, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01850.x>

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**, v. 51, n. 4, p. 294–301, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00160.x>

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v. 265, n. 3, p. 621–636, 1990. <https://doi.org/10.1042/bj2650621>

HERATH, S. et al. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. **Reproduction**, v. 134, n. 5, p. 683–693, 2007.
<https://doi.org/10.1530/REP-07-0229>

HEUWIESER, W.; GRUNERT, E. Significance of chemotactic activity for placental expulsion in cattle. **Theriogenology**, v. 27, n. 6, p. 907–912, 1987.
[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(87\)90212-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(87)90212-3)

HORLOCK, A. D. et al. Uterine infection alters the transcriptome of the bovine reproductive tract three months later. **Reproduction**, v. 160, n. 1, p. 93–107, 2020.
<https://doi.org/10.1530/REP-19-0564>

HUDSON, C. D. et al. Associations between udder health and reproductive performance in United Kingdom dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3683–3697, 2012. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4629>

HUSZENICZA, G. et al. Effects of clinical mastitis on ovarian function in post-partum dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 3, p. 199–204, 2005.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00571.x>

HUZZEY, J. M. et al. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3220–3233, 2007.
<https://doi.org/10.3168/jds.2006-807>

ISHIKAWA, Y. et al. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive diseases. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 11, p. 1403–1408, 2004.
<https://doi.org/10.1292/jvms.66.1403>

JAMALI, H. et al. Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 4729–4746, 2018.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13730>

JEON, S. J. et al. Blood as a route of transmission of uterine pathogens from the gut to the uterus in cows. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 109, 2017.
<https://doi.org/10.1186/s40168-017-0328-9>

KALRA, P. S.; SAHU, A.; KALRA, S. P. Interleukin-1 inhibits the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge and release of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone in rats. **Endocrinology**, v. 126, n. 4, p. 2145–2152, 1990.
<https://doi.org/10.1210/endo-126-4-2145>

KARSCH, F. J. et al. Mechanisms for ovarian cycle disruption by immune/inflammatory stress. **Stress**, v. 5, n. 2, p. 101–112, 2002.
<https://doi.org/10.1080/10253890290027868>

KARSTRUP, C. C. et al. Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows. **Theriogenology**, v. 99, p. 41–47, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.05.013>

- KASIMANICKAM, R. et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 62, n. 1–2, p. 9–23, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.03.001>
- KEHRLI, M. E.; NONNECKE, B. J.; ROTH, J. A. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period AJVR 1989 50 215 Kehrli.pdf. **American journal of veterinary research**, v. 50, n. 2, p. 207–214, 1989a.
- KEHRLI, M. E.; NONNECKE, B. J.; ROTH, J. A. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. **American journal of veterinary research**, v. 50, n. 2, p. 207–214, 1989b.
- KIMURA, K. et al. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 3, p. 544–550, 2002. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74107-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74107-6)
- KUMAR, N. et al. Mastitis effects on reproductive performance in dairy cattle: a review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 4, p. 663–673, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1253-4>
- LAMOTE, I. et al. Influence of sex steroids on the viability and CD11b, CD18 and CD47 expression of blood neutrophils from dairy cows in the last month of gestation. **Veterinary research**, v. 37, n. 1, p. 61–74, 2006. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005038>
- LAVEN, R. A.; PETERS, A. R. Bovine retained placenta: Aetiology, pathogenesis and economic loss. **Veterinary Record**, v. 139, n. 19, p. 465–471, 1996. <https://doi.org/10.1136/vr.139.19.465>
- LAVON, Y. et al. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 40, n. 2, p. 98–109, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.09.004>
- LEBLANC, S. J. et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2223–2236, 2002. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74302-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74302-6)
- LEBLANC, S. J. et al. Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 3, p. 609–619, 2004. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73203-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73203-8)
- LEBLANC, S. J. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 102–114, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.019>
- LEBLANC, S. J. Review : Relationships between metabolism and neutrophil function in dairy cows in the peripartum period. 2020. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003227>

LEWIS, G. S. Uterine Health and Disorders. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 984–994, 1997. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76024-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76024-7)

LEWIS, G. S.; WULSTER-RADCLIFFE, M. C. Prostaglandin F₂ α upregulates uterine immune defenses in the presence of the immunosuppressive steroid progesterone. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 56, n. 2, p. 102–111, ago. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2006.00391.x>

LI, S. et al. Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1 β . **Brain research**, v. 910, n. 1–2, p. 163–173, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02707-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02707-X)

MALLARD, B. A. et al. Alteration in Immune Responsiveness during the Peripartum Period and Its Ramification on Dairy Cow and Calf Health. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 585–595, 1998. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75612-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75612-7)

MANIMARAN, A. et al. Peripheral concentrations of metabolic and inflammatory indicators during transition period and their relationship with postpartum clinical endometritis in dairy cattle. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 89, n. 11, p. 1205–1210, 2019.

MARQUES JÚNIOR, A.; MARTINS, T.; BORGES, Á. Abordagem diagnóstica e de tratamento da infecção uterina em vacas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 293–298, 2011.

MARQUES, R. E. et al. Targeting CCL5 in inflammation. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 17, n. 12, p. 1439–1460, 2013. <https://doi.org/10.1517/14728222.2013.837886>

MATHIALAGAN, N.; BIXBY, J. A.; ROBERTS, R. M. Expression of interleukin-6 in porcine, ovine, and bovine preimplantation conceptuses. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, n. 4, p. 324–330, 1992. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080320404>

MCCANN, S. M. et al. The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 917, p. 4–18, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05368.x>

MCDONALD, B.; KUBES, P. Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. **Journal of Molecular Medicine**, v. 89, n. 11, p. 1079–1088, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0784-9>

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature07201>

MELLADO, M. et al. The effects of periparturient events, mastitis, lameness and ketosis on reproductive performance of Holstein cows in a hot environment. **Austral Journal of Veterinary Sciences**, v. 50, n. 1, p. 1–8, 2018. <https://doi.org/10.4067/S0719-81322018000100102>

- MOORE, S. G. et al. Hot topic: 16S rRNA gene sequencing reveals the microbiome of the virgin and pregnant bovine uterus. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4953–4960, 2017. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12592>
- MULLIGAN, F. et al. Production diseases of the transition cow: Milk fever and subclinical hypocalcaemia. **Irish Veterinary Journal**, v. 59, n. 12, p. 697–702, 2006.
- NOBRE, M. M. et al. Evaluation of incidence rate and risk factors of retained placenta of crossbred dairy cattle. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 101–107, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000100015>
- OPSOMER, G. et al. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. **Theriogenology**, n. 53, p. 1–29, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00234-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00234-X)
- PETERS, A. R.; LAVEN, R. A. Treatment of bovine retained placenta and its effects. **Veterinary Record**, v. 139, n. 22, p. 535–539, 1996. <https://doi.org/10.1136/vr.139.22.535>
- PÉTRILLI, V. et al. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 6, p. 615–622, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.09.002>
- PIERSANTI, R. L. et al. Persistent effects on bovine granulosa cell transcriptome after resolution of uterine disease. **Reproduction**, v. 158, n. 1, p. 35–46, 2019. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0037>
- PIERSANTI, R. L. et al. Uterine infusion of bacteria alters the transcriptome of bovine oocytes. **FASEB BioAdvances**, 2020. <https://doi.org/10.1096/fba.2020-00029>
- REMNANT, J. et al. Association of lameness and mastitis with return-to-service oestrus detection in the dairy cow. **Veterinary Record**, v. 185, n. 14, p. 442, 2019. <https://doi.org/10.1136/vr.105535>
- REZENDE, E. V.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Incidência da retenção de placenta e as consequências na produção de leite e na eficiência reprodutiva de vacas holandesas. **Acta Scient. Vet**, v. 41, p. 1170–1175, 2013.
- RIBEIRO, E. S. et al. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 9, p. 5682–5697, 2013. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6335>
- RIBEIRO, E. S. et al. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 2201–2220, 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10337>
- RIBEIRO, E. S.; CARVALHO, M. R. Impact and mechanisms of inflammatory diseases on embryonic development and fertility in cattle. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 589–600, 2017. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR1002>

- RIDER, P. ET AL. IL-1 α and IL-1 β recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 9, p. 4835–4843, 2011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102048>
- RIVEST, S.; RIVIER, C. Interleukin-1 β inhibits the endogenous expression of the early gene c-fos located within the nucleus of LH-RH neurons and interferes with hypothalamic LH-RH release during proestrus in the rat. **Brain Research**, v. 613, n. 1, p. 132–142, 1993. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90463-W](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90463-W)
- RIVESTT, S. et al. The chronic intracerebroventricular infusion of interleukin-1 β alters the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of cycling rats. I. Effect on LHRH and gonadotropin biosynthesis and secretion. **Endocrinology**, v. 133, n. 6, p. 2424–2430, 1993. <https://doi.org/10.1210/endo.133.6.8243260>
- ROBERSON, J. R. Treatment of Clinical Mastitis. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 271–288, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.011>
- ROCHE, J. R. et al. Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 12, p. 5769–5801, 2009. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2431>
- ROSSI, M. et al. Identification of genes regulated by interleukin-1 β in human endometrial stromal cells. **Reproduction**, v. 130, n. 5, p. 721–729, 2005. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00688>
- SANTOS, J. E. et al. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal reproduction science**, 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)
- SAUT, J. P. E. et al. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to Escherichia coli or LPS in vitro. **Reproduction**, v. 148, n. 6, p. 593–606, 2014. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0230>
- SCHALL, T. J. et al. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. **Nature**, v. 347, n. 6294, p. 669–671, 1990. <https://doi.org/10.1038/347669a0>
- SHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034>
- SEALS, R. C.; WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; LEWIS, G. S. Modulation of the uterine response to infectious bacteria in postpartum ewes. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 47, n. 1, p. 57–63, 2002. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2002.1o062.x>
- SHEETAL, S. K.; CHOUDHARY, S. K.; SENGUPTA, D. Mineral deficiency predisposes occurrence of retention of placenta in crossbred. **Veterinary World**, v. 7, n. 12, p. 1140–1143, 2014. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.1140-1143>

- SHELDON, I. et al. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. **Reproduction**, n. 148, p. R41–R51, 2014. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0163>
- SHELDON, I. M. et al. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. **Reproduction**, v. 123, n. 6, p. 837–845, 2002. <https://doi.org/10.1530/reprod/123.6.837>
- SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516–1530, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.021>
- SHELDON, I. M. et al. Uterine diseases in cattle after parturition. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 115–121, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.031>
- 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, 2009. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077370>
- SHELDON, I. M. Genes and environmental factors that influence disease resistance to microbes in the female reproductive tract of dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 1, p. 72–81, 2015. <https://doi.org/10.1071/RD14305>
- SHELDON, I. M. 23 - The Metritis Complex in Cattle. In: NOAKES, D.; PARKINSON, T.; ENGLAND, G. (Eds.). . **Veterinary Reproduction and Obstetrics (tenth edition)**. 10^a ed. St. Louis (MO): W.B. Saunders, 2019. p. 408–433. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-7233-8.00023-9>
- SHELDON, I. M.; CRONIN, J. G.; BROMFIELD, J. J. Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 7, n. 1, p. 361–384, 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115227>
- SHELDON, I. M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 295–306, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.006>
- SHELDON, I. M.; OWENS, S. E. Postpartum uterine infection and endometritis in dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 622–629, 2017. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR1006>
- SHELDON, I. M.; RYCROFT, A. N.; ZHOU, C. Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. **Veterinary Record**, v. 154, n. 10, p. 289–293, 2004. <https://doi.org/10.1136/vr.154.10.289>
- SORDILLO, L. M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4967–4982, 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10354>
- SORDILLO, L. M.; AITKEN, S. L. Impact of oxidative stress on the health and

immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 104–109, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.305>

