

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**HISTOLOGIA E PRODUÇÃO DE IL-1 β , IL-6 E IL-8 EM
FRAGMENTOS DO TRATO REPRODUTIVO DE
NOVILHAS DESAFIADOS COM LPS**

Paula Batista de Alvarenga

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**HISTOLOGIA E PRODUÇÃO DE IL-1 β , IL-6 E IL-8 EM
FRAGMENTOS DO TRATO REPRODUTIVO DE
NOVILHAS DESAFIADOS COM LPS**

Paula Batista de Alvarenga

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Kele Amaral Alves

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência à obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias (Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva).

UBERLÂNDIA – MG – BRASIL

junho - 2021

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

A473
2020 Alvarenga, Paula Batista de, 1987-
 Histologia e produção de IL-1B, IL-6 e IL-8 em fragmentos do
 trato reprodutivo de novilhas desafiados com LPS [recurso
 eletrônico] / Paula Batista de Alvarenga. - 2020.

 Orientador: João Paulo Elsen Saut.
 Coorientadora: Kele Amaral Alves.
 Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
 graduação em Ciências Veterinárias.
 Modo de acesso: Internet.
 Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.410>
 Inclui bibliografia.
 Inclui ilustrações.

 1. Veterinária. I. Saut, João Paulo Elsen, 1975-, (Orient.). II.
 Alves, Kele Amaral, 1975-, (Coorient.). III. Universidade Federal de
 Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/007/2020				
Data:	17 de abril de 2020	Hora de início:	08:30	Hora de encerramento:	14:00
Matrícula do Discente:	11613VET015				
Nome do Discente:	PAULA BATISTA DE ALVARENGA				
Título do Trabalho:	Histologia e produção de IL-1 β , IL-6 e IL-8 em fragmentos do trato reprodutivo de novilhas desafiados com LPS				
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: **Marcelo Emílio Beletti - UFU; José Octavio Jacomini - UFU; Carla Cristian Campos - UNA; Nádia Simarro Fagundes - Faculdade Pitágoras; João Paulo Elsen Saut** orientador(a) do(a) candidato(a); e o membro do Colegiado do Programa: Ricarda Maria dos Santos.

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 Doutor.

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 17/04/2020, às 21:53, 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 **José Octavio Jacomini, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/04/2020, às 22:05, 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 **Carla Cristian Campos, Usuário Externo**, em 20/04/2020, às 14:28, 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 22/04/2020, às 10:50, 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 **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/04/2020, às 15:52, 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 **1972705** e o código CRC **9AE44242**.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Paula Batista de Alvarenga - nascida na cidade de Ouro Preto do Oeste, Estado de Rondônia aos dez dias do mês de abril de um mil novecentos e oitenta e sete. Iniciou sua trajetória escolar em 1994, na Escola Municipal Raquel de Queiroz, onde cursou a primeira e segunda séries primárias, em seguida foi transferida para a escola Municipal Júlio Verne, onde concluiu a quarta série primária. Não havendo na região, uma escola que atendesse estudantes além deste nível, em 1998 foi matriculada na Escola Família Agrícola Itapirema de Ji-Paraná (EFA), onde estudou pelos próximos cinco anos, concluindo o ensino fundamental e primeiro ano do curso Técnico em Agropecuária. Em 2003 foi contemplada com uma bolsa de estudos no colégio Educandário Curumim de Ouro Preto do Oeste, no qual concluiu o Ensino Médio no ano de 2004. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no segundo semestre de 2007, tendo concluído mesmo em março de 2013. Em 2014 ingressou na Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (Mestrado) da UFU, onde trabalhou em regime de dedicação exclusiva à Pós-Graduação durante todo o período, recebendo bolsa da Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) no período de agosto de 2015 a fevereiro de 2016, quando concluiu o Mestrado. Neste período, pesquisou a influência do metabolismo de transição/ periparto na imunidade uterina de vacas leiteiras e sua atuação como fator predisponente da ocorrência de doenças puerperais. Em 2016 iniciou o Doutorado pela UFU, período no qual dedicou-se a pesquisas relacionadas à imunidade uterina de vacas leiteiras, sendo bolsista CAPES entre março de 2018 e fevereiro de 2020. Além disso, teve a oportunidade de realizar estágio de Doutorado sanduíche na Southern Illinois University (SIU) pelo programa Pesquisador Visitante Especial (PVE) da CAPES, onde permaneceu por cinco meses e retornou ao Brasil para finalizar o curso.

“A gratidão não é só a maior das virtudes, mas o pai de todas as outras”.
(Cícero)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido o dom da vida, inteligência, força e coragem para realizar esse trabalho sem permitir que perdesse a fé e a perseverança nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais e irmãos, pelo trabalho e esforço a que se submeteram para que eu pudesse buscar esse sonho, pela constante colaboração e exemplos de determinação, humildade e superação a serem seguidos.

À Universidade Federal de Uberlândia e seu corpo docente, pela fundamental contribuição à minha formação.

Ao Professor Dr. João Paulo Elsen Saut, por quem tenho grande respeito e admiração, pela oportunidade, orientação, paciência e confiança em mim depositada. Agradeço também pelos conselhos, ensinamentos constantes e exemplo de profissional a ser seguido. Igualmente agradeço ao querido Professor José Octávio Jacomini por sua importante contribuição em minha formação, disponibilizando a vaga no programa de Doutorado e me orientando durante boa parte desta trajetória.

À Professora Dr^a. Kele Amaral Alves, por me proporcionar a experiência de estágio de Doutorado Sanduíche na Southern Illinois University (SIU), uma Universidade de grande prestígio e notoriedade. Externo também minha gratidão ao Professor Dr. Eduardo Leite Gastal por me receber como integrante de seu grupo de pesquisa na SIU.

Aos colegas do Laboratório de Saúde em Grandes Animais (LASGRAN), Laboratório de Reprodução Animal e Laboratório de Patologia Animal da UFU, Amanda, Arlinda, Deborah, Luiz Henrique, Mayara, Graciele, Oglênia, Vanessa e Vitor amigos queridos que foram essenciais para a realização desse trabalho. Sem sua disposição em colaborar e bom humor diário, certamente eu não teria conseguido!

À equipe do Laboratório de Patologia de Ensino em Histologia, Biologia Celular e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) e do Laboratório de Patologia Animal da UFU pela cordialidade e boa vontade em colaborar com que me receberam. Agradeço ainda, ao Professor Felipe Zandonadi Brandão e à equipe do Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF), pela disponibilidade em colaborar com as dosagens hormonais.

Aos amigos mais do que especiais, que me apoiaram e incentivaram para que não desistisse: Aline Cortes, Aline Matos, Ana Paula, Cecília, César Henrique, Erisson, Isabel Rodrigues, Joana D'Arc, Lorena, Lucimara, Maisa, Marcela, Meire Ellen, Meiriele, Paula Rinaldi, Tauana, Valter Moura e Virgínia. Igualmente, ressalto a importância do grupo MAANAIM de Uberlândia e de amigos queridos que conquistei desde que os conheci.

Aos produtores Mariela e Rafael Carreon que gentilmente concordaram em firmar parceria, nos cedendo todas as informações necessárias para o desenvolvimento do projeto, bem como pela autorização das coletas de material junto à diretoria da indústria, facilitando o acesso ao abatedouro.

Aos animais que serviram como objeto de estudos e sem os quais o trabalho não seria possível e nem teria motivos para existir.

Aos funcionários e residentes do Hospital Veterinário da UFU, pelo carinho e amizade que dispensaram a mim durante todo esse período.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, bem como aos colegas de Pós-Graduação e secretárias, que por sua vez, desempenham com maestria seu papel no intuito de oferecer aos discentes um curso de qualidade.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido para custear a execução do projeto.

LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

BEN	Balanço energético negativo
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP	Dias pós-parto
DVP	Descarga vaginal purulenta
E2	Estradiol
ECC	Escore de condição corporal
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FSH	Hormônio folículo estimulante
HMGB1	Proteína da caixa 1 do grupo de alta mobilidade
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IL	Interleucina
IL-6R α	Receptor de Il-6 α
IST	Infecções sexualmente transmissíveis
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeos
MAMP	Padrões moleculares associados a micróbios
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
MyD88	Gene 88 de resposta primária da diferenciação mielóide
NF- κ B	Fator nuclear Kappa B
ONU	Organização das Nações Unidas
P4	Progesterona
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
Pro-IL-1 β	Proteína precursora de IL-1 β
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Retenção de placenta
TE	Transferência de embriões
Th1	Citocinas pró-inflamatórias
Th2	Citocinas anti-inflamatórias
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF	Fator de necrose tumoral
TRF	Trato reprodutivo feminino
NK	Células Natural Killers
IL-1AR	Antagonista do receptor de IL-1
sTNFRs	Receptores solúveis de TNF
ROS	Espécies reativas de oxigênio
PGF α	Prostaglandian F α
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
IFNG	Interferon gama
NF- κ B	Fator nuclear Kappa B

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 2.1:** Reproductive tract regions of crossbred beef heifers for culture and histological profile analyzes. 69
- Figura 2. 2:** Histology (HE) of cranial portion of vagina of crossbred beef heifers during follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle of cellular layers of epithelium and an increase of submucous and muscular tunic during luteal phase. 69
- Figura 2.3:** Histology (HE) of vagina-cervix transition of crossbred beef heifers during follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle. Note that the muscle layer is thicker during follicular than luteal phase. 70
- Figura 2. 4:** Histology (HE) of cervix medium portion of crossbred beef heifers during follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle. 70
- Figura 2.5:** Histology (HE) of cervix-endometrium transition of crossbred beef heifers during follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle. Note that submucous layer has a higher number of endometrial glands during luteal phase compared to follicular phase. Also serous layer is thicker during luteal than follicular phase. 70
- Figura 2.6:** Histology (HE) of uterine caruncles of crossbred beef heifers during follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle. Note that muscle layer is thicker during the luteal than follicular phase. 71
- Figura 2.7:** Histology (HE) of intercaruncular endometrium of crossbred beef heifers during follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle. 71
- Figure 2.8:** Histological illustration of the epithelium of reproductive tract of crossbred beef heifers during follicular (above) and luteal (bellow) phases of the estrous cycle. Note the epithelial differences among regions of the reproductive tract. Vagina (A), vagina-cervix transition (B), cervix (C), cervix-uterus transition (D), intercaruncular region (E) and, uterine caruncle (F). 72
- Figura 3.1:** Collection spots of explants in different regions of the uterus for culture and measurement of interleukins. A (vagina); B (transition vagina-cervix); C (medial cervix); D (transition cervix-endometrium); E (caruncle); F (intercaruncular endometrium). 88
- Figura 3.2:** Production of IL-1 β , IL-6 and IL-8 by the different regions of the bovine female reproductive tract of crossbred heifers in the follicular and luteal phases of the estrous cycle challenged with 1 μ g/mL of LPS of *E. coli* after in vitro culture for 24 hours. Production compared to the respective control groups (100%): A = IL-1 β in the follicular phase; B = IL-1 β in the luteal phase; C = IL-6 in the follicular phase; D = IL-6 in the luteal phase; E = IL-8 in the follicular phase; F = IL-8 in the luteal phase. Uberlândia – MG. The results are presented in mean + standard error of the mean. P = one-way ANOVA between regions. 89
- Figura 3.3:** Production of IL-1 β , IL-6 and IL-8 by the caruncular and intercaruncular endometrium tissue of crossbred heifers, in the follicular phases (white bars) and luteal phase (black bars) of the estrous cycle challenged with 1 μ g/mL LPS of *E. coli* after in vitro culture 24 hours. Production compared to the respective control groups: intercaruncular (A = IL-1 β ; B = IL-6 and C = IL-8); caruncular (D = IL-1 β ; E = IL-6 and F = IL-8). Uberlândia – MG. The results

are presented in mean + standard error of the mean. $P_{interaction}$ = refers to the interaction between the phases of the estrous cycle and treatments (control x LPS); P_{phases} = refers to the differences between phases of the estrous cycle; P_{LPS} = refers to the differences in production of interleukins by the explants challenged with LPS compared to the control. 90

Figura 3.4: Production of IL-1 β , IL-6 and IL-8 in the cervical region and the transitions from vagina to cervix and cervix to endometrium in crossbred heifers, during the follicular phase (white bars) and luteal phase (black bars) of the estrous cycle after challenge with 1 μ g/mL of LPS derived from *E. coli* after in vitro culture for 24 hours. Production compared to the respective control groups: vagina-cervix transition (A – IL-1 β , B – IL-6 and C – IL-8); cervix (D – IL-1 β ; E – IL-6 and F – IL-8); transition from cervix to endometrium (G – IL-1 β ; H – IL-6 and IL-8). Crossbred heifers Uberlândia-MG. Uberlândia – MG. The results are presented in mean + standard error of the mean. $P_{interaction}$ = refers to the interaction between the phases of the estrous cycle and treatments (control x LPS); P_{phases} = refers to the differences between phases of the estrous cycle; P_{LPS} = refers to the differences in production of interleukins by the explants challenged with LPS compared to the control. 91

Figura 3.5: Vaginal epithelial tissue production of IL-1 β , IL-6 and IL-8 of crossbred heifers, during the follicular phase (white bars) and luteal phase (black bars) of the estrous cycle after challenge with 1 μ g/mL with LPS derived from *E. coli* cultured in vitro for 24 hours. Production compared to the respective control groups: A – IL-1 β ; B – IL-6; C – IL-8. Uberlândia-MG. The results are presented in mean + standard error of the mean. $P_{interaction}$ = refers to the interaction between the phases of the estrous cycle and treatments (control x LPS); P_{phases} = refers to the differences between phases of the estrous cycle; P_{LPS} = refers to the differences in production of interleukins by the explants challenged with LPS compared to the control. 92

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 <i>Objetivo geral</i>	19
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 <i>O trato reprodutivo feminino</i>	20
3.2 <i>Doenças puerperais e desempenho reprodutivo</i>	22
3.2.1 <i>Contaminação x infecção uterina</i>	23
3.2.2 <i>Cervicite: uma doença que ganhou destaque no pós-parto de vacas leiteiras</i>	25
3.3 <i>Imunidade inata</i>	27
3.3.1 <i>Imunidade inata no trato reprodutivo feminino (TRF)</i>	29
3.3.2 <i>Receptores Toll-like (TLR)</i>	32
3.3.3 <i>Efeito do ciclo estral na ativação da resposta imune inata</i>	33
3.3.4 <i>Citocinas</i>	35
REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO 2 – Histological evaluation of the uterus and its transitional portions of the reproductive tract of crossbred heifers.....	52
1 INTRODUCTION	53
2 MATERIALS AND METHODS	56
2.1 <i>Animals, housing and nutrition</i>	56
2.2 <i>Blood and RT sampling collection</i>	56
2.3 <i>Sample processing</i>	56
2.3.1 <i>Blood</i> -	56
2.3.2 <i>Uterus</i> -.....	57
2.3.3 <i>Data analyzes</i>	57

3 RESULTS.....	57
3.1 Cranial portion of the vagina	57
3.2 Vagina-cervix transition	58
3.3 Cervix medial portion	58
3.4 Uterus-cervix transition	59
3.5 Uterine caruncles.....	59
3.6 Intercaruncular endometrium.....	59
3.7 Regions of RT in both phases of estrous cycle	60
4 DISCUSSION	60
5 CONCLUSION	64
ACKNOWLEDGMENTS	64
REFERENCES.....	66
CAPÍTULO 3 – Production of proinflammatory cytokines in regions of the reproductive tract of heifers after challenged with lipopolysaccharide	73
1 INTRODUCTION.....	74
2 MATERIAL AND METHODS	76
2.1 Animals and Location of Experiments.....	76
2.2 Sample Collection and Processing.....	76
2.3 Sample Processing	76
2.4 Statistical Analysis.....	78
3 RESULTS.....	78
4 DISCUSSION	80
5 CONCLUSION	82
ACKNOWLEDGEMENTS	82
REFERENCES.....	84
Anexo I	
ANEXO II	

HISTOLOGIA E PRODUÇÃO DE IL-1 β , IL-6 E IL-8 EM FRAGMENTOS DO TRATO REPRODUTIVO DE NOVILHAS DESAFIADOS COM LPS

RESUMO – Infecções do trato reprodutivo (TR) feminino podem acometer até 40% das vacas no pós-parto e são os maiores responsáveis pelo descarte involuntário, constituindo grandes prejuízos econômicos ao setor agropecuário. A resposta imune inata do TR é amplamente estudada com o intuito de compreender os mecanismos responsáveis pela produção do padrão de resposta inflamatória desencadeada pelas infecções uterinas. Objetivou-se verificar a resposta imune inata mediada IL-1 β , IL-6 e IL-8 em diferentes regiões do TR de novilhas mestiças, frente ao desafio com lipopolissacarídeo (LPS) (n = 43) nas fases folicular (n = 10) e luteínica (n = 33) do ciclo estral, bem como, avaliar a dinâmica das mudanças celulares entre as estruturas anatômicas do TR com foco na porção cervical e suas transições, por meio das avaliações macroscópica e histológica (n = 3 em fase folicular e n = 3 em luteínica). Para tanto, foram colhidos fragmentos da porção cranial da vagina, transição vagina-cervix, porção cervical média, transição cervix-endométrio, carúncula uterina e endométrio intercaruncular. Observou-se resposta imune frente ao desafio com LPS em todas as porções do TR, independente da fase do ciclo estral, com maior produção de citocinas pelas transições cervicais, comparado à porção caruncular do endométrio. Além disso, a presença de células caliciformes na cervix e suas transições apresentam contribuição fundamental para a imunidade inata uterina. Concluiu-se produção de interleucinas 1 β , 6 e 8 apresenta comportamento diferente entre as regiões no trato reprodutivo de novilhas mestiças quando desafiadas com LPS e não há efeito do ciclo estral na indução desta resposta. Além disso, que a produção de muco pela cervix e suas transições constituem a principal barreira uterina contra infecções microbianas devido a suas propriedades físico-químicas.

Palavras-Chave: cervix, citocinas pró-inflamatórias, imunidade inata, novilhas mestiças, transições cervicais

HISTOLOGY AND PRODUCTION OF IL-1 β , IL-6 AND IL-8 IN FRAGMENTS OF THE REPRODUCTIVE TRACT OF HEIFERS CHALLENGED WITH LPS

ABSTRACT - Infections of the female reproductive tract (RT) may occur in up to 40% of the postpartum cows and are the major responsible for involuntary disposal, constituting a huge economic loss in the agricultural sector. The innate immune response of the RT is widely studied to comprehend the mechanisms responsible for the production of the inflammatory response pattern triggered by the uterine infections. We aimed to verify the innate immune response mediated by IL-1 β , IL-6, and IL-8 in different regions of the reproductive tract of crossbred heifers challenged with lipopolysaccharide (LPS) (n=43) at the follicular (n=10) and luteal (n=33) phases of the estrous cycle, as well as to evaluate the cellular change dynamic between the anatomic structures of the RT, focusing in the cervical portion and its transitions, using macroscopic and histologic evaluations (n=3 in the follicular phase and n=3 in the luteal phase). For that we collected samples of the cranial portion of the vagina, vagina-cervix transition, cervix medial portion, cervix-endometrium transition, uterine caruncles, and

intercaruncular endometrium. Besides that, the presence of caliciform cells at the cervix and its transitions present a fundamental contribution to the innate uterine immunity. We concluded that the production of interleukins 1 β , 6, and 8 present different behavior between the regions of the reproductive tract of crossbred heifers when challenged with LPS and has no effect of the estrous cycle at the induction of this response. Moreover, the mucous production made by the cervix and its transitional portions constitute the main uterine barrier against microbial infections because of its chemical-physical properties.

Keywords: cervix, proinflammatory cytokines, innate immunity, crossbred heifers, cervical transitions.

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

Conhecer a fisiologia da espécie animal que se trabalha é de suma importância para a obtenção de sucesso na atividade. Quando se pensa em produção animal, especialmente de bovinos, torna-se evidente a necessidade deste conhecimento no intuito de que as intervenções realizadas devem gerar melhorias, visualizadas sob a forma de aumento nos indicadores produtivos, como produção leiteira e de carne, além dos índices zootécnicos, como taxas de concepção, prenhez e parição, demonstrando a chamada eficiência reprodutiva dos rebanhos, indicador que se caracteriza pela produção de um bezerro/vaca/ano.

O relatório da Organização das Nações Unidas (ONU) publicado em junho de 2019, estima que a população mundial deve aumentar de 7,7 para 9,7 bilhões de pessoas em 2050. As previsões realizadas por Britt et al. (2018) estimam que em 2067 a população mundial atinja 10,4 bilhões de pessoas e a área disponível para produção de alimentos será de 0,15 ha/pessoa. Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o aumento da renda per capita será responsável por um aumento significativo no consumo de produtos lácteos, pois o alimento de origem animal, mesmo que em pequenas quantidades, melhora o estado nutricional do indivíduo. Este aumento da população mundial representa um desafio para os setores produtores de alimentos, uma vez que far-se-á necessário aumentar a produtividade para suprir as necessidades nutricionais e garantir segurança alimentar. Como parte desta solução, a produção leiteira representa uma parcela significativa na segurança alimentar mundial, pois é um alimento de alta qualidade ao consumo humano. Porém, apesar dos avanços significativos na indústria de laticínios, com aumento de quase 70% na produtividade, a eficiência reprodutiva animal ainda é um fator a ser enfrentado para melhorar a sustentabilidade e minimizar o impacto ambiental da indústria (HUME et al., 2011).

Por meio do melhoramento genético é possível selecionar animais com alto potencial produtivo, que por sua vez, quando recebem manejo adequado, são capazes de expressá-lo. Assim, dentro de um contexto que exige maior produtividade, para se alcançar a eficiência reprodutiva e garantir segurança alimentar às gerações vindouras, faz-se necessário lançar mão das biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência

de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIVE). Entretanto, para que estas biotecnologias possam ser empregadas e propiciem os resultados esperados, as vacas precisam estar aptas a retornarem ao manejo reprodutivo entre 40 e 60 dias pós-parto (DPP), o que representa um desafio aos Médicos Veterinários e demais técnicos, uma vez que vários fatores podem interferir de maneira negativa nesta fase, como o escore de condição corporal (ECC) ao parto, o balanço energético negativo (BEN) e afecções podais, além das afecções do trato reprodutivo, como retenção de placenta (RP), metrite, endometrite, cervicite, dentre outros.

Infecções uterinas podem acometer até 40% das vacas no pós-parto (SHELDON et al., 2009) e podem levar à não concepção quando cervicite e endometrite estão presentes simultaneamente (AHMADI et al., 2006a; DEGUILLAUME et al., 2012). De acordo com Deguillaume et al. (2012) a endometrite é superestimada em detrimento da cervicite, uma vez que esta também contribui para o aumento de descarga vaginal purulenta (DVP), e de células inflamatórias no trato reprodutivo. Neste sentido, compreender a imunidade inata uterina é de suma importância pois, apesar de a resposta inflamatória auxiliar na restauração da saúde uterina, a ocorrência de doenças ou inflamação exageradas no trato reprodutivo feminino (TRF) podem causar infertilidade (SHELDON et al., 2017). Segundo Herath et al. (2006b), Davies et al. (2008) e Borges et al. (2012), quem regula esta resposta imunológica e o processo inflamatório desencadeado pelo endométrio são os hormônios ovarianos estradiol (E_2) e progesterona (P_4).

Infecções sexualmente transmissíveis (IST) são associadas a microrganismos que ascendem o TRF ou mesmo que alcançam esta região por via hematogêna e caracterizam um problema de saúde mundial para humanos e animais. Devido ao fato de não produzir reação imunológica contra o feto durante a gestação, diz-se que o útero é um local privilegiado imunologicamente (ARCK et al., 2014). Uma das formas de avaliar a resposta imune inata uterina é através da dosagem de citocinas pró-inflamatórias, que consistem em mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de lesão e infecção, no intuito de promover adequada reparação tecidual.

