

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**FATORES QUE AFETAM A SÍNTESE DE MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS DA RESPOSTA IMUNE INATA
ENDOMETRIAL DE BOVINOS**

Amanda Lima Rezende

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**FATORES QUE AFETAM A SÍNTESE DE MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS DA RESPOSTA IMUNE INATA
ENDOMETRIAL DE BOVINOS**

Amanda Lima Rezende

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut

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

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Agosto – 2021

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

R467 Rezende, Amanda Lima, 1991-
2021 Fatores que afetam a síntese de mediadores inflamatórios da resposta imune inata endometrial de bovinos [recurso eletrônico] / Amanda Lima Rezende. - 2021.

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.2021.487>
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



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

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



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

| | | | | | |
|------------------------------------|---|-----------------|-------|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em: | CIÊNCIAS VETERINÁRIAS | | | | |
| Defesa de: | TESE DE DOUTORADO Nº PPGCVET/002/2021 | | | | |
| Data: | 27 de agosto de 2021 | Hora de início: | 14:00 | Hora de encerramento: | 17:30 |
| Matrícula do Discente: | 11713VET007 | | | | |
| Nome do Discente: | AMANDA LIMA REZENDE | | | | |
| Título do Trabalho: | Fatores que afetam a síntese de mediadores inflamatórios da resposta imune inata endometrial de bovinos | | | | |
| 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), da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Ricarda Maria dos Santos - UFU; Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva - UFU; Nadia Simarro Fagundes - Faculdade Pitágoras; Gustavo Guerino Macedo - UFMS; João Paulo Elsen Saut** orientador(a) do(a) candidato(a).

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

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

Aprovada

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de 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 27/08/2021, às 18:03, 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 **Elisa Sant'anna Monteiro da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 18:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/08/2021, às 18:08, 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 30/08/2021, às 21:10, 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 **Gustavo Guerino Macedo, Usuário Externo**, em 23/09/2021, às 17:22, 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 **2961778** e o código CRC **A949865B**.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Amanda Lima Rezende – nascida na cidade de Franca, Estado de São Paulo aos treze dias do mês de abril de um mil novecentos e noventa e um. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) no primeiro semestre de 2010, tendo concluído o curso em janeiro de 2015. Em dezembro de 2014 foi aprovada no processo seletivo de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (Mestrado) da UFU, na área de Produção Animal com linha de pesquisa em Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva. Ingressou no Mestrado em março de 2015, onde foi bolsista pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) no período de fevereiro de março de 2016 a dezembro de 2016, quando concluiu o Mestrado. Em março de 2017 ingressou no Doutorado em Ciências Veterinárias da UFU, na área de Produção Animal com linha de pesquisa em Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva, com período sanduíche na Southern Illinois University (SIU, Carbondale, Illinois, USA) de maio à novembro de 2017. Foi bolsista pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) no período de setembro de 2018 a fevereiro de 2021. Em sistema de dedicação exclusiva à Pós-Graduação durante todo o período, trabalhou com vacas leiteiras no período de transição e pós-parto, buscando verificar a influência de imunomoduladores na resposta inata uterina e sua correlação com a ocorrência de doenças uterinas, bem como a determinação de técnicas de avaliação e tratamento dos animais neste período.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido a vida, por me abençoar e me guiar sempre pelos melhores caminhos.

Aos meus pais, pelo amor, carinho e confiança que depositaram em mim em todos os momentos. Sem a dedicação e o esforço de vocês esta conquista não seria possível.

Aos meus irmãos, meus avós, família e amigos que sempre acreditaram e torceram por mim.

Ao Professor e Orientador Dr. João Paulo Elsen Saut, por me conceder esta oportunidade e por acreditar no meu trabalho. Obrigada pela orientação, pelos ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

Aos amigos do Laboratório de Saúde em Grandes Animais (LASGRAN) e da Pós-Graduação da UFU, em especial, Paula, Oglênia, Antonio e Nádia, que sempre estiveram dispostos a ajudar e que foram essenciais para realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pela fundamental contribuição à minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFU, pela oportunidade de realizar os cursos de Mestrado e Doutorado.

Ao Professor Dr. Marcelo José Barbosa Silva pelo suporte e ensinamento, além de nos ceder o Laboratório de Osteoimunologia e Imunologia dos Tumores (UFU), para realizar as análises de PCR.

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 – Projeto Demanda Universal 01/2016 - APQ-03740-16) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido para realização desta pesquisa.

Aos Professores que aceitaram participar como membros da banca de defesa, Ricarda, Elisa, Gustavo e Nádia. Muito obrigada por se disponibilizarem a realizar as correções e avaliações deste trabalho.

FATORES QUE AFETAM A SÍNTESE DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DA RESPOSTA IMUNE INATA ENDOMETRIAL DE BOVINOS

RESUMO - A ocorrência de doenças uterinas no pós-parto de vacas leiteiras é elevada e impacta diretamente nos índices reprodutivos dos animais. Assim sendo, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios aos 14 e 35 dias em lactação (DEL) no endométrio de vacas mestiças leiteiras com e sem endometrite subclínica (ES). Os animais foram avaliados semanalmente aos sete, 14, 28 e 35 DEL e realizados os exames físico e do sistema reprodutor. Aos 14 e 35 DEL foram coletadas amostras endometriais por meio de biópsia uterina. As amostras foram processadas e analisadas pela técnica de qRT-PCR, para avaliação da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias *IL1 β* , *IL6*, *IL8* e *CCL5*. Além disso, aos 35 DEL foram coletados *swabs* por meio da técnica de escova endometrial (*cytobrush*) para citologia endometrial e diagnóstico da ES. A expressão gênica da *IL1 β* foi maior no grupo sem doença comparado ao grupo ES aos 14 DEL ($p=0,0009$). Houve diferença na expressão gênica da *IL8* entre os grupos ($p<0,001$) aos 14 DEL e em relação ao momento de coleta ($p = 0,0011$), com maior expressão aos 14 DEL quando comparado aos 35 DEL. Não foram observadas diferenças na expressão gênica da *IL6* e *CCL5* entre os grupos com e sem ES e os momentos avaliados (14 x 35 DEL). Concluiu-se que as vacas mestiças leiteiras sem doenças uterinas pós-parto apresentam resposta imune mais robusta aos 14 DEL, com maior expressão das citocinas pró-inflamatórias *IL1 β* e *IL8* quando comparadas às vacas com ES, sendo a análise da expressão gênica destas citocinas uma ferramenta potencial para o diagnóstico precoce da ES. Além disso, tendo em vista que a kisspeptina é um neuropeptídeo conhecido por sua potente ação estimulatória do hormônio liberador de gonadotrofina (GNRH), responsável por regular centralmente a função ovariana e o ciclo estral. Além do seu papel fundamental na regulação do eixo reprodutivo, a kisspeptina é capaz de modular a função das células do sistema imune, com possível regulação na interação destes dois sistemas. O presente estudo também objetivou avaliar o papel modulatório da kisspeptina na resposta imune inata endometrial de fêmeas bovinas. Para tanto, foram realizados cinco experimentos e utilizado o total de 24 tratos reprodutivos de fêmeas bovinas nulíparas, coletados em abatedouro comercial, para

processamento através da técnica de cultivo de endométrio *ex vivo*. Os tratamentos utilizados no cultivo dos explantes endometriais de regiões caruncular e intercaruncular consistiram de kisspeptina (Kp 10^{-5} M; Kp 10^{-6} M; Kp 10^{-7} M), antagonista p234 (p234 10^{-5} M; p234 10^{-7} M; p234 10^{-9} M), progesterona (5ng/mL) e dexametasona (5ng/mL), desafiados ou não com 1 μ g/mL lipopolissacarídeo (LPS), nos tempos de 12 e 24 horas de cultivo. Foram avaliadas a expressão gênica das citocinas IL6, IL1 β e a concentração das citocinas IL6, IL1 β e IL8, pelas técnicas de qRT-PCR e ELISA, respectivamente. Não houve diferença na expressão gênica das citocinas IL1 β e IL6 e na produção de IL6, IL1 β e IL8 em nenhum dos tratamentos realizados com diferentes concentrações de kisspeptina. Concluiu-se que a kisspeptina não apresentou efeito modulatório sobre a resposta imune inata do endométrio bovino quando se utilizou o modelo de cultivo endometrial *ex vivo*.

Palavras-chave: citocinas; endométrio; interleucina 6; interleucina 1 β ; interleucina 8; neuropeptídeo

ABSTRACT - Due to the high occurrence of uterine diseases in the postpartum period of dairy cows and directly impacting the reproductive indices of animals, this study also aimed to evaluate the gene expression of proinflammatory mediators in the endometrium of crossbred dairy cows with and without SE, at 14 and 35 days in milk (DIM). The physical and reproductive system evaluations of the animals were performed weekly at 7, 14, 28 and 35 DIM. At 14 and 35 DIM, endometrial samples were collected by uterine biopsy. The samples were analyzed by the qRT-PCR technique, to evaluate the gene expression of the pro-inflammatory cytokines IL1 β , IL6, IL8 and CCL5. In addition, it was collected endometrial swabs using the endometrial brush technique (cytobrush) for endometrial cytology and diagnosis of SE. The *IL1 β* gene expression to the group without SE was higher than the SE group at 14 DIM ($p = 0.0009$). There was a difference in the *IL8* gene expression at 14 DIM between groups ($p < 0.001$) and in relation to the collection time, with greater expression at 14 DIM when compared to 35 DIM ($p = 0.0011$). There were no differences in the *IL6* and *CCL5* gene expression between cows with and without SE and the collection time. In conclusion, the crossbred dairy cows without uterine diseases have a more robust immune response at 14 DIM, with greater expression of the proinflammatory cytokines IL1 β and IL8 when compared to the cows with SE, being the analysis of the gene expression of these cytokines a potential tool for the early diagnosis of SE. Besides that, in view of the kisspeptin is a neuropeptide known for its potent stimulatory action of the gonadotropin-releasing hormone (GNRH), responsible for centrally regulating ovarian function and the estrous cycle. In addition to its fundamental role in the regulation of the reproductive axis, kisspeptin is able to modulate the function of cells in the immune system, with possible regulation in the interaction of these two systems. The present study also aimed to evaluate the modulatory role of kisspeptin in the innate endometrial immune response of bovine females. Therefore, five experiments were carried out and a total of 24 reproductive tracts of nulliparous bovine females were used, collected in a commercial slaughterhouse, for processing through the ex vivo endometrium cultivation technique. The treatments used in the cultivation of endometrial explants from caruncular and intercaruncular regions consisted of kisspeptin (Kp 10⁻⁵ M; Kp 10⁻⁶ M; Kp 10⁻⁷ M), antagonist p234 (p234 10⁻⁵ M; p234 10⁻⁷ M; p234 10⁻⁹ M), progesterone (5ng/mL) and dexamethasone

(5ng/mL), challenged or not with 1 µg/mL lipopolysaccharide (LPS), at 12 and 24 hours of culture. Gene expression of cytokines IL6, IL1β and concentration of cytokines IL6, IL1β and IL8 were evaluated by qRT-PCR and ELISA, respectively. There was no difference in the gene expression of IL1β and IL6 cytokines and in the production of IL6, IL1β and IL8 in any of the treatments performed with different concentrations of kisspeptin. It was concluded that kisspeptin had no modulatory effect on the innate immune response of the bovine endometrium when the ex vivo endometrial culture model was used.