SPICER, L. J. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) inhibits steroidogenesis of bovine ovarian granulosa and thecal cells in vitro: Involvement of TNF- α receptors. **Endocrine**, v. 8, n. 2, p. 109–115, 1998. <https://doi.org/10.1385/ENDO:8:2:109>

STANGAFERRO, M. L.; WIJMA, R. W.; GIORDANO, J. O. Profitability of dairy cows submitted to the first service with the Presynch-Ovsynch or Double-Ovsynch protocol and different duration of the voluntary waiting period. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4546–4562, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15567>

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. **Genes to Cells**, v. 6, n. 9, p. 733–742, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00458.x>

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2005. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-Like Receptors. **Current Protocols in Immunology**, v. 77, n. 1, p. 1–13, 2007. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1412s77>

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-Like receptors. **Current Protocols in Immunology**, v. 2015, n. April, p. 14.12.1-14.12.10, 2015. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0101s52>

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>

TIZARD, I. I. **Imunologia Veterinária**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

WAGENER, K. et al. Endometrial mRNA expression of selected pro-inflammatory factors and mucins in repeat breeder cows with and without subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 90, p. 237–244, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.013>

WATHES, D. C. et al. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 33, n. 2, p. 203–225, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2006.05.004>

WATHES, D. C. et al. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. **Physiological Genomics**, v. 39, n. 1, p. 1–13, 2009. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00064.2009>

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. 549–559, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.056>

WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; SEALS, R. C.; LEWIS, G. S. Progesterone increases

susceptibility of gilts to uterine infections after intrauterine inoculation with infectious bacteria. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 5, p. 1242–1252, 2003.
<https://doi.org/10.2527/2003.8151242x>

ZERBE, H. et al. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. **Theriogenology**, v. 54, n. 00, p. 771–786, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00389-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00389-7)

CAPÍTULO 2: Efeito da retenção de placenta e mastite clínica pós-parto na eficiência reprodutiva e expressão gênica de citocinas e receptores esteroideogênicos no endométrio de vacas leiteiras mestiças
(Artigo escrito segundo as normas da revista Ciência Rural)

1 **Efeito da retenção de placenta e mastite clínica pós-parto na eficiência**
2 **reprodutiva e expressão gênica de citocinas e receptores esteroidogênicos no**
3 **endométrio de vacas leiteiras mestiças**
4

5 Oglênia Pereira Ramos¹ Amanda Lima Rezende¹ Paula Batista de Alvarenga²
6 Carla Cristian Campos³ Estevão Vieira de Rezende⁴ Ricarda Maria dos Santos⁵
7 Marcelo José Barbosa Silva⁶ João Paulo Elsen Saut¹

8 **RESUMO**

9 As doenças uterinas e não-uterinas no pós-parto impactam na eficiência reprodutiva
10 de vacas leiteiras. No entanto, além de pouco conhecimento em relação a vacas
11 mestiças, ainda não está claro como estas enfermidades interferem negativamente
12 na fertilidade. A hipótese deste estudo foi que vacas mestiças com retenção de
13 placenta (RP) e mastite clínica no pós-parto apresentam piores índices reprodutivos
14 por estas patologias interferirem na imunidade inata endometrial e expressão de
15 receptores dos hormônios esteroidogênicos ao final do puerpério. Portanto, os
16 objetivos com este estudo foram: a) avaliar o efeito da RP e mastite clínica pós-
17 parto na eficiência reprodutiva, período de serviço e intervalo parto-primeira
18 inseminação artificial (IA) de vacas mestiças leiteiras (experimento 1); b) avaliar o
19 efeito destas doenças na imunidade inata endometrial e receptores dos hormônios
20 esteroidogênicos (experimento 2). Para o exp. 1, 232 vacas foram avaliadas e
21 divididas nos grupos saudável, RP e mastite clínica. As vacas foram inseminadas à
22 medida que se observava estro ou submetidas ao protocolo de IATF. As avaliações
23 de ocorrência das doenças se davam após o parto até o final do período voluntário
24 de espera e o diagnóstico de gestação em torno de 32 dias após IA. Para o exp. 2,
25 foram utilizadas 30 vacas, divididas em três grupos (n=10) iguais ao experimento 1.
26 Entre 40-50 dias pós-parto era realizado exame clínico, exame ginecológico e
27 coleta de amostra endometrial por *cytobrush* para citologia endometrial e expressão
28 gênica pela técnica de qRT-PCR de IL1 β , IL6, CCL5, ESR1 e PGR. No exp. 1, a
29 taxa de concepção na primeira IA e porcentagem de vacas gestantes aos 150 dias
30 foram menores em animais doentes (RP, mastite) e os dias do intervalo parto-
31 primeira IA e período de serviço foram maiores nos animais doentes. No exp. 2,
32 26,7% (8/30) dos animais apresentaram endometrite subclínica. A IL1 β apresentou
33 maior expressão nos grupos doentes, IL6 apresentou menor expressão no grupo RP

¹Laboratório de Saúde em Grandes Animais – LASGRAN. Avenida Mato Grosso, nº 3289 – Bloco 2S – Campus Umuarama - Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. CEP 38405-314.

²Docente da Faculdade Pitágoras de Uberlândia e UNIPAC Uberlândia

³Docente do Centro Universitário - UNA Uberlândia

⁴Docente do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM

⁵Docente da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV-UFU)

⁶Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM-UFU)

Email para correspondência: jpsaut@ufu.br

34 e a CCL5 não teve diferença entre os grupos. Não foi observado diferença na
35 expressão gênica dos receptores de esteroides ESR1 e PGR entre vacas doentes e
36 saudáveis. Concluiu-se que vacas com retenção de placenta e mastite clínica no
37 pós-parto apresentam piores índices reprodutivos, alteração na expressão gênica
38 endometrial das citocinas IL1 β e IL6, porém não apresentam alteração na expressão
39 de receptores dos hormônios esteroidogênicos ao final do puerpério.

40
41 **Palavras-chave:** Doença, transcrição, inflamação, puerpério

42 **ABSTRACT**

43 The postpartum uterine and non-uterine diseases impact the reproductive efficiency
44 of dairy cows. However, in addition to little knowledge regarding crossbred cows,
45 it is not yet clear how these diseases negatively affect fertility. The hypothesis of
46 this study was that crossbred cows with placenta retention (RP) and clinical mastitis
47 in the postpartum period have worse reproductive rates because these pathologies
48 interfere with endometrial innate immunity and expression of steroidogenic
49 hormone receptors at the end of the puerperium. Therefore, the objectives with this
50 study were: a) to evaluate the effect of PR and postpartum clinical mastitis on
51 reproductive efficiency, service period and interval between birth and first artificial
52 insemination (AI) of crossbred dairy cows (experiment 1); b) to evaluate the effect
53 of these diseases on innate endometrial immunity and steroidogenic hormone
54 receptors (experiment 2). For exp. 1, 232 cows were evaluated and divided into the
55 healthy, PR and clinical mastitis groups. Cows were inseminated as estrus was
56 observed or submitted to the IATF protocol. The assessments of the occurrence of
57 diseases took place after delivery until the end of the voluntary waiting period and
58 the diagnosis of pregnancy around 32 days after AI. For exp. 2, 30 cows were used,
59 divided into three groups (n = 10) equal to experiment 1. Between 40-50 days
60 postpartum clinical examination, gynecological examination and endometrial
61 sample collection by cytobrush for endometrial cytology and gene expression by
62 IL1 β , IL6, CCL5, ESR1 and PGR qRT-PCR technique. In exp. 1, the conception
63 rate in the first AI and the percentage of pregnant cows at 150 days were lower in
64 sick animals (PR, mastitis) and the days of the birth-first AI interval and service
65 period were higher in sick animals. In exp. 2, 26.7% (8/30) of the animals had
66 subclinical endometritis. IL1 β showed higher expression in sick groups, IL6
67 showed less expression in RP group and CCL5 had no difference between groups.
68 There was no difference in the gene expression of ESR1 and PGR steroid receptors
69 between sick and healthy cows. It was concluded that cows with placenta retention
70 and clinical mastitis in the postpartum period present worse reproductive indexes,
71 alteration in the endometrial gene expression of the cytokines IL1 β and IL6,
72 however, they do not present changes in the expression of steroidogenic hormone
73 receptors at the end of the puerperium.

74
75 **Key words:** Disease, transcription, inflammation, puerperium

76

77

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o segundo maior efetivo do rebanho mundial de bovinos com 213,5 milhões de cabeças. Na produção leiteira brasileira, nos últimos anos, houve aumento na produtividade de leite e queda no número de vacas ordenhadas, sendo que a produção no Brasil alcançou 33,84 bilhões de litros com 16,36 milhões de animais ordenhados (BRASIL, 2019). Com isso, é fundamental estabelecer bom desempenho reprodutivo para que haja lucratividade (STANGAFERRO; WIJMA; GIORDANO, 2019). Deste modo a rápida recuperação do período pós-parto para que o ambiente uterino possa se preparar para uma nova gestação todo ano se torna uma ferramenta importante para maximizar a produção (SHELDON, 2015).

As doenças uterinas clínicas causam grande impacto na saúde reprodutiva dos bovinos gerando como consequência a subfertilidade e infertilidade (RIBEIRO et al., 2013; SHELDON; OWENS, 2017), além de ovários císticos e fases lúteas prolongadas (OPSOMER et al., 2000). De acordo com Fourichon, Seegers, e Malher (2000), vacas com retenção de placenta (RP) apresentam aumento de dois a três dias no primeiro serviço, menor taxa de concepção que pode variar de 4% a 10%, resultando em seis a 12 dias a mais para a concepção. Buso et al. (2018) observaram 46 dias a mais no período de serviço e uma taxa de descarte de 19,4% por RP, quando comparado a vacas saudáveis, além do aumento no número de inseminações artificiais (IA) para as vacas se tornarem gestantes. Há também uma correlação da ocorrência RP com a queda na produção leiteira (DUBUC et al., 2011), chegando a 355 litros a menos nos primeiros 60 dias de lactação (SHELDON; RYCROFT; ZHOU, 2004).

A RP tem incidência variando de 4% a 8%, sendo que podem ocorrer maiores variações de acordo com o tipo de parto, nascimento de gêmeos, influência de agentes patogênicos, deficiência de vitamina E ou selênio e falhas na maturação placentária (SHELDON, 2019). A RP também predispõe o animal a outras doenças, há dados de que 25% a 50% dos animais podem vir a apresentar metrite (LEBLANC, 2008) e a ocorrência de endometrite subclínica tem 3,15 vezes mais chances (KASIMANICKAM et al., 2004).