Neste sentido, este estudo se baseia na hipótese de que o trato reprodutivo apresenta resposta imune distinta nas regiões uterinas entre vagina, transição vagina-

cérvix, cérvix medial, transição cérvix-endométrio e endométrio, nas porções caruncular e intercaruncular, sob a influência dos hormônios esteroides ovarianos circulantes no momento do abate dos animais, bem como de que as transições cervicais (vagina-cérvix e cérvix-endométrio) desempenham papel fundamental na proteção uterina, e que a histologia de transição seja então responsável pelo perfil da resposta imune que estas regiões apresentam.

Além disso, buscou-se evidenciar o perfil histológico do TR de novilhas mestiças nunca submetidas ao manejo reprodutivo, em suas porções vaginal, cervical e uterina, bem como suas transições, para que pesquisas futuras sejam realizadas no intuito de fazer esta correlação de maneira direta, e assim, elucidar o papel de cada região no perfil da resposta imune do TR.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a imunidade inata *in vitro* e inflamação do trato reprodutivo feminino de novilhas mestiças virgens nas diferentes fases do ciclo estral.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterização anatômica e histológica do trato reprodutivo feminino, e padronização dos locais de colheita dos explantes.
- Avaliar a resposta *in vitro* da concentração das interleucinas 1 β (IL-1 β), 6 (IL-6) e 8 (IL-8) nas fases do ciclo estral, em explantes cervicais submetidos ao tratamento com lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli* (L2880, *E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich®).
- Avaliar e comparar a resposta *in vitro* da IL-1 β , IL-6 e IL-8 nas porções cranial, medial e caudal da cérvix, em explantes cervicais submetidos ao tratamento com LPS.
- Comparar a resposta imune inata *in vitro* em explantes das porções cervicais com explantes coletados do endométrio uterino.
- Estabelecer a técnica de explante cervical bovino como modelo experimental para futuros ensaios clínicos, desta forma minimizando ensaios *in vivo*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O trato reprodutivo feminino

O trato reprodutivo feminino (TRF) bovino é composto pelos ovários, tubas uterinas, cornos uterinos, cérvix, vagina, vestibulo vulvar e vulva. Os ovários são sustentados pelo ligamento largo (mais especificamente, pelo mesovário), as tubas uterinas pela mesossalpinge, e o útero, pelo mesométrio (POPESKO, 2012; FEITOSA, 2014).

De acordo com a literatura, a parede uterina é dividida em três camadas: endométrio (mucosa), localizada internamente; miométrio (muscular lisa), localizada na porção média e perimétrio (serosa), localizada mais externamente.

O endométrio pode ser dividido em zona funcional e zona basal (DELLMANN; BROWN, 1982). O epitélio da zona funcional é do tipo pseudo-estratificado e/ou colunar simples, podendo apresentar áreas de epitélio cúbico simples (BANKS, 1992; DELLMANN & BROWN, 1982). Já o tecido sub-epitelial da porção superficial da zona funcional (estrato compacto) é composto de tecido conjuntivo frouxo, altamente vascularizado e celularizado, rico em fibrócitos, macrófagos, mastócitos, e eventualmente, também podem ser encontrados eosinófilos, linfócitos e plasmócitos. Na região mais profunda desta zona (o estrato esponjoso), também se verifica tecido conjuntivo frouxo, porém menos celularizado. No pró-estro, sob ação estrogênica, é possível verificar crescimento endometrial enquanto no diestro, onde há predominância de progesterona, verifica-se desenvolvimento e atividade secretora de glândulas endometriais (BACHA Jr. & BACHA, 2003; BANKS, 1992). Nos ruminantes, durante o estro, o edema endometrial acontece devido ao acúmulo de grande quantidade de fluido no espaço intersticial da zona funcional (DELLMANN; BROWN, 1982).

O miométrio por sua vez, também pode ser dividido em camada circular interna lisa (espessa) e camada longitudinal externa lisa (fina), as quais são separadas pelo estrato vascular, que é altamente vascularizado e innervado. Em vacas, comumente o estrato vascular pode ser visualizado entremeando a camada muscular circular interna (DELLMANN & BROWN, 1982; BANKS, 1992; BACHA Jr. & BACHA, 2003). Já o perimétrio ou serosa, constitui-se de tecido conjuntivo frouxo, coberto pelo mesotélio peritoneal, além de ampla rede de vasos sanguíneos, linfáticos e fibras nervosas (BANKS, 1992; DELLMANN & BROWN, 1982).

O endométrio bovino apresenta proeminências não glandulares denominadas carúnculas uterinas. Estas por sua vez, consistem-se de tecido conjuntivo altamente celularizado, com predominância de fibroblastos, dos quais, em sua porção mais profunda, se localizam numerosos vasos sanguíneos (BACHA Jr. & BACHA, 2003). A porção intercaruncular por sua vez, possui estruturas tubulares, ramificadas e espiraladas e seu epitélio é do tipo colunar simples. Além disso, sua forma sofre alterações de acordo com fase do ciclo estral, apresentando-se retas durante o cio e, conforme aumentam as concentrações circulantes de progesterona, vão se tornando maiores e espiraladas devido ao aumento de sua atividade secretora. Quando as concentrações de progesterona começam a declinar as glândulas também regridem (HAFEZ & HAFEZ, 2003).

A cérvix é um órgão tubular de seis a 13 cm de comprimento, fibroso, composto de colágeno tipo I, III e IV, proteoglicanos, elastina e reticulina, bastante desenvolvido nas vacas, constituído por tecido conjuntivo associado a musculatura lisa, e se caracterizada por apresentar parede espessa e lúmen constrito. A disposição dos anéis cervicais permite uma segura oclusão do canal cervical, que durante o cio, devido à ação hormonal, se relaxa levemente para permitir a passagem dos espermatozoides (WINKLER & RATH, 1999; HAFEZ & HAFEZ, 2003). Seu epitélio possui células semelhantes às caliciformes, e a lâmina própria submucosa alterna entre os tecidos conjuntivos frouxo e denso, conforme a fase do ciclo estral. A mucosa cervical é do tipo colunar simples com células caliciformes, e possui dobras longitudinais que podem ser divididas em secundárias e terciárias (BREEVELD-DWARKASING et al., 2000). Desta forma, diz-se que o revestimento cervical interno possui características glandulares e sua atividade secretora varia de acordo com a fase do ciclo estral (BANKS, 1992). Durante a gestação, a cérvix sofre mudanças em sua composição bioquímica e nas suas propriedades funcionais determinadas por parâmetros que regulam as propriedades físicas da matriz do tecido conjuntivo. Estas alterações por sua vez, acontecem conforme a gestação avança e ocorre então o esgotamento do tecido devido à destruição da rede colágena. A partir deste momento, em decorrência de maior vascularização e do aumento nas concentrações de glicoproteínas associado à redução dos componentes de sua matriz, ocorre aumento de volume cervical que pode chegar até oito vezes o tamanho normal. Após o parto, a cérvix retoma seu tamanho original devido à ação de enzimas, a produção de

proteoglicanos e hialuronatos, redução dos níveis de hexuronato e reorganização da rede de colágenos (HAFEZ & HAFEZ, 2003).

O muco cervical é constituído de macromoléculas de mucina advindas do epitélio, cuja composição compreende de glicoproteínas (sialomucina) com 25% de aminoácidos e 75% de carboidratos. Dentre as proteínas do muco cervical, pode-se destacar pré-albumina, lipoproteína, albumina, β -globulina e γ -globulina. Além disso, as enzimas glucoronidase, amilase, fosforilase, esterase e fosfatase também compreendem importantes constituintes deste muco, cuja secreção é estimulada pelos estrógenos e alterada pela progesterona. Alterações cíclicas promovidas pelos hormônios ovarianos, favorecem a passagem dos espermatozoides pelo canal cervical, característica denominada penetrabilidade. Durante o cio e ovulação, devido a ação estrogênica, percebe-se aumento na quantidade, viscosidade, cristalização e pH do muco, enquanto no diestro, sob ação da progesterona, ocorre o inverso. Portanto, diz-se que, além de separar a luz uterina da vagina, em função do muco que produz, a cérvix auxilia no transporte de espermatozoides até o útero, bem como, armazena e participa dos processos de capacitação e seleção espermáticas (HAFEZ & HAFEZ, 2003).

A porção cranial da vagina por sua vez, é formada pelas camadas mucosa, muscular e adventícia. Seu epitélio é do tipo colunar estratificado com células caliciformes (DELLMANN & BROWN, 1982; BANKS, 1992; BACHA Jr. & BACHA, 2003). Já o epitélio da porção caudal da vagina é do tipo escamoso estratificado com células caliciformes contendo entre três e seis camadas de células. Por sua vez, o número de camadas celulares pode variar de acordo com a fase do ciclo estral (BLAZQUEZ et al., 1987). Estes autores, observaram uma mudança gradual no epitélio da porção caudal da vagina para a cérvix e presença de linfócitos intra-epiteliais e leucócitos polimorfonucleares (PMN) ao longo do epitélio, bem como linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos. Além disso, visualizaram que os linfócitos em algumas regiões se organizavam em nódulos linfáticos abaixo do epitélio.

3.2 Doenças puerperais e desempenho reprodutivo

Um dos indicadores de sucesso na atividade leiteira se baseia na chamada eficiência produtiva e reprodutiva do rebanho (MARTINS, 2014). De modo geral, os sistemas de produção buscam constantemente por aumentar a produtividade, o

número de bezerros nascidos por ano e a vida útil da vaca no rebanho (KASK et al., 2003; LEITE et al., 2001; SHELDON et al., 2006). A vida útil da vaca está relacionada com a idade ao primeiro parto e ao intervalo de partos. O intervalo de partos compreende à soma dos períodos de serviço e gestacional. Devido ao fato de a gestação ser um período fixo, quem determina o intervalo entre partos é o período de serviço, isto é, o tempo decorrido entre o parto e a nova concepção. Além disso, dentre outros fatores, a vida útil da vaca está relacionada à duração do puerpério, uma vez que, nesta fase, para voltar a conceber, o útero precisa eliminar o lóquio, envolver de tamanho, combater as infecções causadas por microrganismos que colonizam o trato reprodutivo no momento do parto, e então apresentar ambiente uterino favorável, bem como retornar à ciclicidade ovariana (BELLOWS et al., 2002; KASK et al., 2003; LEBLANC, 2014; PETERS, 1984; SARTORI, 2007).

3.2.1 Contaminação x infecção uterina

Acredita-se que 100% das vacas podem apresentar contaminação ascendente do trato reprodutivo no momento do parto, visto que a abertura das barreiras anatômicas constituídas pela vulva, vagina e cérvix permitem a colonização uterina por microrganismo presentes no ambiente, nas fezes, e no próprio trato genital dos animais (SHELDON et al., 2002; ROCHA et al., 2004; SHELDON & DOBSON, 2004; SHELDON, 2007). Além disso, de acordo com Sheldon e Dobson (2004) e Azawi (2008), durante o puerpério, diversos tipos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias podem ser encontrados no útero de vacas. Nestes casos, as bactérias aeróbias mais comumente encontradas são *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.; por outro lado, as bactérias anaeróbias mais encontradas são *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides* spp. e *Prevotella melaninogenica* (KASK et al., 2003; ROCHA et al., 2004; WILLIAMS et al., 2005; McDOUGALL et al., 2011). Durante as duas primeiras semanas pós-parto, a multiplicação destes microrganismos se dá de maneira acelerada devido ao fato de que o conteúdo uterino remanescente da gestação/parto constitui meio de cultura favorável ao seu desenvolvimento (AZAWI, 2008). Além disso, a abertura da cérvix, a involução uterina e a consequente drenagem do conteúdo uterino, favorecem a eliminação bacteriana em vacas com puerpério fisiológico (ROCHA et al., 2004).

Entretanto, de acordo com os estudos realizados por Galvão et al. (2019) os principais microrganismos causadores de infecções uterinas são *Bacteroides*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*, os quais, causam infecção devido à uma disbiose da microbiota uterina em que há redução dos microrganismos naturalmente ali encontrados e consequente aumento nas população destes agentes. Estes autores mostraram ainda, que o TRF é colonizado por microrganismos num prazo máximo de 20 minutos após o parto. Além disso, mostraram que vacas saudáveis entre zero e 2 DPP apresentam microbiota uterina composta por *Bacteroides*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Tenericutes* e *Firmicutes* e que entre quatro e 14 DPP, estas mesmas vacas apresentam redução nas quantidades de *Bacteroides* e *Fusobacteria*, com consequente aumento de *Protobacteria* e *Tenericutes*, enquanto as vacas que desenvolvem doença uterina mostraram exatamente o contrário, com crescimento de *Bacteroides* e *Fusobacteria* e substancial redução de *Protobacteria* e *Tenericutes*.

Fatores como partos gemelares e retenção de placenta podem promover alteração nos mecanismos de defesa do endométrio ao estabelecimento de infecções uterinas (POTTER et al., 2010). Estas alterações possibilitam que bactérias aeróbias (*E. coli* e *T. pyogenes*) e anaeróbias (*F. necrophorum* e *Prevotella* spp.) atuem de maneira sinérgica, favorecendo o crescimento de ambas, bem como aumentando sua patogenicidade (SHELDON & DOBSON, 2004; SHELDON, 2007; WILLIAMS et al., 2005).

De acordo com Williams et al. (2007), vacas holandesas com infecção uterina aguda causada por *E. coli* e *T. pyogenes* apresentam menor crescimento folicular por sofrerem alterações em sua função ovariana. Segundo os autores, isso se deve à menor sensibilidade ovariana a ação do hormônio folículo estimulante (FSH), visto que a concentração deste hormônio é semelhante entre os animais, independente da ocorrência de infecção uterina. Segundo estes autores, nestes casos, os corpos lúteos formados após a primeira ovulação de vacas com infecção uterina apresentam diâmetro reduzido e menor produção de progesterona (P₄) devido a alterações promovidas pelo LPS às células luteais.

3.2.2 Cervicite: uma doença que ganhou destaque no pós-parto de vacas leiteiras

Problemas reprodutivos superaram o descarte por mastite e tornaram-se a principal causa de descarte involuntário nas propriedades leiteiras, e, conseqüentemente, reduzem a lucratividade, pois não estão associados com o descarte do animal devido a sua ineficiente produção leiteira (BONNEVILLE-HÉBERT et al., 2011).

Dentre os problemas na reprodução destacam-se as infecções uterinas, que estão onipresentes no pós-parto de bovinos leiteiros com incidência de 2 a 5% de retenção de placenta, 25 a 40% de metrite, 20% de endometrite clínica, e 10 a 30% de endometrite citológica entre 30 e 60 DPP (SHELDON et al., 2008, 2009; LEBLANC et al., 2011; DEGUILLAUME et al., 2012; ROBERTS et al., 2012;). Essas doenças afetam cerca de metade das vacas leiteiras e causam infertilidade. Portanto, a definição de critérios rigorosos para o diagnóstico, tratamento e prevenção destas enfermidades no pós-parto destes animais continua sendo um desafio (LEFEBVRE & STOCK, 2012).

Entre estas enfermidades, encontra-se a cervicite com incidência entre 15 e 40% em rebanhos leiteiros aos 30 DPP (DEGUILLAUME et al., 2012). Outrora, aceitava-se que a presença de secreção mucopurulenta ou purulenta na vagina e externamente na vulva ou na cauda estavam relacionadas com endometrite clínica (LEBLANC, 2012). No entanto, Dubuc et al. (2010) verificaram uma fraca correlação entre secreção vaginal e endometrite clínica, definida através do exame de citologia uterina. Ahmadi et al. (2006a) e Deguillaume et al. (2012) verificaram que estas secreções vaginais poderiam ter como origem a inflamação cervical, sendo considerada uma doença isolada ou associada com infecções uterinas, porém com importante prejuízo ao desempenho reprodutivo de vacas leiteiras no pós-parto.

Quando se buscam informações sobre os prejuízos que a endometrite clínica causa ao desempenho reprodutivo, diversos são os autores preocupados em entender as infecções e imunidade uterinas (GILBERT et al., 2005; SHELDON et al., 2008), com destaque para as revisões de literatura (CRONIN et al., 2012; GALVÃO et al., 2011; LEBLANC, 2012; SWANGCHAN-UTHAI et al., 2012; TURNER et al., 2012). Estes trabalhos trouxeram grande contribuição à ciência, no entanto, eles estão

relacionados apenas à endometrite e imunidade uterina. Portanto, fica evidente que o efeito da inflamação endocervical tem sido inadequadamente investigado em vacas leiteiras (DEGUILLAUME et al., 2012) e a maioria dos trabalhos existentes apresentam como foco apenas a definição desta condição clínica de acordo com Stephens et al. (1986).

De acordo com Ahmadi et al. (2006b) a inflamação cervical pós-parto, em vacas com puerpério normal, é regulada pela fase do ciclo estral, sendo que o aumento de progesterona reduz o número de neutrófilos no lúmen cervical. Van Engelen et al. (2009) verificaram que a fase final de maturação cervical para a parição faz parte de um processo inflamatório regulado por citocinas, com aumento de oito vezes na expressão de interleucina 1 β (IL-1 β), 10 vezes de IL-10 e um notável aumento de 430 vezes na expressão de IL-8 permitindo um grande influxo de neutrófilos. Neste experimento os autores estudaram amostras cervicais colhidas por biopsia da porção caudal da cérvix feitas *in vivo* em animais em terço final de gestação. Porém, sabe-se que há consideráveis variações nas porções longitudinais e transversais da cérvix em relação à quantidade de água, colágeno e degradação de colágeno, além de diferenças na sua consistência e textura de acordo com as fases do ciclo estral (BREEVELD-DWARKASING et al., 2003). Isto sugere que talvez a resposta imune inata possa não ser a mesma nas diferentes porções do lúmen cervical.

Histologicamente, cervicite é definida pela presença de infiltrado inflamatório na mucosa cervical (SANTOS et al., 2011) e na citologia é determinada pela contagem de neutrófilos superior a 5%. Este limite está relacionado diretamente à prejuízos na taxa de concepção de vacas (DEGUILLAUME et al., 2012). De acordo com Hartmann et al. (2016), cervicite ocorre independentemente de endometrite podendo causar danos ao desempenho reprodutivo dos animais e pode ser diagnosticada quando houver inflamação no segundo anel cervical associado ao prolapso do mesmo ou edema na cérvix, com ou sem vermelhidão no primeiro anel cervical. De acordo com Alvarenga et al. (2018), pouco se conhece e discute sobre a incidência de cervicite em rebanhos leiteiros brasileiros, e sua relação com a endometrite citológica. Estes autores verificaram intercorrência de cervicite e endometrite em 11,4% das vacas com mais de 60 DPP descartadas por problemas reprodutivos ao exame citológico pós-mortem.

É preciso prosseguir com pesquisas na área de doenças reprodutivas por três principais razões: primeira, informações detalhadas sobre os mecanismos da imunidade inata e imunidade de mucosas foram identificadas (BEUTLER, 2004; AKIRA et al., 2006); segunda, avanços foram feitos para compreender os mecanismos da infecção uterina, as principais bactérias (*Escherichia coli* e *Arcanobacterium pyogenes*) e modelos teciduais em bovinos (HERATH et al., 2006a; DAVIES et al., 2008; HERATH et al., 2009a; HERATH et al., 2009b) e; terceira, o fluxo de raças bovinas leiteiras internacionais no Brasil fez com que houvesse aumento significativo no impacto e incidência destas doenças e diversos cruzamentos têm sido realizados entre *Bos indicus* x *Bos taurus*.

3.3 Imunidade inata

A imunidade inata constitui a primeira resposta à invasão microbiana ao organismo. Ela é capaz de prevenir, controlar, e/ou eliminar infecções causadas por alguns patógenos (ABBAS et al., 2011), e promove uma resposta inespecífica, rapidamente induzível quando as células reconhecem o perigo (SHELDON et al., 2017). O primeiro passo para a montagem de uma resposta imunológica que culmine na eliminação do microrganismo invasor é o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro. Diversos estudos têm sido conduzidos desde a década de 1990 no intuito de elucidar os mecanismos moleculares pelos quais se dá o reconhecimento inicial de moléculas chave presentes na estrutura de microrganismo invasores, como bactérias, vírus e fungos (WERLING & COFFEY, 2007; HORNE et al., 2008; SORDILLO et al., 2009).

O sistema imune inato não reconhece estruturas moleculares de mamíferos, mas sim estruturas características de patógenos microbianos que são essenciais à sobrevivência destes microrganismos. Isto possibilita que patógenos alvos da imunidade inata sejam reconhecidos pelo hospedeiro, apesar da alta frequência de mutações por eles sofridas (ABBAS et al., 2011). Receptores *Toll-like* (TLR), localizados na membrana externa e/ou no citoplasma de células de defesa, epiteliais e estromais dos tecidos susceptíveis à patógenos reconhecem moléculas conservadas durante o processo de evolução, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). Entretanto, pelo fato de microrganismo não

patogênicos também apresentarem padrões moleculares conservados, o termo mais adequado é padrões moleculares associados a micróbios (MAMP) (AUSUBEL, 2005). O reconhecimento destes MAMP pelos receptores respectivos, desencadeia respostas inflamatórias com produção de quimiocinas, citocinas e peptídeos antimicrobianos (AKIRA, 2003; SCHAEFER et al., 2004; WERLING & COFFEY, 2007; SWANGCHAN-UTHAI et al., 2012). Um dos MAMP mais estudados é o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa da *Escherichia coli* e demais bactérias Gram-negativas (MARTINS & BORGES, 2015). De acordo com Beutler (2004), apesar de as bactérias apresentarem organização molecular complexa, compostas por proteínas, ácidos nucleicos e outras pequenas moléculas orgânicas, o hospedeiro está alheio à maioria destas moléculas, e por isto, apenas algumas delas incitam a resposta imune inata, como o LPS, os lipopeptídeos, ácido lipoteicóico, flagelina e DNA não metilado. Estes indutores microbianos são responsáveis por provocar a maior parte da resposta imune inata do hospedeiro a uma bactéria.

Além de patógenos, o sistema imune inato é capaz de reconhecer padrões moleculares associados a danos (DAMP), que nada mais são do que moléculas endógenas produzidas ou liberadas por células danificadas ou mortas. Os DAMP são produzidos a partir de danos celulares, que por sua vez, são causados por infecção, ou podem indicar lesões assépticas causadas por toxinas químicas, traumas ou redução do suprimento sanguíneo. Porém, é importante ressaltar que células mortas por apoptose normalmente não liberam DAMP (ABBAS et al., 2011). Os diversos receptores utilizados pelo sistema imune inato para reconhecer MAMP e DAMP podem ser encontrados em diferentes locais nas células, moléculas solúveis no sangue e nas secreções de mucosas. Moléculas de reconhecimento associadas às células do sistema imune inato geralmente são expressas, dentre outros, por fagócitos (linfócitos, macrófagos e neutrófilos), células dendríticas, células epiteliais (interface entre o corpo e ambiente externo) (BEUTLER, 2004).

De acordo com Sheldon et al. (2017), a imunidade adaptativa funciona como uma defesa suplementar no TRF, uma vez que, a imunidade inata é suficiente para lidar com a maioria dos perigos que o desafiam. Neste sentido, a imunidade adaptativa só entra em ação quando a resposta induzida pela imunidade inata não for suficientemente capaz de eliminar o problema. Ou ainda, quando o antígeno não for

reconhecido pelo sistema imune inato em função de não apresentar moléculas conservadas passíveis de reconhecimento por seus mecanismos.