Keywords: cytokines; endometrium; interleukin 6; interleukin 1β; interleukin 8; neuropeptide

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS | 12 |
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 Doenças Uterinas do pós parto | 16 |
| 2.2 Imunidade Inata | 18 |
| 2.2.1 Componentes celulares da resposta imune inata | 18 |
| 2.2.2 Receptores <i>Toll-like</i> (TLRs) | 20 |
| 2.2.3 Citocinas | 21 |
| <i>Interleucina 1 beta (IL1β)</i> | 22 |
| <i>Interleucina 6 (IL6)</i> | 22 |
| <i>Interleucina 8 (IL8)</i> | 23 |
| <i>Interleucina 10 (IL10)</i> | 23 |
| <i>Interleucina 17 (IL17)</i> | 23 |
| <i>Quimiocina CCL5</i> | 24 |
| <i>Fator inibidor da leucemia (LIF)</i> | 24 |
| <i>Fator de necrose tumoral (TNFα)</i> | 25 |
| 2.2.4 Resposta inflamatória no útero pós-parto | 25 |
| 2.3 Kisspeptina | 27 |
| 2.3.1 O Papel da kisspeptina na reprodução | 28 |
| 2.3.2 O Papel da kisspeptina na gestação e na resposta imune | 32 |
| REFERÊNCIAS | 34 |
| CAPÍTULO 2 – Artigo 1 | 53 |
| Expression of inflammatory immune mediators in crossbreed dairy cows with and without subclinical endometritis during the postpartum period | 54 |
| Abstract | 54 |
| Introduction | 55 |
| Materials and Methods | 56 |
| Experimental design, animals and management | 56 |
| Animals monitoring and samples collection | 57 |
| Sample processing | 58 |
| Endometrial cytology | 58 |
| RNA extraction and reverse transcription | 59 |

| | |
|--|-----------|
| Real-time polymerase chain reaction qRT-PCR..... | 60 |
| Statistical Analyses | 61 |
| Results | 61 |
| Discussion | 62 |
| References | 66 |
| CAPÍTULO 3 – Artigo 2..... | 70 |
| Efeito da Kisspeptina na resposta imune inata endometrial de bovinos..... | 71 |
| RESUMO | 71 |
| 1. INTRODUÇÃO | 72 |
| 2. METODOLOGIA | 74 |
| <i>2.1 Animais e local de execução.....</i> | <i>74</i> |
| <i>2.3 Delineamento experimental.....</i> | <i>74</i> |
| <i>2.4 Coleta e processamento das amostras.....</i> | <i>75</i> |
| <i>2.5 Técnica de qRT-PCR.....</i> | <i>78</i> |
| <i>2.6 Técnica de Elisa.....</i> | <i>80</i> |
| <i>2.7 Análise estatística.....</i> | <i>81</i> |
| 3. RESULTADOS..... | 81 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 85 |
| CONCLUSÃO | 87 |
| REFERÊNCIAS | 88 |

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS
(Redigido de acordo com as normas da Biblioteca-UFU)

1. INTRODUÇÃO

Com a expansão e desenvolvimento constante da cadeia produtiva da carne e do leite, torna-se evidente a necessidade da busca pela maior produtividade e eficiência reprodutiva dos animais. Fatores que interferem no funcionamento deste setor trazem grandes prejuízos, como é o caso das doenças uterinas, que estão associadas diretamente à queda de produtividade dos animais (BRITT et al., 2018; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019).

As infecções uterinas são decorrentes da presença de bactérias patogênicas no útero após o parto e acometem cerca de 40% das vacas leiteiras. Além da elevada incidência, promovem transtornos na saúde e bem estar dos animais e estão associadas à redução das taxas de concepção ao primeiro serviço e aumento do intervalo entre partos, sendo responsáveis pelas principais causas de subfertilidade e infertilidade do rebanho (WAGENER; GABLER; DRILLICH, 2017; RALIOU et al., 2019; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019).

A contaminação bacteriana do útero no momento do parto associada aos inúmeros desafios presentes no periparto das vacas leiteiras, como a alteração brusca promovida no metabolismo dos animais devido à diminuição da ingestão de matéria seca e maior demanda energética para produção de leite, promovem uma depressão do sistema imune e maior predisposição à ocorrência de enfermidades (BRITT et al., 2018; HAMMON et al., 2006).

O epitélio endometrial representa a primeira linha de defesa do útero contra os agentes patogênicos. As células endometriais e imunes que compõem o endométrio ativam uma resposta imune local, através da detecção dos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), pelos receptores do tipo *Toll-like* (TLRs), presentes nestas células (DAVIES et al., 2008; SHELDON et al., 2008). Após a ligação dos TLRs às moléculas patogênicas, inicia-se uma cascata de sinalização, com produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, resultando no recrutamento de neutrófilos e macrófagos, responsáveis pela fagocitose e eliminação bacteriana (WIRA; GRANT-TSCHUDY; CRANE-GODREAU, 2005; KANNAKI; SHANMUGAM; VERMA, 2011; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019).

A resposta do sistema imune e a reação inflamatória são imprescindíveis para detecção e eliminação de patógenos. Porém, essa resposta deve ser pontual e equilibrada, pois uma sinalização inflamatória prolongada e exacerbada promove efeitos indesejáveis, como a ocorrência de condições inflamatórias crônicas (DAVIES et al., 2008; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019).

Em condições fisiológicas, existe uma série de mecanismos reguladores que dimensionam a proporção da resposta inflamatória, com o objetivo de responder à invasão bacteriana durante sua fase inicial e conter a mesma quando os patógenos são eliminados. No entanto, especialmente em situações de desordens pré-existentes, como em animais com redução brusca na ingestão de matéria seca no periparto, em acentuado balanço energético negativo (BEN) e com histórico de endometrite, observa-se uma ativação desregulada da resposta inflamatória, com concentrações alteradas das quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (GALVÃO et al., 2011; TURNER et al., 2016; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019).

Na busca por mecanismos alternativos que visem a regulação da inflamação, especialmente nos casos de desordens metabólicas e reprodutivas pré-existentes, surge a necessidade de pesquisas que objetivem a utilização de moduladores capazes de conter a resposta inflamatória, para que esta seja direcionada e eficaz na eliminação do patógeno, sendo desativada após a obtenção do seu objetivo.

Estudos recentes tem avaliado o papel de imunomoduladores na prevenção e tratamento das principais doenças do pós parto de vacas leiteiras (CANNING et al., 2017; RUIZ; TEDESCHI; SEPÚLVEDA, 2017; ZINICOLA et al., 2019a, 2019b; A. HIDALGO; RATTO; A. BURGOS, 2020; MASMEIJER et al., 2020). O uso da rbIL-8 (interleucina 8 bovina recombinante) (ZINICOLA et al., 2019b, 2019a), do pegbovigastim (Fator estimulador das colônias de granulócitos bovinos) (CANNING et al., 2017; RUIZ; TEDESCHI; SEPÚLVEDA, 2017; ZINICOLA et al., 2018) e do ômega 3, (A. HIDALGO; RATTO; A. BURGOS, 2020; MASMEIJER et al., 2020) objetivam a restauração da função imune e recuperação da função dos neutrófilos no pós parto (CANNING et al., 2017; RUIZ; TEDESCHI; SEPÚLVEDA, 2017; ZINICOLA et al., 2019b, 2019a).

Em consonância com este cenário, recentemente tem sido investigado o papel da kisspeptina na resposta imune e imunotolerância (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014; SHIRSHEV; GORBUNOVA; ORLOVA, 2017). A kisspeptina é um neuropeptídeo conhecido por sua potente ação estimulatória do hormônio liberador de gonadotrofina (GNRH), promovendo liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e, especialmente, do hormônio luteinizante (LH), sendo responsável por regular centralmente o ciclo estral e a função ovariana (TENA-SEMPERE, 2010; NAVARRO et al., 2011; GAHETE et al., 2016). Além do seu papel já estabelecido na regulação da reprodução, estudos recentes comprovaram sua produção pela placenta durante a gestação, com papel ativo na inibição da resposta imune (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014).

Neste contexto, a partir da hipótese de que a kisspeptina possui efeito direto na regulação da resposta imune inata endometrial, inibindo a resposta inflamatória, objetivou-se com este estudo avaliar o papel modulatório da kisspeptina na resposta imune inata uterina de fêmeas bovinas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças Uterinas do pós parto

A presença de bactérias no útero em decorrência do parto é frequente, ocorrendo na maioria dos casos, a eliminação destes agentes potencialmente patogênicos nos primeiros dias após o parto. No entanto, em aproximadamente 40% dos animais estas bactérias persistem, ocasionando quadros de doenças uterinas (SHELDON et al., 2009; DUBUC, 2011; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019).

Retenção de placenta, metrite e endometrite são as principais doenças que acometem o trato reprodutivo da fêmea bovina após o parto (SHELDON et al., 2009; DUBUC et al., 2010). A retenção de placenta consiste na não expulsão total ou parcial das membranas fetais em até 12 horas após o parto, devido à uma falha nas separações das vilosidades da placenta fetal (cotilédones) com as criptas maternas (carúnculas) (SENGER, 2003; DERVISHI; AMETAJ, 2017; SHELDON, 2019). É considerada um importante fator de risco para a metrite, sendo que, de 30 a 50% das vacas que tiveram retenção de placenta desenvolvem metrite (LEBLANC, 2008; SHELDON et al., 2009; SHELDON, 2019).

A metrite é uma doença de caráter agudo que geralmente ocorre logo na primeira semana após o parto. É classificada em leve, moderada e grave de acordo com os sinais clínicos. A metrite leve é caracterizada clinicamente por um aumento anormal do útero, acompanhado de descarga uterina purulenta, com coloração achocolatada e de odor fétido, na ausência de sinais sistêmicos. A metrite moderada, além de apresentar os sinais clínicos da metrite leve, é acompanhada por sintomatologia sistêmica, como febre, desidratação, anorexia, prostração e queda na produção de leite. Já a metrite grave, além dos sinais apresentados nos quadros anteriores, difere-se pela presença de sinais de toxemia (LEBLANC, 2008; SHELDON et al., 2008; DUBUC, 2011; SHELDON, 2019). De 20 a 40% dos animais de alta produção, mantidos em sistemas intensivos, apresentam metrite na primeira semana pós-parto e este quadro persiste em até 20% dos animais na forma de endometrite clínica (SHELDON et al., 2009; DUBUC, 2011).