109 Doenças não-uterinas, isto é, que não estão relacionadas ao útero, também
110 estão associadas a problemas na eficiência reprodutiva. A mastite clínica até 28 dias
111 pós-parto (DPP) atrasa a ciclicidade normal do ovário e do estro (HUSZENICZA et
112 al., 2005), reduz a taxa de crescimento do folículo ovariano (LAVON et al., 2011),
113 aumenta o número de IA, diminui as chances de prenhez na primeira IA e aumenta
114 o período de serviço (CAMPOS et al., 2020; DALANEZI et al., 2020). Outras
115 doenças como as respiratórias, digestórias e metabólicas como aumentos de ácidos
116 graxos não-esterificados (NEFA) e hipocalcemia subclínica também afetam a
117 retomada do ciclo estral e na taxa de prenhez por IA (RIBEIRO et al., 2013).
118 Ribeiro et al. (2016) demonstraram que doenças inflamatórias impactam
119 negativamente na fertilização dos ovócitos, desenvolvimento inicial do embrião e
120 que podem persistir por mais de quatro meses.

121 Ao se observar o efeito destas doenças uterinas e não-uterinas no ambiente
122 uterino, Horlock et al. (2020) mostraram que infecções uterinas alteram a expressão
123 de genes relacionados a imunidade e inflamação do ambiente uterino, no istmo,
124 ampola e das células da granulosa por até três meses após a resolução da doença.
125 Este fato reforça a ideia de que regiões do trato reprodutivo que não são afetadas
126 diretamente pela doença, tenham sua contribuição com a ocorrência de infertilidade
127 (RIBEIRO et al., 2016). Piersanti et al. (2019) verificaram que após seis semanas
128 de resolução da metrite ainda permaneciam alterações no transcriptoma da
129 granulosa de folículos dominantes e os autores acreditam que isso diminui a
130 qualidade dos oócitos e prejudica sua capacidade de desenvolvimento.

131 Campos et al. (2018) demonstraram que a mastite clínica provocou
132 importantes alterações na expressão endometrial incluindo genes envolvidos na
133 resposta imune, em moléculas de adesão celular e em vias de sinalização, assim
134 como também observado na mastite subclínica (LAVON et al., 2011) alterando a
135 expressão gênica das células da teca e granulosa.

136 A hipótese deste estudo foi que vacas com RP e mastite clínica no pós-parto
137 apresentam piores índices reprodutivos por estas patologias interferirem na
138 imunidade inata endometrial e expressão de receptores dos hormônios
139 esteroideogênicos ao final do puerpério. Portanto, os objetivos com este estudo
140 foram: a) avaliar o efeito da RP e mastite clínica pós-parto na eficiência reprodutiva

141 de vacas mestiças leiteiras (experimento 1); b) avaliar o efeito destas doenças na
142 imunidade inata endometrial e receptores dos hormônios esteroideogênicos
143 (experimento 2). Justifica-se a escolha da RP como doença uterina por ela não estar
144 mais presente ao final do puerpério e não provocar alterações clínicas evidentes por
145 tempo mais prolongado quando comparado a outras doenças uterinas, como a
146 endometrite clínica.

147

148 **2 METODOLOGIA**

149

150 Neste estudo foram realizados dois experimentos utilizando o total de 262
151 vacas mestiças Holandês x Gir oriundas de propriedades leiteiras comerciais do
152 estado de Minas Gerais, Brasil. Sendo 232 animais pertencentes à duas fazendas da
153 região do Alto Paranaíba (experimento 1) e 30 animais pertencentes à três fazendas
154 do Triângulo Mineiro (experimento 2).

155

156 **2.1 Experimento 1**

157

158 Com o primeiro o experimento objetivou-se de avaliar o efeito da RP e da
159 mastite clínica pós-parto nos índices reprodutivos. Para tanto foram utilizadas 232
160 vacas com composição genética variando de 3/4 Holandês 1/4 Gir a 7/8 Holandês
161 1/8 Gir de duas propriedades leiteiras, ambas criadas em sistema *Compost barn* no
162 período de 2017-2018. A divisão dos grupos e os respectivos critérios de inclusão
163 foram: a) grupo 1 (saudável), vacas que não apresentaram nenhuma doença
164 puerperal; b) grupo 2 (retenção de placenta – RP), vacas que não liberaram os
165 anexos fetais até 12 horas após a parição de acordo com Ferreira (2010); c) grupo 3
166 (mastite), vacas que apresentaram mastite clínica grau 1, de acordo com a definição
167 proposta por Roberson (2012), até o final do período voluntário de espera (30DPP).

168 Os animais receberam suplementação volumosa a base de silagem de milho
169 e pré-secado de Tifton 85, além do concentrado balanceado de acordo com a
170 produção leiteira, água e sal mineral *ad libitum*. A primeira fazenda com média de
171 90 vacas em lactação, com produção diária total de 2.400 litros de leite (27 kg de
172 leite/vaca/dia). A segunda fazenda possuía em média 215 animais em lactação com

173 produção diária total de 8.000 litros de leite (37 kg de leite/vaca/dia). As vacas
174 eram ordenhadas três vezes ao dia nas duas propriedades. Ambas fazendas
175 possuíam sistema de aspersão e ventilação na sala de espera da ordenha. A terapia
176 de secagem das vacas era feita aos 60 dias antes da data prevista para o parto e o
177 lote de vacas secas era mantido no *Compost Barn* recebendo dieta específica para
178 esta fase, sendo constituída de volumoso, concentrado e suplementação mineral.

179 O calendário sanitário, nas duas propriedades, obedeceu a legislação
180 sanitária estadual para bovinos contra febre aftosa e brucelose, acrescidas das
181 vacinas reprodutivas contra herpes vírus bovino 1 (BoHV-1), vírus da diarreia viral
182 bovina (BVDV), leptospirose, além de raiva e das clostridioses. As vacas também
183 eram desverminadas duas vezes ao ano, com alternância dos princípios-ativos. As
184 vacas eram tratadas com somatotropina recombinante bovina (bST) a partir dos 60
185 DPP com intervalo de 14 dias entre as aplicações, até atingirem 190 dias de
186 gestação.

187 No manejo reprodutivo, a IA era feita mediante observação de estro
188 (2x/dia), por cerca de 30 minutos. As vacas não detectadas em estro eram
189 submetidas ao seguinte protocolo de IA em tempo fixo (IATF): Dia 0- inserção do
190 dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (P4) contendo 1g desse
191 hormônio e injeção i.m. de 2,0 mg (2,0 ml) de benzoato de estradiol; Dia 7 - injeção
192 i.m. de 0,75 mg (3,0 ml) de cloprostenol sódico (PGF2 α); Dia 9 - injeção i.m. de
193 1,0 mg (0,5 ml) de cipionato de estradiol, de 0,5 mg (2,0 ml) de cloprostenol sódico
194 e retirada do dispositivo de P4; Dia 11 - IATF. As avaliações reprodutivas eram
195 feitas semanalmente nas propriedades com auxílio de aparelho de ultrassonografia
196 equipado com transdutor retal linear de 7,5-MHz (Mindray® modelo DP-2200
197 VET). As fêmeas diagnosticadas com doença pós-parto eram avaliadas
198 independente dos dias em lactação. O diagnóstico de gestação era realizado 32 ± 4
199 dias após a IA.

200 As variáveis avaliadas neste experimento foram a taxa de concepção na
201 primeira IA e porcentagem de vacas gestantes aos 150 dias pós-parto, o intervalo
202 parto-primeira IA e o período de serviço.

203

204 2.2 Experimento 2

205 No segundo experimento objetivou-se avaliar a influência da RP e mastite
206 clínica pós-parto na imunidade inata endometrial e nos receptores esteroidogênicos.
207 Para tanto foram utilizadas 30 vacas leiteiras mestiças Holandês x Gir de três
208 propriedades no período de 08/2019 - 02/2020. A divisão e critérios de inclusão
209 foram semelhantes ao experimento 1, ou seja: a) grupo 1 (saudável), dez vacas que
210 não apresentaram nenhuma doença puerperal; b) grupo 2 (RP), dez vacas que não
211 liberaram os anexos fetais até 12 horas após a parição (FERREIRA, 2010); c) grupo
212 3 (mastite), dez vacas que apresentaram mastite clínica grau 1 após o parto
213 (ROBERSON, 2012) até o final do período voluntário de espera (30DPP).

214 Os animais recebiam suplementação volumosa a base de silagem de milho,
215 além do concentrado balanceado, água e sal mineral *ad libitum*. A fazenda 1 com
216 média de 280 vacas em lactação, com produção diária total de 7500 litros de leite
217 (27 kg de leite/vaca/dia). A fazenda 2 com média de 270 vacas em lactação, com
218 produção diária total de 6000 litros de leite (22 kg de leite/vaca/dia). E a fazenda 3
219 com média de 195 animais em lactação, com produção diária total de 4200 litros de
220 leite (22 kg de leite/vaca/dia). Nas três fazendas, as vacas eram ordenhadas duas
221 vezes ao dia, a terapia de secagem das vacas executada aos 60 dias antes da data
222 prevista para o parto com dieta específica para esta fase, constituída de silagem de
223 capim. O calendário sanitário obedeceu a legislação sanitária estadual para bovinos,
224 além da vermifugação. As vacas eram tratadas com bST a partir dos 60 DPP com
225 intervalo de 14 dias entre as aplicações, até atingirem 190 dias de gestação.

226 Entre 40 e 50 DPP foi realizado o exame clínico, exame ginecológico e
227 coleta de amostra endometrial por meio da técnica de escova endometrial
228 (*citobrush*), para avaliação da expressão gênica através da técnica de reação em
229 cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR) e citologia endometrial.

230 **2.2.1 Exame físico geral e específico do sistema genital feminino**

231 No momento da coleta as vacas eram examinadas clinicamente quanto à
232 saúde geral e parâmetros vitais de acordo com Feitosa (2008). Apenas vacas
233 clinicamente saudáveis no exame proposto foram inseridas no estudo. O ECC foi
234 avaliado no momento da coleta, numa escala de 1 a 5 pontos e subunidades de 0,25
235 (EDMONSON et al., 1989). O exame específico do sistema genital foi realizado
236 pela palpação retal e avaliação ultrassonográfica dos cornos uterinos para avaliação

237 da saúde uterina e do fluido intrauterino (FIU), além da avaliação das
238 características da secreção vaginal por meio do aparelho Metrichick®
239 (MCDUGALL; MACAULAY; COMPTON, 2007; SHELDON; CRONIN;
240 BROMFIELD, 2019).

241 Em seguida, realizou-se a coleta de células endometriais pela técnica de
242 esfregação endometrial *cytobrush* (KASIMANICKAM et al., 2004) para a confecção
243 de lâmina para avaliação citológica e para realização da qRT-PCR. Esta técnica
244 consiste na adaptação de uma escova cervical descartável (labor import®) na ponta
245 de um aplicador de sêmen de aço inoxidável. Esse instrumento foi protegido por
246 uma bainha para inseminação e camisa sanitária que eram trocados para cada
247 animal e o aplicador de inox era higienizado. Dessa forma, o *cytobrush* destinado a
248 realização do qRT-PCR após a coleta foi armazenado em tubo criogênico estéril
249 com tampa de rosca livre de DNase, RNase e metais pesados. No momento da
250 coleta as amostras foram armazenadas em botijão de transporte de nitrogênio
251 líquido com capacidade para 1 litro e, posteriormente, armazenado em ultrafreezer
252 vertical a -80° C. O *cytobrush* para a lâmina de citologia após a confecção da
253 mesma foi descartado.