3.3.1 Imunidade inata no trato reprodutivo feminino (TRF)

A homeostase do trato reprodutivo feminino (TRF), é constantemente testada por uma ampla gama de desafios, incluindo infecções, danos e até inseminação. Esta homeostasia é mantida através do mecanismo da imunidade inata (SHELDON et al., 2017). Neste sentido, entende-se por exemplo, que a lesão da superfície ovariana para a ovulação, bem como a descamação endometrial que culmina na menstruação nos primatas, caracterizam danos que precisam ser reconhecidos e corrigidos pelo sistema imune inato e portanto, faz-se necessária uma resposta por parte dos tecidos acometidos (CHOVATIYA & MEDZHITOV, 2014). Por outro lado, para que ocorra a fecundação, faz-se necessária uma modulação do sistema imune, de modo que não seja montada resposta inflamatória contra o sêmen depositado no TRF, para posterior formação da placenta para nutrir o feto (BEAGLEY & GOCKEL, 2003; CHAOUAT et al., 2010).

A compreensão da imunidade inata é necessária porque doenças e/ou respostas inflamatórias inadequadas no TRF (especialmente no endométrio ou ovário) podem levar à infertilidade (SHELDON et al., 2017). Apesar de a resposta inflamatória ajudar a manter e restaurar a saúde uterina, também pode causar consequências negativas para a fertilidade, como a perturbação da competência ovocitária. Sua intensidade reflete o equilíbrio entre o nível de perigo e os sistemas que regulam a imunidade inata, como o ambiente endócrino. O estradiol (E₂) e a progesterona (P₄) se apresentam como os principais responsáveis pela regulação da resposta imunológica e do processo inflamatório desencadeado pelo endométrio (HERATH et al., 2006b; DAVIES et al., 2008; BORGES et al., 2012). Sabe-se que as células epiteliais e estromais do endométrio e as células da granulosa ovariana expressam TLR que por sua vez, quando ativados, levam à inflamação, recrutamento de células imunes da circulação periférica e fagocitose (SHELDON et al., 2017).

A primeira barreira física às infecções e danos ao TRF é a chamada resiliência celular, seguida de vulva, cérvix, mucosa superficial de revestimento do trato, bem como a membrana basal dos folículos ovarianos e a zona pelúcida do oócito. Além

dela, o muco presente no TRF, associado aos peptídeos antimicrobianos e as proteínas do sistema complemento tornam o trato genital um ambiente hostil aos microrganismo (SHELDON et al., 2017). De acordo com Amos et al. (2014) e Healy et al. (2015) as células epiteliais do endométrio são mais resistentes a micróbios e toxinas do que as células estromais subjacentes. Além disso, Amos et al. (2014) verificaram comprometimento da resiliência endometrial em função do colesterol das células estromais do endométrio. Com isto, atestaram que estas células são mais sensíveis a citolisinas dependentes de colesterol (que são produzidas por bactérias) do que as células epiteliais. Neste caso, a destruição do colesterol das células estromais permitiriam maior resiliência do endométrio às toxinas bacterianas.

Além do fato de não produzir resposta imunológica contra o feto durante a gestação (ARCK et al., 2014), Sheldon et al. (2017) afirmam que o útero é um local imune-privilegiado devido à sua posição anatômica e barreiras físicas e químicas que lhe antecedem pois, o agente infeccioso precisa romper estas barreiras para causar danos ao TR. A vagina, a cérvix, o endométrio e as tubas uterinas são constantemente desafiados quanto à sua homeostase. As infecções sexualmente transmissíveis (IST) são associadas a micróbios que ascendem o TRF ou mesmo que alcançam esta região via circulação sanguínea e caracterizam um problema de saúde mundial para humanos e animais. Estas infecções expõem o TRF a PAMP e outros agentes danosos, como traumas e toxinas formadoras de esporos. Estas lesões estimulam os tecidos a liberarem DAMP e com isso, inicia-se um processo inflamatório para reparação tecidual e reestabelecimento da homeostasia.

A infertilidade, na maioria dos casos é causada por distúrbios como endometrite e endometriose (SHELDON et al., 2017). Pelo fato da resposta imune inata ser rapidamente induzida quando há o reconhecimento de perigo, uma de suas principais características é a detecção inespecífica de micróbios produzindo, portanto, uma inflamação, recrutamento de células imunes da circulação periférica para a resolução do problema e fagocitose (KAWAI & AKIRA, 2010; CHOVIATYA & MEDZHITOV, 2014; SHELDON et al., 2017). O reconhecimento específico com montagem de resposta inflamatória elaborada contra o patógeno é realizado pela imunidade adaptativa, que por sua vez, só entra em ação quando a imunidade inata não é suficientemente capaz de resolver o problema instalado (SHELDON et al., 2017).

A adição de PAMP ao tecido endometrial normalmente estimula respostas inflamatórias semelhante à dos macrófagos (PIOLI et al., 2004; HIRATA et al., 2005; SCHAEFER et al., 2005) com produção abundante de IL-6 e IL-8, que por sua vez, é aumentada devido à sinalização parácrina e feedback positivo, via receptor de IL-6 e transdutor de sinal e ativador de transcrição-3 (STAT3) (CRONIN ET AL., 2016). Independentemente do desafio ter sido reconhecido no ápice ou na base do endométrio, a IL-6 é liberada pela porção apical na direção do desafio pelas células endometriais polarizadas, enquanto mediadores como as prostaglandinas são liberadas na porção basolateral do endométrio (HEALY et al., 2015).

É importante ressaltar que apesar das células endometriais atuarem na defesa contra micróbios, os macrófagos são mais eficientes e importantes. Prova disso é que as células endometriais não detectam DAMPs como o hialuronano, a proteína da caixa 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1), ou células necróticas, mas conseguem produzir IL-1 α em resposta a infecção bacteriana (HEALY et al., 2015). Os receptores de reconhecimento de padrões do útero, além de identificar patógenos e danos, contribuem na resposta inflamatória ao plasma seminal depositado no TRF durante a inseminação. Em camundongos que não possuem TLR4 ficou provado que o reconhecimento do plasma seminal é dependente das vias ativadas pelos TLR4 (SCHJENKEN et al., 2015) e que portanto, o TLR4 é o responsável por reconhecer o plasma seminal após a inseminação, e direcionar as ações a serem tomadas pelo TRF a partir deste reconhecimento (HEALY et al., 2015; SCHJENKEN et al., 2015). Além disso, TLR4 estão presentes nas células do cumulus murinas, e são responsáveis pela expansão destas células após a fecundação (SHIMADA et al., 2008), e apresentam regulação endócrina nas células da granulosa murinas e bovinas, como evidenciado por Price e Sheldon (2013). Entretanto, segundo Poltorak et al. (1998) e Hoshino et al. (1999), os TLR4 não são indispensáveis à função ovariana, uma vez que camundongos TLR4 mutantes ou TLR4-nulos se reproduzem naturalmente com sucesso.

É importante que o tecido esteja em bom estado homeostático para que consiga sinalizar para a finalização da resposta imune inata tão logo o perigo seja contido. Caso isto não aconteça, a inflamação adquire caráter crônico e pode prejudicar o funcionamento do tecido (SHELDON et al., 2017). Neste sentido, faz-se necessário saber que uma inflamação típica apresenta vários tipos de PAMP e DAMP,

e que fatores de virulência podem tornar a resposta inflamatória maior do que o esperado, como o mRNA bacteriano (SANDER et al., 2011). Entretanto, vale ressaltar que nem todos os microrganismo induzem inflamação porque alguns desenvolveram fatores capazes de “burlar” o sistema imune inato, limitando assim, a resposta inflamatória (BAXT et al., 2013).

As células do hospedeiro juntamente com as vias metabólicas que ativam também podem amplificar ou regular as respostas inflamatórias. Por exemplo, a resposta ao LPS pelas células do estroma endometrial é aumentada pelo receptor IL-6 e a via STAT3 (CRONIN et al., 2016). Já em camundongos, o LPS induz ao acúmulo de succinato no ciclo de Krebs, levando à maior secreção de IL-1 β (TANNAHILL et al., 2013). Em bovinos, Healey et al. (2016) verificaram que a inflamação é reduzida no endométrio quando a via do mevalonato é inibida com o uso de estatinas. Além disso, a ligação mecânica do TLR4 e suas consequentes vias de sinalização, também favorecem respostas inflamatórias mais discretas pelas células endometriais. Ao violar o epitélio endometrial, as células estromais subjacentes ficam sujeitas a desafios inesperados. Entretanto, o dano microbiano promove a liberação de DAMP como IL-1 α e uridina 5'-difosfoglucose, que por sua vez, atuam escalonando a resposta inflamatória (HEALY et al., 2014).

3.3.2 Receptores Toll-like (TLR)

Os receptores *Toll-like* compreendem glicoproteínas do tipo I integrais presentes nas membranas celulares de mamíferos (ABBAS et al., 2011). Sua primeira identificação foi em *Drosophila melanogaster*, onde tem papel fundamental para desenvolvimento dorso-ventral destas moscas. Em seguida, verificou-se que este receptor estava envolvido em respostas antifúngicas na mosca adulta (IMLER & HOFFMANN, 2001). A partir de então, o interesse por conhecer melhor o papel destes receptores na imunidade inata nas mais diferentes espécies, tem motivado pesquisas que por sua vez, já conseguiram identificar diferentes tipos de TLR, bem como, esclarecer algumas de suas funções. O primeiro homólogo do TLR de *D. melanogaster* descoberto em humanos foi denominado TLR4 por Medzhitov et al., 1997). A descoberta destes receptores em humanos, ajudou a responder uma lacuna

existente no campo da imunologia, facilitando a compreensão da maneira como o sistema imune do hospedeiro reconhece patógenos (VIJAY, 2018).

Em mamíferos, são conhecidos 13 diferentes tipos de TLR, sendo que dez tipos de TLR em humanos (TLR1 – TLR10) e 12 em camundongos (TLR1 a TLR9, TLR11 a TLR13) (TAKEDA & AKIRA, 2015). Cada TLR é responsável por reconhecer um grupo particular de moléculas microbianas conservadas, de tal modo, que juntos, são capazes de detectar a maioria dos microrganismos (BEUTLER, 2004). Com a aplicação das ferramentas genéticas “forward” e “reverse”, identificou-se a especificidade da maioria dos TLR presentes em protozoários, bactérias, fungos e vírus (AKIRA et al., 2001; MEIER et al., 2003; BEUTLER, 2004; ZHANG et al., 2004). Destes, os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 são expressos na superfície extracelular, e são compostos por sequências repetidas de leucina, enquanto os demais são expressos na membrana intracelular. São estas sequências de leucinas que se ligam diretamente aos PAMPs e DAMPs para formar homodímeros ou heterodímeros que alteram a conformação celular, desencadeando então a resposta inflamatória, a partir da ativação de vias de sinalização. De maneira geral, todos os TLRs podem usar vias de sinalização dependentes do gene 88 de resposta primária da diferenciação mielóide (MyD88), que acionam as cascatas de fator nuclear Kappa B (NF- κ B) e a proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK). Isto induz a expressão de genes que codificam mediadores inflamatórios (KAWAI & AKIRA, 2010; SHELDON et al., 2017).

3.3.3 Efeito do ciclo estral na ativação da resposta imune inata

Diferente dos demais tecidos do corpo, a regulação da imunidade inata no endométrio sofre influência dos hormônios ovarianos estradiol e progesterona, que são capazes de modular a susceptibilidade à infecção, e a resposta inflamatória aos micróbios (BEAGLEY & GOCKEL, 2003; WIRA et al., 2015). Durante o ciclo menstrual, a expressão dos TLR é alterada em função da predominância do estrógeno ou da progesterona (WIRA et al., 2015). Prova disso é que a permeabilidade vascular do endométrio é aumentada na predominância da progesterona (GODDARD et al., 2014). A prostaglandina endometrial E₂ (PGE₂), além de sofrer modulação hormonal, também é secretada pelas células estromais do endométrio murino e bovino em resposta ao LPS (HERATH et al., 2006a; SHELDON & ROBERTS, 2010). Em contrapartida, Saut

et al. (2014) verificaram que os hormônios ovarianos estradiol e progesterona exógenos, e a inibição de receptores nucleares de esteroides em endométrio *ex vivo* de vacas não influenciaram na resposta inflamatória. Neste sentido, diz-se que além da regulação hormonal, existem outros fatores importantes na regulação da imunidade inata do endométrio, como as citocinas IL-4 e IL-10, as quais, inibem a produção de quimiocinas induzidas por TNF α (GERMEYER et al., 2009; OCHIEL et al., 2010).

A resolução da inflamação é um processo ativo em que lipídeos como lipoxinas e resolvinas atenuam a resposta inflamatória após a eliminação microbiana dos tecidos. Estas lipoxinas são produzidas pelo metabolismo que envolve a via da lipoxigenase do ácido aracdônico, enquanto as resolvinas são sintetizadas a partir de ácidos graxos essenciais como o ômega-3 eicosapentaenoico e ácido docosahexanóico (SERHAN et al., 2008).

A P₄ é o principal esteroide ovariano que comanda a capacidade do útero de resistir a infecções de acordo com os níveis circulantes. Em bovinos, elevadas concentrações promove uma redução na função imunológica e torna o útero susceptível a infecções (LEWIS, 2003b, 2004). Estudos realizados em bovinos, ovinos e suínos mostraram menor susceptibilidade às infecções uterinas quando as concentrações de P₄ eram basais comparado à fase lútea, em que os níveis deste hormônio estavam elevados (RAMADAN et al., 1997; SEALS et al., 2002; LEWIS, 2003a, 2003b; WULSTER-RADCLIFFE et al., 2003). Vacas com distocias que, posteriormente, apresentam retenção de placenta, têm o útero colonizado por bactérias durante o parto (LEWIS, 1997, 2003b), e após a formação do primeiro corpo lúteo (CL) pós-parto, a P₄ desregula as funções imunológicas uterinas favorecendo a proliferação das bactérias (especialmente *E. coli* e *T. pyogenes*) com consequente manifestação de doença uterina que, de acordo com Lewis (2003b), geralmente persiste até a luteólise.

Neste sentido, é compreensível o motivo pelo qual a prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}) exógena, com sua função luteolítica, se tornou o tratamento de eleição para vacas com piometra sem evidências de função lútea (LEWIS, 1997). Veterinários clínicos afirmam que a PGF_{2 α} estimula a contração uterina e, por consequência, a eliminação bacteriana juntamente com a lóquia, porém, não contabilizam que as bactérias que permanecem no útero e o novo CL com aumento de P₄ favorecerá o desenvolvimento

de doença (LEWIS, 2003a). Além disso, a literatura não permite inferir que as contrações uterinas promovidas pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ sejam capazes de eliminar as bactérias do útero (NIKOLAKOPOULOS; WATSON, 1999). Nesta revisão, Lewis (2003b), afirma que concentrações basais de P_4 e E_2 são capazes de impedir a proliferação bacteriana e garantir que o útero esteja protegido. Com isso, o autor infere que quando as concentrações de P_4 são basais e a contaminação bacteriana não é suficientemente grave, a ponto de sobrecarregar as defesas uterinas causando metrite, por exemplo, o útero é dito como resistente à infecção.

Durante o ciclo estral, quando há redução das concentrações de P_4 , ocorre o aumento do E_2 , da $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina e de leucotrieno B_4 (LTB_4) endometrial dificultando o desenvolvimento de infecções (VAGNONI et al., 2001), pois a $\text{PGF}_{2\alpha}$ promove um aumento na quimiotaxia de neutrófilos e os LTB_4 melhoram a capacidade destes neutrófilos em promoverem a neutralização e fagocitose bacteriana (LEWIS; WULSTER-RADCLIFFE, 2006). O aumento das concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em função da administração exógena de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumenta a fosfolipase A_2 (PLA_2) e da ciclooxigenase 2 (COX_2) (BINELLI et al., 2000; NARAYANSINGH et al., 2002). Este aumento de PLA_2 pode elevar os níveis de ácido aracdônico livre que, por sua vez, é utilizado para a produção de metabólitos da via da COX_2 , (como $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2) e lipoxigenase (como o LTB_4) (LEWIS, 2004). Além disso, o fator de necrose tumoral α ($\text{TNF}\alpha$), que ajuda na regulação das respostas inflamatórias e citotóxicas, também estimulam a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (MIYAMOTO et al., 2000; SKARZYNSKI et al., 2000; LEWIS, 2004). Dessa forma, infere-se que o aumento da secreção intrauterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e LTB_4 pode regular positivamente as funções imunológicas e permitir que o útero resolva e/ou previna infecções (SZEKERES-BARTHO et al., 2001; LEWIS, 2003b; LEWIS; WULSTER-RADCLIFFE, 2006).

3.3.4 Citocinas

Citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis cujo peso varia de 8 a 30 kDa, produzidas no local da lesão por diversos tipos celulares, ou por células do sistema imune, em função da ativação de MAPK. Por não serem armazenadas sob a forma de moléculas pré-formadas como os hormônios, sua atuação acontece de maneira parácrina ou autócrina (LIN et al., 2000; OLIVEIRA et

al., 2011). Diz-se que as citocinas são pleiotrópicas, isto é, uma única citocina pode ser produzida por vários tipos celulares e ainda, agir também em diversos outros tipos celulares (ZHANG & AN, 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Quando ligadas aos seus receptores, ativam mensageiros intracelulares reguladores da transcrição gênica, e com isto, influenciam diretamente na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência das células imunes. Além disso, modulam a produção de outras citocinas de acordo com o microambiente em que estão inseridas, podendo aumentar (pró-inflamatórias – Th1) ou atenuar (anti-inflamatórias – Th2) a inflamação (CURFS et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

As citocinas compreendem os mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de lesão e infecção, permitindo assim, adequada cicatrização da ferida. Entretanto, a produção exagerada de citocinas Th1 em uma lesão pode gerar instabilidade hemodinâmica, ou ainda, distúrbios metabólicos, dependendo da extensão da lesão. Além disso, quando há citocinas Th1 em excesso nas lesões e infecções graves, podem ocorrer lesões severas e/ou insuficiência de órgãos-alvo, podendo culminar na morte do indivíduo. Nestes casos, a produção de Th2 é importante para amenizar alguns efeitos indesejáveis (CURFS et al., 1997; LIN et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2011).

A função da resposta inflamatória na produção de dor não é limitada apenas aos efeitos produzidos pela migração de leucócitos. Como não se conhece exatamente a origem das citocinas pró-inflamatórias que participam da produção de dor, elas foram agrupadas em interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF), quimiocinas, interferons (INF) e fatores de crescimento mesenquimal (RAEBURN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011).

3.3.4.1 Interleucina 1 β (IL-1 β)

Mais do que qualquer outra família de citocinas, os membros da família da interleucina-1 (IL-1) estão mais intimamente ligados à inflamação prejudicial (DINARELLO, 2011). Embora quase todos os tipos de microrganismos induzam IL-1 β a partir da ligação a TLR, a IL-1 se induz *in vivo* e em monócitos *in vitro* (DINARELLO et al., 1987). Cerca de 15 minutos após o estímulo de LPS aos monócitos do sangue humano, os níveis de mRNA da IL-1 β aumentam e atingem seus níveis máximos em

quatro horas, quando começam a declinar em função da meia vida do mRNA. Porém, comparado ao LPS, quando a própria IL-1 é utilizada como estimulante, os níveis de mRNA da IL-1 β são mantidos por mais de 24 horas (SCHINDLER et al., 1990).

Zheng et al. (1995) e Fantuzzi et al. (1997a) observaram que camundongos IL-1 β deficientes não apresentam doença espontânea. Além disso, quando estes animais receberam injeção subcutânea de aguarrás, diferente de seus controles selvagens, não manifestaram inflamação aguda, anorexia, aumento nos níveis circulantes de IL-6 e febre nas primeiras 24 horas. Quando estes animais tiveram peritonite induzida por zymozan, a inflamação desenvolvida foi reduzida (FANTUZZI et al., 1997b). Em contrapartida, os camundongos IL-1 β deficientes apresentaram febre elevada em resposta ao LPS, IL-1 β ou IL-1 α quando comparado ao controle selvagem (ALHEIM et al., 1997), com pouca ou nenhuma expressão de mRNA de leptina e da síntese proteica de leptina (FAGGIONI ET AL., 1998).

A síntese de IL-1 β se dá sob a forma de proteína precursora (Pro-IL-1 β), que por sua vez, não é secretada em sua forma ativa enquanto não for metabolizada pela caspase-1. Esta citocina é amplamente expressa em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal (LIN et al., 2000; RAEBURN et al., 2002; ZHANG & AN, 2009), e induz resposta inflamatória a partir da ativação da ciclooxigenase-2 (COX-2), com formação de PGE₂ no hipotálamo, causando febre (RAEBURN et al., 2002; WOLF et al., 2008; ZHANG & AN, 2009). Esta citocina estimula linfócitos B e aumenta a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão das células endoteliais vasculares, levando a infiltração de células inflamatórias no espaço extravascular. A ativação de neutrófilos e monócitos para aumentar a fagocitose e morte bacteriana também constitui uma função da IL-1 β (SICA et al., 1990; WANG et al., 1991; DINARELLO, 2002).

O sistema IL-1, sob as formas de IL-1 β e IL-1R1 está presente no trato reprodutivo feminino e em embriões de várias espécies de mamíferos, inclusive em bovinos, e desempenha um importante papel durante o desenvolvimento embrionário (CORREIA-ÁLVAREZ et al., 2015). Em embriões humanos, a IL-1 β é produzida na fase inicial da gestação e em casos de fertilização *in vitro*, é correlacionada à implantação bem-sucedida do embrião após sua transferência para a cavidade uterina (SHETH et al., 1991; BARAÑAO et al., 1997). Neste sentido, em mulheres, baixos

níveis de IL-1 β são relacionados à ocorrência de abortos recorrentes (VON WOLFF et al., 2000). Em bovinos, a transcrição aumentada de mRNA do gene IL-1 β ocorre durante a fase lútea inicial (dia 7 do ciclo estral), e sua supressão ocorre por volta dos dias 13 a 16 do ciclo, numa fase tardia, mantendo o ambiente uterino com baixos níveis de fatores pró-inflamatórios, como forma de antecipação à gestação (OLIVEIRA et al., 2013). No início da gestação bovina, há uma queda nos níveis uterinos de IL-1 β e conseqüentemente, redução da expressão de NF κ B (fator nuclear kappa B) e das respostas inflamatórias decorrentes da ativação desta via, favorecendo o processo de imunotolerância uterina ao embrião. Neste período, a alta concentração de progesterona produzida pelo CL, inibe a liberação de prostaglandina F α (PGF α) por inibir a expressão de IL-1 β (NOTHNICK & PATE, 1990).

A IL-1 β foi correlacionada com saúde uterina em vacas, de modo que quanto mais o gene era expresso em biópsias endometriais na primeira semana pós-parto, menor era a fertilidade do animal (HERATH et al., 2009b). Além disso, animais com endometrite clínica e subclínica apresentam maior expressão do gene IL-1 β quando comparados aos saudáveis (ROCHE et al., 2009).

3.4.4.2 Interleucina 6 (IL-6)

Trata-se de uma glicoproteína com peso molecular variando de 22 a 27 kDa, secretada por vários tipos celulares, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e células da glia. É um importante indutor de febre e ativador do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal por meio de receptores α (IL-6R α), e seus principais indutores são o TNF α e IL-1 (CURFS et al., 1997). Além disso, é considerada uma citocina pleiotrópica capaz de regular o crescimento celular, angiogênese, inflamação e hematopoiese (ALTUN et al., 2011).

A IL-6 constitui um dos mais precoces e importantes moduladores de síntese das proteínas de fase aguda no fígado após estímulos de dor, como trauma, infecções, queimaduras e cirurgias. Também é considerada o marcador mais importante do grau de lesão tecidual em procedimentos cirúrgicos, haja visto que cerca de uma hora após a lesão pode-se detectar a elevação de concentrações plasmáticas, com pico entre quatro e seis horas após a lesão (KATO et al., 1997; GEBHARD et al., 2000; LIN et al., 2000).