A endometrite pode ser classificada em clínica e subclínica. A endometrite clínica em geral, ocorre entre 21 e 28 DPP e é caracterizada por descarga uterina purulenta aos 21 DPP ou mucopurulenta a partir dos 26 DPP. Já a endometrite subclínica não apresenta alterações macroscópicas, sendo diagnosticada pelo exame de citologia endometrial e baseada na contagem de neutrófilos na lâmina, superior a 18% entre 21 e 33 DPP, ou superior a 10% entre 34 e 47 DPP (DUBUC, 2011; SHELDON, 2019; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019).

As infecções uterinas são consideradas uma das principais causas de subfertilidade e infertilidade de vacas leiteiras, acarretando sérios prejuízos à eficiência reprodutiva do rebanho. Animais com histórico de retenção de placenta apresentam maior predisposição ao desenvolvimento de metrite e endometrite (LEBLANC, 2008; SHELDON et al., 2009; SHELDON; OWENS, 2017; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019), além de redução da interleucina-8 um potente quimioatratador de células efectoras do sistema imune (WISCHRAL et al., 2001).

Diminuição da taxa de concepção à primeira inseminação, aumento do intervalo de partos e de dias em aberto e o aumento do descarte involuntário e de casos de infertilidade são fatores observados no pós-parto de animais que apresentam infecções uterinas (GILBERT et al., 2005; ROCHE, 2006; KONYVES et al., 2009; SHELDON; OWENS, 2017; WAGENER; GABLER; DRILLICH, 2017).

O comprometimento da eficiência reprodutiva se deve em grande parte, pelo fato das doenças uterinas promoverem alterações no ambiente uterino que dificultam a implantação do embrião e a placentação, sendo responsáveis também por alterações na produção e concentração circulante dos hormônios esteroides. Com isso, ocorre um crescimento lento do folículo dominante, com menor produção de estradiol e frequência do pulso de LH, que culminam em baixas taxas de ovulação. Por sua vez, quando a ovulação ocorre, a produção de progesterona pelo corpo lúteo formado é baixa, e conseqüentemente, a taxa de concepção também é reduzida (RALIOU et al., 2019; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019).

2.2 Imunidade Inata

O sistema imunológico é constituído por uma variedade de moléculas, células e órgãos interligados com o objetivo de manter a homeostase do organismo. Este sistema é conceitualmente dividido em imunidade inata e imunidade adaptativa, de acordo com sua função e mecanismo de resposta frente à estímulos (TURVEY; BROIDE, 2010; SHELDON; OWENS; TURNER, 2017).

A imunidade inata corresponde à segunda barreira de defesa do organismo contra agentes patogênicos, ativada quando há perda da integridade das barreiras físicas. É caracterizada por uma resposta rápida e inespecífica, sendo a liberação de mediadores químicos, ativação das células de defesa e de proteínas do sistema complemento, quimiotaxia e a fagocitose, seus principais mecanismos de ação. Esses mecanismos são ativados por estímulos específicos conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), tais como moléculas de lipopolissacarídeos, ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos componentes da superfície de microorganismos patogênicos. Estes estímulos são reconhecidos pelo organismo do hospedeiro através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR), presentes em suas células sentinelas, que ao se ligarem as PAMPs promovem a ativação da resposta imune inata (CHAPLIN, 2010; TURVEY; BROIDE, 2010; CARNEIRO; CRONIN; SHELDON, 2016; SHELDON; OWENS; TURNER, 2017).

Uma vez ativada a resposta imune inata, o organismo hospedeiro direciona seus mecanismos de defesa para o local de invasão microbiana, que irão desencadear uma série de reações e a instalação da inflamação. Além dos PAMPs, as células de defesa do organismo possuem outro tipo de receptores de reconhecimento de padrões associados à lesão, os DAMPs (Padrões Moleculares Associados à Danos), tais como as alarminas, moléculas liberadas por células mortas ou por células que foram lesionadas (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; TURVEY; BROIDE, 2010; CARNEIRO; CRONIN; SHELDON, 2016).

2.2.1 Componentes celulares da resposta imune inata

As principais células de defesa responsáveis pelos mecanismos de ação da resposta imune inata são os neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e

células *Natural Killer* (NK) (PARKIN; COHEN, 2001; CHAPLIN, 2010; SHELDON; OWENS; TURNER, 2017).

Os leucócitos ou glóbulos brancos são as células responsáveis pela defesa do organismo frente a injúrias e invasão de agentes patogênicos. Os neutrófilos são células polimorfonucleares que constituem a maior quantidade dos leucócitos presentes na circulação sanguínea, sendo uma das primeiras a serem ativadas e migrarem para o local da infecção. Essas células de atividade fagocitária, apresentam grânulos em seu citoplasma compostos por proteínas e enzimas antimicrobianas, que promovem a destruição dos patógenos após sua internalização. Subsequente a fagocitose e eliminação do patógeno, os neutrófilos sofrem apoptose e são removidos da circulação e dos tecidos inflamados pelos macrófagos (PARKIN; COHEN, 2001; BRINKMANN; ZYCHLINSKY, 2007; DALE; BOXER; CONRAD LILES, 2008).

Os monócitos são leucócitos presentes na circulação sanguínea que ao migrarem para os tecidos dão origem aos macrófagos. Essas células possuem importante papel na fagocitose de patógenos e debris celulares, na imunomodulação, por secretarem grandes quantidades de mediadores pró-inflamatórios, além da apresentação de antígenos. Uma vez ativados, os monócitos e macrófagos estimulam a liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, tais como IL1, IL6 e TNF α , além de secretarem espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO), importantes moléculas microbidas (PARKIN; COHEN, 2001; DALE; BOXER; CONRAD LILES, 2008).

As células dendríticas são as primeiras células a chegarem ao local da infecção, sendo responsáveis pela captura dos antígenos e apresentação aos linfócitos. Existem dois tipos funcionais de células dendríticas, as imaturas e as maduras. As imaturas são mais especializadas na captura dos antígenos, enquanto as maduras são direcionadas à apresentação, além de auxiliarem no recrutamento de outras células de defesa através da secreção de quimiocinas. Essas células são capazes de armazenar por muito tempo os antígenos capturados nos tecidos linfoides, potencializando sua memória imunológica. Assim, essas células representam uma importante ligação entre a imunidade

inata e a imunidade adaptativa (BANCHEREAU et al., 2000; PARKIN; COHEN, 2001; STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003).

As células *Natural Killer* (NK) são grandes linfócitos granulares ativadas em resposta precoce à células tumorais e infecções microbianas. Possuem grânulos citotóxicos em seu citoplasma, compostos principalmente por enzimas como a perforina, que criam poros na membrana plasmática, ocasionando a lise das células alvo. Além do reconhecimento de antígenos e lise celular, também possuem importante papel no recrutamento de células dendríticas, neutrófilos, macrófagos e células T, por meio da secreção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente de interferon gama (IFN- γ) (PARKIN; COHEN, 2001; VIVIER et al., 2008).

2.2.2 Receptores *Toll-like* (TLRs)

Os receptores do tipo *Toll-like* possuem papel de destaque na ligação a patógenos e ativação da resposta inflamatória, sendo considerados os principais receptores de reconhecimento de padrões. Estes receptores podem ser expressos na superfície de células do sistema imune ou no citoplasma de células epiteliais e do estroma endometrial (HERATH et al., 2006a; DAVIES et al., 2008; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009; KANNAKI; SHANMUGAM; VERMA, 2011; SHELDON; OWENS; TURNER, 2017).

No genoma de mamíferos são expressos vários tipos de receptores da família *Toll Like*. Os TLRs que se localizam na superfície das células reconhecem principalmente proteínas e lipoproteínas microbianas, como o LPS, lipopolissacarídeo presente na membrana de bactérias gram negativas. O receptor do tipo TLR4 é o receptor responsável pela detecção do LPS, sendo constituinte da membrana plasmática de macrófagos e células dendríticas. Os receptores do tipo TLR1, TLR2 e TLR6 são conhecidos por detectarem lipídios bacterianos, enquanto os receptores TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 reconhecem os ácidos nucleicos presentes nos antígenos e o TLR5 detecta a flagelina, componente estrutural do flagelo bacteriano (HERATH et al., 2006b; DAVIES et al., 2008; KANNAKI; SHANMUGAM; VERMA, 2011; CRONIN et al., 2012; TURNER et al., 2014b; SHELDON; OWENS; TURNER, 2017).

A ativação dos TLRs ocorre após ligação ao seu respectivo alvo, podendo estimular diferentes vias de sinalização, que irão resultar na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). Uma vez ativado, o NF- κ B é translocado ao núcleo da célula e se liga a sítios específicos de seu DNA, formando o complexo DNA/NF- κ B, responsável pela transdução de uma proteína capaz de alterar a função celular. Desta forma, a ativação da via do NF- κ B promove a ativação de vários genes pró-inflamatórios nas células imunes inatas, com indução da transcrição de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (HERATH et al., 2009a; KANNAKI; SHANMUGAM; VERMA, 2011; LIU et al., 2017).

2.2.3 Citocinas

As citocinas são pequenas moléculas proteicas produzidas por vários tipos celulares, especialmente por células do sistema imunológico, nos locais de infecção e inflamação. Essas moléculas são responsáveis pela sinalização e modulação de células imunológicas, estimulando ou inibindo a diferenciação, atividade e proliferação destas células, além de regular a síntese e secreção de outras citocinas inflamatórias. Como existe uma variedade de citocinas com diversas funções, essas moléculas foram conceitualmente agrupadas em interleucinas (IL), quimiocinas, interferons (TNF), fatores de necrose tumoral (FNT) e fatores de crescimento (HAWIGER, 2001; PARKIN; COHEN, 2001; TIZARD, 2009; TURNER et al., 2014a).

As interleucinas são citocinas produzidas principalmente por leucócitos, que em sua grande maioria atuam na ativação ou supressão do sistema imune e indução de divisão celular. Já as quimiocinas são citocinas com potente ação quimiotática, que promovem recrutamento e migração das células de defesa. Os interferons participam do controle e replicação celular, modulação das respostas imunológicas e inflamatórias, estimulam a apoptose de células infectadas, além de potencializar a apresentação de antígenos através da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade do tipo II (MHC II) (GOODBOURN; DIDCOCK; RANDALL, 2000; PARKIN; COHEN, 2001; TURNER et al., 2014a).

Interleucina 1 beta (IL1 β)

A citocina IL1 β é sintetizada principalmente por células de defesa como macrófagos e monócitos, através de estímulos resultantes da ligação de receptores TLRs aos antígenos. Além das células de defesa estas citocinas também são produzidas por outros tipos celulares em resposta a inflamação e injúrias, como é o caso da produção por células epiteliais e endoteliais ativadas em situações de lesão tecidual (SIMS; SMITH, 2010; TURNER et al., 2014a).