254 As lâminas de citologia endometrial foram coradas utilizando o kit Panótico
255 rápido (Laborclin®, Pinhais, Brasil), conforme recomendações do fabricante. A
256 leitura foi feita em microscópio óptico no aumento de 40X. Foram contadas 100
257 células e registrado o percentual de polimorfonucleares (PMNs) e células epiteliais.
258 A porcentagem de neutrófilos foi definida de acordo com Gilbert et al. (2005), ou
259 seja, uma proporção maior ou igual a 5% foi considerada endometrite subclínica.

260

261 **2.2.2 Técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT- 262 PCR)**

263 As extrações de RNAs das amostras de *cytobrush* endometrial foram
264 realizadas no aparelho Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA)
265 juntamente com o kit de extração de RNA de tecido Maxwell® 16 LEV simply
266 RNA Tissue Kit (Referência: AS1280, Promega, Madison, WI, USA). Todas as
267 etapas seguiram as recomendações do fabricante, bem como foram utilizadas todas
268 as soluções disponíveis no kit.

269 Aos tubos criogênicos contendo os *cytobrush* foram adicionados 200 µl de
270 solução de homogeneização e agitadas em vórtex para recuperar a secreção
271 endometrial do *cytobrush*. Em seguida foram adicionados 200 µl de tampão de lise
272 e foram agitadas em vórtex novamente. Os sobrenadantes foram coletados e
273 colocados nas *cartridges* (rack descartável disponível no kit). As *cartridges* foram
274 preparadas, utilizando todos os reagentes e posteriormente inseridas no aparelho
275 Maxwell® 16 Instrument para extração dos RNAs. Após essa etapa, o RNA total
276 foi quantificado no Quantus™ Fluorometer utilizando o kit QuantiFluor® RNA
277 System (Referência: E3310, Promega, Madison, WI, USA), conforme
278 recomendações do fabricante.

279 A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit GoScript™ Reverse
280 Transcription System (Referência: A5001, Promega, Madison, WI, USA). Todas as
281 etapas foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.
282 Inicialmente 5µl de Mix qDNA Removal foi previamente preparado com 10 µl da
283 respectiva amostra. Posteriormente essa mistura foi colocada no termociclador para
284 a primeira incubação. Enquanto isso o RT Mix foi preparado para ser misturado nos
285 tubos das amostras e incubados em termociclador novamente para a desnaturação
286 da enzima transcriptase reversa. Ao final, o cDNA de cada amostra foi quantificado
287 no Quantus™ Fluorometer utilizando o kit Quantifluor™ ssDNA System
288 (Referência: E3190, Promega, Madison, WI, USA), respeitando as indicações do
289 fabricante e armazenado em freezer a -20°C até a utilização em PCR em tempo
290 real.

291 A quantificação da expressão relativa dos genes que codificam os
292 mediadores pró-inflamatórios IL1β, IL6, quimiocina CCL5, receptores dos
293 hormônios esteroideogênicos ESR1 (receptor de estrogênio α) e PGR foram
294 realizados no aparelho Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Applied
295 Biosystems, Foster, CA, USA), por meio do método comparativo de threshold
296 cycles (Ct). Foi utilizado o gene GAPDH como controle. A placa utilizada foi a de
297 96 poços Axygen® PCR-96 AB-C (Axygen 214 Scientific, Union City, CA, USA)
298 e as amplificações foram conduzidas em duplicata. As condições da reação foram
299 determinadas em ciclos previamente padronizados de 50°C por 2 min, 95°C por 2

300 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, totalizando 2
301 horas.

302 Para a reação, utilizou-se o kit Quantinova™ Sybr® Green PCR, as
303 proporções dos reagentes utilizados no mix para cada amostra foram as seguintes:
304 5µl de sybr green PCR Master MIX, 1,0 µl de QN ROX Reference Dye, 0,2µl de
305 primer forward, 0,2µl de primer reverse, 1,6µl de água livre de RNase e 2,0µl de
306 cDNA na concentração de 35ng/µl, totalizando 10µl de reação. Os primers
307 utilizados para amplificar os genes IL1β, IL6, quimiocina CCL5, receptores dos
308 hormônios esteroidogênicos ESR1 e PGR estão na tabela 1. O gene endógeno
309 selecionado foi o GAPDH, pois é expresso de forma estável em várias células
310 (VANDESOMPELE et al., 2002) e também em tecido uterino (WATHES et al.,
311 2009).

312

313 2.3 Análise Estatística

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

319 No experimento 1, para as variáveis qualitativas (taxa de concepção a
320 primeira IA e porcentagem de vacas gestantes aos 150 dias) utilizou-se o teste de
321 qui-quadrado e nas variáveis quantitativas (intervalo parto – primeira IA e período
322 de serviço) realizou-se o Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados
323 apresentavam ou não distribuição paramétrica. As variáveis com distribuição
324 paramétrica foram submetidas à análise de variância (ANOVA paramétrica) e pós-
325 teste de Comparação Múltipla de Bonferroni. As variáveis com distribuição não-
326 paramétrica foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis (Anova não-
327 paramétrica) e pós-teste de Comparação Múltipla de Dunn's. A significância
328 estatística foi estabelecida como $P \leq 0,05$.

329 No experimento 2, as variáveis quantitativas foram submetidas ao Teste de
330 Kolmogorov-Smirnov para verificar se apresentavam ou não distribuição
331 paramétrica. As variáveis com distribuição paramétrica foram submetidas à análise

332 de variância (ANOVA paramétrica) e pós-teste de Comparação Múltipla de
333 Bonferroni. As variáveis com distribuição não-paramétrica foram analisadas pelo
334 teste de Kruskal-Wallis (Anova não-paramétrica) e pós-teste de Comparação
335 Múltipla de Dunn's. A significância estatística foi estabelecida como $P \leq 0,05$.

336

337 **3 RESULTADOS**

338

339 **3.1 Efeito da retenção de placenta e mastite clínica nos índices** 340 **reprodutivos (experimento 1)**

341 Das 232 vacas avaliadas, 79,3% (184/232) permaneceram saudáveis durante
342 o experimento e 20,7% (48/232) apresentaram alguma das duas doenças pós-parto.
343 Das 48 vacas que adoeceram 9,5% (22/232) apresentaram casos de RP e 11,2%
344 (26/232) apresentaram mastite clínica.

345 O efeito da RP e mastite clínica nos índices intervalo parto-primeira IA e o
346 período de serviço está apresentado na figura 1. A RP e mastite clínica
347 apresentaram maior intervalo parto-primeira IA em comparação com vacas
348 saudáveis ($P < 0,0001$). As médias para animais saudáveis, RP e mastite foram $51,3$
349 $\pm 12,8$ dias, $63,4 \pm 14,3$ dias e $62,4 \pm 14,8$ dias, respectivamente (Figura 1A).
350 Também foi detectado efeito das doenças para o período de serviço ($P < 0,0001$)
351 sendo as médias para animais saudáveis, RP e mastite $86,3 \pm 65,0$ dias, $117,1 \pm$
352 $41,9$ dias e $144,4 \pm 79,5$ dias, respectivamente (Figura 1B).

353 Verificou-se redução significativa ($P = 0,0062$) na taxa de concepção na
354 primeira IA dos grupos de vacas doentes comparados ao grupo de vacas saudáveis.
355 Fêmeas saudáveis tiveram uma taxa de concepção a primeira IA de 41,3%, vacas
356 com RP e mastite clínica apresentaram concepção de 13,6% e 19,2%,
357 respectivamente (Tabela 2). Aos 150 dias de lactação, 92,4% e 86,4%,
358 respectivamente, das vacas saudáveis e RP já estavam gestantes. Em contrapartida,
359 das vacas que desenvolveram mastite clínica somente 53,8%, estavam gestantes aos
360 150 dias (Tabela 2).

361

3.2 Influência da retenção de placenta e mastite clínica na imunidade inata endometrial e receptores de hormônios esteroidogênicos (experimento 2)

3.2.1 Parâmetros vitais e condição corporal dos animais

Todas as vacas estavam aparentemente saudáveis de acordo com o exame clínico realizado. Os parâmetros vitais e ECC estão apresentados na Tabela 3.

3.2.1 Citologia endometrial

Dos 30 animais avaliados, 26,7% (8/30) apresentaram endometrite subclínica (*neutrófilos* > 5%) na leitura das lâminas de citologia endometrial. Dentro de cada grupo, 10% (1/10) foram pertencentes ao grupo saudável, 40% (4/10) ao grupo RP e 30% (3/10) ao grupo mastite clínica.

3.2.2 Expressão das interleucinas 1 β , 6 e CCL5 no endométrio bovino de fêmeas mestiças

As médias das expressões dos genes IL1 β , IL6 e CCL5 estão apresentadas na Figura 2. A expressão de mRNA do IL1 β foi maior nos grupos com RP e mastite clínica em relação ao grupo saudável ($P=0,0234$), não existindo diferença entre os grupos de doenças (Figura 2A). A expressão de mRNA de IL6 foi menor no grupo com RP diferindo dos grupos controle e mastite ($P=0,043$) (Figura 2B). Já a expressão de mRNA de CCL5 não teve diferença entre os três grupos ($P=0,2623$) (Figura 2C). As médias das expressões dos genes IL1 β , IL6 e CCL5 estão apresentadas na Figura 2.

3.2.3 Expressão dos receptores de estrogênio α e de progesterona no endométrio bovino de fêmeas mestiças

A média da expressão de ambos os receptores de esteróides, PGR ($P=0,924$) e ESR1 ($P=0,1965$), não foi afetada pela presença ou ausência das doenças avaliadas neste estudo. As expressões dos receptores de hormônios esteroidogênicos ESR1 e PGR estão apresentadas na Figura 3.

4 DISCUSSÃO

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

Este estudo foi capaz de testar algumas hipóteses relacionadas a subfertilidade ou infertilidade em vacas leiteiras doentes no pós-parto e, principalmente, reforçar que este efeito ocorre de maneira semelhante em vacas mestiças dos cruzamentos oriundos de Gir x Holstein, que representam a grande maioria de vacas ordenhadas no Brasil (ABCG, 2011). Este estudo corroborou com diversos trabalhos na literatura que mostram o impacto das doenças e das inflamações na eficiência reprodutiva de vacas leiteiras e seus efeitos no endométrio a longo prazo na reprodução (CARVALHO et al., 2019; HORLOCK et al., 2020; RIBEIRO et al., 2013, 2016; RIBEIRO; CARVALHO, 2017).

405

406

407

408

409

410

411

412

A incidência de RP no experimento 1 (9,48%) foi semelhante a apresentada por Pandit (1981) na Índia (8,9%) em vacas Gir e seus cruzamentos e, inferior as relatadas por Buso et al. (2018) de 14,5% em vacas Girolando, por Nobre et al. (2012) de 12,8% em vacas mestiças holandês zebu, Fernandes et al. (2000) de 12,9% em vacas holandesas e Rezende, Campos e Santos (2013) que relataram 13,75% de RP em vacas holandesas. Islam et al. (2012) citam que a raça tem influência direta na ocorrência de RP, sendo que vacas mestiças indianas tiveram as maiores incidências (10,5%) quando comparadas as indianas puras (2,7%).