A IL-6 exerce tanto atividades pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias. Dentre suas várias funções pode-se destacar que é uma citocina pró-inflamatória promotora de maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação de linfócitos-T citotóxicos e células *natural killers* (NK). Além disso, contribui para a regeneração de lesão neuronal através da regulação da expressão de neuropeptídeos após a lesão, bem como, pela ativação de astrócitos e micróglia (CURFS et al., 1997; LIN et al., 2000; RAEBURN et al., 2002). Entretanto, por meio de *feedback* negativo, inibe a síntese de IL-1, interferon gama (IFNG) e TNF, atenuando a síntese de proteínas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo que estimula discretamente, a síntese de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e fator de crescimento transformador β (TGF- β) (SCHELLER et al., 2011), além de liberar receptores solúveis de TNF (sTNFRs) e antagonista de receptores de IL-1 (IL-1AR) no local da lesão (CURFS et al., 1997; LIN et al., 2000; RAEBURN et al., 2002).

Em bovinos, verificou-se que a IL-6 pode ser essencial para a implantação bem-sucedida do embrião no útero (YANG et al., 2016), uma vez que suas maiores concentrações foram observadas na fase de alongamento e pré-implantação embrionária (MATHIALAGAN et al., 1992), que por sua vez, de acordo com Hansen et al. (2010), só ocorre após o 18º dia de gestação em bovinos. Em mulheres, a IL-6 é fator essencial para o desenvolvimento correto e adequado da placenta (GOYAL et al., 2013), e baixas concentrações desta citocina estão relacionadas a aborto (VON WOLFF et al., 2000). Além disso, sabe-se que o plasma seminal estimula a expressão de IL-6 em células epiteliais do endométrio *in vitro* e na ausência de plasma seminal, devido à não ocorrência do estímulo, a expressão gênica e as concentrações de IL-6 reduzem a ponto de influenciar negativamente a ocorrência da gestação (BROMFIELD et al., 2014).

3.4.4.3 Interleucina 8 (IL-8)

A IL-8 foi uma das primeiras citocinas descobertas. Outrora foi identificada como quimiocina secretada por monócitos ativos e macrófagos responsáveis pela migração coordenada e direcionada de células imunes como neutrófilos, basófilos e linfócitos (BAGGIOLINI et al., 1989). Em seguida, devido às suas propriedades pró-inflamatórias, foi apontada como indicador de doenças inflamatórias e autoimunes.

Diversos são os fatores que podem influenciar na expressão de IL-8, com destaque para aqueles que induzem estresse celular, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), privação de nutrientes, hipóxia, secreção de fatores pró-inflamatórios como TNF, IL1 β ou infiltração de macrófagos (SMYTH et al., 1991; KOCH et al., 1992; HARADA et al., 1994).

Uma de suas funções é a de agente quimiotático direcionador de neutrófilos para ajudar na remoção de patógenos do foco inflamatório (BAGGIOLINI, 2001). Em bovinos, a IL-8 atua tanto no recrutamento como na ativação de neutrófilos durante os processos inflamatórios (GALLIGAN & COOMBER, 2000). As infecções causadas por bactérias gram-negativas produzem maior aumento de IL-8 no sangue do que aquelas causadas por gram-positivas (BAL et al., 2017). Neste sentido, vacas diagnosticadas com endometrite apresentam maior expressão e secreção de IL-8 do que vacas saudáveis (GALVÃO et al., 2011) e por isto, foi sugerido por Fischer et al. (2010), que IL-8 fosse utilizado como marcador para a detecção de vacas com endometrite subclínica.

Considerando a importância da resposta imune inata para a manutenção da saúde uterina de vacas, faz-se necessário utilizar-se da pesquisa para compreender os mecanismos pelos quais o sistema imune atua, “preferindo” a ativação de uma determinada via inflamatória ao se deparar com determinados tipos de DAMPs e/ou PAMPs. Acreditamos que a histologia de cada região do trato reprodutivo feminino seja essencial para o reconhecimento destes agentes ou danos, bem como, para atuação do sistema imune inato no intuito de reestabelecer a homeostase.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- AHMADI, M. R.; NAZIFI, S.; GHASARI, H. R. Comparative cervical cytology and conception rate in postpartum dairy cows. **Veterinarski arhiv**, v. 76, n. 4, p. 323–332, 2006a.
- AHMADI, M. R.; NAZIFI, S.; GHASARI, H. R. Comparison of hormonal changes of estrous cycle with cytology of cervical mucosa and hematological parameters in dairy heifers. **Comparative Clinical Pathology**, v. 15, p. 94–97, 2006b.
- AKIRA, S. Mammalian Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, p. 5–11, 2003.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, v. 2, n. 8, p. 675–680, 2001.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.
- ALHEIM, K. et al. Hyperresponsive febrile reactions to interleukin (IL) 1 α and IL-1 β , and altered brain cytokine mRNA and serum cytokine levels, in IL-1 β -deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 6, p. 2681–2686, 18 mar. 1997.
- 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.
- AMOS, M. R. et al. Differential Endometrial Cell Sensitivity to a Cholesterol-Dependent Cytolysin Links *Trueperella pyogenes* to Uterine Disease in Cattle1. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 3, p. 1–13, 2014.
- ARCK, P. et al. The immune privilege of testis and gravid uterus: Same difference? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 509–520, 2014.
- AUSUBEL, F. M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? **NATURE IMMUNOLOGY**, v. 6, n. 10, p. 973–979, 2005.
- AZAWI, O. I. Postpartum uterine infection in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 3–4, p. 187–208, 2008.
- BACHA JR., W. J.; BACHA, L. M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003.
- BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, v. 84, n. 4, p. 1045–1049, 1989.
- BAL, Z. Ş. et al. Diagnostic accuracy of interleukin-6 , interleukin-8 , and interleukin-10 for predicting bacteremia in children with febrile neutropenia. **Turkish Journal of Hematology**, v. 34, p. 254–257, 2017.

- BANKS, W. J. Sistema reprodutor feminino. In: **Histologia veterinária aplicadas**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 565–588.
- BARAÑAO, R. I. et al. Determination of IL-1 and IL-6 levels in human embryo culture-conditioned media. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 2, p. 191–194, 1997.
- BAXT, L. A.; GARZA-MAYERS, A. C.; GOLDBERG, M. B. Bacterial subversion of host innate immune pathways. **Science**, v. 340, n. 6133, p. 697–701, 2013.
- BEAGLEY, K. W.; GOCKEL, C. M. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 13–22, 18 ago. 2003.
- BELLOWS, D. S.; OTT, S. L.; BELLOWS, R. A. Review: Cost of reproductive diseases and conditions in cattle. **The Professional Animal Scientist**, v. 18, n. 5, p. 26–32, 2002.
- BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 257–263, 2004.
- BINELLI, M. et al. Interferon- τ modulates phorbol ester-induced production of prostaglandin and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase-A2 from bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 2, p. 417–424, 2000.
- BLAZQUEZ, N. et al. Histology and histochemistry of the bovine reproductive tract caudal to the cervix. Part II. The vagina and associated structures. **The British Veterinary Journal**, v. 143, n. 4, p. 337–343, 1987.
- BONNEVILLE-HÉBERT, A. et al. Effect of reproductive disorders and parity on repeat breeder status and culling of dairy cows in Quebec. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 75, n. 2, p. 147, 2011.
- BORGES, A. M.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation Ex Vivo. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 1, p. 526–539, 2012.
- BREEVELD-DWARKASING, V. N. A. et al. The bovine cervix during the oestrous cycle: Regional differences in morphology and density of steroid hormone receptors. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, n. 3–4, p. 120–124, 2000.
- BREEVELD-DWARKASING, V. N. A. et al. Regional Differences in Water Content, Collagen Content, and Collagen Degradation in the Cervix of Nonpregnant Cows. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 69, n. 1, p. 1600–1607, 2003.
- 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. 10, n. 1, p. 1–20, 2018.
- BROMFIELD, J. J. et al. Maternal tract factors contribute to paternal seminal fluid impact on metabolic phenotype in offspring. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 6, p. 2200–2205, 2014.
- CHAOUAT, G. et al. Tolerance to the foetal allograft? **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 624–636, 2010.

CHOVATIYA, R.; MEDZHITOV, R. Stress, inflammation, and defense of homeostasis. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 281–288, 24 abr. 2014.

CORREIA-ÁLVAREZ, E. et al. Expression and localization of interleukin 1 beta and interleukin 1 receptor (type I) in the bovine endometrium and embryo. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 110, p. 1–13, 2015.

CRONIN, J. G. et al. Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 2, p. 1–9, 1 fev. 2012.

CRONIN, J. G. et al. Signal transducer and activator of transcription-3 licenses Toll-like receptor 4-dependent interleukin (IL)-6 and IL-8 production via IL-6 receptor-positive feedback in endometrial cells. **Mucosal Immunology**, v. 9, n. 5, p. 1125–1136, 2016.

CURFS, J. H. A. J.; MEIS, J. F. G. M.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A. A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 742–780, out. 1997.

DAVIES, D. et al. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, n. 53, p. 1–12, 18 nov. 2008.

DE ALVARENGA, P. B. et al. Prevalence of inflammatory processes in the reproductive tracts of crossbred dairy cows. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 3, 2018.

DEGUILLAUME, L. et al. Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 1776–1783, abr. 2012.

DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

DINARELLO, C. A. et al. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 139, n. 6, p. 1902–10, 15 set. 1987.

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

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720–3732, 2011.

DUBUC, J. et al. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 1, p. 5764–5771, 2010.

FAGGIONI, R. et al. IL-1 β mediates leptin induction during inflammation. **American Journal of Physiology**, v. 274, p. 204–208, jan. 1998.

FANTUZZI, G. et al. Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme-deficient mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 158, n. 4, p. 1818–24, 15 fev. 1997a.

FANTUZZI, G. et al. Physiological and cytokine responses in IL-1 beta-deficient mice after zymosan-induced inflammation. **The American journal of physiology**, v. 273, n. 1 Pt 2, p. R400-6, jul. 1997b.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária: a arte do diagnóstico**. 3ª ed. São Paulo: Roca, 2014.

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.

GALLIGAN, C. L.; COOMBER, B. L. Effects of human IL-8 isoforms on bovine neutrophil function in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 74, p. 71–85, 2000.

GALVÃO, K. N. et al. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 290–299, 2011.

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.

GEBHARD, F. et al. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? **Archives of Surgery**, v. 135, n. 3, p. 291–295, 2000.

GERMEYER, A. et al. Paracrine effects of uterine leucocytes on gene expression of human uterine stromal fibroblasts. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, n. 1, p. 39–48, 2009.

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.

GODDARD, L. M. et al. Progesterone receptor in the vascular endothelium triggers physiological uterine permeability pre-implantation. **Cell**, v. 156, n. 3, p. 549–562, 2014.

GOYAL, P. et al. Cytokine IL-6 secretion by trophoblasts regulated via sphingosine-1-phosphate receptor 2 involving Rho/Rho-kinase and Rac1 signaling pathways. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, n. 8, p. 528–538, 2013.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2003.

HANSEN, T. R. et al. Endocrine actions of interferon-tau in ruminants. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 67, p. 325–340, 2010.

HARADA, A. et al. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, n. 5, p. 559–564, 1994.

HARTMANN, D. et al. Prevalence of cervicitis in dairy cows and its effect on reproduction. **Theriogenology**, v. 85, n. 2, p. 247–253, jan. 2016.

HEALEY, G. D. et al. Mevalonate biosynthesis intermediates are key regulators of

innate immunity in bovine endometritis. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 2, p. 823–831, 2016.

HEALY, L. L.; CRONIN, J. G.; SHELDON, I. M. Endometrial cells sense and react to tissue damage during infection of the bovine endometrium via interleukin 1. **Scientific Reports**, v. 4, n. 7060, p. 1–9, 2014.

HEALY, L. L.; CRONIN, J. G.; SHELDON, I. M. Polarized epithelial cells secrete interleukin 6 apically in the bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 6, p. 1–12, 2015.

HERATH, S. et al. Expression and function of Toll-like Receptor 4 in bovine endometrium. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 562–570, 2006a.

HERATH, S. et al. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 69, n. 1, p. 13–22, fev. 2006b.

HERATH, S. et al. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F 2 α to prostaglandin E 2 in bovine endometrium. **Endocrinology**, v. 150, n. 4, p. 1912–1920, 2009a.

HERATH, S. et al. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 55, p. 1–13, 29 maio 2009b.

HIRATA, T. et al. Evidence for the presence of toll-like receptor 4 system in the human endometrium. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 1, p. 548–556, 2005.

HORNE, A. W.; STOCK, S. J.; KING, A. E. **Innate immunity and disorders of the female reproductive tract** **Reproduction**, jun. 2008.

HOSHINO, K. et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 7, p. 3749–52, 1999.

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

IMLER, J.-L.; HOFFMANN, J. A. Toll receptors in innate immunity. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 7, p. 304–311, 2001.

JI MING WANG et al. Expression of monocyte chemotactic protein and interleukin-8 by cytokine-activated human vascular smooth muscle cells. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, v. 11, n. 5, p. 1166–1174, 1991.

KASK, K. et al. Assessment of early postpartum reproductive performance in two high producing estonian dairy herds. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 44, n. 3–4, p. 131–143, 2003.

KATO, M. et al. Elevated plasma levels of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte colony-stimulating factor during and after major abdominal surgery. **Journal of clinical anesthesia**, v. 9, n. 4, p. 293–298, jun. 1997.

- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010.
- KOCH, A. E. et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, v. 258, p. 1798–1801, 1992.
- LEBLANC, S. J. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 5, p. 18–30, 2012.
- LEBLANC, S. J. Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. **Animal**, v. 8, n. 1, p. 54–63, 2014.
- LEBLANC, S. J.; OSAWA, T.; DUBUC, J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 1610–1618, 2011.
- LEFEBVRE, R. C.; STOCK, A. E. **Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F2 α in postpartum dairy cows with clinical endometritis: an evidence-based evaluation** *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, mar. 2012.
- LEITE, T. E.; MORAES, J. C. F.; PIMENTEL, C. A. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras. **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 467–472, 2001.
- LEWIS, G. S. Symposium: Health problems of the postpartum cow. **J Dairy Sci**, v. 80, p. 984–994, 1997.
- LEWIS, G. S. Role of ovarian progesterone and potential role of prostaglandin F 2 α and prostaglandin E2 in modulating the uterine response to infectious bacteria in postpartum ewes. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 1, p. 285–293, 2003a.
- LEWIS, G. S. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 117, n. 1, p. 1–8, 28 nov. 2003b.
- LEWIS, G. S. Steroidal regulation of uterine immune defenses. **Animal Reproduction Science**, v. 82, n. 83, p. 281–294, 2004.
- 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, 2006.
- LIN, E.; CALVANO, S. E.; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, n. 2, p. 117–126, 2000.
- MARTINS, T. M. **Avaliação da imunidade inata uterina em vacas: transcrição endometrial de receptores de padrões moleculares microbianos no pós-parto e histopatologia após infusão de Escherichia coli inativada na fase de estro.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2014.
- MARTINS, T. M.; BORGES, Á. M. Uterine immunology and fertility. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 39, n. 1, p. 129–135, 2015.
- 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.

MCDUGALL, S. et al. Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 229–240, 15 jul. 2011.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394–397, 1997.

MEIER, A. et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for Aspergillus-induced activation of murine macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 561–570, 1 ago. 2003.

MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Is tumor necrosis factor α a trigger for the initiation of endometrial prostaglandin F $_{2\alpha}$ release at luteolysis in cattle? **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1109–1115, 2000.

NARAYANSINGH, R. M.; SENCHYNA, M.; CARLSON, J. C. Treatment with prostaglandin F $_{2\alpha}$ increases expression of prostaglandin synthase-2 in the rat corpus luteum. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 70, p. 145–160, 2002.

NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E. D. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 413–423, 1999.

NOTHNICK, W. B.; PATE, J. L. Interleukin-1 β is a potent stimulator of prostaglandin synthesis in bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 5, p. 898–903, 1990.

OCHIEL, D. O. et al. Human uterine epithelial cell secretions regulate dendritic cell differentiation and responses to TLR ligands. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, n. 3, p. 435–444, 2010.

OLIVEIRA, C. M. B. DE et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 260–265, 2011.

OLIVEIRA, L. J. et al. Characterization of the Th profile of the bovine endometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–13, 2013.

PETERS, A. R. Reproductive activity of the cow in the post-partum period. I. Factors affecting the length of the post-partum acyclic period. **British Veterinary Journal**, v. 140, n. 1, p. 76–84, 1984.

PIOLI, P. A. et al. Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in tissues of the human female reproductive tract. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5799–5806, out. 2004.

POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 1998.

POPESKO, P. **Atlas de anatomia topográfica dos animais domésticos**. 5. ed.

São Paulo: Manole, 2012.

POTTER, T. J. et al. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 127–134, jul. 2010.

PRICE, J. C.; SHELDON, I. M. Granulosa Cells from Emerged Antral Follicles of the Bovine Ovary Initiate Inflammation in Response to Bacterial Pathogen-Associated Molecular Patterns via Toll-Like Receptor Pathways. **Biology of Reproduction**, v. 89, n. 5, p. 1–12, 2013.

RAEBURN, C. D. et al. Cytokines for surgeons. **American journal of surgery**, v. 183, n. 3, p. 268–73, mar. 2002.

RAMADAN, A. A.; JOHNSON, G. L.; LEWIS, G. S. Regulation of uterine immune function during the estrous cycle and in response to infectious bacteria in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 6, p. 1621–1632, 1997.

ROBERTS, T. et al. Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 1, p. 3057–3063, 2012.

ROCHA, A. A. et al. MICROBIOTA CÉRVICO-VAGINAL DURANTE O FINAL DE GESTAÇÃO E. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 4, p. 215–220, 2004.

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. 5769–801, dez. 2009.

SANDER, L. E. et al. Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 385–392, 2011.

SANTOS, R. L.; NASCIMENTO, E. E.; EDWARDS, J. F. Sistema reprodutivo feminino. In: **Patologia Veterinária**. 1ª ed. São Paulo: Rocca, 2011. p. 797–854.

SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. **Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 153–159, 2007.

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 Research**, v. 148, n. 1, p. 593–606, 2014.

SCHAEFER, T. M. et al. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. **Immunology**, v. 112, n. 3, p. 428–436, jul. 2004.

SCHAEFER, T. M. et al. Innate immunity in the human female reproductive tract: antiviral response of uterine epithelial cells to the TLR3 agonist poly(I:C). **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 2, p. 992–1002, 2005.

SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011.

SCHINDLER, R.; GHEZZI, P.; DINARELLO, C. A. IL-1 induces IL-1. IV. IFN-gamma suppresses IL-1 but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 144, n. 6, p. 2216–22, 15 mar. 1990.

SCHJENKEN, J. E. et al. TLR4 signaling is a major mediator of the female tract response to seminal fluid in mice. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 3, p. 1–13, 2015.

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.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 349–361, 2008.

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.

SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516–1530, maio 2006.

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

SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 1, p. 1025–1032, 2009.

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

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

SHELDON, I. M.; ROBERTS, M. H. Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–10, 2010.

SHELDON, M. Endometritis in cattle: pathogenesis, consequences for fertility, diagnosis and therapeutic recommendations. **Partners in Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2007.

SHETH, K. V. et al. Prediction of successful embryo implantation by measuring interleukin-1-alpha and immunosuppressive factor(s) in preimplantation embryo culture fluid. **Fertility and Sterility**, v. 55, n. 5, p. 952–957, 1991.

SHIMADA, M. et al. Hyaluronan fragments generated by sperm-secreted hyaluronidase stimulate cytokine/chemokine production via the TLR 2 and TLR4 pathway in cumulus cells of ovulated COCs, which may enhance fertilization. **Development**, v. 135, n. 11, p. 2001–2011, 2008.

SICA, A. et al. IL-1 transcriptionally activates the neutrophil chemotactic factor/IL-8 gene in endothelial cells. **Immunology**, v. 69, n. 4, p. 548–53, 1990.

SKARZYNSKI, D. J.; MIYAMOTO, Y.; OKUDA, K. Production of prostaglandin F2 α

by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor α : Cell type specificity and intracellular mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1116–1120, 2000.

SMYTH, M. J. et al. IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. **The Journal of Immunology**, v. 146, p. 3815–3823, 1991.

SORDILLO, L. M.; CONTRERAS, G. A.; AITKEN, S. L. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. **Animal Health Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 53–63, 2009.

STEPHENS, L. R. et al. Investigation of purulent vaginal discharge in cows, with particular reference to *Haemophilus somnus*. **Austra**, v. 63, n. 6, p. 182–184, 1986.

SWANGCHAN-UTHAI, T. et al. Time Course of Defense Mechanisms in Bovine Endometrium in Response to Lipopolysaccharide1. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 6, p. 1–13, 1 dez. 2012.

SZEKERES-BARTHO, J. et al. Progesterone as an immunomodulatory molecule. **International Immunopharmacology**, v. 1, p. 1037–1048, 2001.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-Like receptors. **Current Protocols in Immunology**, v. 109, p. 1–10, 2015.

TANNAHILL, G. et al. Succinate is a danger signal that induces IL-1 β via HIF-1 α . **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 238–242, 2013.

TURNER, M. L.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Immunity and inflammation in the uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL.4, p. 402–409, ago. 2012.

VAGNONI, K. E. et al. The influence of the phase of the estrous cycle on sheep endometrial tissue response to lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 2, p. 463–469, 2001.

VAN ENGELEN, E. et al. Cervical ripening and parturition in cows are driven by a cascade of pro-inflammatory cytokines. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 5, p. 834–841, 2009.

VIJAY, K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. **International Immunopharmacology**, v. 59, p. 391–412, 2018.

VON WOLFF, M. et al. Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 7, p. 627–634, 2000.

WERLING, D.; COFFEY, T. J. **Pattern recognition receptors in companion and farm animals - The key to unlocking the door to animal disease?** *Veterinary Journal*, set. 2007.

WILLIAMS, E. J. et al. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 102–117, 2005.

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, 1 set. 2007.

WINKLER, M.; RATH, W. Changes in the cervical extracellular matrix during pregnancy and parturition. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 27, n. 1, p. 45–61, 1999.

WIRA, C. R.; RODRIGUEZ-GARCIA, M.; PATEL, M. V. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. **Nature reviews Immunology**, v. 15, n. 4, p. 217–230, 2015.

WOLF, G. et al. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 7, p. 1072–1077, out. 2008.

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.

YANG, L. et al. Changes in expression of Th1 and Th2 cytokines in bovine peripheral blood mononuclear cells during early pregnancy. **Indian Journal of Animal Research**, v. 50, n. 4, p. 466–470, 2016.

ZHANG, D. et al. A Toll-like receptor that prevent infection by uropathogenic bacteria. **Science**, v. 303, p. 1522–1526, 2004.

ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **Intertional Anesthesiology Clinics**, v. 69, n. 2, p. 27–37, 2009.

ZHENG, H. et al. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 β -deficient mice. **Immunity**, v. 3, n. 1, p. 9–19, 1995.