É uma potente citocina pró-inflamatória, que atua estimulando a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, promove ativação de neutrófilos e monócitos potencializando a fagocitose, além de estimular e promover a diferenciação de células T e induzir a inflamação sistêmica através da ativação da via da ciclooxigenase-2 (COX-2) (PARKIN; COHEN, 2001; SIMS; SMITH, 2010; TURNER et al., 2014a).

Interleucina 6 (IL6)

A interleucina 6 é uma citocina pró-inflamatória secretada por diversas células, entre elas macrófagos, monócitos, células endoteliais e hepatócitos e corresponde a um dos mecanismos mais precoces e fundamentais na regulação da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. Além disso, promove a maturação e ativação de neutrófilos, atua como fator de crescimento para as células B sendo fundamental para sua maturação final e estimula a maturação de macrófagos e diferenciação de células T (TURNER et al., 2014a; HUNTER; JONES, 2015).

Além do seu conhecido papel pró-inflamatório, a IL6 também atua promovendo um feedback negativo sobre a liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias, como a IL1, TNF e IFN- γ , limitando e controlando a resposta inflamatória (HEINRICH et al., 2003; TURNER et al., 2014a; HUNTER; JONES, 2015).

De acordo com a literatura, a IL6 também possui importante papel na manutenção inicial da gestação (MATHIALAGAN; BIXBY; ROBERTS, 1992; SCHJENKEN; ROBERTSON, 2014; YANG et al., 2016). Estudos comprovaram o aumento da expressão de IL6 pelos tecidos maternos e fetais durante a implantação e placentação, indicando que esta citocina atua promovendo maior

receptividade do endométrio ao blastocisto, além de regular diretamente a invasão do trofoblasto em humanos e roedores, contribuindo assim para o sucesso da implantação (MCEWAN et al., 2009; YANG et al., 2016).

Interleucina 8 (IL8)

A IL8 é uma importante quimiocina pró-inflamatória sintetizada principalmente por macrófagos ativados, células epiteliais e linfócitos T, que promove ativação e migração de neutrófilos e outros leucócitos para os locais de inflamação e lesão tecidual. Além do importante papel como mediador inflamatório na quimiotaxia de células de defesa, também atua como fator angiogênico nas células endoteliais e induz a expressão de moléculas de adesão (RUSSO et al., 2014; TURNER et al., 2014a).

Interleucina 10 (IL10)

A IL10 é uma citocina anti-inflamatória, sintetizadas por células do sistema imune ativadas, principalmente macrófagos, monócitos e células T. Esta citocina promove inibição da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL1, IL6, IL8 e TNF pelos macrófagos e monócitos, além inibir a apresentação de antígenos pelos macrófagos e monócitos e estimular a produção de outras citocinas anti-inflamatórias. Também atua diretamente nas células T, suprimindo sua ação e prejudicando o desenvolvimento da imunidade mediada por Th1 (linfócitos T helper do tipo 1) (MOORE et al., 2001; PARKIN; COHEN, 2001; SABAT et al., 2010).

Possui importante papel na modulação e contenção da resposta inflamatória, uma vez que níveis baixos ou deficientes de IL10 promovem uma ativação imunológica persistente e a instalação de quadros de doenças crônicas (MOORE et al., 2001; SABAT et al., 2010). De acordo estudos, a IL10 também possui papel na formação da imunotolerância materna durante os estágios iniciais da gestação, suprimindo a resposta inflamatória (MELLOR; MUNN, 2001; EPHREM et al., 2013; GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014, 2020).

Interleucina 17 (IL17)

A interleucina 17 é uma citocina pró-inflamatória produzida predominantemente por linfócitos T ativados, que estimula a ativação de neutrófilos e outros leucócitos por meio da síntese e liberação de citocinas, como

IL6 e IL8 e de moléculas de adesão. Além do papel na mediação da resposta imune inata, a IL17 atua diretamente na imunidade adaptativa, por meio de sinalização e liberação de estímulos aos linfócitos T (MOSELEY et al., 2003; KOLLS; LINDÉN, 2004).

De acordo com estudos em humanos, a IL17 está diretamente relacionada a imunotolerância materna durante o primeiro trimestre da gestação. Elevados níveis de IL17 sintetizada por células T helper (Th17) tem sido associados a perda de gestação, por induzirem respostas pró-inflamatórias na junção materno-fetal (PONGCHAROEN et al., 2007; NAKASHIMA et al., 2010; LEE et al., 2011).

Quimiocina CCL5

A CCL5 é uma quimiocina sintetizada por vários tipos celulares, entre eles macrófagos, eosinófilos, células epiteliais, endoteliais e células T e atua no recrutamento de células de defesa, potencializa os processos inflamatórios, além de destacar-se por sua ação antiviral. Além do papel pró-inflamatório, a CCL5 também está associada à processos patológicos como doenças inflamatórias crônicas e ao câncer, por estimular a angiogênese e a proliferação celular (MARQUES et al., 2013; ALDINUCCI; COLOMBATTI, 2014).

Vários estudos evidenciam a importante atuação da CCL5 nas fases iniciais da resposta inflamatória. No entanto, também é notória a contribuição desta citocina no estabelecimento da inflamação excessiva e danos teciduais observados nas fases mais tardias desta resposta (DÉNES et al., 2010; MARQUES et al., 2013; ALDINUCCI; COLOMBATTI, 2014).

Fator inibidor da leucemia (LIF)

O fator inibidor da leucemia (LIF) é uma citocina pertencente à família da IL6 produzida principalmente por linfócitos T ativados, leucócitos, fibroblastos e células endoteliais. É considerada uma citocina pleiotrópica por desenvolver diversas funções em variados tecidos, participando de processos inflamatórios, proliferação e diferenciação celular, foliculogênese, embriogênese, dentre outras funções (METCALF, 1991; NICOLA; BABON, 2015).

Possui um importante papel no estabelecimento e manutenção da gestação em diversas espécies, auxiliando na sinalização, receptividade do útero ao embrião e na implantação, além de atuar na função endometrial e na decidualização (METCALF, 1991; CULLINAN et al., 1996; MCEWAN et al., 2009; LUZ et al., 2011; NICOLA; BABON, 2015).

Fator de necrose tumoral (TNF α)

O TNF α é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos, linfócitos T, células epiteliais e estromais. É uma das mais importantes citocinas moduladoras da resposta imune inata e possui diversas funções (SINGH et al., 2008; KASIMANICKAM et al., 2013; TURNER et al., 2014a; KOH et al., 2018). Entre elas, estimula a proliferação de linfócitos T, fibroblastos, células NK e a síntese de outras citocinas e quimiocinas; é um potente indutor do metabolismo muscular por estimular a lipólise, além de regular a síntese de prostaglandina pelo endométrio e promove ativação da coagulação e da apoptose celular (SINGH et al., 2008; KASIMANICKAM et al., 2013; TURNER et al., 2014a; KOH et al., 2018).

2.2.4 Resposta inflamatória no útero pós-parto

A resposta inflamatória é um processo biológico complexo cujo objetivo é remover o estímulo desencadeador da resposta e promover o reparo tecidual completo no local da lesão. Este processo é caracterizado por sinais clínicos específicos, como calor, rubor, edema, dor e perda da função e envolve diversos componentes celulares e vasculares, além de uma série de substâncias solúveis (BARTON, 2008; MEDZHITOV, 2008; TIZARD, 2009).

Dentre as substâncias liberadas durante o processo inflamatório estão as aminas vasoativas, as proteínas do sistema complemento e as citocinas e quimiocinas inflamatórias, que irão promover a permeabilidade vascular, a adesão, migração e ativação das células de defesa, proporcionando as condições necessárias para a fagocitose e reparação tecidual (MEDZHITOV, 2001; PARKIN; COHEN, 2001; BARTON, 2008; TIZARD, 2009).

Durante o pós-parto, os animais enfrentam vários desafios metabólicos, como a diminuição da ingestão de matéria seca, a maior demanda energética

para a produção de leite e, com isso, uma maior mobilização das reservas corporais e a instalação do quadro de balanço energético negativo (BEN), onde a quantidade de nutrientes disponíveis encontra-se inferior à elevada exigência (SORDILLO; CONTRERAS; AITKEN, 2009; LEBLANC, 2010, 2012; GALVÃO, 2013). Esta alteração brusca evidenciada no metabolismo dos animais após o parto, corresponde à um dos principais fatores responsáveis pela depressão do sistema imune nesta fase, que de acordo com vários estudos (HAMMON et al., 2006; SORDILLO; CONTRERAS; AITKEN, 2009; LEBLANC, 2012, 2014; SHELDON; CRONIN; BROMFIELD, 2019), pode perdurar por várias semanas até que ocorra o restabelecimento completo desta função.

A depressão do sistema imune e a diminuição da capacidade de resposta e eliminação de injúrias pelas células de defesa, promove uma maior predisposição à ocorrência das infecções uterinas (HAMMON et al., 2006; SINGH et al., 2008; KASIMANICKAM et al., 2013; LEBLANC, 2014; RALIOU et al., 2019). A função fagocitária dos neutrófilos, principais responsáveis pela eliminação bacteriana no útero, é dependente da captação de glicose, que se encontra deficiente em decorrência do BEN, prejudicando a capacidade de resposta destas células. Além disso, a presença de elevados níveis de metabólitos provenientes da mobilização de reservas corporais, como β -hidroxibutirato (BHBA) e os ácidos graxos não esterificados (NEFA), promove uma menor atividade neutrofílica e capacidade de eliminação do desafio bacteriano (CHAPINAL et al., 2011; ESPOSITO et al., 2014; LEBLANC, 2014; TURNER et al., 2016; DAIBERT et al., 2018).

A alteração na expressão de algumas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL6, IL1 β , IL8 e CCL5, também tem sido relacionada as condições do ambiente uterino no pós-parto e predisposição à doenças. Animais com infecções uterinas apresentam alteração na expressão destas citocinas no pós parto quando comparados à animais saudáveis (HERATH et al., 2009b; FISCHER et al., 2010; GABLER et al., 2010; GALVÃO et al., 2011; KASIMANICKAM et al., 2013). De acordo com Kasimanickam et al., 2013, vacas que desenvolvem doenças uterinas após o parto apresentam uma maior concentração sérica de IL6, IL1 β e TNF α . Além disso, a alteração observada na concentração destas citocinas é diretamente associada à maior perda de

condição corporal nestes animais, o que predispõe à ocorrência de inflamações crônicas.

Alguns estudos observaram menor expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL6, IL1 β e TNF α no pós parto imediato de vacas que desenvolveram endometrite (GALVÃO et al., 2011). No entanto, outros resultados evidenciaram uma maior expressão de IL1 β , IL8 e CCL5 após a segunda semana subsequente ao parto em animais que apresentaram inflamação no útero quando comparados aos animais saudáveis (FISCHER et al., 2010; GABLER et al., 2010). Desta forma, alterações na produção e concentração das citocinas no pós parto estão diretamente relacionadas à desordens metabólicas e reprodutivas subsequentes, com significativa queda na produção e na fertilidade dos animais (HERATH et al., 2009b; FISCHER et al., 2010; GABLER et al., 2010; GALVÃO et al., 2011; KASIMANICKAM et al., 2013; LEBLANC, 2014; KOH et al., 2018).