413

414

415

A incidência de mastite clínica neste estudo foi semelhante a apresentada por Ribeiro et al. (2013) em vacas leiteiras mestiças (12,9%) e Ribeiro et al. (2016) em vacas Holandesas (10,6%).

416

417

418

419

420

421

422

423

424

Em nosso estudo, ao se analisar a taxa de prenhez na primeira IA observou-se uma queda na média de até 27% na concepção a primeira IA em vacas com RP e de até 22% em vacas com mastite clínica, demonstrando os efeitos negativos desses processos inflamatórios na eficiência reprodutiva de vacas mestiças leiteiras. Buso et al. (2018) relataram que RP em vacas Girolando prolongou o período de serviço, sendo 46 dias mais longo do que para vacas saudáveis. Em contrapartida, endometrite subclínica não afetou a taxa de concepção a primeira IA e na porcentagem de gestação aos 150 dias em vacas Girolando (CARNEIRO et al., 2014).

425

426

Os efeitos negativos das doenças na eficiência reprodutiva são multifatoriais e ainda necessitam de maiores esclarecimentos (BROMFIELD et al., 2015;

427 RIBEIRO et al., 2016; SHELDON, 2019). Segundo Bromfield et al. (2015) e
428 Karsch et al. (2002), as doenças, em virtude da presença do patógeno e ativação da
429 resposta imune, provocam alterações nas vias necessárias para a função ovariana e,
430 desta forma, causam um impacto negativo na fertilidade, como atraso no
431 crescimento do folículo dominante, redução na liberação de GnRH e pulsatilidade
432 do LH e alteram a síntese endometrial de PGF2 α para PGE2. As interleucinas como
433 a IL6 e a TNF- α perturbam a esteroidogênese das células foliculares dos ovários de
434 vacas (ALPIZAR; SPICER, 1994; SPICER, 1998) e a IL1 β infundida
435 intracerebroventriculamente por 4 a 6 dias causa interrupção total do ciclo estral e
436 inibição da ativação de neurônios GnRH em ratos (RIVEST; RIVIER, 1993), além
437 da diminuição e até mesmo bloqueando a liberação de LH e FSH (KALRA; SAHU;
438 KALRA, 1990; RIVESTT et al., 1993).

439 Além disso, as doenças inflamatórias, sejam elas uterinas ou não-uterinas,
440 podem provocar alterações significativas nas expressões de importantes genes
441 envolvidos na resposta imune endometrial, como em moléculas de adesão celular e
442 de vias de sinalização. Campos et al. (2018) demonstraram estes efeitos com
443 infusões experimentais intramamárias de lipopolissacarídeos (LPS) em vacas
444 Holandesas e Ribeiro et al. (2016) em genes estimulados por interferon (ISG) em
445 leucócitos de sangue periféricos.

446 Em nosso estudo, os efeitos negativos da RP e mastite clínica no intervalo
447 parto – primeira IA e no período de serviço foram notórios nas vacas mestiças.
448 Houve comprometimento do desempenho reprodutivo provocado pelas doenças,
449 aumentando o tempo para se tornarem gestantes. Esses resultados corroboraram
450 com outros estudos a campo que mostram o efeito negativo da mastite clínica na
451 eficiência reprodutiva de vacas Holandesas aumentando as chances de
452 reinseminação em 20% quando mastite ocorreu antes da primeira IA, reduzindo
453 números de IA por concepção de 50% para até 20% e apresentando dias em aberto
454 de 84 dias para até 160 dias (CAMPOS et al., 2020; DAHL et al., 2017; HUDSON
455 et al., 2012; REMNANT et al., 2019).

456 Os resultados do experimento 2 evidenciaram uma ocorrência de 26,7% dos
457 animais apresentando endometrite subclínica, semelhante ao descrito por Buso et al.
458 (2018) de 27,49% de endometrite subclínica em 462 vacas leiteiras Girolando na

459 mesma região do presente estudo (Minas Gerais). Esses valores são menores que os
460 encontrados em vacas Holandesas com 40-60 DPP por Gilbert et al. (2005) de 53%
461 de prevalência ($n=141$) e semelhantes aos encontrados por Cheong et al. (2011) que
462 encontraram 25% de vacas Holandesas com endometrite subclínica ($n=779$) com
463 40-60 DPP.

464 A expressão da quimiocina CCL5 foi semelhante entre os grupos com e sem
465 doença uterina/não-uterina e do gene IL6 foi significativamente menor no grupo
466 RP. Porém, a expressão de IL1 β foi significativamente maior em grupos de vacas
467 doentes comparado ao grupo saudável. Esse último achado corrobora com o
468 resultado apresentado por Fischer et al. (2010) que trabalharam com um grupo de
469 vacas Holandesas saudáveis ($n=9$), com endometrite clínica ($n=9$) e subclínica
470 ($n=9$) e observaram diferença na expressão de IL1 β em vacas saudáveis em
471 comparação com vacas com endometrite clínica ou subclínica, aumentando em
472 vinte e 5 vezes mais a expressão na endometrite subclínica e clínica,
473 respectivamente. A IL1 β é uma citocina importante, pois ativa células vasculares
474 endoteliais, promove infiltração de células inflamatórias (DINARELLO, 2002) e
475 estimula a liberação de proteínas de fase aguda como haptoglobina, proteína
476 amiloide sérica A, ceruloplasmina e proteína C reativa pelo fígado (HEINRICH;
477 CASTELL; ANDUS, 1990).

478 No presente estudo, as coletas foram feitas em uma média de 45 dias pós-
479 parto, diferentemente de Fischer et al. (2010) que realizaram coletas mais recentes
480 no puerpério (21-27 DPP), demonstrando que os efeitos na expressão da IL1 β pode
481 se estender por mais tempo após o evento doença. Fagundes et al. (2019)
482 verificaram que não houve diferenças nas expressões da quimiocina CCL5 em
483 vacas comparando regiões carunculares e intercarunculares do epitélio endometrial
484 em graus de inflamação ausente e leve, porém a expressão foi maior nos
485 endométrios com inflamação grave quando comparados aos grupos sem e com
486 inflamação leve. Em nosso estudo não houve diferença na expressão da quimiocina
487 CCL5 entre os três grupos estudados.

488 O efeito persistente da doença no endométrio foi muito bem evidenciado por
489 Horlock et al. (2020), que verificaram que, mesmo após três meses da infusão
490 experimental de agentes patogênicos *Escherichia coli* ou *Trueperella pyogenes* no

491 útero de novilhas, ainda permaneciam alterações no transcriptoma do endométrio e
492 em regiões distantes da infecção. Esses autores acreditam que várias regiões do
493 trato reprodutivo possam contribuir com a infertilidade observada após a doença
494 uterina. Horlock et al. (2020) também verificaram poucas transcrições para IL6,
495 semelhante ao observado no presente estudo.

496 Na pesquisa de Ishikawa et al. (2004), avaliando vacas dois meses antes e
497 depois do parto, observaram que vacas holandesas com RP apresentaram
498 concentrações sanguíneas de IL6 menores que o grupo normal, semelhante ao
499 presente estudo em que o grupo RP teve menores expressões de IL6 em relação ao
500 grupo saudável. Esses autores acreditam que níveis sanguíneos pré-parto reduzidos
501 de IL6 sejam uma ferramenta para prever RP após o parto.

502 Há trabalhos na literatura que relatam a supressão pela progesterona de
503 diversas citocinas e outras moléculas imunoestimulatórias no útero, como a
504 prostaglandina F2alfa (PGF2 α), óxido nítrico, IL8, IL6, IL12 e leucotrieno B4
505 (LEWIS; WULSTER-RADCLIFFE, 2006; SEALS; WULSTER-RADCLIFFE;
506 LEWIS, 2002; WULSTER-RADCLIFFE; SEALS; LEWIS, 2003). Entretanto,
507 pouco se conhece sobre o efeito da doença intra-uterina e extra-uterina na expressão
508 gênica dos receptores de esteroides ESR1 e PGR, sendo que neste estudo não se
509 observou interferência do fator doença na expressão destes receptores em vacas
510 mestiças.

511 De forma geral, os dados mais recentes da literatura são consistentes em
512 mostrar que as doenças uterinas interferem na reprodução. As doenças uterinas
513 estão associadas a alterações no transcriptoma da granulosa e na qualidade dos
514 oócitos (PIERSANTI et al., 2019). Vacas com endometrite clínica induzida tem
515 oócitos com menores capacidades de atingir o estágio de mórula após a fertilização
516 *in vitro* (FIV) (DICKSON et al., 2020). Além disso, Piersanti et al. (2020)
517 demonstraram que em até 60 dias após a infecção por endometrite clínica
518 experimental foram encontradas alterações no transcriptoma de oócitos e
519 correlações negativas com a expressão endometrial de IL6, afetando a capacidade
520 de desenvolvimento dos oócitos. Os resultados encontrados no presente estudo
521 (exp.1) mostraram que vacas leiteiras mestiças Gir x Holandês, que apresentam
522 doenças uterinas ou extra-uterinas, apresentam baixa eficiência reprodutiva

523 semelhante ao reportado em vacas leiteiras especializadas da raça Holandesa. Além
524 disso, observaram-se alterações persistentes no ambiente endometrial (exp.2),
525 avaliadas ao final do puerpério, sugerindo que este possa ser um dos fatores que
526 contribuem negativamente na eficiência reprodutiva destes animais.

527 Na avaliação do efeito das doenças (RP, mastite clínica) estudadas no
528 endométrio, as principais diferenças foram observadas na expressão gênica da
529 citocina IL1 β e IL6, no entanto, entende-se que para uma melhor compreensão
530 destes eventos, um número maior de mediadores inflamatórios e receptores devem
531 ser avaliados. Diante dessas informações poder-se-á propor novas terapias e
532 prevenções para uma melhora nos índices reprodutivos e fertilidade de vacas em
533 propriedades leiteiras. Além disso, compreender melhor por quanto tempo após o
534 parto ainda ocorre esse efeito negativo no ambiente uterino.

535

536 **5 CONCLUSÕES**

537

538 Concluiu-se que vacas com retenção de placenta e mastite clínica no pós-
539 parto apresentam piores índices reprodutivos, alteração na expressão gênica
540 endometrial das citocinas IL1 β e IL6 e não apresentam alteração na expressão de
541 receptores dos hormônios esteroideogênicos ao final do puerpério.

542

543 **AGRADECIMENTOS**

544 Os autores agradecem as propriedades leiteiras e seus funcionários, por cederem
545 seus animais para o estudo, ao Laboratório de Nanobiotecnologia (NANO BIO),
546 Laboratório de Reprodução Animal, Laboratório de Osteoimunologia e Imunologia
547 dos Tumores e Laboratório de Biotecnologia Animal (LABIO) da Universidade
548 Federal de Uberlândia, por cederam o espaço e os equipamentos para realização das
549 análises, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais –
550 FAPEMIG, ao apoio financeiro aprovado (Demanda Universal - 01/2016 processo
551 APQ-01 199-16 – R.M. Santos), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
552 Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudos concedida (O.P. Ramos) e ao CNPq
553 pela bolsa produtividade (J.P.E. Saut). O presente trabalho foi realizado com apoio
554 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil
555 (CAPES) - Código de Financiamento 001.