**CAPÍTULO 2 – Histological evaluation of the uterus and its transitional portions
of the reproductive tract of crossbred heifers**

Histological evaluation of the uterus and its transitional portions of the reproductive tract of crossbred heifers

P. B. de Alvarenga¹, A. L. Rezende¹, V. A. Martinez², A. B. Cardoso Neto¹, V. S. Marques², A. F. Coletto¹, L. H. V. Neves³, K. A. Alves⁵, C. C. Campos⁶, J. P. E. Saut⁴

¹Pós-Graduandos em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG, Brasil

²Graduandos do curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) UFU, MG, Brasil

³Graduando do curso de Medicina Veterinária, Fundação Presidente Antônio Carlos de Uberlândia (UNIPAC Uberlândia), MG, Brasil

⁴Docentes do curso de Medicina Veterinária, FAMEV, UFU, MG, Brasil

⁵Docente do Centro Universitário do Triângulo (UNITRI), MG, Brasil

⁶Docente do Centro Universitário UNA Câmpus Uberlândia, MG, Brasil

ABSTRACT – Infections of the bovine reproductive tract (RT) are one of the main causes of involuntary culling of dairy cows and, comprehend the histology of the RT may help in understanding the uterine innate immune response. We aimed to evaluate the alterations of tissue layers dynamic among the different anatomical structures of the bovine female RT focusing on the cervix and its transitional portions using macroscopic and histological evaluations during follicular and luteal phases of the estrous cycle. Samples from the cranial portion of the vagina, vagina-cervix transition, cervix medial portion, cervix-endometrium transition, uterine caruncles and, intercaruncular endometrium were collected and submitted to classic histological process with HE stains. After that, the description of the observed characteristics of each analyzed region was performed. The results showed that the cervix presents more robust structure than the other portions of the RT. The histological profile of the cervical transition portions characterized fundamental importance on homeostasis maintenance. This is due to the presence of caliciform cells which produces mucous with antimicrobial properties and function as a physical-chemical barrier against the colonization of the RT by pathogenic microorganisms. We conclude that the gradual epithelial change with the presence of mucous producer cells at the cervical transitional portions that converge to the cervix is an important factor for the maintenance of that immunity by constituting an effective antimicrobial barrier.

Keywords: cervical transitions, cervix, crossbred heifers, innate immunity

1 INTRODUCTION

The reproductive tract (RT) infections affects about 15 to 40% of dairy cows during postpartum period while subclinical diseases could affect a higher number of animals (DEGUILLAUME et al., 2012; SHELDON et al., 2009). These diseases are known to be the mainly causes of involuntary culling of dairy cows (BONNEVILLE-HÉBERT et al., 2011; LEBLANC et al., 2002). Due to the reduction in milk production,

elevated costs with treatment and replacement of cows these diseases represent an annual cost of US\$ 650 million in USA and €1.4 billion in European Union (SHELDON et al., 2009).

The RT infections usually happens during postpartum period and are mostly caused by bacteria, which can be Gram-negative (*Escherichia coli*) or Gram-positive (*Trueperella pyogenes*) (GILBERT; SANTOS, 2016; SHELDON et al., 2002, 2010). The response of the animals against infection depends of the strategies such as resistance, defined as a capacity of reduction of pathogen load and, tolerance described as the ability to limit the severity of the disease, tolerating a specific microbial load (AMOS et al., 2014b; AYRES; SCHNEIDER, 2008; READ; GRAHAM; RÅBERG, 2008).

Both resistance and tolerance are disrupted by metabolic stress that commonly occurs during postpartum period of dairy cows. The negative effect of energetic metabolic stress on inflammatory response of pathogen associated molecular pattern (PAMP) in bovine endometrial tissue was described by Turner et al. (2016). Noletto, Saut and Sheldon (2017) showed that lower offer of glutamine influenced in vitro endometrial inflammatory response after lipopolysaccharide (LPS) exposure. Turner, Owens and Sheldon (2020) reported that glutamine privation reduce the viability of cells from endometrial stroma when challenged with pyolisin (PLO), which is a cholesterol-dependent cytolysin synthesized by *Trueperella pyogenes*.

The tolerance may vary depending on the cell type involved. Cells from endometrial stroma are notably more sensible of cell lysis mediated by PLO than cell from endometrial epithelium. These cells forms a physical barrier between uterine lumen and stroma by a columnar endometrial epithelium (AMOS et al., 2014b). However, this epithelium layer can be discontinued and expose the stroma due to traumas related with calving and flaking of the surface of uterine caruncles about 12 to 14 days after calving (ARCHBALD et al., 1972; WAGNER; HANSEL, 1969).

Among the diseases that affect RT of bovine females, the postpartum endometrial infections are the most common and notably more researched (SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019; VAN SCHYNDEL; PASCOTTINI; LEBLANC, 2018). However, in the last years great emphasis has been placed on the inflammation and infection of cervical portion of the uterus, once the conception of dairy

cows is directly related to diseases occurrence such as cervicitis and/or endometritis (ALVARENGA et al., 2018; DEGUILLAUME et al., 2012). According to Deguillaume et al. (2012) and Ahmadi et al. (2005) cows that develop endometritis and cervicitis simultaneously have a higher risk to not conceive. Hartmann et al. (2016) and Deguillaume et al. (2012) verified the occurrence of cervicitis of 76.9% and 42%, respectively in Holstein dairy cows evaluated with less than 35 days postpartum (DPP). The same authors also reported that 66.3% (HARTMANN et al., 2016) and 94% (DEGUILLAUME et al., 2012) of evaluated cows did not present concomitant endometrial infection, demonstrating the importance of cervicitis in purulent vaginal discharge (PVD) during puerperal phase. In crossbred dairy cows culled by reproductive problems after 60 DPP the prevalence of cytological endometritis found was 12.1% and cervicitis was 6.1% (ALVARENGA et al., 2018).

The bovine cervix is a fibrous tubular organ with 6 to 13 cm of length and well developed. It is composed of collagen type I, III and, IV, proteoglycans, elastin, reticulin, connective tissue associated with a smooth musculature, characterized by a thick wall and constricted lumen. The arrangement of the cervical rings permits a safe occlusion of the cervical canal, which slightly relaxes to allow the passage of sperm during estrus due to hormonal action (SENGER, 2003; HAFEZ; HAFEZ, 2000; WINKLER; RATH, 1999). During pregnancy the biochemistry composition and its functional properties of the cervix changes, determined by parameters that regulates the physical properties of connective tissue matrix. In this phase mucus producing cells forms a barrier similar as a valve which separates uterine from vaginal lumen and protects the fetus by avoiding the ascendancy of harmful agents (SAMUELSON, 2007). These alterations happen while gestation progresses and thus the collagenous fiber network destruction leads to tissue depletion. From this moment due to a higher vascularization and increase of glycoproteins concentration associated with matrix components decrease, there is an increase in cervical volume about 8 times greater than normal size. After calving, cervix returns to its original/non pregnant size due to the action of enzymes and, synthesis of proteoglycans and hyaluronates, reduction of hexuronate level and collagenous fiber network reorganization (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

Considering the importance of anatomical structures of RT and the cellular populations role in resistance and tolerance against infection agents to maintenance

of uterine health, this study aimed to evaluate the dynamics of tissue layers changes among anatomical structures of RT from bovine females with focus on cervical portions and its transitions, using macroscopic and histological evaluations during follicular and luteal phases of estrous cycle.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals, housing and nutrition

This experiment was performed at the Laboratory of Health of Large Animals (LASGRAN) from the Federal University of Uberlândia (UFU).

Crossbred (Nelore x Aberdeen Angus) beef virgin heifers (n = 6) with 18 months of age and clinically healthy were used. The animals were all from the same farm located in Iturama, Minas Gerais, Brazil. The nutritional management was based on pasture until 14 months of age and then the animal was moved to feedlot for the last 4 months. The sanitary program of the farm was also the same for all animals.

2.2 Blood and RT sampling collection

The blood (collected during bleed process) and RT samples were collected at a commercial slaughterhouse. All samples were identified, placed on ice immediately after collection and, transported to the laboratory for analyses within two hours.

2.3 Sample processing

2.3.1 Blood - the blood samples were centrifuged at $120 \times g$ for 10 min at 4°C (Global Trade 80-2B-15mL[®]). Serum samples were transferred for cryotubes and stored in a -80°C freezer until subsequent analysis. These samples were sent to the Hormonal Dosing Laboratory (HDL) of Animal Reproduction Department of Veterinary Faculty of Federal Fluminense University (UFF), Rio de Janeiro, Brazil. Progesterone (P_4) concentration in serum was determined by Radioimmunoassay (RIA) technique in solid phase using commercial kits (ICN Pharmaceuticals, Ins.[®], Costa Mesa, CA, USA). The sensibility and intra assay coefficient of the test were 0.05 ng/mL and 11%, respectively. All data was within maximum and minimal points of the curve. According

to the progesterone serum concentration obtained, animals were classified in follicular ($[P_4] < 1\text{ng/mL}$; $n = 3$) or luteal phase of the estrous cycle ($[P_4] > 1\text{ng/mL}$; $n = 3$) (LIU et al., 2018).

2.3.2 Uterus - after macroscopic evaluation of uterus samples to certify that there was no disease and/or pregnancy evidence, fragments from cranial portion of the vagina, vagina-cervix transition, cervix medial portion, cervix-endometrium transition, uterine caruncles and, intercaruncular endometrium were collected (Figure 2.1). The samples were fixed in 10% buffered formaldehyde and subsequent submitted to histological processing, as performed by Alvarenga et al. (2018), adapted from the methodology proposed by Tolosa; Rodrigues; Freitas Neto (2005). The fragments were sectioned at $5\text{ }\mu\text{m}$ of size and the slides stained in Hematoxylin and Eosin (HE) and then evaluated in an optical microscope (40X).

2.3.3 Data analyzes

For better both visualization and histological profile representation, all slides were scanned in Leica ScanScope AT Turbo® (Amperio) equipment (20X) and analyzed by Amperio ImageScope SVC (v12.3.3.5048)® software.

The histological evaluation of fragments from cranial portion of the vagina, vagina-cervix transition, cervix medial portion, cervix-endometrium transition, uterine caruncles and, intercaruncular endometrium were submitted to a descriptive analyze using studies of Palomares et al., 2018, Thasmi et al. (2018) and Eurell and Frappier (2006) as a reference. Inflammatory infiltrates were classified as mild, moderate and, severe according to Gonzalez et al. (1985).

3 RESULTS

The results of histological evaluation will be present by region of the RT as well as the variations observed, according to estrous cycle phase.

3.1 Cranial portion of the vagina

In the cranial portion of the vagina a cubic stratified lining epithelium containing 3 to 11 layers (follicular phase) or 6 layers (luteal phase) was observed. The submucous was constituted by loose connective tissue with congested blood vessels and moderate neutrophils amount involved by fibrovascular connective tissue in follicular phase. The muscular tunic was arranged in two layers (smooth internal circle and smooth external longitudinal) and presented a moderate infiltrate of mononuclear cells. The serosa in both phases was constituted by mesothelium and loose connective tissue (Figure 2.2).

3.2 *Vagina-cervix transition*

In the region of transition between vagina and cervix an epithelium transition was observed, frequently switching from columnar pseudostratified lining epithelium with goblet cells and cubic stratified epithelium in both phases of the estrous cycle. During follicular phase, in some regions there were evidences of discrete cervical rings lined by simple columnar epithelium with goblet cell hypertrophy. During luteal phase, these cervical rings seem to be thinner than those observed during follicular phase.

The submucous during follicular phase was constituted by loose connective tissue with a discrete infiltrate of mononuclear cells and less thick than cranial portion of the vagina. However, during luteal phase the connective tissue verified in submucous was dense with a presence of a focal infiltrate of mononuclear cells and all this layer was thinner than during follicular phase. In both phases of the estrous cycle, the muscular tunic has two layers, and it was thicker than submucous region. The serosa was constituted by mesothelium and loose connective tissue (Figure 2.3).

3.3 *Cervix medial portion*

In both phases of the estrous cycle, cervical rings lining by simple columnar epithelium was verified although, during luteal phase these structures were smaller, thinner and more widely spaced. The cervical submucous layer was composed by dense connective tissue intensely vascularized regardless of the phase of the estrous cycle. In this region the muscular tunic was rich in elastic fibers and the serosa was

constituted by mesothelium and loose connective tissue in both phases of the estrous cycle (Figure 2.4).

3.4 Uterus-cervix transition

In the region of transition between the uterus and cervix a columnar pseudostratified epithelium with goblet cells was noted, switching from cubic stratified epithelium areas and the presence of discrete cervical rings in both phases of the estrous cycle.

During follicular phase was possible to observe the presence of simple tubular or spiral endometrial glands, lining by ciliated columnar pseudostratified epithelium with congested blood vessels involved by edematous loose connective tissue. During luteal phase the submucous has a large amount of was also involved by tubular or spiral endometrial glands involved by dense connective tissue.

In both phases of the estrous cycle the muscular tunic was composed by two layers. However, a congested vascular stratum and the presence of interstitial edema in the inner circular layer was detected during follicular phase. Also, in both phases of the estrous cycle the serosa layer was constituted by mesothelium and loose connective tissue (Figure 2.5).

3.5 Uterine caruncles

In follicular phase the endometrium was composed by dense connective tissue intensely vascularized with a columnar pseudostratified lining epithelium. The myometrium has two layers with an evident vascular stratum and a discrete lymphocyte infiltrate was observed in both phases of the estrous cycle. In luteal phase was verified that the compact stratum was thicker than in the follicular phase. The serosa was constituted by mesothelium and loose connective tissue in both phases of the estrous cycle (Figure 2.6).

3.6 Intercaruncular endometrium

In the region of intercaruncular endometrium a simple columnar lining epithelium was observed during follicular phase, while in luteal phase the epithelium was the pseudostratified type. In the submucous during follicular phase a compact stratum of dense and vascularized connective tissue was verified. The spongy stratum was composed by simple tubular and/or spiral glands with simple columnar ciliate epithelium and congested blood vessels involved by loose connective tissue. During the luteal phase, a spongy stratum less vascularized with endometrial glands was observed.

In both phases, the myometrium was presented in two layers and, during follicular phase the presence of a discrete polymorphonuclear infiltrate in the longitudinal external layer was detected. The perimetrium was constituted by loose connective tissue and lined by simple cubic epithelium in both phases of the estrous cycle (Figure 2.7).

3.7 Regions of RT in both phases of estrous cycle

After histological evaluation of all regions of RT, a representative illustration was performed, showing with more details the mainly differences among epithelium and its transitions during follicular and luteal phases of estrous cycle (Figure 8).

4 DISCUSSION

The cellular components of bovine female RT, especially the endometrium, has been shown very important in creating an efficient innate immune response against pathogenic agents that invade uterine environment during copulation or calving (SHELDON et al., 2009). Many research demonstrated that epithelial and stromal cells are able to express TLR-4 mRNA and secrete IL-6 and IL-8 as a response to LPS challenge (HERATH et al., 2006). These cells also answer to lipopeptides with an accumulation of IL-6 and IL-8 (TURNER et al., 2014). Endometrial tissue *ex vivo* cultured produced the cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-8 as an answer against Gram-positive and Gram-negative bacteria and their molecules associated with pathogens (SAUT et al., 2014; BORGES; HEALEY; SHELDON, 2012).

The post-partum comprehends a period of big challenge for RT of high producing dairy cows, because the epithelium layer can be discontinued exposing internal layers, in addition to the physiological process of flaking of uterine caruncles (ARCHBALD et al., 1972; WAGNER; HANSEL, 1969). Therefore, we pretended with this study to contribute with a better understanding about the subject and visualize the dynamics of the histological changes of RT, especially in the transition regions (vagina-cervix and cervix-uterus). This research used only bovine females that have never been submitted to any reproductive management and which were clinically healthy.

The literature is still scarce when referring to inflammation and infection of cervical portion of the uterus. However, even with a lower incidence when compared to endometritis (ALVARENGA et al., 2018; DEGUILLAUME et al., 2012; AHMADI et al., 2005), cervicitis also interfere negatively in reproductive performance of dairy cows (LEBLANC, 2014; DEGUILLAUME et al., 2012; AHMADI et al., 2005). It is unclear if cervicitis is an isolated process and independent of other portions of RT or if it is related to inflammatory processes of the endometrium, once the majority of the researches were performed to clarify the mechanisms by which the endometrial affections influence the uterine innate immune response (PALOMARES et al., 2018; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019; PALOMARES et al., 2018; TURNER et al., 2014). It is known that cows that develop cervicitis and endometritis simultaneously presents a decrease in reproductive indexes due to the delay in conception (HARTMANN et al., 2016; DEGUILLAUME et al., 2012). These authors reported that cervicitis can be develop by 42 and 76% of Holstein cows until 35 DPP, while endometritis can reach 24,7% of cows between 21 and 50 DPP (LUENGO et al., 2019), compromising reproductive indexes and causing subfertility in these animals (SHELDON; OWENS; TURNER, 2017).

The results obtained in the present study demonstrated that the cervix has a more robust structure than the other portions of the RT. According to other studies (SENGER, 2003; HAFEZ; HAFEZ, 2000; WINKLER; RATH, 1999), the fiber elastic characteristic of the cervix associated with the presence of spheric cells ensure mucus production which has the role of keeping the cervical canal closed so that the uterus is not affected by infections. In this way, we understand that cervical rings also acts as a physical barrier by making difficult the passage of microorganisms and as a chemical barrier due to its large surface mucus producer (BANKS, 1992). These characteristics

are due to the simple columnar epithelium with spheric cells and the antimicrobial properties of the mucus (DADARWAL; PALMER; GRIEBEL, 2017).

The cervical canal opening that happens during follicular phase is due to a strong influence of estrogen. However, to ensure that the uterine environment will not be colonized by pathogenic agents, the cervical mucus in this phase despite having a more fluid appearance has elements that makes its pH improper for microbes' survival or at least for the majority of these agents. These microbes death is related with the release of reactive oxygen species (ROS) by apoptosis and defense cells as reported by Bornhöfft et al. (2019). In the present study, considering that the used heifers were not submitted to any type of reproductive management, the cervical rings were visibly more discrete than those from old cows, which suggest that beyond ovarian hormones the parity influences the way the cervical rings present.

It is important to note that there was no histological difference among follicular and luteal phases in submucous, muscular tunic and serosa, which followed the pattern the pattern described in the literature. Other authors reported that submucous is composed by loose connective tissue, muscular tunic has two layers and, serosa is constituted by mesothelium and loose connective tissue (BACHA JR.; BACHA, 2003; BANKS, 1992; DELLMANN; BROWN, 1982).

The histological profile verified in cranial portion of the vagina, cervix and, intercaruncular endometrium are compatible with hormonal variations for necessary changes in each stage of the estrous cycle described in the literature. The cited changes are the proliferation of endometrial glands and the hyperplasia that provides a greater number of epithelial layers in the vagina, often observed in the follicular phase in order to prepare the uterus to receive the conceptus (BACHA JR.; BACHA, 2003; BANKS, 1992). In the same way, during the luteal phase the tubular profile of endometrial glands associated with a reduction in the number of cellular layers of vaginal epithelium is due to the fact that progesterone influence in this phase leads to a secretory property of RT structures. This secretion has the objective to provide to the embryo an adequate uterine environment for development, as described by Blazquez et al. (1987).

The gradual alteration in histological profile from cranial portion of the vagina until the cervix allows us to infer that the cervix is responsible to block the majority of

the threats to the uterus (BORNHÖFFT et al., 2019). In this way, the presence of neutrophilic and mononuclear infiltrates in cranial portion of the vagina, vagina-cervix transition and cervix during follicular phase can be justified by the fact that the vagina is constantly challenged by pathogenic agents. Also, the cervical opening during estrus makes the uterus more accessible to invading agents that are barred by defense mechanisms of these RT portions. During the luteal phase the permanency of these infiltrates in the vagina and vagina-cervix transition can be explained by the necessity of phagocytosis of epithelial apoptotic cells and microorganisms that have been combated. Bornhöfft et al. (2019) demonstrated that although cervical mucins are not the only immuno-modulating biomolecules of the bovine female RT, they are capable of modulating the immune response regardless of the stage of the estrous cycle, producing neutrophilic extracellular traps that neutralize microbes.

The cervix play an essential role in RT homeostasis and immunity maintenance, acting as a physical barrier against contaminants and promoting spermatocapacitation after copulation (HAFEZ; HAFEZ, 2000). Furthermore, due to mucus production by spheric cells and submucous glands, cervix is a chemical barrier against microorganisms which try to reach the uterus to cause infection (BORNHÖFFT et al., 2019; SAMUELSON, 2007; HAFEZ; HAFEZ, 2000). According to Bornhöfft et al. (2019), the cervical mucus set extracellular traps of neutrophils with the aim to barred microorganisms and sperm cells during capacitation by phagocytosis. Moreover, neutrophils, microorganisms and, dead cells release ROS that compromises sperm and bacteria survival.

The fact that the uterine portions do not have spheric cells suggests that they do not require such aggressive immune responses against pathogens, since most of them are retained by cervical mucus. In addition, for this reason it is suggested that the epithelium of these portions no longer needs a large number of cell layers. According to Sheldon, Cronin and Bromfield, (2019), more important than uterine immunity, is the tolerance to infections of tissues. Thus, these authors reported that a failure in tolerance to pathogens allows for tissue colonization and, consequently, the development of the inflammatory process and installation of infections, due to the rupture of homeostasis.

The vulva, vagina, cervix and cervical mucus tampon which constitutes protective physical barriers of the uterus during pregnancy are broken at the time of calving. In humans, the presence of *Lactobacillus* represents 70% of normal vaginal microbiome and contributes for acidification of the vaginal environment (pH = 4.5), making this portion improper for microbial development (MILLER et al., 2016). In cows the proportion of this *Lactobacillus* is only 1% when compared to women, thus the vaginal pH of cows is consider neutral when compared to human (SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019). The mucus epithelial layer is a considerable obstacle for the microbes to reach the epithelium. This mucus secretion is under the influence of ovarian steroids hormones (SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019), but it increases in face of a LPS challenge (DAVIES et al., 2008).

The present study sought to elucidate the dynamics of the histological profile of the RT with special attention to the transitions of the cervix and to correlate with the maintenance of resistance and tolerance against microorganisms. The authors understand that future research should be carried out in order to establish a direct correlation that allows to elucidate the role of the cervix in the profile of the bovine female RT immune response and, therefore, to seek mechanisms that improve the defense against infections at the time of greatest challenge such as calving and post-partum period.

5 CONCLUSION

The gradual epithelial alteration with the presence of mucus producing cells in cervical transitions which converges to the cervix is an important factor for immunity maintenance due to its effective antimicrobial barrier function.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by the financial support (protocol MCTI/CNPq #01/2016). The authors also thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) by scholarships awarded and, the Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM)

of Universidade Federal de Uberlândia (UFU), by the laboratory, equipments and technical people availability. The present study was performed with the support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior– Brazil (CAPES) – Financial code 001.

REFERENCES

- AHMADI, M. R. et al. The comparative evaluation of uterine and cervical mucosa cytology with endometrial histopathology in cows. **Comparative Clinical Pathology**, v. 14, n. 2, p. 90–94, 2005.
- ALVARENGA, P. B. et al. Prevalence of inflammatory processes in the reproductive tracts of crossbred dairy cows. **Bioscience Journal**, v. 34, n. 3, p. 703–708, 2018.
- AMOS, M. R. et al. Differential endometrial cell sensitivity to a cholesterol-dependent cytolytic toxin links *Trueperella pyogenes* to uterine disease in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 3, p. 1–27, 2014.
- ARCHBALD, L. F. et al. A sequential histological study of the post-partum bovine uterus. **Journal of reproduction and fertility**, v. 29, n. 1, p. 133–136, 1972.
- AYRES, J. S.; SCHNEIDER, D. S. Two ways to survive an infection: what resistance and tolerance can teach us about treatments for infectious diseases. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 11, p. 889–895, 2008.
- BACHA JR., W. J.; BACHA, L. M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003.
- BANKS, W. J. Sistema reprodutor feminino. In: **Histologia veterinária aplicadas**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 565–588.
- BLAZQUEZ, N. et al. Histology and histochemistry of the bovine reproductive tract caudal to the cervix. Part II. The vagina and associated structures. **The British Veterinary Journal**, v. 143, n. 4, p. 337–343, 1987.
- BONNEVILLE-HÉBERT, A. et al. Effect of reproductive disorders and parity on repeat breeder status and culling of dairy cows in Quebec. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 75, n. 2, p. 147, 2011.
- BORGES, A. M.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation Ex Vivo. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 1, p. 526–539, 2012.
- BORNHÖFFT, K. F. et al. Sialylated cervical mucins inhibit the activation of neutrophils to form neutrophil extracellular traps in bovine in vitro model. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1–15, 2019.
- DADARWAL, D.; PALMER, C.; GRIEBEL, P. Mucosal immunity of the postpartum bovine genital tract. **Theriogenology**, v. 104, p. 62–71, 2017.
- DAVIES, D. et al. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, p. 1–12, 2008.
- DEGUILLAUME, L. et al. Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 1776–1783, abr. 2012.
- DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.
- EURELL, J.; FRAPPIER, B. **Dellmann's textbook of veterinary histology**. 6. ed. Hoboken: Blackwell Publishing, 2006.