2.3 Kisspeptina

A kisspeptina é um neuropeptídeo expresso pelo gene *KISS 1* sintetizado principalmente pelos neurônios dos núcleos hipotalâmicos e conhecido por sua potente ação estimuladora da síntese e secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (PINILLA et al., 2012; TREVISAN et al., 2018; CAO et al., 2019; DWYER; QUINTON, 2019). Este peptídeo pode ser encontrado na forma de quatro moléculas biologicamente ativas originadas a partir de um precursor comum, porém diferenciadas de acordo com a quantidade de aminoácidos que as compõe, sendo elas Kp-54, Kp-14, Kp13 e Kp10 (OHTAKI et al., 2001; PINILLA et al., 2012; HU et al., 2019). Atualmente, sabe-se que o gene *KISS 1* também é expresso fora do tecido nervoso central, sendo identificado em tecidos periféricos como ovários, testículos, útero, placenta, intestino delgado, fígado e pâncreas (TENA-SEMPERE, 2013; KANDA; OKA, 2016; CAO et al., 2019).

Este neuropeptídeo, descoberto em 1996, foi nomeado primeiramente de metastina, devido à capacidade de inibir a metástase tumoral em células de melanoma maligno em humanos, atuando como regulador da multiplicação

celular (LEE et al., 1996). Posteriormente, descobriu-se que a kisspeptina é um estimulador essencial para secreção do GnRH, sendo responsável por sua regulação central no hipotálamo através da ligação ao seu receptor presente nos neurônios GnRH. Desta forma, a kisspeptina atua estimulando a foliculogênese, espermatogênese, esteroidogênese, além do seu papel fundamental na ovulação (GUTIÉRREZ-PASCUAL et al., 2007; WAHAB; SHAHAB; BEHR, 2015; IWASA et al., 2018).

A kisspeptina possui afinidade pelo receptor *KISS1R* conhecido também como *GPR54*, o qual encontra-se nas células acoplado a uma proteína G transmembrana e apresenta expressão em vários tecidos, especialmente, nos neurônios GnRH (TREVISAN et al., 2018; CAO et al., 2019; HU et al., 2019). A ligação do sistema *KISS1/KISS1R* promove sinalização por diferentes vias, sendo a via de ativação da fosfolipase C a mais importante para emissão dos sinais reprodutivos. Uma vez ativada, a fosfolipase C promove aumento da mobilização intracelular de cálcio (Ca^{+2}), com consequente alteração da permeabilidade do canal iônico e despolarização, resultando na emissão do estímulo (CASTAÑO et al., 2009; ROA et al., 2009; HU et al., 2019).

2.3.1 O Papel da kisspeptina na reprodução

A função reprodutiva é regulada por um complexo sistema neuroendócrino, o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. O hipotálamo, a hipófise e as glândulas gonadais correspondem as estruturas primárias deste eixo, que juntos regulam a produção hormonal e a reprodução (SENGER, 2003; OYOLA; HANDA, 2017). Os neurônios GnRH, cujos núcleos estão presentes no hipotálamo, possuem papel primordial na regulação do eixo reprodutivo e executam diversas funções. Dentre elas, destaca-se a síntese do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que irá atuar na hipófise estimulando a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) (OYOLA; HANDA, 2017; DWYER; QUINTON, 2019).

Além da síntese e secreção do GnRH, os neurônios GnRH promovem a modulação da função reprodutiva e controle da liberação hormonal através da transmissão de sinais provenientes de feedbacks centrais e periféricos (OYOLA;

HANDA, 2017; DWYER; QUINTON, 2019). Hormônios e peptídeos como estradiol, testosterona, leptina e kisspeptina, atuam direta ou indiretamente nos neurônios GnRH promovendo a regulação dos eventos reprodutivos (TENA-SEMPERE, 2010, 2013; OYOLA; HANDA, 2017; DWYER; QUINTON, 2019).

Na fêmea, a regulação através de feedbacks promovida pelos esteroides gonadais ocorre de forma indireta nos neurônios de GnRH, uma vez que estas células não expressam receptores de estrógeno dos tipos α ($ER\alpha$) ou β ($ER\beta$) e de progesterona (PR), que são os receptores relacionados as transmissões destes sinais no cérebro (SMITH et al., 2006; CLARKSON et al., 2008; OAKLEY; CLIFTON; STEINER, 2009; BEYMER et al., 2016). Neste caso, a modulação da reprodução e do ciclo estral realizada por esses hormônios ocorre via neurônios intermediários, sendo os neurônios kisspeptina os principais mediadores desta sinalização. O mesmo ocorre nos machos, visto que não há expressão de receptores de testosterona nos neurônios GnRH (KAUFFMAN; CLIFTON; STEINER, 2007; BEYMER et al., 2016; FRANSSSEN; TENA-SEMPERE, 2018).

Os neurônios kisspeptina estão amplamente distribuídos no hipotálamo e constituem duas principais populações neuronais, uma no núcleo periventricular anteroventral (AVPV) e outra nos núcleos arqueados (ARC) (PINILLA et al., 2012; BEYMER et al., 2016). Ambas as populações neuronais de kisspeptina expressam receptores de estrógeno ($ER\alpha$) e testosterona, sendo a sinalização de feedback positivo associada aos neurônios presentes no AVPV, enquanto a sinalização de feedback negativo ocorre por meio dos neurônios do ARC. Desta forma, o sistema KISS1/KISS1R corresponde a principal via intermediária da transmissão dos sinais de feedback promovido pelos esteroides gonadais na liberação de GnRH, e conseqüentemente, das gonadotropinas FSH e principalmente, do LH (OAKLEY; CLIFTON; STEINER, 2009; PINILLA et al., 2012; BEYMER et al., 2016; OYOLA; HANDA, 2017).

De acordo com importantes estudos que auxiliaram na descoberta do papel exato do sistema KISS1/KISS1R no eixo reprodutivo, pacientes com mutações e ausência do gene KISS1R apresentavam imaturidade sexual, falha na função reprodutiva e hipogonadotropismo. No entanto, estes pacientes se mantinham responsivos a administração de GnRH exógeno, com reversão

destes quadros anteriormente observados, indicando que a falha ocorria a nível da liberação deste hormônio (DE ROUX et al., 1997, 2003; SEMINARA et al., 2003; NOVAIRA et al., 2014).

Outros pesquisadores realizaram experimentalmente a ruptura da sinalização KISS1/KISS1R através da inativação do gene KISS1 em camundongos ou através da administração de um antagonista exógeno da kisspeptina (p234) e obtiveram resultados semelhantes, com ruptura da sinalização do eixo reprodutivo e subfertilidade (DE TASSIGNY et al., 2007; LAPATTO et al., 2007; ROSEWEIR et al., 2009; CAO et al., 2019). Estes dados evidenciam a falha funcional do sistema reprodutivo decorrente da ausência de ligação da kisspeptina ao seu receptor, destacando o papel fundamental do neuropeptídeo no desempenho correto da função reprodutiva (DE ROUX et al., 1997, 2003; SEMINARA et al., 2003; NOVAIRA et al., 2014; CAO et al., 2019).

Além da atuação direta dos neurônios kisspeptina nos neurônios de GnRH, o neuropeptídeo também promove estimulação por outra via, constituída por uma população neuronal que expressa simultaneamente diferentes peptídeos, os chamados neurônios KNDy. Os neurônios KNDy estão localizados nos núcleos arqueados (ARC) do hipotálamo e além de expressarem a kisspeptina, expressam também a neuroquinina B (NKB) pertencente à família das taquicininas e a dinorfina (Dyn), um opioide endógeno. De acordo com a literatura, os peptídeos NKB e Dyn atuam de forma complementar controlando a liberação da kisspeptina nos neurônios KNDy, sendo que o NKB promove a emissão de sinais estimulatórios e o Dyn de sinais inibitórios (WAKABAYASHI et al., 2010; NAVARRO et al., 2011; PINILLA et al., 2012; CLARKE; DHILLO; JAYASENA, 2015; MANFREDI-LOZANO; ROA; TENA-SEMPERE, 2018).

Os neurônios KNDy também expressam os receptores ER α , de progesterona (PR) e testosterona, estando diretamente relacionados ao feedback promovido pelos esteroides gonadais na secreção de kisspeptina (TENA-SEMPERE, 2010; WAKABAYASHI et al., 2010; NAVARRO et al., 2011; PINILLA et al., 2012; BEYMER et al., 2016). Segundo autores, os neurônios KISS1 no ARC, incluindo os neurônios KNDy, estão relacionados ao feedback negativo promovido pelo estrógeno na secreção de GnRH durante o diestro e

manutenção da pulsatilidade basal do LH. Já os neurônios KISS1 no AVPV, estão relacionados ao feedback positivo do estradiol, responsável pelo pico de LH no estro, essencial para ovulação e luteinização (TENA-SEMPERE, 2010; PINILLA et al., 2012; BEYMER et al., 2016; MANFREDI-LOZANO; ROA; TENA-SEMPERE, 2018).

Além da modulação e controle da liberação de kisspeptina realizada pelos esteroides gonadais, alguns reguladores metabólicos também são capazes de transmitir sinais através dos neurônios kisspeptina e representam uma importante via mediadora entre o status metabólico e a função reprodutiva. A reprodução é um evento biológico que demanda muita energia, necessitando de reservas energéticas e de nutrientes suficientes para o desenvolvimento adequado desta função (CLARKE; DHILLO; JAYASENA, 2015; HARTER; KAVANAGH; SMITH, 2018; MANFREDI-LOZANO; ROA; TENA-SEMPERE, 2018; TREVISAN et al., 2018; WAHAB et al., 2018).

Neste contexto, situações de deficiência nutricional e energética causam efeitos negativos no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, inibindo a liberação de GnRH e interrompendo a reprodução. Dentre os hormônios responsáveis pela sinalização metabólica no eixo reprodutivo destacam-se a leptina, a grelina e o neuropeptídeo Y, os quais possuem intensa sinalização neuronal e transmissão de estímulos reguladores da liberação de kisspeptina (TENA-SEMPERE, 2010; CLARKE; DHILLO; JAYASENA, 2015; WAHAB; SHAHAB; BEHR, 2015; HARTER; KAVANAGH; SMITH, 2018; MANFREDI-LOZANO; ROA; TENA-SEMPERE, 2018; WAHAB et al., 2018).