556

557 **Declaração de conflito de interesses**

558 Não há conflito de interesses a declarar.

559

560 **Contribuição dos autores**

561 Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do
562 manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a
563 versão final.

564

565 **Aprovação do comitê de ética e biossegurança**

566 O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
567 Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo 003/17.

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

REFERÊNCIAS

582

583

584 ALPIZAR, E.; SPICER, L. J. Effects of Interleukin-6 on Proliferation and Follicle-
585 Stimulating Hormone-Induced Estradiol Production by Bovine Granulosa Cells in
586 Vitro: Dependence on Size of Follicle1. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 1, p.
587 38–43, 1994. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.1.38>

588

589 BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Produção da**
590 **pecuária municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em:
591 [https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/9130d7d3e67](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/9130d7d3e67662a2277b97bde61a52d0.pdf)
592 [662a2277b97bde61a52d0.pdf](https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/9130d7d3e67662a2277b97bde61a52d0.pdf). Acesso em: 02 04 2020

593

594 BROMFIELD, J. J. et al. Physiology and endocrinology symposium: Uterine
595 infection: Linking infection and innate immunity with infertility in the high-
596 producing dairy cow. **Journal Animal Science**, v. 93, n. 5, p. 2021–2033, 2015.
597 <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8496>

598

599 BUSO, R. R. et al. Retenção de placenta e endometrite subclínica: prevalência e
600 relação com o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras mestiças. **Pesquisa**
601 **Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 1–5, 2018. [https://doi.org/10.1590/1678-](https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4707)
602 [5150-pvb-4707](https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4707)

603

604 CAMPOS, C. C. et al. Intramammary infusion of lipopolysaccharide promotes
605 inflammation and alters endometrial gene expression in lactating Holstein cows.
606 **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 10440–10455, 2018.
607 <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14393>

608

609 CAMPOS, C. C. et al. Effects of clinical mastitis and puerperal diseases on
610 reproductive efficiency of dairy cows. **Tropical Animal Health and Production**,
611 p. 1–8, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02326-2>

612

613 CARNEIRO, L. C. et al. Incidence of subclinical endometritis and its effects on
614 reproductive performance of crossbred dairy cows. **Tropical Animal Health and**
615 **Production**, v. 46, n. 8, p. 1435–1439, 2014. [https://doi.org/10.1007/s11250-014-](https://doi.org/10.1007/s11250-014-0661-y)
616 [0661-y](https://doi.org/10.1007/s11250-014-0661-y)

617

618 CARVALHO, M. R. et al. Long-term effects of postpartum clinical disease on milk
619 production, reproduction, and culling of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.
620 102, n. 12, p. 11701–11717, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17025>

621

622 CHEONG, S. H. et al. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical
623 endometritis in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 2, p.
624 762–770, 2011. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3439>

625

626 DAHL, M. O. et al. Evidence that mastitis can cause pregnancy loss in dairy cows:
627 A systematic review of observational studies. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n.
628 10, p. 8322–8329, 2017. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12711>

629

- 630 DALANEZI, F. M. et al. Influence of pathogens causing clinical mastitis on
631 reproductive variables of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 4, p.
632 3648–3655, 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16841>
633
- 634 DICKSON, M. J. et al. Experimentally induced endometritis impairs the
635 developmental capacity of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, 2020.
636 <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa129>
637
- 638 DINARELLO, C. A. The IL-1 family and inflammatory diseases. **Clinical and**
639 **Experimental Rheumatology**, v. 20, p. S1–S13, 2002.
640
- 641 DUBUC, J. et al. Effects of postpartum uterine diseases on milk production and
642 culling in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1339–1346, 2011.
643 <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3758>
644
- 645 EDMONSON, A. J. et al. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy
646 Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 68–78, 1989.
647 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79081-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79081-0)
648
- 649 FAGUNDES, N. S. et al. Short communication: Proinflammatory gene expression
650 relative to the collection technique of endometrial samples from cows with and
651 without subclinical endometritis. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 6, p. 5511–
652 5517, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15212>
653
- 654 FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: A arte do diagnóstico**. São Paulo,
655 SP: Editora Roca, 2008.
656
- 657 FERNANDES, C. A. DE C. et al. Variação sazonal da incidência de retenção de
658 placenta em rebanhos leiteiros no sul do Estado de Minas Gerais. **Revista**
659 **Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 179–181, 2000.
660 <https://doi.org/10.4322/rbcv.2015.209>
661
- 662 FERREIRA, A. M. **Reprodução da fêmea bovina: fisiologia aplicada e**
663 **problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. 1^a ed. Juiz de Fora, MG: Edição
664 do Autor, 2010.
665
- 666 FISCHER, C. et al. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine
667 endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in
668 case of subclinical or clinical endometritis. **Reproduction, Fertility and**
669 **Development**, v. 22, n. 5, p. 818–829, 2010. <https://doi.org/10.1071/RD09120>
670
- 671 FOURICHON, C., SEEGER, H., MALHER, X. Effect of disease on reproduction
672 in the dairy cow: a meta-analysis. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1729–1759, 2000.
673 [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00311-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00311-3)
674
- 675 GILBERT, R. O. et al. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive
676 performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p. 1879–1888, 2005.
677 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.022>

- 678
679 HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase
680 response. **Biochemical Journal**, v. 265, n. 3, p. 621–636, 1990.
681 <https://doi.org/10.1042/bj2650621>
682
- 683 HORLOCK, A. D. et al. Uterine infection alters the transcriptome of the bovine
684 reproductive tract three months later. **Reproduction**, v. 160, n. 1, p. 93–107, 2020.
685 <https://doi.org/10.1530/REP-19-0564>
686
- 687 HUDSON, C. D. et al. Associations between udder health and reproductive
688 performance in United Kingdom dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7,
689 p. 3683–3697, 2012. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4629>
690
- 691 HUSZENICZA, G. et al. Effects of clinical mastitis on ovarian function in post-
692 partum dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 3, p. 199–204,
693 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00571.x>
694
- 695 ISHIKAWA, Y. et al. Changes in interleukin-6 concentration in peripheral blood of
696 pre- and post-partum dairy cattle and its relationship to postpartum reproductive
697 diseases. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 11, p. 1403–1408,
698 2004. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.1403>
699
- 700 ISLAM, M. et al. Incidence of Retained Placenta in Relation with Breed, Age,
701 Parity and Body Condition Score of Dairy cows. **International Journal of Natural**
702 **Sciences**, v. 2, n. 1, p. 15–20, 2012. <https://doi.org/10.3329/ijns.v2i1.10878>
703
- 704 KALRA, P. S.; SAHU, A.; KALRA, S. P. Interleukin-1 inhibits the ovarian steroid-
705 induced luteinizing hormone surge and release of hypothalamic luteinizing
706 hormone-releasing hormone in rats. **Endocrinology**, v. 126, n. 4, p. 2145–2152,
707 1990. <https://doi.org/10.1210/endo-126-4-2145>
708
- 709 KARSCH, F. J. et al. Mechanisms for ovarian cycle disruption by
710 immune/inflammatory stress. **Stress**, v. 5, n. 2, p. 101–112, 2002.
711 <https://doi.org/10.1080/10253890290027868>
712
- 713 KASIMANICKAM, R. et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the
714 detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v.
715 62, n. 1–2, p. 9–23, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.03.001>
716
- 717 LAVON, Y. et al. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid
718 concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. **Domestic**
719 **Animal Endocrinology**, v. 40, n. 2, p. 98–109, 2011.
720 <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.09.004>
721
- 722 LEBLANC, S. J. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive
723 performance: A review. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 102–114, 2008.
724 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.019>
725

- 726 LEWIS, G. S.; WULSTER-RADCLIFFE, M. C. Prostaglandin F2a Upregulates
727 Uterine Immune Defenses in the Presence of the Immunosuppressive Steroid
728 Progesterone. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 56, n. 2, p.
729 102–111, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2006.00391.x>
730
- 731 MCDOUGALL, S.; MACAULAY, R.; COMPTON, C. Association between
732 endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive
733 performance in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1–2, p. 9–23,
734 2007. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.017>
735
- 736 NOBRE, M. M. et al. Evaluation of incidence rate and risk factors of retained
737 placenta of crossbred dairy cattle. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e**
738 **Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 101–107, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000100015>
739
- 740
- 741 OPSOMER, G. et al. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high
742 producing dairy cows in Belgium: a field study. **Theriogenology**, n. 53, p. 1–29,
743 2000. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00234-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00234-X)
744
- 745 PANDIT, R. K. Incidence of retention of placenta in Gir cows and their crosses
746 with special reference to subsequent fertility. **Indian Journal of Animal Sciences**,
747 v. 51, p. 505–507, 1981.
748
- 749 PIERSANTI, R. L. et al. Persistent effects on bovine granulosa cell transcriptome
750 after resolution of uterine disease. **Reproduction**, v. 158, n. 1, p. 35–46, 2019.
751 <https://doi.org/10.1530/REP-19-0037>
752
- 753 PIERSANTI, R. L. et al. Uterine infusion of bacteria alters the transcriptome of
754 bovine oocytes. **FASEB BioAdvances**, 2020. <https://doi.org/10.1096/fba.2020-00029>
755
- 756
- 757 REMNANT, J. et al. Association of lameness and mastitis with return-to-service
758 oestrus detection in the dairy cow. **Veterinary Record**, v. 185, n. 14, p. 442, 2019.
759 <https://doi.org/10.1136/vr.105535>
760
- 761 REZENDE, E. V.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Incidência da retenção de
762 placenta e as consequências na produção de leite e na eficiência reprodutiva de
763 vacas holandesas. **Acta Scient. Vet**, v. 41, p. 1170–1175, 2013.
764
- 765 RIBEIRO, E. S. et al. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility
766 of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. **Journal**
767 **of Dairy Science**, v. 96, n. 9, p. 5682–5697, 2013. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6335>
768
- 769
- 770 RIBEIRO, E. S. et al. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on
771 developmental biology and fertility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy**
772 **Science**, v. 99, n. 3, p. 2201–2220, 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10337>
773