GILBERT, R. O.; SANTOS, N. R. Dynamics of postpartum endometrial cytology and bacteriology and their relationship to fertility in dairy cows. **Theriogenology**, v. 85, n. 8, p. 1367–1374, 2016.

GONZALEZ, H. E. et al. Morphometric studies of the bovine uterus: microscopic lesions and retrospective reproductive history. **American journal of veterinary research**, v. 46, n. 12, p. 2588–95, dez. 1985.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in farm animals**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000.

HARTMANN, D. et al. Prevalence of cervicitis in dairy cows and its effect on reproduction. **Theriogenology**, v. 85, n. 2, p. 247–253, jan. 2016.

HERATH, S. et al. Expression and function of Toll-Like Receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 562–570, 1 jan. 2006.

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, set. 2002.

LEBLANC, S. J. Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. **Animal**, v. 8, n. 1, p. 54–63, 2014.

LIU, T. C. et al. Effect of GnRH on ovulatory response after luteolysis induced by two low doses of PGF2 α in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 105, p. 45–50, 2018.

LUENGO, R. M.-C. et al. Delayed differentiation of vaginal and uterine microbiomes in dairy cows developing postpartum endometritis. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–23, 1 jan. 2019.

MILLER, E. A. et al. Lactobacilli dominance and vaginal pH: Why is the human vaginal microbiome unique? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–13, 2016.

NOLETO, P. G.; SAUT, J. P. E.; SHELDON, I. M. Short communication: Glutamine modulates inflammatory responses to lipopolysaccharide in ex vivo bovine endometrium. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 2207–2212, mar. 2017.

PALOMARES, R. A. et al. Chronic inflammatory and degenerative endometrial lesions in subfertile Criollo Limonero cattle; a B. taurus Latin-American breed threatened with extinction; A case-control study. **Animal Reproduction Science**, v. 197, p. 22–32, 2018.

READ, A. F.; GRAHAM, A. L.; RÅBERG, L. Animal defenses against infectious agents: is damage control more important than pathogen control? **PLoS Biology**, v. 6, n. 12, p. 2638–2641, 2008.

SAMUELSON, D. A. Sistema reprodutor feminino. In: **Tratado de histologia veterinária**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 429–470.

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 Research**, v. 148, n. 1, p. 593–606, 2014.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Second Rev ed. Pullman: Currents Conceptions, Inc., 2003.

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.

SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 1, p. 1025–1032, 2009.

SHELDON, I. M. et al. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. **Plos One**, v. 5, n. 2, p. e991–e9192, 2010.

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. **Annu. Rev. Anim. Biosci.**, v. 15, n. 7, p. 361–384, 2019.

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

THASMI, C. N. et al. Anatomical and histological changes of uterine horn of Aceh cattle with repeat breeding. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 5, n. 4, p. 445–453, 2018.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2ª ed. Barueri: Manole, 2005.

TURNER, M. L. et al. Epithelial and stromal cells of bovine endometrium have roles in innate immunity and initiate inflammatory responses to bacterial lipopeptides in vitro via Toll-like receptors TLR2, TLR1, and TLR6. **Endocrinology**, v. 155, n. 4, p. 1453–1465, 2014.

TURNER, M. L. et al. Glucose availability and AMP-activated protein kinase link energy metabolism and innate immunity in the bovine endometrium. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–20, 2016.

TURNER, M. L.; OWENS, S. E.; SHELDON, I. M. Glutamine supports the protection of tissue cells against the damage caused by cholesterol-dependent cytolysins from pathogenic bacteria. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, p. 1–20, 2020.

VAN SCHYNDEL, S. J.; PASCOTTINI, O. B.; LEBLANC, S. J. Comparison of cow-side diagnostic techniques for subclinical endometritis in dairy cows. **Theriogenology**, v. 120, p. 117–122, 2018.

WAGNER, W. C.; HANSEL, W. Reproductive physiology of the post partum cow. **Journal of reproduction and fertility**, v. 18, p. 493–500, 1969.

WINKLER, M.; RATH, W. Changes in the cervical extracellular matrix during pregnancy and parturition. **Journal of Perinatal Medicine**, v. 27, n. 1, p. 45–61, 1999.

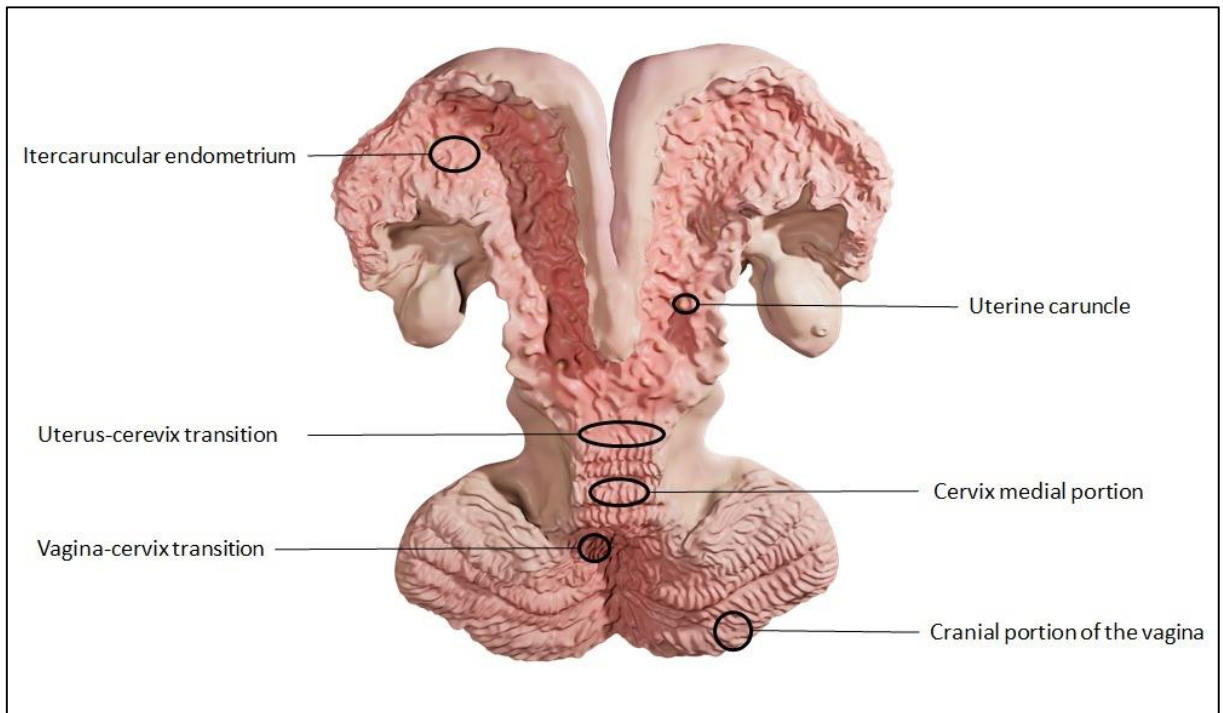


Figure 2.1: Reproductive tract regions of crossbred beef heifers for culture and histological profile analyzes.

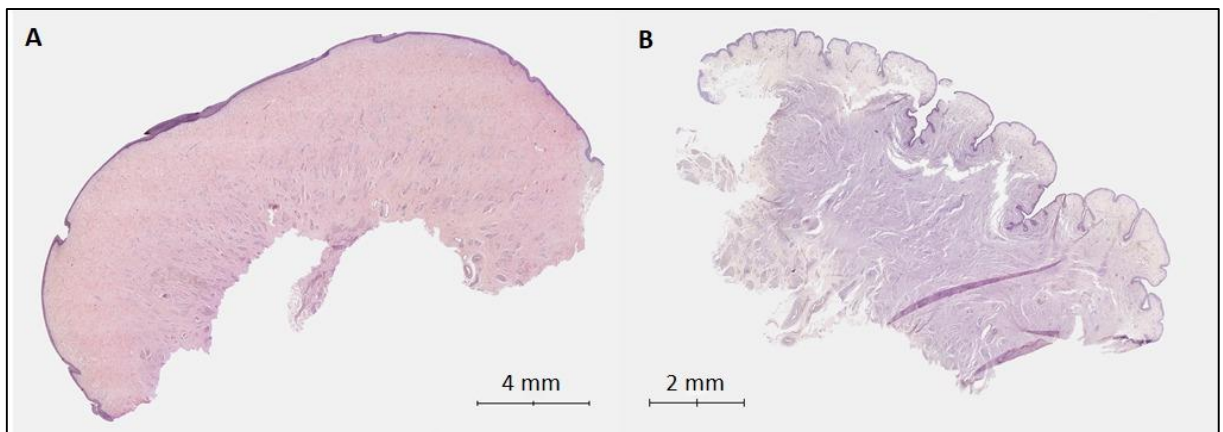


Figure 2. 2: Histology (HE) of cranial portion of vagina of crossbred beef heifers during

follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle of cellular layers of epithelium and an increase of submucous and muscular tunic during luteal phase.

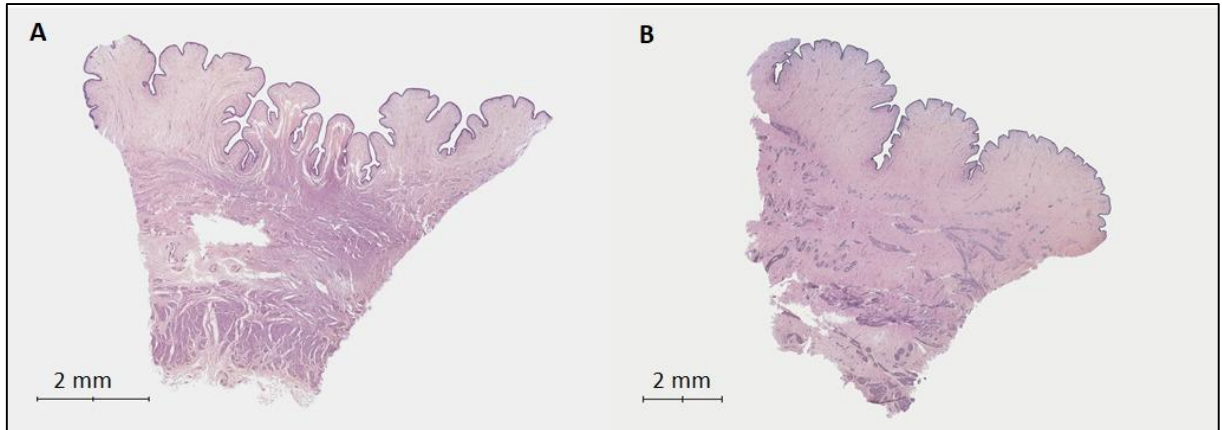


Figure 2.3: Histology (HE) of vagina-cervix transition of crossbred beef heifers during follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle. Note that the muscle layer is thicker during follicular than luteal phase.

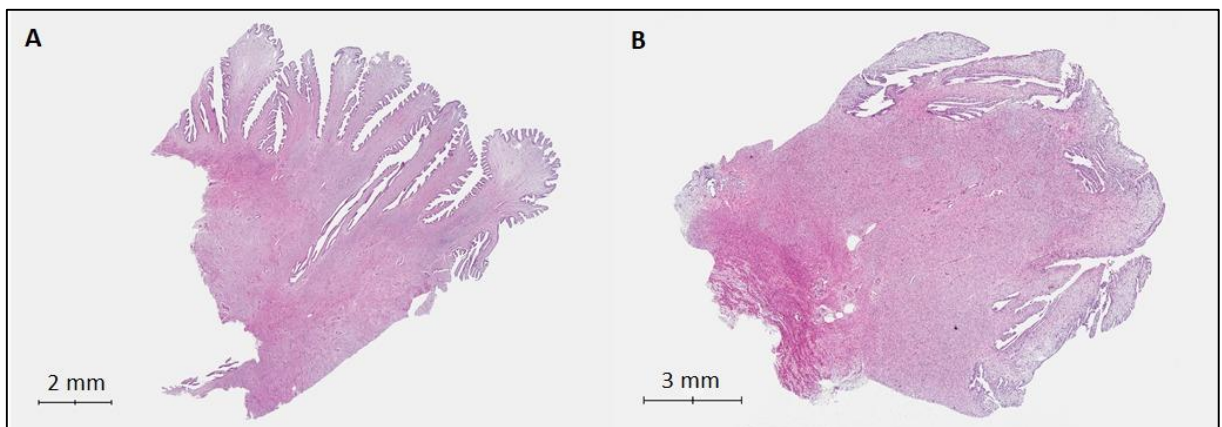


Figure 2. 4: Histology (HE) of cervix medium portion of crossbred beef heifers during follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle.

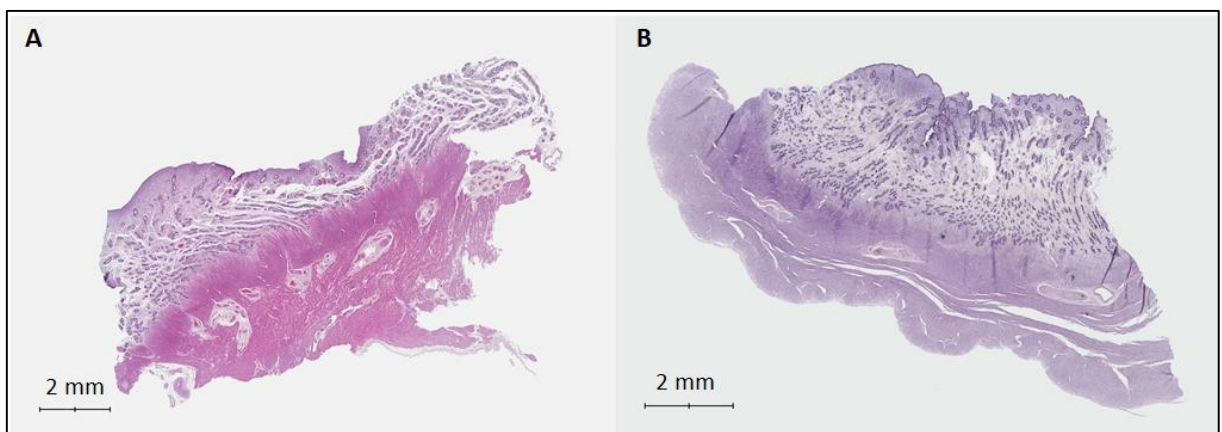


Figure 2.5: Histology (HE) of cervix-endometrium transition of crossbred beef heifers during follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle.

follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle. Note that submucous layer has a higher number of endometrial glands during luteal phase compared to follicular phase. Also serous layer is thicker during luteal than follicular phase.

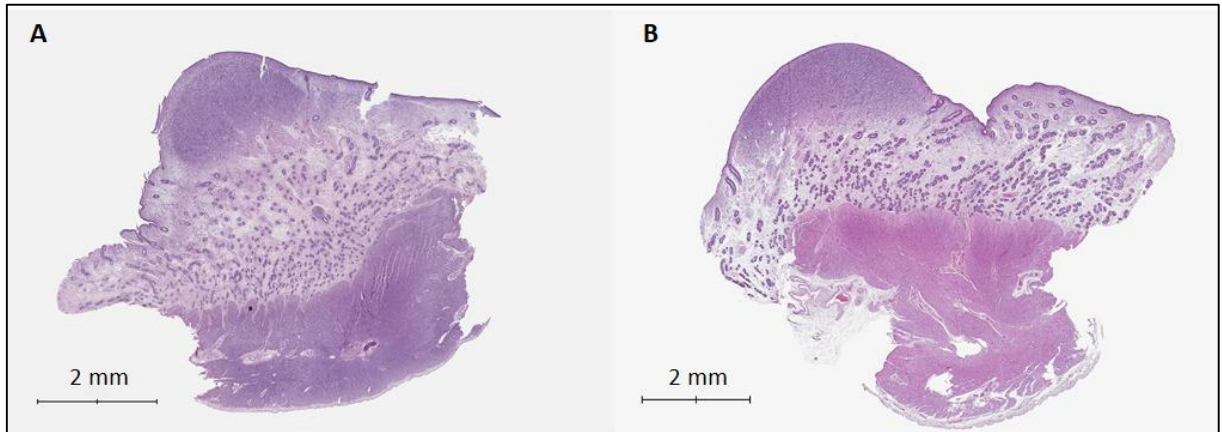


Figure 2.6: Histology (HE) of uterine caruncles of crossbred beef heifers during follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle. Note that muscle layer is thicker during the luteal than follicular phase.

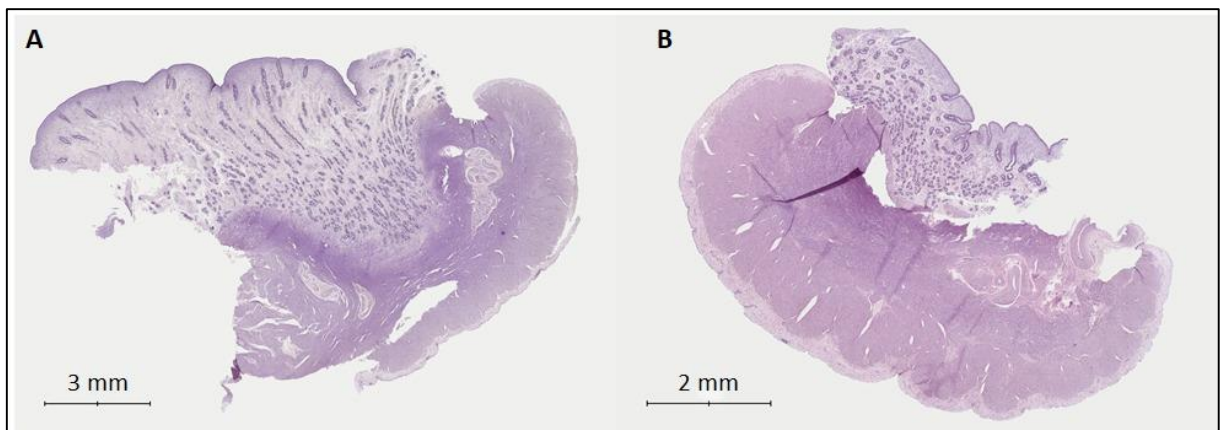


Figure 2.7: Histology (HE) of intercaruncular endometrium of crossbred beef heifers during follicular (A) and luteal (B) phases of the estrous cycle.

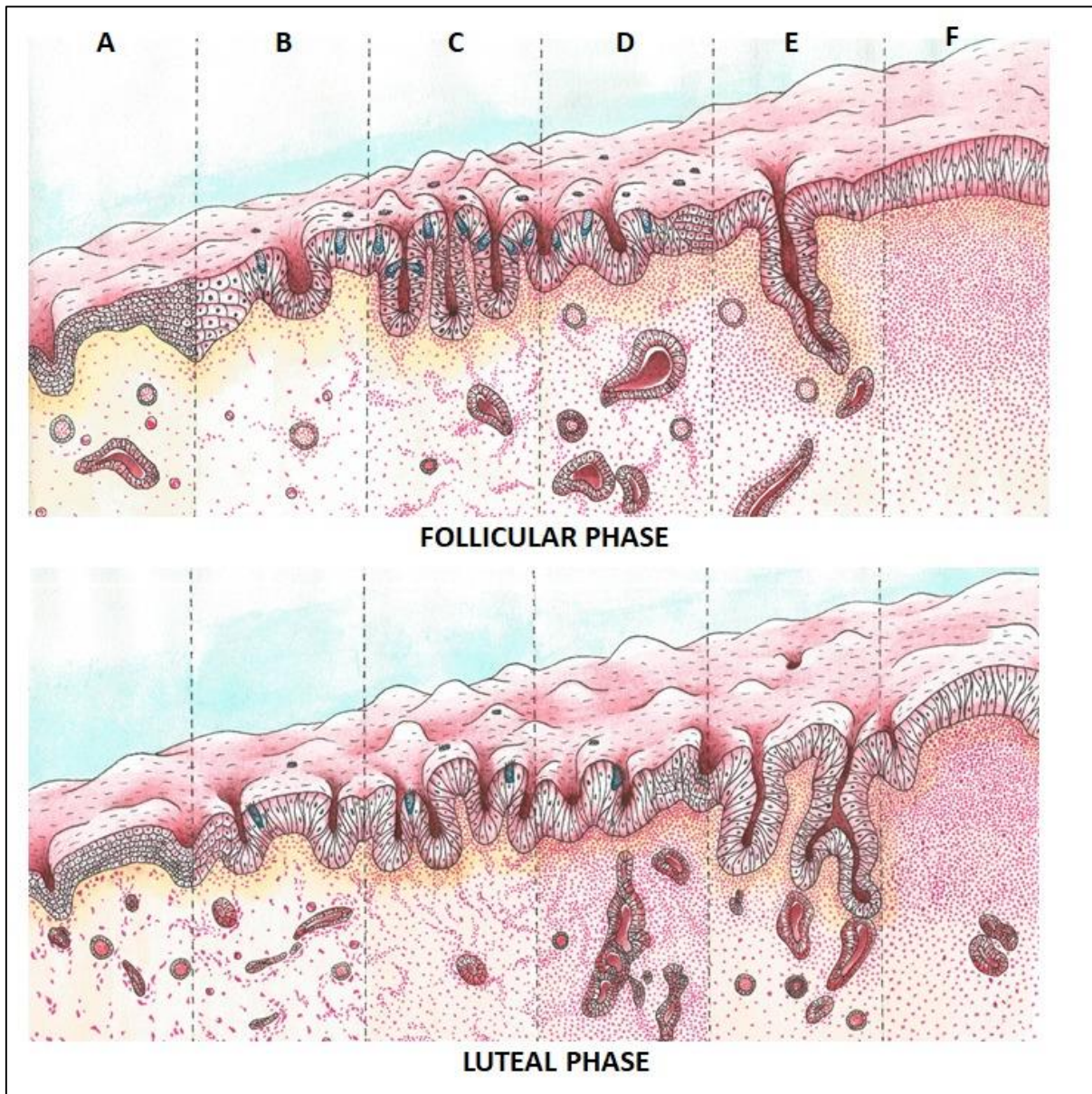


Figure 2.8: Histological illustration of the epithelium of reproductive tract of crossbred beef heifers during follicular (above) and luteal (below) phases of the estrous cycle. Note the epithelial differences among regions of the reproductive tract. Vagina (A), vagina-cervix transition (B), cervix (C), cervix-uterus transition (D), intercaruncular region (E) and, uterine caruncle (F).

CAPÍTULO 3 – Production of proinflammatory cytokines in regions of the reproductive tract of heifers after challenged with lipopolysaccharide

Production of proinflammatory cytokines in regions of the reproductive tract of heifers after challenged with lipopolysaccharide

P. B. de Alvarenga^{1†}, A. L. Rezende¹², V. A. Martinez^{2†}, A. B. Cardoso Neto^{1†}, D. F. Vaz^{2†}, D. O. Gomes^{1†}, V. S. Marques^{2†}, A. F. Coletto^{1†}, L. H. V. Neves³³, R. M. dos Santos^{4†}, F. Z. Brandão⁵⁴ J. P. E. Saut^{4†}

ABSTRACT

We aimed to verify the innate immune response mediated by the proinflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-8 in six different *ex vivo* regions of the female bovine reproductive tract (RT), collected from 43 crossbred beef heifers in the follicular (n = 10) and luteal (n = 33) phases of the estrous cycle, after challenged *in vitro* with 1 μ g/mL of lipopolysaccharide (LPS) for 24 h. We evaluated the interaction between treatments and phases of the estrous cycle using two-way ANOVA, followed by the Bonferroni post-test (P < 0.05); between RT regions, we used one-way ANOVA or the Kruskal–Wallis test (P < 0.05). There was significant cytokine production due to LPS challenge in all portions of the RT, regardless of the estrous cycle phase. We conclude that the production of IL-6 and IL-8 after LPS challenge *in vitro* is higher in the cervical transitions than to the the caruncular endometrium collected from crossbred heifers. The effects of estrous cycle phase at the moment of tissue collection are not detected in the IL-1 β , IL-6, and IL-8 response *in vitro* after LPS challenge.