A leptina é um hormônio secretado pelos adipócitos, as células que constituem o tecido adiposo, sendo conhecido também como hormônio da saciedade, por ser um importante sinalizador de reserva energética. Em condições onde há grandes quantidades de energia no organismo, a leptina é sintetizada e age no hipotálamo reduzindo o apetite, estimulando o gasto energético e regulando a função neuroendócrina. Desta forma, a leptina atua nos neurônios KNDy e neurônios kisspeptina estimulando a liberação de kisspeptina e conseqüentemente, a liberação de GnRH e a função reprodutiva (WAHAB;

SHAHAB; BEHR, 2015; SHIRSHEV; GORBUNOVA; ORLOVA, 2017; WAHAB et al., 2018; GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2020).

Ao contrário da leptina a grelina é o hormônio da fome, um potente indicador de déficit energético sintetizado pelo estômago e pâncreas em condições de jejum prolongado e perda da condição corporal. O neuropeptídeo Y, sintetizado por uma população neuronal localizada no ARC, tem sua produção estimulada sob as mesmas condições metabólicas da grelina, ou seja, em situações de deficiência de energia. Ambos atuam nos neurônios Kp e KNDy inibindo a secreção da kisspeptina e do GnRH, bloqueando assim a reprodução (NAVARRO et al., 2005; TENA-SEMPERE, 2010; CLARKE; DHILLO; JAYASENA, 2015; WAHAB; SHAHAB; BEHR, 2015; MANFREDI-LOZANO; ROA; TENA-SEMPERE, 2018; WAHAB et al., 2018).

2.3.2 O Papel da kisspeptina na gestação e na resposta imune

Após a descoberta de que a placenta é o local de maior expressão de kisspeptina fora do tecido nervoso central e do aumento drástico dos seus níveis circulantes em gestantes, vários estudos se dedicaram a investigar o papel do neuropeptídeo na gestação (HORIKOSHI et al., 2003; BILBAN et al., 2004; ROSEWEIR; KATZ; MILLAR, 2012; GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014, 2020).

Atualmente, ainda pouco se sabe sobre todos os mecanismos de ação da kisspeptina durante a gestação nos mamíferos e do seu papel na resposta imune, sendo observada algumas divergências entre as espécies. De acordo com pesquisas realizadas com camundongos e humanos, a kisspeptina possui um importante papel no processo de decidualização, através da estimulação do fator inibidor de leucemia (*LIF*), uma citocina pertencente à família da *IL-6* fundamental para o sucesso da implantação. Esta citocina secretada pelas glândulas uterinas, promove a comunicação embrionária-uterina e contribuiu para sinalização e receptividade do útero ao embrião, sendo fundamental para sua adesão no endométrio (STEWART et al., 1992; CULLINAN et al., 1996; MCEWAN et al., 2009; ZHANG et al., 2014; ABDELKAREEM et al., 2018; KELLEHER et al., 2018).

A kisspeptina também promove modulação das metaloproteinases da matriz celular durante o período de peri-implantação, regulando a invasão do trofoblasto no endométrio e estimula a expressão de moléculas de adesão que auxiliam no processo de implantação, em humanos e roedores (ZHANG et al., 2014; KELLEHER et al., 2018; CAO et al., 2019; HU et al., 2019). Segundo autores, a expressão de KISS1/KISS1R na placenta é maior durante o primeiro trimestre e diminui gradualmente conforme a gestação evolui e que, falhas neste sistema estão diretamente relacionadas à ocorrência de aborto. Esses dados reafirmam a importância da kisspeptina durante a fase inicial da gestação, especialmente no processo de implantação do embrião e decidualização, em humanos e roedores (JANNEAU et al., 2002; CARTWRIGHT; WILLIAMS, 2012; CAO et al., 2019; RADOVICK; BABWAH, 2019).

Além da atuação da kisspeptina na decidualização e implantação do embrião, estudos também evidenciaram seu papel na formação da imunotolerância materna durante a gestação (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014, 2020). De acordo com estes estudos, as células do sistema imunológico expressam receptores de membrana específicos para kisspeptina, que atua estimulando a diferenciação das células T regulatórias (Tregs). Estas células promovem supressão das células T efectoras, inibindo a ativação e função dos linfócitos T. Desta forma, modulam a resposta imunológica e promovem a imunotolerância materna (MELLOR; MUNN, 2001; EPHREM et al., 2013; GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2020).

Dentre os mecanismos de ação das células Tregs na inibição da resposta imune está a secreção de IL10, conhecida por seu efeito anti-inflamatório e a diminuição da diferenciação de células Th17, com conseqüente inibição da síntese de IL17, que por sua vez, atua na secreção de quimiocinas, potencializando o recrutamento dos neutrófilos (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014, 2020; SHIRSHEV; GORBUNOVA; ORLOVA, 2017). Sendo assim, a kisspeptina inibe a reação inflamatória promovida pela ativação do sistema imune materno em resposta à detecção do embrião, auxiliando na imunossupressão necessária para manutenção da gestação (GORBUNOVA; SHIRSHEV, 2014, 2020; SHIRSHEV; GORBUNOVA; ORLOVA, 2017).

REFERÊNCIAS

A. HIDALGO, M.; RATTO, M.; A. BURGOS, R. Beneficial Effect of Omega-3 Fatty Acids on Immune and Reproductive Endometrial Function. In: **Apolipoproteins, Triglycerides and Cholesterol**. [s.l.] IntechOpen, 2020.

ABDELKAREEM, A. O. et al. Endometrial leukemia inhibiting factor (LIF) and integrin $\alpha\beta 3$ (ITG $\alpha\beta 3$) expression after kisspeptin trigger of ovulation in mice. **Fertility and Sterility**, v. 110, n. 4, p. e252–e253, 1 set. 2018. Disponível em: <<http://www.fertstert.org/article/S0015028218313141/fulltext>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

ALDINUCCI, D.; COLOMBATTI, A. The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/292376>>. Acesso em: 4 ago. 2020.

BANCHEREAU, J. et al. **Immunobiology of dendritic cells** *Annual Review of Immunology* Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA , , 28 nov. 2000. . Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>>. Acesso em: 29 jul. 2020.

BARTON, G. M. **A calculated response: Control of inflammation by the innate immune system** *Journal of Clinical Investigation*, 1 fev. 2008. .

BEYMER, M. et al. The role of kisspeptin and RFRP in the circadian control of female reproduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 438, p. 89–99, 15 dez. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27364888/>>. Acesso em: 25 ago. 2020.

BILBAN, M. et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1319–1328, 15 mar. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15020672/>>. Acesso em: 2 set. 2020.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 577–582, ago. 2007.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17632569/>>. Acesso em: 29 jul. 2020.

BRITT, J. H. et al. Invited review: Learning from the future—A vision for dairy farms and cows in 2067. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3722–3741, 1 maio 2018.

CANNING, P. et al. Efficacy and clinical safety of pegbovigrastim for preventing naturally occurring clinical mastitis in periparturient primiparous and multiparous cows on US commercial dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 8, p. 6504–6515, 1 ago. 2017.

CAO, Y. et al. **Reproductive functions of Kisspeptin/KISS1R Systems in the Periphery** **Reproductive Biology and Endocrinology** BioMed Central Ltd., , 9 ago. 2019. . Disponível em: <<https://link.springer.com/articles/10.1186/s12958-019-0511-x>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

CARNEIRO, L. C.; CRONIN, J. G.; SHELDON, I. M. Mechanisms linking bacterial infections of the bovine endometrium to disease and infertility. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 1, 2016.

CARTWRIGHT, J. E.; WILLIAMS, P. J. Altered placental expression of kisspeptin and its receptor in pre-eclampsia. **Journal of Endocrinology**, v. 214, n. 1, p. 79–85, jul. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22526494/>>. Acesso em: 2 set. 2020.

CASTAÑO, J. P. et al. **Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: Do multiple signals underlie function diversity?** **Peptides** Elsevier, , 1 jan. 2009. .

CHAPINAL, N. et al. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 10, p. 4897–4903, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21943741/>>. Acesso em: 5 ago. 2020.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, fev. 2010.

CLARKE, H.; DHILLO, W. S.; JAYASENA, C. N. **Comprehensive review on kisspeptin and its role in reproductive disorders***Endocrinology and Metabolism*Korean Endocrine Society, , 2015. . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2581256/>. Acesso em: 1 set. 2020.

CLARKSON, J. et al. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 35, p. 8691–8697, 27 ago. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1848277/>. Acesso em: 27 ago. 2020.

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. 51–51, 29 fev. 2012. Disponível em: <http://www.biolreprod.org/cgi/doi/10.1095/biolreprod.111.092718>>. Acesso em: 4 out. 2016.

CULLINAN, E. B. et al. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 7, p. 3115–3120, 2 abr. 1996. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/93/7/3115>>. Acesso em: 4 ago. 2020.

DAIBERT, E. et al. Metabolites able to predict uterine diseases in crossbred dairy cows during the transition period. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 39, n. 3, 2018.

DALE, D. C.; BOXER, L.; CONRAD LILES, W. The phagocytes: Neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 935–945, 15 ago. 2008. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/112/4/935/1456693/zh801608000935.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2020.

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

DE ROUX, N. et al. A Family with Hypogonadotropic Hypogonadism and Mutations in the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 22, p. 1597–1603, 27 nov. 1997. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199711273372205>>. Acesso em: 28 ago. 2020.

DE ROUX, N. et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 19, p. 10972–10976, 16 set. 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12944565/>>. Acesso em: 28 ago. 2020.

DE TASSIGNY, X. D. A. et al. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 25, p. 10714–10719, 19 jun. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16611111/>>. Acesso em: 28 ago. 2020.

DÉNES, Á. et al. Chronic systemic infection exacerbates ischemic brain damage via a CCL5 (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted)-mediated proinflammatory response in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 30, p. 10086–10095, 28 jul. 2010. Disponível em: <www.jneurosci.org>. Acesso em: 4 ago. 2020.

DERVISHI, E.; AMETAJ, B. N. Retained placenta: A systems veterinary approach. In: **Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach**. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. p. 121–137.

DUBUC, J. et al. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5764–5771, 2010.

DUBUC, J. Postpartum Uterine Diseases : Prevalence , Impacts , and Treatments. **WCDS Advances in Dairy Technology**, v. 23, p. 255–267, 2011. Disponível em: <<http://www.wcds.ca/proc/2011/Manuscripts/Dubuc.pdf>>.

DWYER, A. A.; QUINTON, R. Anatomy and Physiology of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal (HPG) Axis. In: **Advanced Practice in Endocrinology**

Nursing. [s.l.] Springer International Publishing, 2019. p. 839–852.

EPHREM, A. et al. Modulation of Treg cells/T effector function by GITR signaling is context-dependent. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 9, p. 2421–2429, 1 set. 2013. Disponível em: <www.eji-journal.eu>. Acesso em: 26 jun. 2021.

ESPOSITO, G. et al. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal reproduction science**, v. 144, n. 3–4, p. 60–71, 30 jan. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037843201300328X>>. Acesso em: 7 dez. 2016.

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, 20 maio 2010. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RD09120>>. Acesso em: 16 jun. 2020.