- 774 RIBEIRO, E. S.; CARVALHO, M. R. Impact and mechanisms of inflammatory
775 diseases on embryonic development and fertility in cattle. **Animal Reproduction**,
776 v. 14, n. 3, p. 589–600, 2017. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR1002>
777
- 778 RIVEST, S.; RIVIER, C. Interleukin-1 β inhibits the endogenous expression of the
779 early gene c-fos located within the nucleus of LH-RH neurons and interferes with
780 hypothalamic LH-RH release during proestrus in the rat. **Brain Research**, v. 613,
781 n. 1, p. 132–142, 1993. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90463-W](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90463-W)
782
- 783 RIVESTT, S. et al. The chronic intracerebroventricular infusion of interleukin-1 β
784 alters the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of cycling rats. I.
785 Effect on LHRH and gonadotropin biosynthesis and secretion. **Endocrinology**, v.
786 133, n. 6, p. 2424–2430, 1993. <https://doi.org/10.1210/endo.133.6.8243260>
787
- 788 ROBERSON, J. R. Treatment of Clinical Mastitis. **Veterinary Clinics of North**
789 **America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 271–288, 2012.
790 <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.011>
791
- 792 SEALS, R. C.; WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; LEWIS, G. S. Modulation of the
793 uterine response to infectious bacteria in postpartum ewes. **American Journal of**
794 **Reproductive Immunology**, v. 47, n. 1, p. 57–63, 2002.
795 <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2002.1o062.x>
796
- 797 SHELDON, I. M. Genes and environmental factors that influence disease resistance
798 to microbes in the female reproductive tract of dairy cattle. **Reproduction,**
799 **Fertility and Development**, v. 27, n. 1, p. 72–81, 2015.
800 <https://doi.org/10.1071/RD14305>
801
- 802 SHELDON, I. M. 23 - The Metritis Complex in Cattle. In: NOAKES, D.;
803 PARKINSON, T.; ENGLAND, G. (Eds.). **Veterinary Reproduction and**
804 **Obstetrics (tenth edition)**. 10^a ed. St. Louis (MO): W.B. Saunders, 2019. p. 408–
805 433. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-7233-8.00023-9>
806
- 807 SHELDON, I. M.; CRONIN, J. G.; BROMFIELD, J. J. Tolerance and Innate
808 Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of
809 Endometritis in Dairy Cattle. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 7, n. 1, p.
810 361–384, 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115227>
811
- 812 SHELDON, I. M.; OWENS, S. E. Postpartum uterine infection and endometritis in
813 dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 622–629, 2017.
814 <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR1006>
815
- 816 SHELDON, I. M.; RYCROFT, A. N.; ZHOU, C. Association between postpartum
817 pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. **Veterinary Record**, v. 154,
818 n. 10, p. 289–293, 2004. <https://doi.org/10.1136/vr.154.10.289>
819
- 820 SPICER, L. J. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) inhibits steroidogenesis of bovine
821 ovarian granulosa and thecal cells in vitro: Involvement of TNF- α receptors.

- 822 **Endocrine**, v. 8, n. 2, p. 109–115, 1998. <https://doi.org/10.1385/ENDO:8:2:109>
823
- 824 STANGAFERRO, M. L.; WIJMA, R. W.; GIORDANO, J. O. Profitability of dairy
825 cows submitted to the first service with the Presynch-Ovsynch or Double-Ovsynch
826 protocol and different duration of the voluntary waiting period. **Journal of Dairy**
827 **Science**, v. 102, n. 5, p. 4546–4562, 2019. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15567>
828
- 829 VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-
830 PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome**
831 **Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034-1, 2002.
832
- 833 WATHES, D. C. et al. Negative energy balance alters global gene expression and
834 immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. **Physiological**
835 **Genomics**, v. 39, n. 1, p. 1–13, 2009.
836 <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00064.2009>
837
- 838 WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; SEALS, R. C.; LEWIS, G. S. Progesterone
839 increases susceptibility of gilts to uterine infections after intrauterine inoculation
840 with infectious bacteria. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 5, p. 1242–1252,
841 2003. <https://doi.org/10.2527/2003.8151242x>
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853

854

855

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

Gene	Direção do primer	Sequência do primer
IL1 β	Forward	ACGAGTTTCTGTGTGACGCA
	Reverse	TGCAGAACACCACTTCTCGG
IL6	Forward	GGGCTCCCATGATTGTGGTA
	Reverse	GTGTGCCCAGTGGACAGGTT
CCL5	Forward	CATGGCAGCAGTTGTCTTTATCA
	Reverse	CTCTCGCACCCACTTCTTCTCT
ESR1	Forward	CAGGCACATGAGCAACAAAG
	Reverse	TCCAGCAGCAGGTCGTAGAG
PGR	Forward	TCCCCCACTGATCAACTTG
	Reverse	TCCGAAAACCTGGCAGTGA
GAPDH	Forward	GGTCACCAGGGCTGCTTTTA
	Reverse	TTCCCGTTCTCTGCCTTGAC

858 Nota: IL1 β – Interleucina 1 β ; IL6 – Interleucina 6; CCL5 – Ligante da quimiocina 5; ESR1 –
 859 Receptor de estrogênio α ; PGR – Receptor de progesterona; GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato
 860 desidrogenase.

861

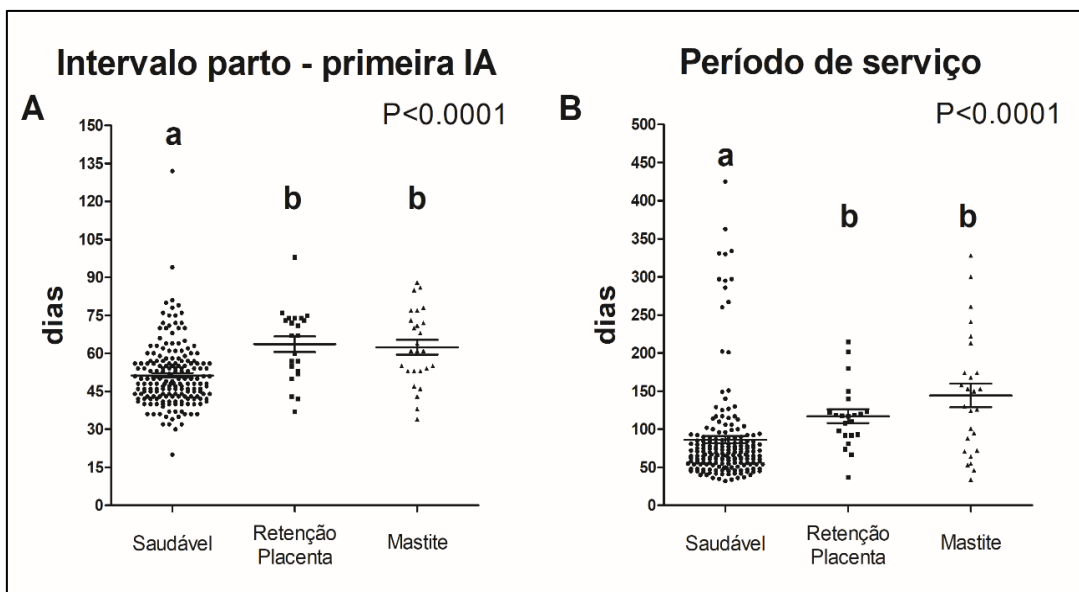
862

863

864

865

866



867

868

869

870

871

872

873

874

875

Figura 1 - Efeito da retenção de placenta e mastite no intervalo parto – primeira IA (A) e período de serviço (B). Letras diferentes indicam diferença estatística por *one-way* ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni (A). Letras diferentes indicam diferença estatística por Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação Múltipla de Dunn's. Ambos os testes a 5% de significância ($P < 0,05$).

876 Tabela 2 - Efeito da retenção de placenta (RP) e mastite clínica na taxa de
 877 concepção e na porcentagem de vacas gestantes aos 150 dias de lactação.

	Saudável	RP	Mastite	<i>P valor</i>
Concepção 1ª IA (%)	41,3 ^a (76/184)	13,6 ^b (3/22)	19,2 ^b (5/26)	0,0062
Gestantes aos 150 dias (%)	92,4 ^a (170/184)	86,4 ^a (19/22)	53,8 ^b (14/26)	<0,0001

878 Nota: Letras diferentes indicam diferença estatística a 0,05% de significância (Teste de qui-
 879 quadrado).

880

881 Tabela 3 – Médias e desvio padrão dos parâmetros vitais avaliados e escore de
 882 condição corporal dos animais pertencentes aos três grupos do experimento dois.

	Saudável	RP	Mastite	<i>P</i> -valor
Freq. respiratória (mpm)	48,35 ± 10,78	54,43 ± 19,59	52,36 ± 18,81	0,2615
Freq. cardíaca (bpm)	68,80 ± 18,46	71,65 ± 24,57	71,43 ± 22,33	0,1121
Freq. ruminal (mov/3min)	2,0 ± 0,0	2,2 ± 0,7	2,2 ± 0,8	0,7443
Temperatura (°C)	38,3 ± 0,4	38,4 ± 0,6	38,3 ± 0,5	0,6044
ECC (1 -5)	2,94 ± 0,11	2,87 ± 0,18	3,02 ± 0,32	0,6517

883 Nota: Bpm, batimentos por minuto; mpm, movimentos por minuto; mov/3min, movimentos
 884 ruminais completos em 3 minutos. Teste de *one way*-ANOVA com pós-teste de Bonferroni (FR, FC
 885 e temperatura) e Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn's. Todos os testes
 886 com significância de 5% ($P < 0,05$).