Keywords: proinflammatory cytokines, crossbred heifers, uterus.

1 INTRODUCTION

Uterine infections directly impact the reproductive efficiency of dairy herds; indeed, they are one of the main causes of infertility, leading to involuntary culling and causing expressive economic losses to producers (Sheldon et al., 2009). These infections can affect between 15% and 40% of the dairy cows in the postpartum period (Deguillaume et al., 2012) and decrease the chances of conception when associated with endometritis and cervicitis (Ahmadi et al., 2005; Deguillaume et al., 2012).

Fertility in cows depends on immunological modulation, which is promoted by steroid hormones that regulate the estrous cycle. This allows the reproductive tract (RT) to respond in different ways to various events (Sheldon et al., 2017) and may

¹ Corresponding author: paulabatista_alvarenga@hotmail.com

² Laboratório de Saúde em Grandes Animais - LASGRAN, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 38.400-970, Brasil

³ Faculdade de Medicina Veterinária, Fundação Presidente Antônio Carlos de Uberlândia - UNIPAC, Uberlândia, Minas Gerais, 38400-504

⁴ Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 24230-340, Brasil

favor the occurrence of uterine infections during the postpartum period (Leblanc, 2012; Hansen, 2013; Williams, 2013). Negative energy balance worsens the situation and this also predisposes the cows to non-uterine puerperal diseases that compromises milk production and the return to cyclicity postpartum (Lewis, 1997; Sordillo et al., 2009; Ribeiro et al., 2016).

Lesions and trauma caused by parturition break the physical integrity of the endometrial epithelia, which exposes the stromal cells to infectious agents (Potter et al., 2010; Sheldon et al., 2017). Besides, some dysfunctions such as retained placenta increase the risk of uterine infections (Potter et al., 2010). The contact between the endometrial epithelium and pathogenic microorganisms activates the innate and adaptive immune response in cattle (Martins et al., 2013; Potter et al., 2010). Innate immunity is responsible for detecting invading agents and for controlling uterine contamination in cows. It triggers phagocytosis and inflammation against invading microorganisms and only if it fails, the adaptive immunity will be activated (Janeway Jr. and Medzhitov, 2002; Takeuchi and Akira, 2010).

The immune system first recognizes the invading microorganisms by microbe associated molecular patterns (MAMPs) (Martins and Borges, 2015). The most known microbial patterns are the Toll-like receptors (TLRs), which are transmembrane proteins capable of identifying MAMPs and triggering the innate immune response. In cows with uterine infections, Herath et al. (2006) showed that endometrial challenge with inactivated *Escherichia coli* or lipopolysaccharide (LPS) increased transcription of TLR4 and led to an increase in prostaglandin (PG) and pro-inflammatory cytokines production. According to Potter et al. (2010), TLR4 recognizes LPS through cluster of differentiation 14 (CD14) and myeloid differentiation protein 2 (MD2) co-receptors and induces a response through secretion of interleukin (IL)-6, IL-8, and PGE₂. Based on these findings, it appears that the innate immune response associated with pathogens depends on the action of various cellular types, not only specialized immune cells (Sheldon et al., 2014).

Considering that the bovine female reproductive tract may show distinct immune response in uterine regions, also under the influence of ovarian steroid hormones, we aimed to verify the intensity of the innate immune response mediated by the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and IL-8 in ex vivo regions of the female bovine

reproductive tract collected from crossbred heifers in the follicular and luteal phases of the estrous cycle after an *in vitro* challenge with LPS.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals and Location of Experiments

This study was conducted at the Large Animals Health Laboratory (LASGRAN) of the Universidade Federal de Uberlândia (UFU), using the reproductive tract of 43 beef cattle heifers, crossbred of the same genetic composition ($\frac{1}{2}$ Nelore \times $\frac{1}{2}$ Aberdeen Angus), from a commercial farm at Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. The heifers were on average 18 months old and clinically healthy. At the farm the heifers had the same nutrition and health status, were kept in pasture until 14 months of age, and were finished in a feedlot system for 120 days before slaughter. They were never subjected to reproductive management.

2.2 Sample Collection and Processing

Blood samples from bleeding trail and the RT from the heifers were collected at a commercial slaughterhouse from August 2018 to March 2019. All the material was properly identified, conditioned in insulated boxes, and referred to the laboratory for analysis and processing within a maximum of 2 h.

2.3 Sample Processing

Blood. The blood samples were centrifuged at 3000 G for 10 min in a serological centrifuge (Global Trade 80-2B-15mL) for separation of serum that was then transferred to cryotubes and maintained in an ultra-freezer at -80°C until submission to the Hormonal Dosage Laboratory (DHL) from the Reproduction Sector of the Veterinary School of the Universidade Federal Fluminense (UFF). Progesterone (P₄) was measured using a commercial solid phase radioimmunoassay kit (ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA, USA). The sensitivity and intra-assay coefficient were 0.05 ng/mL and 11%, respectively. All data were located between the minimal and maximal point of the curve. The measured P₄ serum concentration was

used to classify the cows according to their estrous cycle phase: follicular ($P_4 < 1$ ng/mL; $n = 10$) or luteal ($P_4 > 1$ ng/mL; $n = 33$), according to Liu et al. (2018).

Bovine Female Reproductive Tract Sample Processing. The RT of each heifer was processed after macroscopic evaluation to certify the absence of any alterations and/or evidence of lesions and/or gestation, followed by external cleaning with 70% ethanol and opening with sterile scissors from the apex of the ipsilateral horn to the dominant ovarian structure (functional corpus luteum or dominant follicle). Then, the exposed endometrium was cleaned using a solution of Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS; Sigma-Aldrich, Dorset, UK) with penicillin (10,000 IU/mL), streptomycin (10,000 µg/mL), and amphotericin B (25 µg/mL) (100× Antibiotic-Antimycotic, Gibco, New York, United States). Uterine tissues (explants) were removed from the epithelial layer by using a sterile 8 mm-diameter biopsy punches (KRUUSE®, Langeskov, Denmark) (Figure 3.1).

Two explants were collected from the epithelium of each region of the RT: vagina, vagina–cervix transition, medial cervix, cervix–endometrium transition, uterine caruncle, and intercaruncular endometrium of both uterine horns, adding a total of 12 explants per animal. The explants were submerged in Hank's balanced salt solution (HBSS; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, United States) enriched with penicillin (10,000 IU/mL), streptomycin (10,000 µg/mL), and amphotericin B (25 µg/mL) (100× Antibiotic-Antimycotic, Gibco). Each explant was washed three times in a biosafety cabinet and then transferred to a 24-well cell culture plate free from DNase, RNase and pyrogens (K12-24, Kasvi, Curitiba, Brazil), with one explant per well. All possible measures to avoid extensive manipulations of the samples were made. For this purpose, specifically in cervical explants, a greater amount of D-PBS was used slightly with penicillin, streptomycin and amphoterecin B to remove excess mucus in the mucosa of that region.

After washing, the explants were cultured at 37°C and 5% CO₂ in 24-well cell culture plates for 24 h (Saut et al., 2014; Noletto et al., 2017). Each well contained 2 mL of the solution with the respective proposed treatments: control media with RPMI 1640 (Gibco) plus 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich); 10,000 IU/mL penicillin, 10,000 µg/mL streptomycin, and 25 µg/mL amphotericin B (Gibco); and 1 µg/mL LPS derived from *E. coli* 0111:B4 (L2880, Sigma-Aldrich). After culturing for 24 h, the

supernatant was collected to measure pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and IL-8) using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs).

The IL-1 β , IL-6, and IL-8 production profiles were measured following the instructions from the manufacturer described at the ELISA kits specific for each cytokine (Bovine IL-6 Reagent Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, United States; Bovine IL-1 β ELISA Kit, Invitrogen, Vienna, Austria; Human IL-8/CXCL8 ELISA Kit, DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, United States). Optical density was measured at 450 and 550 nm for IL-1 β and IL-6 or 450 and 540 nm for IL-8, according to the product specifications, using an EspectraMax M2 / M2^e device (Molecular Devices Corporation, San Jose, CA, United States). The values were transferred to a Microsoft Excel spreadsheet. Data were then analyzed using MyAssays Analysis Software Solutions (<https://www.myassays.com/home.aspx>) to obtain IL values (pg/mL) in the analyzed supernatants. For each RT region, the cytokine production after LPS challenge was expressed as a percent of the respective control, which was considered 100%.

2.4 Statistical Analysis

Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, United States) was used for statistical analysis and to generate graphs. Animal factor was considered as an experimental unit. Data were initially tabulated in Excel spreadsheets and descriptive statistics were presented as mean, standard error of the mean and percentage. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni multiple comparison test was used to evaluate the interaction between treatments (control \times LPS) and estrous cycle (follicular \times luteal) of the cytokine production in each RT region. One-way ANOVA followed by the Bonferroni multiple comparison test (parametric data) or the Kruskal–Wallis test (nonparametric data) was used to compare the production of cytokines within the RT regions. Statistical significance was defined as $P \leq 0.05$ for the main effects and interactions, and a tendency was defined as $0.05 < P \leq 0.10$ (Piersanti et al., 2019).

3 RESULTS

Comparing the responses between RT regions after 24-h challenge with LPS small changes were observed in the intensity of the cytokine production evaluated in this study. (Figure 3.2). In the follicular phase, IL-6 production by the cervix–endometrium transition was 9.7 times higher than the caruncle region (Figure 3.2C). Moreover, in the luteal phase, the vagina–cervix transition produced 6.2 times more IL-8 than the caruncle region (Figure 3.2F).

After evaluating the influence of the estrous cycle phase on the immune response of each RT region, we verified that the ovarian hormones, which were circulating until slaughter, did not influence pro-inflammatory cytokine production in the tissue explants of the analyzed regions when challenged with LPS in vitro (Figures 3.3 – 3.5), except in the intercaruncular endometrium (Figure 3.4C). The IL-8 production from intercaruncular endometrium during the luteal phase was 4.4 times higher than the follicular phase ($P_{phases} = 0.0295$). Therefore, that was the only RT region where ovarian hormones affected the inflammatory response against LPS challenge (Figure 3.4C). The caruncular endometrium was not influenced by the ovarian hormones with regard to cytokine production after LPS challenge (Figure 3.3D – 3.3F).

In the cervix and its transitions (vagina–cervix and cervix–endometrium), there was mucus production during the 24-h LPS challenge, which made it hard to obtain the supernatant of some explants to measure IL production. In these regions LPS challenge markedly increased IL-1 β , IL-6, and IL-8 production (Figure 3.4). The highest IL-6 production occurred in the cervix–endometrium transition explants, with an average increase of 16.7 times compared with the respective control groups (Figure 3.4H), followed by the vagina–cervix transition, which showed an average of 10 times more IL-8 production compared with the respective control groups (Figure 3.5C), regardless of the estrous cycle phase. The highest IL-1 β production occurred in the cervix–endometrium transition, with an average of 3.4 times more production compared with the control (Figure 3.5G).

In the vaginal tissue explants (Figure 3.5), compared with the control group, LPS challenge led to similar IL-6 and IL-8 production, whereas the intensity of the response mediated by IL-1 β was comparatively low. In this region, the estrous cycle phase did not influence the immune response mediated by IL-1 β , IL-6, and IL-8.

4 DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study that aimed to understand and demonstrate the production dynamics of the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and IL-8 in different parts of the bovine female reproductive tract, including the transitions of the cervical region. In addition, we compared the luteal and follicular phases to identify the possible effects of the estrous cycle on cytokine production in different portions of the reproductive tract.

We used beef heifers as the animal model based on previous studies: Rezende (2016), who did not find any difference in the production of proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 between crossbred dairy cows and Zebu cows challenged with different LPS concentrations *in vitro*, and Saut et al. (2014), who evaluated the same cytokines after LPS challenge in endometrial cell cultures of beef and dairy European breeds.

The inclusion of the cervix transitions is justified by the fact that the epithelial cells participate in the immune response either as a mechanical barrier to bacterial infections through the formation of cervical folds or through the production of mucus by goblet cells (Banks, 1992; Breeveld-Dwarkasing et al., 2000; Amos et al., 2014) that have some antimicrobial properties (Dadarwal et al., 2017; Bornhöfft et al., 2019). Given that the epithelium changes throughout these transitions, we hypothesized that the production of cytokines may also change. Based on our findings, we partially accept the hypothesis that the different parts of the bovine female RT respond differently to LPS challenge. However, we did not observe any pattern that could correlate P₄ serum levels with the evaluated cytokines and/or the estrous cycle phase of the animals at slaughter. The most important differences were in the anatomical transitions of the cervix, which showed higher cytokine production compared with the caruncular endometrium. This could be explained by the fact that the caruncles have a direct communication with the placenta (Atkinson et al., 1984); thus, higher proinflammatory cytokine production at this region would trigger an inflammatory response that could culminate in fetal death.

According to our data, the higher occurrence of endometritis compared with cervicitis, as described in the literature by Ahmadi et al. (2005) and Deguillaume et al. (2012), can be partially explained by the greater IL-6 and IL-8 production observed in the cervical transitions compared with the endometrium, mainly the caruncular

endometrium. Those regions had an average 10 times greater cytokine production compared with the respective controls; these elevated cytokine levels stimulate chemotaxis of immune cells to these regions, making them more efficient in combating pathogenic microorganisms in the cervical area compared with the endometrium. Hartmann et al. (2016) claimed that moderate and severe cervicitis can affect the conception rate up to 200 days postpartum, resulting in low reproductive efficiency. Furthermore, endometritis and cervicitis occurring simultaneously may be responsible for the occurrence of subfertility in cows (Hartmann et al., 2016).

At the endometrial portion of the RT, we expected lower IL-1 β , IL-6, and IL-8 production during the luteal phase compared with the follicular phase, due to the immunosuppression caused by the low levels of estrogen, as well as high P₄ levels, which reduce the activity of neutrophils and other defense cells and favor the establishment of infections in the reproductive tract (Borges et al., 2012; Fischer et al., 2010; Lewis, 2004). According to Martins and Borges (2015), the susceptibility to endometrial infections is reduced during diestrus to prepare the uterus to receive an embryo. However, Saut et al. (2014) claimed that exogenous ovarium hormones do not cause an alteration in immune response when using endometrial tissue cultures or epithelial and stromal cells of the endometrium *in vitro*. The epithelial cells of the endometrium are responsible for the first defense against pathogens and cytokine production, which is responsible for recruitment and activation of innate and adaptive immune system cells. In women, the secretion of those cytokines is regulated by estradiol, which controls their action against infections (Wira et al., 2010). In cows, high estradiol levels also stimulate the innate immune response in the RT, a phenomenon that allows more effective responses for fighting infections (Borges et al., 2012).

To our surprise, both estrogen and P₄ that sensitized the RT at the time of the collection did not influence the intensity of cytokine production in the RT tissue explants, with the exception of IL-8 in the intercaruncular endometrium. This probably occurred to maintain the dynamic balance of capability and effectiveness of the immune response by the epithelial cells, because they are capable of distinguishing pathogens, commensal microorganisms, allogenic sperm, and the developing fetus, such as it occurs in women (Wira and Fahey, 2004; Wira et al., 2005; Fahey et al., 2008), to avoid the occurrence of an exacerbated inflammatory process, which can damage the RT.

When comparing the RT regions, we expected that the intensity in the production of the cytokines evaluated from the medial-cervix tissue would be higher than its transitions. The fact that the highest IL-6 and IL-8 production occurred at the cervical transitions (vagina–cervix in the follicular phase and cervix–endometrium in the luteal phase, respectively) shows the importance, particularities, and specific characteristics of each RT segment. This fact underscores the necessity of further studies to understand the role of these regions in the RT immune response against infectious agents.

The vagina has direct contact with the external environment through the vestibule, and it is the last anatomical barrier before the cervix. Mucus-producing cells, which are important for combatting microorganisms along with the physical barrier provided by the epithelial layer, are not present in this region. Thus, the immune response has to be efficient to eliminate as many microorganisms as possible (Bornhöfft et al., 2019); this response comprises cell tolerance and resistance (Ayres and Schneider, 2008; Read et al., 2008; Amos et al., 2014; Turner et al., 2016). This might be the reason that IL-1 β , IL-6, and IL-8 production in this region was similar regardless to estrous cycle phases in this study.

5 CONCLUSION

In conclusion, the production of IL-1 β and IL-8 after LPS challenge in vitro is higher in the cervical transitions than to the caruncular endometrium collected from crossbred heifers. The effects of estrous cycle phase at the moment of tissue collection are not detected in the IL-1 β , IL-6, and IL-8 response in vitro after LPS challenge.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for funding our research project (entitled “Cervicitis, a disease that gained the spotlight in the postpartum of dairy cows”) under the protocol MCTI/CNPq n. 01/2016.

We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

– Brasil (CAPES) for providing scholarships. This study was financed in part by the CAPES – Finance Code 001.

REFERENCES

- Ahmadi, M.R., A. Khodakaram Tafti, S. Nazifi, and H.R. Ghaisari. 2005. The comparative evaluation of uterine and cervical mucosa cytology with endometrial histopathology in cows. *Comp. Clin. Path.* 14:90–94. doi:10.1007/s00580-005-0565-3.
- Amos, M.R., G.D. Healey, R.J. Goldstone, S.M. Mahan, A. Düvel, H.-J. Schuberth, O. Sandra, P. Zieger, I. Dieuzy-Labaye, D.G.E. Smith, and I.M. Sheldon. 2014. Differential endometrial cell sensitivity to a cholesterol-dependent cytolysin links *Trueperella pyogenes* to uterine disease in cattle. *Biol. Reprod.* 90:1–27. doi:10.1095/biolreprod.113.115972.
- Atkinson, B., G. King, and E. Amoroso. 1984. Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biol. Reprod.* 30:763–774.
- Ayres, J.S., and D.S. Schneider. 2008. Two ways to survive an infection: what resistance and tolerance can teach us about treatments for infectious diseases. *Nat Rev Immunol* 8:889–895. doi:10.1038/nri2432.
- Banks, W.J. 1992. *Sistema reprodutor feminino*. 2nd ed. Manole, São Paulo.
- Borges, A.M., G.D. Healey, and I.M. Sheldon. 2012. Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation Ex Vivo. *Am. J. Reprod. Immunol.* 67:526–539. doi:10.1111/j.1600-0897.2012.01106.x.
- Bornhöfft, K.F., A. Rebl, M.E. Gallagher, T. Viergutz, K. Zlatina, C. Reid, and S.P. Galuska. 2019. Sialylated cervical mucins inhibit the activation of neutrophils to form neutrophil extracellular traps in bovine in vitro model. *Front. Immunol.* 10:1–15. doi:10.3389/fimmu.2019.02478.
- Breeveld-Dwarkasing, V.N.A., G.C. Van Der Weijden, M.A.M. Taverne, and F.M.F. Van Dissel-Emiliani. 2000. The bovine cervix during the oestrous cycle: Regional differences in morphology and density of steroid hormone receptors. *Reprod. Domest. Anim.* 35:120–124. doi:10.1046/j.1439-0531.2000.00223.x.
- Dadarwal, D., C. Palmer, and P. Griebel. 2017. Mucosal immunity of the postpartum bovine genital tract. *Theriogenology* 104:62–71. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.08.010.
- Deguillaume, L., A. Geffré, L. Desquillet, A. Dizien, S. Thoumire, C. Vornière, F. Constant, R. Fournier, and S. Chastant-Maillard. 2012. Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:1776–1783. doi:10.3168/jds.2011-4602.
- Fahey, J., J. Wright, L. Shen, J. Smith, M. Ghosh, R. Rossoll, and C. Wira. 2008. Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture. *Mucosal Immunol.* 1:317–325. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- Fischer, C., M. Drillich, S. Oda, W. Heuwieser, R. Einspanier, and C. Gabler. 2010. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod. Fertil. Dev.* 22:818–829. doi:10.1071/RD09120.
- Gipson, I.K. 2001. Mucins of the human endocervix. *Front. bioscience* 6:1245–1255.
- Gipson, I.K., S. Spurr-Michaud, R. Moccia, Q. Zhan, N. Toribara, S.B. Ho, A.R.