FRANSSSEN, D.; TENA-SEMPERE, M. **The kisspeptin receptor: A key G-protein-coupled receptor in the control of the reproductive axis** *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* Bailliere Tindall Ltd, , 1 abr. 2018. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29678280/>>. Acesso em: 25 ago. 2020.

GABLER, C. et al. Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, 22 dez. 2010.

GAHETE, M. D. et al. Role of the Kiss1/Kiss1r system in the regulation of pituitary cell function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 438, p. 100–106, 15 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720716302787?via%3Dihub#fig1>>. Acesso em: 28 mar. 2019.

GALVÃO, K. N. et al. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 2,

p. 290–299, 15 jul. 2011.

GALVÃO, K. N. **Uterine diseases in dairy cows: understanding the causes and seeking solutions***Anim. Reprod.*, v. [s.l.] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 26 jul. 2013. .

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

GOODBURN, S.; DIDCOCK, L.; RANDALL, R. E. **Interferons: Cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures***Journal of General Virology*. [s.l: s.n.].

GORBUNOVA, O. L.; SHIRSHEV, S. V. The role of kisspeptin in immune tolerance formation during pregnancy. **Doklady Biological Sciences**, v. 457, n. 1, p. 258–260, 2014.

GORBUNOVA, O. L.; SHIRSHEV, S. V. **Role of Kisspeptin in Regulation of Reproductive and Immune Reactions***Biochemistry (Moscow)*Pleiades Publishing, , 1 ago. 2020. . Disponível em:
<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33045946/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

GUTIÉRREZ-PASCUAL, E. et al. Direct pituitary effects of kisspeptin: Activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 19, n. 7, p. 521–530, 1 jul. 2007. Disponível em:
<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2826.2007.01558.x>>. Acesso em: 6 ago. 2020.

HAMMON, D. S. et al. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. 1–2, p. 21–29, 15 set. 2006.

HARTER, C. J. L.; KAVANAGH, G. S.; SMITH, J. T. **The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism***Journal of Endocrinology*BioScientifica Ltd., , 1 set. 2018. . Disponível em:
<<https://doi.org/10.1530/JOE-18-0108><http://joe.endocrinology-journals.org>>.

Acesso em: 1 set. 2020.

HAWIGER, J. Innate immunity and inflammation: A transcriptional paradigm. **Immunologic Research**, v. 23, n. 2–3, p. 99–109, 2001.

HEINRICH, P. C. et al. **Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation** **Biochemical Journal** Portland Press, , 15 ago. 2003. . Disponível em: </biochemj/article/374/1/1/43650/Principles-of-interleukin-IL-6-type-cytokine>. Acesso em: 4 ago. 2020.

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, jan. 2006a. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/10.1210/en.2005-1113>>. Acesso em: 20 out. 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, jan. 2006b.

HERATH, S. et al. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 55, 29 maio 2009a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19476661>>. Acesso em: 3 fev. 2017.

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, 29 maio 2009b.

HORIKOSHI, Y. et al. Dramatic Elevation of Plasma Metastin Concentrations in Human Pregnancy: Metastin as a Novel Placenta-Derived Hormone in Humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 2, p. 914–919, 1 fev. 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article/88/2/914/2845392>>. Acesso em: 2 set. 2020.

HU, K. L. et al. Potential roles for the kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation. **Human Reproduction Update**, v. 25, n. 3, p.

326–343, 1 maio 2019. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30649364/>>. Acesso em: 25 ago. 2020.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. **IL-6 as a keystone cytokine in health and disease***Nature Immunology*Nature Publishing Group, , 28 maio 2015. .

Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ni.3153>>. Acesso em: 4 ago. 2020.

IWASA, T. et al. **The roles of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in stress-induced reproductive disorders***Endocrine*

JournalJapan Endocrine Society, , 2018. . Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29375085/>>. Acesso em: 6 ago. 2020.

JANNEAU, J. L. et al. Transcriptional expression of genes involved in cell invasion and migration by norm and tumoral trophoblast cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 11, p. 5336–5339, 1 nov. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12414911/>>. Acesso em: 2 set. 2020.

KANDA, S.; OKA, Y. Kisspeptin. In: **Handbook of Hormones**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 10-e1B-2.

KANNAKI, T. R.; SHANMUGAM, M.; VERMA, P. C. **Toll-like receptors and their role in animal reproduction***Animal Reproduction Science*, maio 2011. .

KASIMANICKAM, R. K. et al. Associations among serum pro- and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 11, p. 103, 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3830449&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

KAUFFMAN, A. S.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. **Emerging ideas about kisspeptin- GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction***Trends in Neurosciences*Trends Neurosci, , out. 2007. .

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17904653/>>. Acesso em: 27

ago. 2020.

KELLEHER, A. M. et al. Uterine glands coordinate on-time embryo implantation and impact endometrial decidualization for pregnancy success. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29934619/>>. Acesso em: 2 set. 2020.

KOH, Y. Q. et al. Regulation of inflammatory mediator expression in bovine endometrial cells: effects of lipopolysaccharide, interleukin 1 beta, and tumor necrosis factor alpha. **Physiological Reports**, v. 6, n. 9, p. e13676, 1 maio 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.14814/phy2.13676>>. Acesso em: 31 jul. 2020.

KOLLS, J. K.; LINDÉN, A. **Interleukin-17 family members and inflammation** Immunity Cell Press, , 1 out. 2004. .

KONYVES, L. et al. Risk assessment of postpartum uterine disease and consequences of puerperal metritis for subsequent metabolic status, reproduction and milk yield in dairy cows. **Acta veterinaria Hungarica**, v. 57, n. 1, p. 155–69, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19457784>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. **Toll-like receptors and innate immunity** Biochemical and Biophysical Research Communications, 30 out. 2009. .

LAPATTO, R. et al. Kiss1 ^{-/-} Mice Exhibit More Variable Hypogonadism than Gpr54^{-/-} Mice. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4927–4936, 1 out. 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/148/10/4927/2501727>>. Acesso em: 28 ago. 2020.

LEBLANC, S. Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in the Transition Period. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. S, p. S29–S35, 2010. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jrd/1056S29?from=CrossRef>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

LEBLANC, S. J. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive

performance: A review. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 102–114, 2008.

LEBLANC, S. J. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 47 Suppl 5, p. 18–30, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22913557>>. Acesso em: 30 set. 2016.

LEBLANC, S. J. Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. **Animal**, v. 8, n. SUPPL. 1, p. 54–63, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24679404/>>. Acesso em: 31 jul. 2020.

LEE, J.-H. et al. KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-Suppressor Gene. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 23, p. 1731–1737, 4 dez. 1996. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/88.23.1731>>. Acesso em: 28 mar. 2019.

LEE, S. K. et al. An imbalance in interleukin-17-producing T and Foxp3 regulatory T cells in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. **Human Reproduction**, v. 26, n. 11, p. 2964–2971, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humrep/article-abstract/26/11/2964/658338>>. Acesso em: 4 ago. 2020.

LIU, T. et al. **NF- κ B signaling in inflammation** **Signal Transduction and Targeted Therapy** Springer Nature, , 14 jul. 2017. . Disponível em: <www.nature.com/sigtrans>. Acesso em: 29 jul. 2020.

LUZ, V. B. et al. Characterization, mechanisms of action and role of leukemia inhibitory factor in ovarian physiology and embryonic implantation. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 213–220, 2011. Disponível em: <<http://pd-beta.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId>>. Acesso em: 4 ago. 2020.

MANFREDI-LOZANO, M.; ROA, J.; TENA-SEMPERE, M. **Connecting metabolism and gonadal function: Novel central neuropeptide pathways involved in the metabolic control of puberty and fertility** **Frontiers in**

Neuroendocrinology Academic Press Inc., , 1 jan. 2018. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28754629/>>. Acesso em: 2 set. 2020.

MARQUES, R. E. et al. Targeting CCL5 in inflammation. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 17, n. 12, p. 1439–1460, 3 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.2013.837886>>. Acesso em: 4 ago. 2020.

MASMEIJER, C. et al. Effects of omega-3 fatty acids on immune, health and growth variables in veal calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 179, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32388034/>>. Acesso em: 23 jun. 2021.

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, 1 ago. 1992. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mrd.1080320404>>. Acesso em: 21 ago. 2020.

MCEWAN, M. et al. **Cytokine regulation during the formation of the fetal-maternal interface: Focus on cell-cell adhesion and remodelling of the extra-cellular matrix** *Cytokine and Growth Factor Reviews* Pergamon, , 1 jun. 2009. .

MEDZHITOV, R. **Toll-like receptors and innate immunity** *Nature Reviews Immunology* European Association for Cardio-Thoracic Surgery, , 2001. .

MEDZHITOV, R. **Origin and physiological roles of inflammation** *Nature* Nature Publishing Group, , 24 jul. 2008. . Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature07201>>. Acesso em: 29 jul. 2020.

MELLOR, A. L.; MUNN, D. H. Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal anti-fetal immune responses. In: *Journal of Reproductive Immunology*, 1–2, **Anais...Elsevier**, 1 out. 2001.

METCALF, D. The leukemia inhibitory factor (LIF). **The International Journal of Cell Cloning**, v. 9, n. 2, p. 95–108, 1 jan. 1991. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/stem.5530090201>>. Acesso em: 4 ago. 2020.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, n. 1, p. 683–765, 28 abr. 2001. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>>.

Acesso em: 4 ago. 2020.

MOSELEY, T. A. et al. **Interleukin-17 family and IL-17 receptors** *Cytokine and Growth Factor Reviews* Elsevier BV, , 1 abr. 2003. .

NAKASHIMA, A. et al. Accumulation of IL-17-Positive Cells in Decidua of Inevitable Abortion Cases. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 64, n. 1, p. 4–11, 1 fev. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0897.2010.00812.x>>. Acesso em: 4 ago. 2020.

NAVARRO, V. M. et al. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54.

Endocrinology, v. 146, n. 1, p. 156–163, jan. 2005. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15375028/>>. Acesso em: 28 ago. 2020.

NAVARRO, V. M. et al. Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 300, n. 1, jan. 2011.

NICOLA, N. A.; BABON, J. J. **Leukemia inhibitory factor (LIF)** *Cytokine and Growth Factor Reviews* Elsevier Ltd, , 1 out. 2015. .

NOVAIRA, H. J. et al. Disrupted Kisspeptin Signaling in GnRH Neurons Leads to Hypogonadotropic Hypogonadism. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 2, p. 225–238, 1 fev. 2014. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/mend/article/28/2/225/2556171>>. Acesso em: 25 ago. 2020.

OAKLEY, A. E.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. **Kisspeptin signaling in the brain** *Endocrine Reviews* The Endocrine Society, , 2009. . Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19111114/>>. Acesso em: 27 ago. 2020.

OHTAKI, T. et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 411, n. 6837, p. 613–617, maio

2001. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/35079135>>. Acesso em: 28 mar. 2019.