887

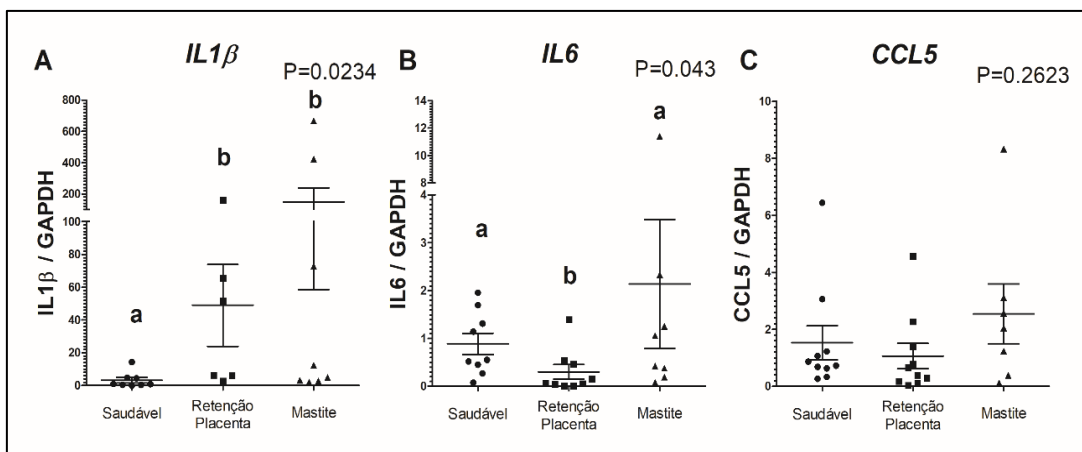
888

889

890

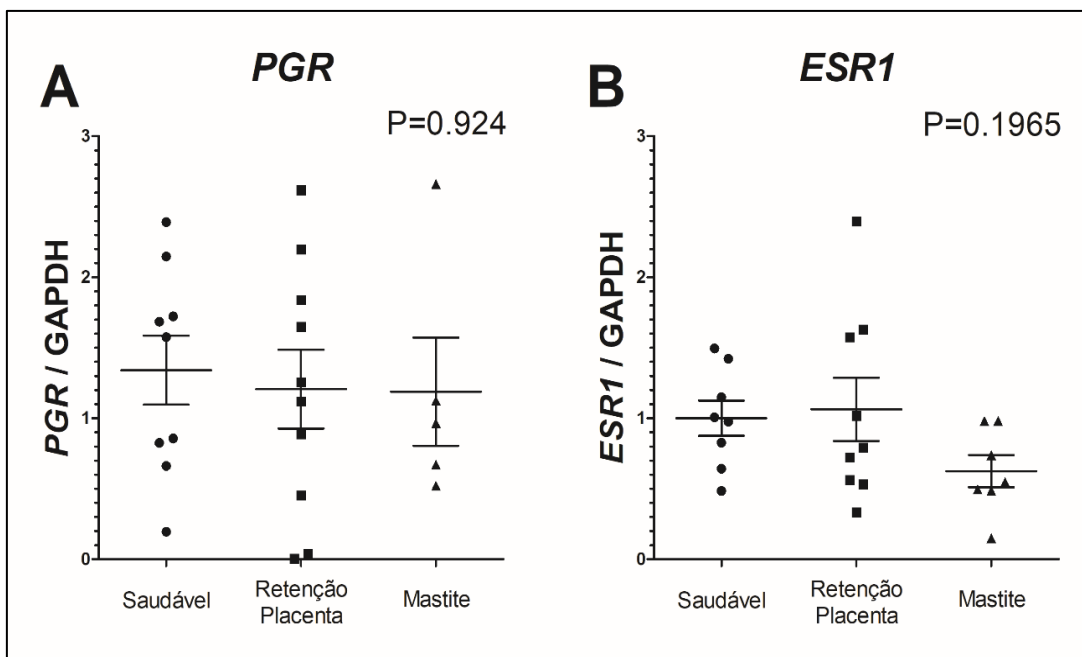
891

892



893

894 Figura 2 - Expressão dos transcritos dos genes IL1 β , IL6 e CCL5 de fêmeas
 895 bovinas. Letras diferentes indicam diferença estatística por *one-way* ANOVA e pós-
 896 teste de comparação múltipla de Bonferroni com 5% de significância ($P < 0,05$).
 897



898

899 Figura 3 - Expressão dos receptores de esteroides de fêmeas bovinas. Letras
 900 diferentes indicam diferença estatística por *one-way* ANOVA com o pós-teste de
 901 comparação múltipla de Bonferroni a 5% de significância ($P < 0,05$).

902

903

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

906



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 128/17 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 003/17

Projeto Pesquisa: Ocorrência de doenças no peri-parto pode comprometer resposta imune uterina inata e a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras mestiças?.

Pesquisador Responsável: Ricarda Maria dos Santos

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: A CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 19 de julho de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU
Portaria nº 665/17

907

908

909

910

911 ANEXO 2: Normas para a publicação da revista Ciência Rural

912

913 **Normas para publicação**

914

915 **ESCOPO:**

916 **1. CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da
 917 Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões
 918 bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser
 919 destinados com exclusividade.

920 **2. Os artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica e
 921 editados **preferencialmente em idioma Inglês**. Os encaminhados em Português
 922 poderão ser traduzidos após a 1º rodada de avaliação para que ainda sejam
 923 revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente.
 924 Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados** para publicação, terão
 925 que ser **obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas credenciadas
 926 pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de
 927 tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR.

928 **Empresas credenciadas:**

929

- 930 - American Journal Experts (<http://www.journalexperts.com/>)
- 931 - Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)
- 932 - BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>)
- 933 - Edanz (<http://www.edanzediting.com>)
- 934 - Editage (<http://www.editage.com.br/>) 10% discount for CR clients. Please inform
 935 Crural10 code.
- 936 - Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>) Please inform CIRURAL for
 937 special rates.
- 938 - GlobalEdico (<http://www.globaledico.com/>)
- 939 - JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)
- 940 - Liberty Medical Communications (<http://libertymedcom.com/>)
- 941 - Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)
- 942 - Readytopub (<https://www.readytopub.com/home>)

943

944 **LIMITE DE PÁGINAS:**

945 Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O
 946 trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25
 947 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e
 948 direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas
 949 será **15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para**

950 **nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser
951 disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não
952 poderão ultrapassar as margens e **nem estar com apresentação paisagem.**

953 **Tendo em vista o formato de publicação eletrônica estaremos considerando**
954 **manuscritos com páginas adicionais** além dos limites acima. No entanto, os
955 trabalhos aprovados que possuírem páginas **excedentes** terão um custo adicional
956 para a publicação ([vide taxa](#)).

957

958 **ESTRUTURA:**

959 **3. O artigo científico** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes**
960 **tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key
961 words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e
962 Discussão ou resultados/discussão (juntos); Conclusão; Referências e Declaração
963 de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos
964 autores; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança
965 devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e**
966 **animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um**
967 **comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente, pode ser enviado
968 um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo](#)
969 [Animal](#)).

970 **4. A revisão bibliográfica** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes**
971 **tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key
972 words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências e Declaração de
973 conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores;
974 Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem
975 aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais**
976 **obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de**
977 **ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos
978 modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

979 **5. A nota** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título
980 (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem
981 subdivisão, porém com Introdução; Metodologia; Resultados e Discussão e
982 Conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências e Declaração de
983 conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores;
984 Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem
985 aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais**
986 **obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de**
987 **ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos
988 modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

989

990 **COVER LETTER:**

991 6. O preenchimento do campo "**cover letter**" deve apresentar, obrigatoriamente, as
992 seguintes informações em inglês, **exceto** para artigos **submetidos em**
993 **português** (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em
994 inglês).

- 995
996 a) What is the major scientific accomplishment of your study?
997 b) The question your research answers?
998 c) Your major experimental results and overall findings?
999 d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
1000 e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for
1001 review?

1002
1003 Para maiores informações acesse o seguinte [tutorial](#).

1004 7. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato
1005 pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

1006

1007 **TÍTULOS:**

1008 8. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) -
1009 inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título
1010 do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas
1011 e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando
1012 estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais
1013 seções quando necessários.

1014 9. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas
1015 seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de
1016 acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996),
1017 como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

1018 10. Nesse [link](#) é disponibilizado o **arquivo de estilo** para uso com o
1019 software **EndNote** (o EndNote é um software de gerenciamento de referências,
1020 usado para gerenciar bibliografias ao escrever ensaios e artigos). Também é
1021 disponibilizado nesse [link](#) o **arquivo de estilo** para uso com o software **Mendeley**.

1022

1023 **REFERÊNCIAS:**

1024 11. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000)
1025 conforme normas próprias da revista.

1026 11.1. Citação de livro:

1027 JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders,
1028 1985. 2v.

- 1029 TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a**
1030 **bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.
- 1031 **11.2.** Capítulo de livro com autoria:
1032 GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.;
1033 SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.
- 1034 **11.3.** Capítulo de livro sem autoria:
1035 COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling**
1036 **techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.
1037 TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas**
1038 **cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.
- 1039 **11.4.** Artigo completo:
1040 O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de
1041 identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:
- 1042 MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against
1043 different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera:
1044 Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus*
1045 *granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera:
1046 Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (**Cidade opcional**),
1047 v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)
1048 [474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-
1049 [474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3).
- 1050 PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus*
1051 *oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus*
1052 *surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored
1053 wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (**Cidade opcional**), v. 38, n. 8, p.2103-2108,
1054 nov. 2008 . Available from:
1055 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)
1056 [84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi:
1057 [10.1590/S0103-84782008000800002](http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008000800002).
- 1058 SENA, D. A. et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds
1059 cv. 'Sertanejo'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, e20150705, 2017 .
1060 Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso)
1061 [84782017000300151&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dez-
1062 2016. doi: [10.1590/0103-8478cr20150705](http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150705) (**Artigo publicado eletronicamente**).
- 1063 **11.5.** Resumos:
1064 RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio
1065 nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA
1066 DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-
1067 graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236. (**OBS.: tentar evitar esse tipo de**
1068 **citação**).

- 1069 **11.6.** Tese, dissertação:
1070 COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas**
1071 **entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f.
1072 Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia)
1073 - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa
1074 Maria. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).
- 1075 **11.7.** Boletim:
1076 ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção
1077 Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20). (OBS.: tentar evitar esse tipo de
1078 citação).
- 1079 **11.8.** Informação verbal:
1080 Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre
1081 parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal).
1082 Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo
1083 do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi
1084 emitida a informação.
- 1085 **11.9.** Documentos eletrônicos:
1086 MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as**
1087 **possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia,
1088 FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).
- 1089 GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL
1090 ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech
1091 Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Online. Available
1092 from:
1093 <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>.
1094 Accessed: Mar. 18, 2005 (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).
- 1095 UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais.
1096 Online. Available from: <<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed:
1097 Mar. 18, 2001(OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).
- 1098 ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low
1099 and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**,
1100 (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE.
1101 1994-2000. Online. Available from: <[http://www. Medscape.com/server-](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)
1102 [java/MedlineSearchForm](http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm)>. Accessed: Mar. 18, 2007.
- 1103 MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de
1104 recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In:
1105 SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997,
1106 Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias -
1107 UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC. (OBS.: tentar evitar
1108 esse tipo de citação).
- 1109

1110 DESENHOS, GRÁFICOS E FOTOGRAFIAS:

1111 **12.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de
1112 ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras
1113 devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos, as figuras e
1114 os gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico
1115 sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas
1116 devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e
1117 não devem exceder uma lauda.

1118 **13.** Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade
1119 do(s) autor(es).

1120 **14.** Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O
1121 artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente,
1122 mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser
1123 utilizado.

1124 **15.** Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

1125 **16.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

1126 **17.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o
1127 encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

1128 **18.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de
1129 dirigir-se à Comissão Editorial.

1130 **19.** Todos os artigos encaminhados devem pagar a [taxa de tramitação](#). Artigos
1131 reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de
1132 tramitação novamente. Artigos arquivados por **decorso de prazo** não terão a taxa
1133 de tramitação reembolsada.

1134 **20.** Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio
1135 usando o programa “Cross Check”.

1136

1137 CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:**1138 21. Contribuição dos autores**

1139 Para se qualificar para a autoria do manuscrito submetido, todos os autores listados
1140 deveriam ter contribuições intelectuais substanciais tanto para a pesquisa quanto
1141 para sua preparação. Por favor, use um dos exemplos abaixo ou faça o seu.

1142 Exemplo um

1143 RW, RA e RCNO conceberam e projetaram experimentos. WC, LM e AA
1144 realizaram os experimentos, BB realizou as análises laboratoriais. BB
1145 supervisionou e coordenou os experimentos com animais e forneceu dados clínicos.

1146 BB realizou análises estatísticas de dados experimentais. WC, MB e NO
1147 prepararam o rascunho do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o
1148 manuscrito e aprovaram a versão final.

1149 **Exemplo dois**

1150 Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do
1151 manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a
1152 versão final.

1153 **Exemplo três**

1154 Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito

1155

1156 **ORCID:**

1157 **22.** O **ORCID** (Open Research and Contributors Identification) permite a criação
1158 de identificadores digitais únicos (ORCID ID) para pesquisadores, facilitando a
1159 identificação nacional e internacional do pesquisador e sua produção.

1160 Dessa forma **recomendamos** que todos os autores de cada submissão adotem o
1161 registro **ORCID** em suas publicações.

1162

1163

1164