- Gargiulo, and J.A. Hill. 1999. MUC4 and MUC5B transcripts Are the prevalent mucin messenger ribonucleic acids of the human endocervix. *Biol. Reprod.* 60:58–64. doi:10.1095/biolreprod60.1.58.
- Han, L., R. Taub, and J.T. Jensen. 2017. Cervical mucus and contraception: what we know and what we don't. *Contraception* 96:310–321. doi:10.1016/j.contraception.2017.07.168.
- Hansen, P.J. 2013. Maternal immunological adjustments to pregnancy and parturition in ruminants and possible implications for postpartum uterine health: Is there a prepartum-postpartum nexus?. *J. Anim. Sci.* 91:1639–1649. doi:10.2527/jas2012-5934.
- Hartmann, D., J. Rohkohl, S. Merbach, T. Heilkenbrinker, H.P. Klindworth, H.A. Schoon, and M. Hoedemaker. 2016. Prevalence of cervicitis in dairy cows and its effect on reproduction. *Theriogenology* 85:247–253. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.09.029.
- Herath, S., D.P. Fischer, D. Werling, E.J. Williams, S.T. Lilly, H. Dobson, C.E. Bryant, and I.M. Sheldon. 2006. Expression and function of Toll-like Receptor 4 in bovine endometrium. *Endocrinology* 147:562–570. doi:10.1210/en.2005-1113.
- Janeway Jr., C.A., and R. Medzhitov. 2002. Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol* 20:197–216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.
- Kutteh, W.H., S.J. Prince, K.R. Hammond, C.C. Kutteh, and J. Mestecky. 1996. Variations in immunoglobulins and IgA subclasses of human uterine cervical secretions around the time of ovulation. *Clin. Exp. Immunol.* 104:538–542. doi:10.1046/j.1365-2249.1996.36742.x.
- Leblanc, S.J. 2012. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 47:18–30. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02109.x.
- Lewis, G.S. 1997. Uterine health and disorders. *J. Dairy Sci.* 80:984–994. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76024-7.
- Lewis, G.S. 2004. Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Anim. Reprod. Sci.* 82:281–294. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.026.
- Liu, T.C., C.F. Chiang, C.T. Ho, and J.P.W. Chan. 2018. Effect of GnRH on ovulatory response after luteolysis induced by two low doses of PGF2 α in lactating dairy cows. *Theriogenology* 105:45–50. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.09.013.
- Martins, T.M., and Á.M. Borges. 2015. Uterine immunology and fertility. *Rev. Bras. Reprod. Anim* 39:129–135.
- Martins, T.M., R.L. Santos, T.A. Paixão, É.A. Costa, A.C. Pires, and Á.M. Borges. 2013. Aspectos reprodutivos e produtivos de vacas da raça Holandesa com puerpério normal ou patológico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Belo Horiz.* 65:1348–1356.
- Noletto, P.G., J.P.E. Saut, and I.M. Sheldon. 2017. Short communication: Glutamine modulates inflammatory responses to lipopolysaccharide in ex vivo bovine endometrium. *J. Dairy Sci.* 100:2207–2212. doi:10.3168/jds.2016-12023.
- Piersanti, R.L., R. Zimpel, P.C.C. Molinari, M.J. Dickson, Z. Ma, K.C.C. Jeong, J.E.P. Santos, I.M. Sheldon, and J.J. Bromfield. 2019. A model of clinical endometritis in

- Holstein heifers using pathogenic *Escherichia coli* and *Trueperella pyogenes*. *J. Dairy Sci.* 102:2686–2697. doi:10.3168/jds.2018-15595.
- Potter, T.J., J. Guitian, J. Fishwick, P.J. Gordon, and I.M. Sheldon. 2010. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology* 74:127–134. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.01.023.
- Read, A.F., A.L. Graham, and L. Råberg. 2008. Animal defenses against infectious agents: is damage control more important than pathogen control?. *PLoS Biol.* 6:2638–2641. doi:10.1371/journal.pbio.1000004.
- Rezende, A.L. 2016. Produção de IL-1B e IL-6 em explantes ex vivo de endométrio de vacas nelore e mestiças tratadas com LPS e esteroides ovarianos. Universidade Federal de Uberlândia (UFU),.
- Ribeiro, E.S., G. Gomes, L.F. Greco, R.L.A. Cerri, A. Vieira-Neto, P.L.J. Monteiro, F.S. Lima, R.S. Bisinotto, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos. 2016. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:2201–2220. doi:10.3168/jds.2015-10337.
- Saut, J.P.E., G.D. Healey, A.M. Borges, and I.M. Sheldon. 2014. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to *Escherichia coli* or LPS in vitro. *Reprod. Res.* 148:593–606. doi:10.1530/REP-14-0230.
- Sheldon, I.M., J. Cronin, L. Goetze, G. Donofrio, and H.J. Schuberth. 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.* 81:1025–1032. doi:10.1095/biolreprod.109.077370.
- Sheldon, I.M., J.G. Cronin, G.D. Healey, C. Gabler, W. Heuwieser, D. Streyl, J.J. Bromfield, A. Miyamoto, C. Fergani, and H. Dobson. 2014. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. *Reproduction* 148:R41–R51. doi:10.1530/REP-14-0163.
- Sheldon, I.M., S.E. Owens, and M.L. Turner. 2017. Innate immunity and the sensing of infection, damage and danger in the female genital tract. *J. Reprod. Immunol.* 119:67–73. doi:10.1016/j.jri.2016.07.002.
- Sordillo, L.M., G.A. Contreras, and S.L. Aitken. 2009. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim. Heal. Res. Rev.* 10:53–63. doi:10.1017/S1466252309990016.
- Takeuchi, O., and S. Akira. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140:805–820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Tomasi, J.B. de, M.M. Opata, and C.N. Mowa. 2019. Immunity in the cervix: Interphase between immune and cervical epithelial cells. *J. Immunol. Res.* 2019:1–13. doi:10.1155/2019/7693183.
- Turner, M.L., J.G. Cronin, P.G. Noleto, and I.M. Sheldon. 2016. Glucose availability and AMP-activated protein kinase link energy metabolism and innate immunity in the bovine endometrium. *PLoS One* 11:1–20. doi:10.1371/journal.pone.0151416.
- Williams, E. 2013. Drivers of post-partum uterine disease in dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 48:53–58. doi:10.1111/rda.12205.
- Wira, C.R., and J. V. Fahey. 2004. The innate immune system: Gatekeeper to the female reproductive tract. *Immunology* 111:13–15. doi:10.1111/j.1365-

2567.2004.01796.x.

Wira, C.R., J. V. Fahey, M. Ghosh, M. V. Patel, D.K. Hickey, and D.O. Ochiel. 2010. Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63:544–565. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00842.x.

Wira, C.R., J. V. Fahey, C.L. Sentman, P.A. Pioli, and L. Shen. 2005. Innate and adaptive immunity in female genital tract: Cellular responses and interactions. *Immunol. Rev.* 206:306–335. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00287.x.

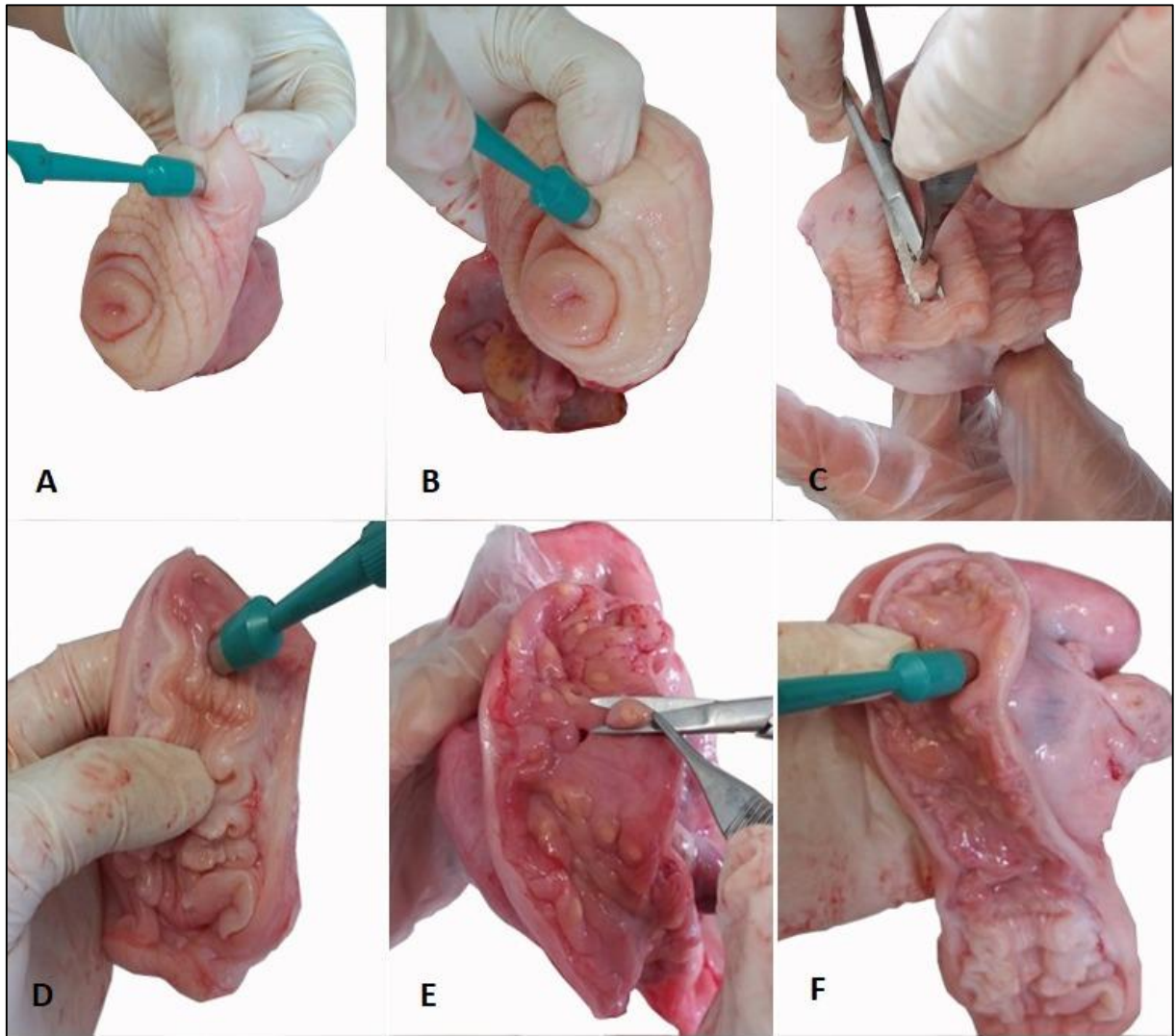


Figura 3.1: Collection spots of explants in different regions of the uterus for culture and measurement of interleukins. A (vagina); B (transition vagina-cervix); C (medial cervix); D (transition cervix-endometrium); E (caruncle); F (intercaruncular endometrium).

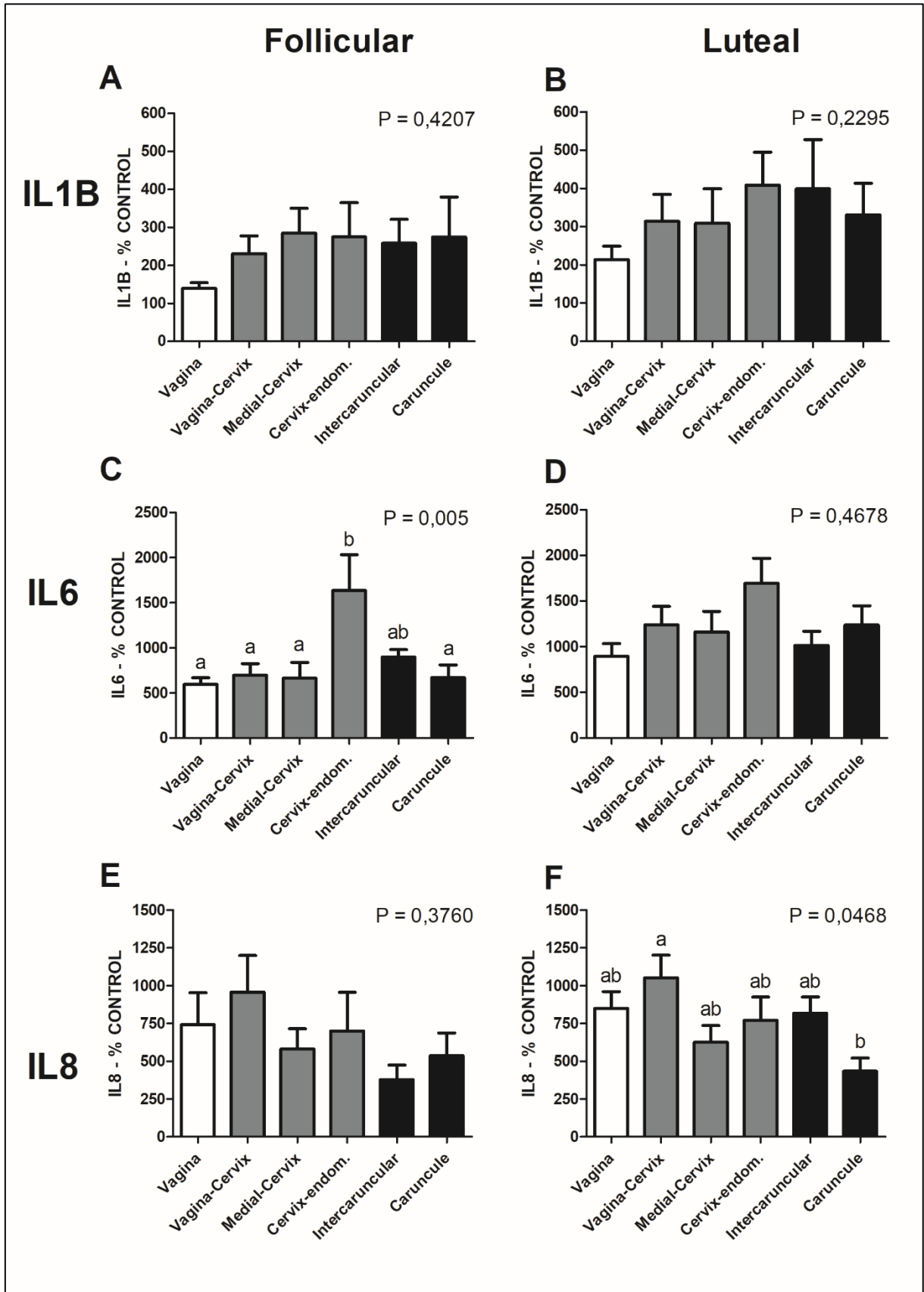


Figure 3.2: Production of IL-1 β , IL-6 and IL-8 by the different regions of the bovine female reproductive tract of crossbred heifers in the follicular and luteal phases of the estrous cycle challenged with 1 μ g/mL of LPS of *E. coli* after *in vitro* culture for 24 hours.

Production compared to the respective control groups (100%): A = IL-1 β in the follicular phase; B = IL-1 β in the luteal phase; C = IL-6 in the follicular phase; D = IL-6 in the luteal phase; E = IL-8 in the follicular phase; F = IL-8 in the luteal phase. Uberlândia – MG. The results are presented in mean + standard error of the mean. P = one-way ANOVA between regions.

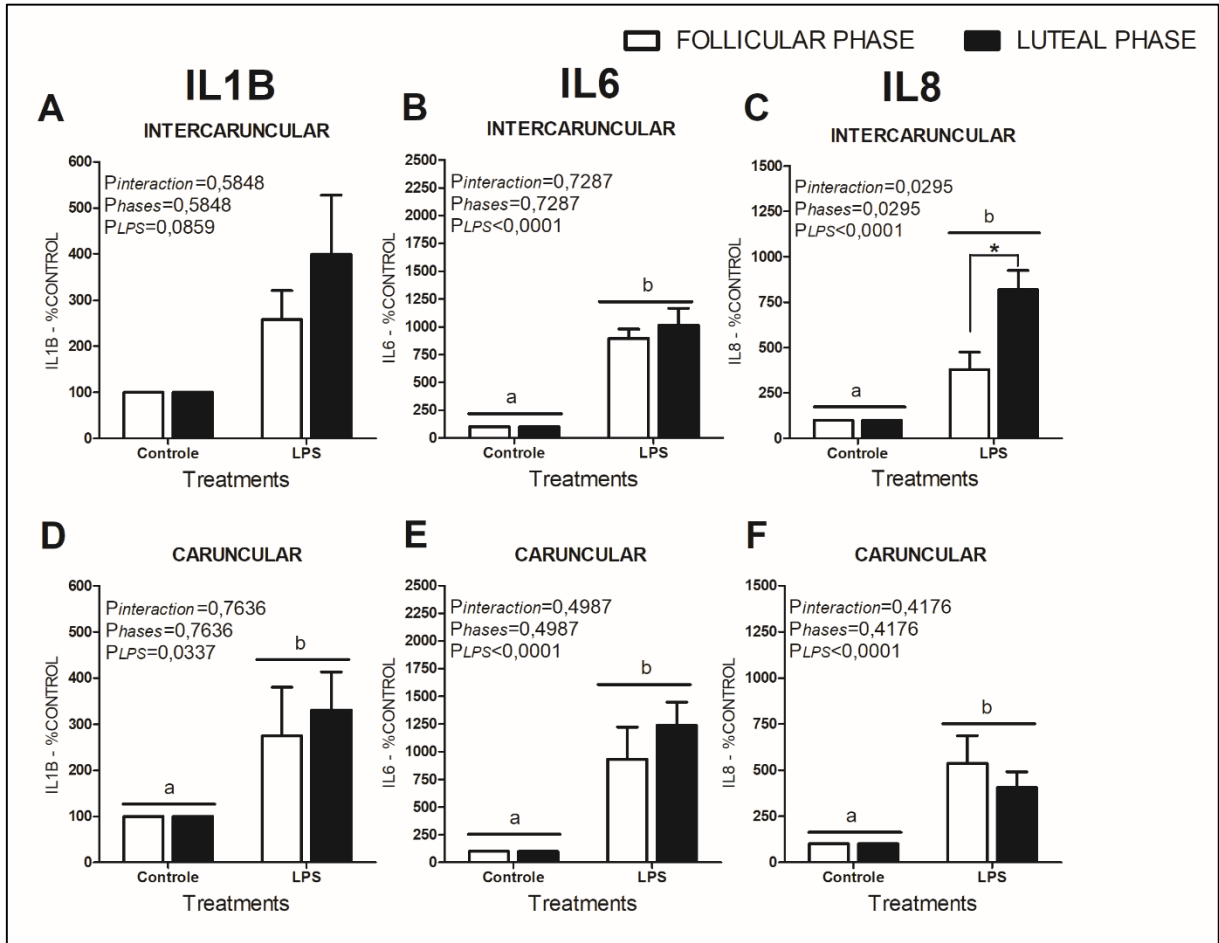


Figura 3.3: Production of IL-1 β , IL-6 and IL-8 by the caruncular and intercaruncular endometrium tissue of crossbred heifers, in the follicular phases (white bars) and luteal phase (black bars) of the estrous cycle challenged with 1 μ g/mL LPS of *E. coli* after in vitro culture 24 hours. Production compared to the respective control groups: intercaruncular (A = IL-1 β ; B = IL-6 and C = IL-8); caruncular (D = IL-1 β ; E = IL-6 and F = IL-8). Uberlândia – MG. The results are presented in mean + standard error of the mean. $P_{interaction}$ = refers to the interaction between the phases of the estrous cycle and treatments (control x LPS); P_{phases} = refers to the differences between phases of the estrous cycle; P_{LPS} = refers to the differences in production of interleukins by the explants challenged with LPS compared to the control.

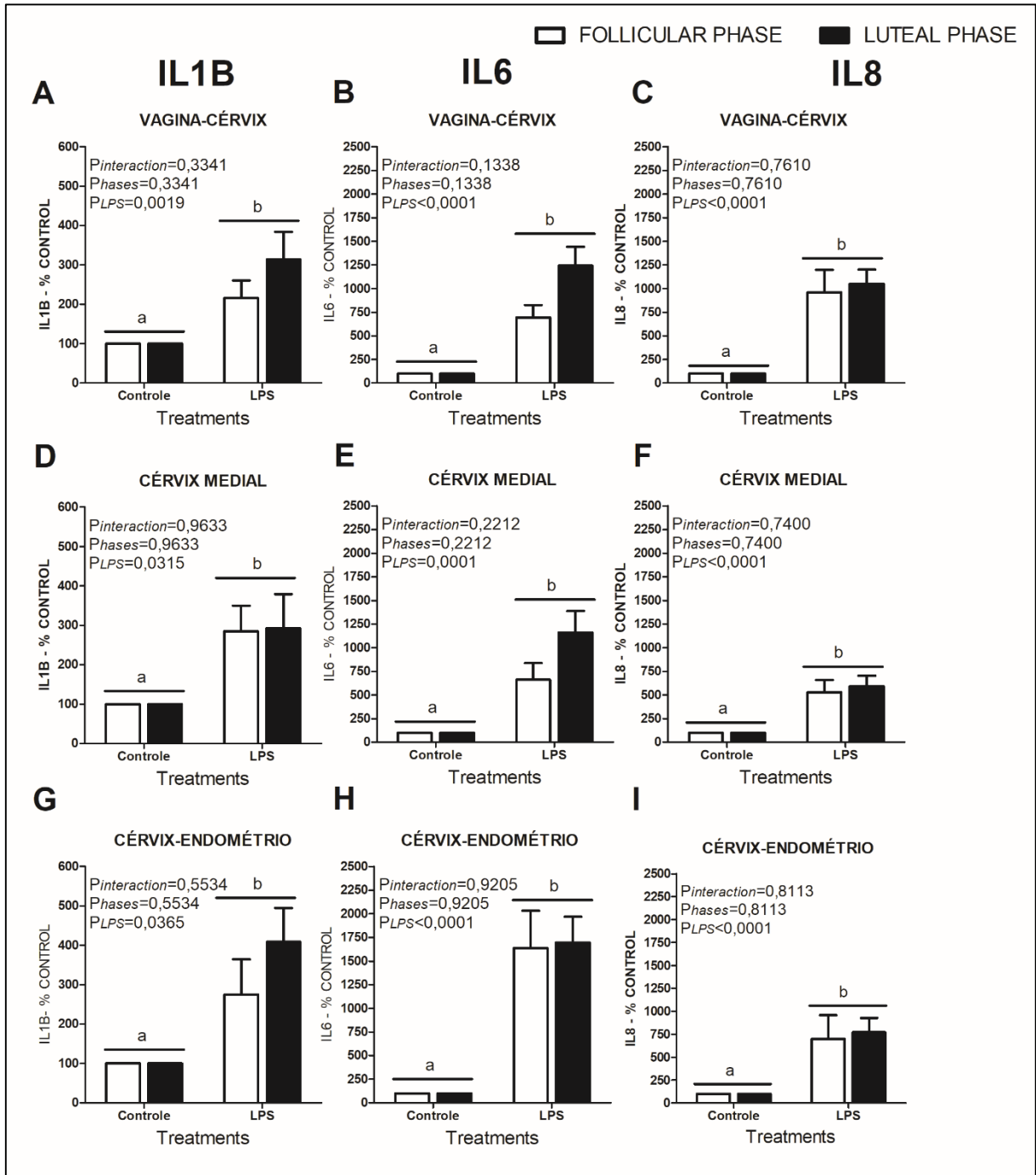


Figura 3.4: Production of IL-1 β , IL-6 and IL-8 in the cervical region and the transitions from vagina to cervix and cervix to endometrium in crossbred heifers, during the follicular phase (white bars) and luteal phase (black bars) of the estrous cycle after challenge with 1 μ g/mL of LPS derived from *E. coli* after *in vitro* culture for 24 hours. Production compared to the respective control groups: vagina-cervix transition (A – IL-1 β , B – IL-6 and C – IL-8); cervix (D – IL-1 β ; E – IL-6 and F – IL-8); transition from cervix to endometrium (G – IL-1 β ; H – IL-6 and IL-8). Crossbred heifers Uberlândia-MG. Uberlândia – MG. The results are presented in mean + standard error of the mean. $P_{interaction}$ = refers to the interaction between the phases of the estrous cycle and treatments (control x LPS); P_{phases} = refers to the differences between phases of the estrous cycle; P_{LPS} = refers to the differences in production of interleukins by the explants challenged with LPS compared to the control.

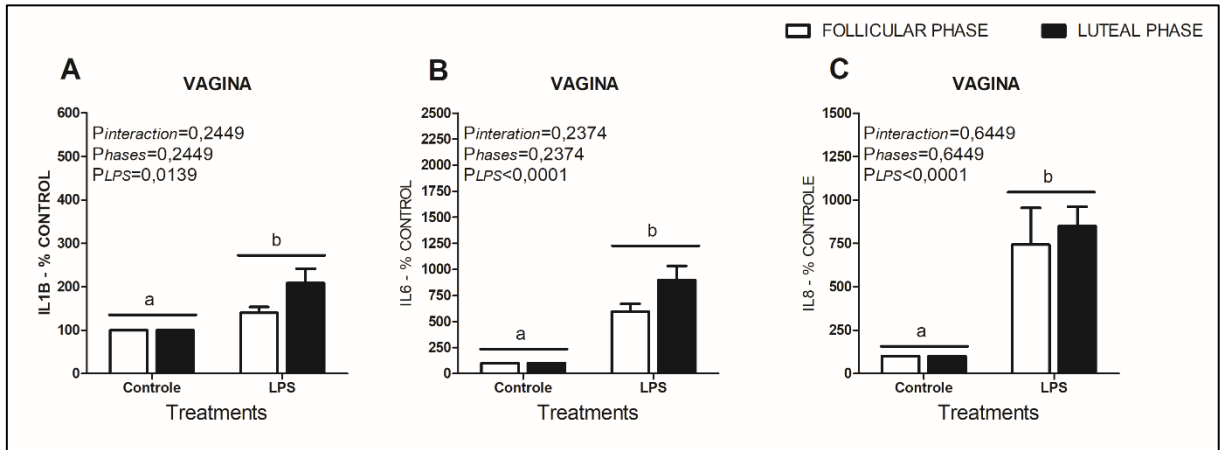


Figura 3.5: Vaginal epithelial tissue production of IL-1 β , IL-6 and IL-8 of crossbred heifers, during the follicular phase (white bars) and luteal phase (black bars) of the estrous cycle after challenge with 1 μ g/mL with LPS derived from *E. coli* cultured in vitro for 24 hours. Production compared to the respective control groups: A – IL-1 β ; B – IL-6; C – IL-8. Uberlândia-MG. The results are presented in mean + standard error of the mean. $P_{interaction}$ = refers to the interaction between the phases of the estrous cycle and treatments (control x LPS); P_{phases} = refers to the differences between phases of the estrous cycle; P_{LPS} = refers to the differences in production of interleukins by the explants challenged with LPS compared to the control.