OYOLA, M. G.; HANDA, R. J. **Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity** *Stress* Taylor and Francis Ltd, , 3 set. 2017. . Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5815295/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35079135/)>. Acesso em: 27 ago. 2020.

PARKIN, J.; COHEN, B. **An overview of the immune system** *Lancet* Elsevier Limited, , 2 jun. 2001. . Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673600049047/fulltext>>. Acesso em: 29 jul. 2020.

PINILLA, L. et al. Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 3, p. 1235–1316, jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22811428>>. Acesso em: 28 mar. 2019.

PONGCHAROEN, S. et al. Interleukin-17 Expression in the Human Placenta. **Placenta**, v. 28, n. 1, p. 59–63, 1 jan. 2007.

RADOVICK, S.; BABWAH, A. V. Regulation of Pregnancy: Evidence for Major Roles by the Uterine and Placental Kisspeptin/KISS1R Signaling Systems. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 37, n. 4, p. 182–190, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31972863/>>. Acesso em: 2 set. 2020.

RALIOU, M. et al. Subclinical endometritis in dairy cattle is associated with distinct mRNA expression patterns in blood and endometrium. **PLOS ONE**, v. 14, n. 8, p. e0220244, 2 ago. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31374089>>. Acesso em: 29 set. 2019.

ROA, J. et al. **Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents** *Peptides* Elsevier, , 1 jan. 2009. .

ROCHE, J. F. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 96, p. 282–296, 2006.

ROSEWEIR, A. K. et al. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 12, p. 3920–3929, 25 mar. 2009. Disponível em: </pmc/articles/PMC3035813/?report=abstract>. Acesso em: 28 ago. 2020.

ROSEWEIR, A. K.; KATZ, A. A.; MILLAR, R. P. Kisspeptin-10 inhibits cell migration in vitro via a receptor-GSK3 beta-FAK feedback loop in HTR8SVneo cells. **Placenta**, v. 33, n. 5, p. 408–415, maio 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22349353/>. Acesso em: 2 set. 2020.

RUIZ, R.; TEDESCHI, L. O.; SEPÚLVEDA, A. Investigation of the effect of pegbovigrastim on some periparturient immune disorders and performance in Mexican dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 3305–3317, 1 abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12003>. Acesso em: 22 jun. 2021.

RUSSO, R. C. et al. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 10, n. 5, p. 593–619, 29 maio 2014. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/1744666X.2014.894886>. Acesso em: 4 ago. 2020.

SABAT, R. et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 5, p. 331–344, 1 out. 2010.

SCHJENKEN, J.; ROBERTSON, S. Seminal Fluid and Immune Adaptation for Pregnancy - Comparative Biology in Mammalian Species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 27–36, set. 2014. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/rda.12383>. Acesso em: 21 ago. 2020.

SEMINARA, S. B. et al. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 17, p. 1614–1627, 23 out. 2003. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa035322>. Acesso em: 28 ago. 2020.

SENGER, P. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2nd ed. ed. Pullman WA: Current Conceptions, 2003.

SHELDON, I. M. et al. Uterine diseases in cattle after parturition. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 176, n. 1, p. 115–21, abr. 2008.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18329302>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

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. 6, p. 1025–32, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19439727>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

SHELDON, I. M. The Metritis Complex in Cattle. In: **Veterinary Reproduction and Obstetrics**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 408–433.

SHELDON, I. M.; CRONIN, J. G.; BROMFIELD, J. J. Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 7, n. 1, p. 361–384, 15 fev. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30359085>>. Acesso em: 29 set. 2019.

SHELDON, I. M.; OWENS, S. E. Postpartum uterine infection and endometritis in dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 622–629, 2017.

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** Elsevier Ireland Ltd, , 1 fev. 2017. .

SHIRSHEV, S. V.; GORBUNOVA, O. L.; ORLOVA, E. G. Role of Kisspeptin and Leptin in the Development of Immune Reactivity during Pregnancy. **Human Physiology**, v. 43, n. 6, p. 705–710, 1 nov. 2017.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. **The IL-1 family: Regulators of immunity** **Nature Reviews Immunology** Nature Publishing Group, , 18 fev. 2010. . Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri2691>>. Acesso em: 31 jul. 2020.

SINGH, J. et al. **The immune status of the bovine uterus during the peripartum period** **Veterinary Journal** W.B. Saunders, , 1 mar. 2008. .

SMITH, J. T. et al. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for

- generating the preovulatory luteinizing hormone surge. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 25, p. 6687–6694, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16793876/>>. Acesso em: 28 ago. 2020.
- 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, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19558749>>. Acesso em: 8 nov. 2016.
- STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic Dendritic Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 685–711, 28 abr. 2003. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040>>. Acesso em: 29 jul. 2020.
- STEWART, C. L. et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. **Nature**, v. 359, n. 6390, p. 76–79, 1992. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1522892/>>. Acesso em: 2 set. 2020.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. **Pattern Recognition Receptors and Inflammation** *Cell*, , mar. 2010. .
- TENA-SEMPERE, M. **Kisspeptin signaling in the brain: Recent developments and future challenges** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 27 jan. 2010. .
- TENA-SEMPERE, M. Kisspeptins. In: **Handbook of Biologically Active Peptides**. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. p. 819–827.
- TIZARD, I. R. Como se inicia a inflamação. In: **Imunologia Veterinária**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 11–27.
- TREVISAN, C. M. et al. **Kisspeptin/GPR54 System: What Do We Know about Its Role in Human Reproduction?** *Cellular Physiology and Biochemistry* S. Karger AG, , 1 out. 2018. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30205368/>>. Acesso em: 25 ago. 2020.

TURNER, M. D. et al. **Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease***Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*Elsevier, , 1 nov. 2014a. .

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, abr. 2014b. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/10.1210/en.2013-1822>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

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. e0151416, 14 mar. 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0151416>>. Acesso em: 30 nov. 2016.

TURVEY, S. E.; BROIDE, D. H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, p. S24–S32, 1 fev. 2010.

VIVIER, E. et al. **Functions of natural killer cells***Nature Immunology*Nature Publishing Group, , 18 maio 2008. . Disponível em: <<http://www.nature.com/natureimmunology>>. Acesso em: 29 jul. 2020.

WAGENER, K.; GABLER, C.; DRILLICH, M. **A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows***Theriogenology*Elsevier Inc., , 1 maio 2017. .

WAHAB, F. et al. **Metabolic impact on the hypothalamic kisspeptin-kiss1r signaling pathway***Frontiers in Endocrinology*Frontiers Media S.A., , 28 mar. 2018. .

WAHAB, F.; SHAHAB, M.; BEHR, R. **The involvement of gonadotropin inhibitory hormone and kisspeptin in the metabolic regulation of reproduction***Journal of Endocrinology*BioScientifica Ltd., , 1 maio 2015. . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1530/JOE-14-0688>>. Acesso em: 6 ago. 2020.

WAKABAYASHI, Y. et al. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 8, p. 3124–3132, 24 fev. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20181609/>>. Acesso em: 31 ago. 2020.

WIRA, C. R.; GRANT-TSCHUDY, K. S.; CRANE-GODREAU, M. A. Epithelial Cells in the Female Reproductive Tract: a Central Role as Sentinels of Immune Protection. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, n. 2, p. 65–76, fev. 2005.

WISCHRAL, A. et al. Pre-parturition profile of steroids and prostaglandin in cows with or without foetal membrane retention. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 3, p. 181–188, 2001.

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. Disponível em: <www.arccjournals.com/www.ijaronline.in>. Acesso em: 24 ago. 2020.

ZHANG, P. et al. Expression and function of kisspeptin during mouse decidualization. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 15 maio 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24830702/>>. Acesso em: 2 set. 2020.

ZINICOLA, M. et al. Effects of pegbovigrastim administration on periparturient diseases, milk production, and reproductive performance of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 12, p. 11199–11217, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30316593/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

ZINICOLA, M. et al. Effects of recombinant bovine interleukin-8 (rbIL-8) treatment on health, metabolism, and lactation performance in Holstein cattle II: Postpartum uterine health, ketosis, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 11, p. 10316–10328, 1 nov. 2019a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31495609/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

ZINICOLA, M. et al. Effects of recombinant bovine interleukin-8 (rbIL-8)

treatment on health, metabolism, and lactation performance in Holstein cattle IV: Insulin resistance, dry matter intake, and blood parameters. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 11, p. 10340–10359, 1 nov. 2019b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31495618/>>. Acesso em: 21 jun. 2021.

CAPÍTULO 2 – Artigo 1
(Artigo submetido ao periódico Tropical Animal Health and Production)

1 **Expression of inflammatory immune mediators in crossbreed dairy cows**
2 **with and without subclinical endometritis during the postpartum period**

3 Amanda Lima Rezende¹, Paula Batista de Alvarenga², Oglênia Pereira Ramos¹,
4 Nádia Simarro Fagundes³, Ricarda Maria dos Santos⁴, Marcelo José Barbosa
5 Silva⁵, Luisa Cunha Carneiro⁶, João Paulo Elsen Saut^{1,4*}

6 ¹ *Large Animal Health Laboratory - LASGRAN. Avenida Mato Grosso, nº 3289 -*
7 *Bloco 2S - Umuarama Campus - Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. CEP 38405-*
8 *314.*

9 ² *Professor at Pitágoras University of Uberlândia and UNIPAC Uberlândia,*
10 *Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.*

11 ³ *Professor at Pitágoras University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais,*
12 *Brazil.*

13 ⁴ *Professor at Faculty of Veterinary Medicine (FAMEV), Federal University of*
14 *Uberlândia, Km 78 BR 050 highway, Campus Glória, Uberlândia, Minas Gerais*
15 *38410-337, Brazil.*

16 ⁵ *Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University*
17 *of Uberlândia (ICBIM-UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.*

18 ⁵ *Department of Animal Reproduction, Laboratory of Teaching and Research in*
19 *Pathology of Reproduction, Center of Biotechnology in Animal Reproduction,*
20 *School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo*
21 *(USP), Pirassununga, SP, Brazil.*

22 * Corresponding author:

23 E-mail address: jpsaut@ufu.br (J.P.E. Saut)

24

25 **Abstract**

26 The aim of this study was to evaluate the gene expression of proinflammatory
27 mediators in the endometrium at 14 and 35 days in milk (DIM) of crossbreed dairy
28 cows without and with subclinical endometritis (SE). For that, a total of 12 animals
29 were divided into two groups according to the SE diagnosis at 35 DIM as follows:
30 Group 1- cows without SE (n=5) and Group 2- cows with SE (n=7). The physical
31 and reproductive systems were evaluated at 7, 14, 28 and 35 DIM. At 14 and 35
32 DIM, endometrial samples were collected for uterine biopsy. The samples were
33 analyzed by qRT-PCR to evaluate the gene expression of *IL1 β* , *IL6*, *IL8* and

34 *CCL5* proinflammatory cytokines. In addition, endometrial swabs were collected
35 by cytobrush technique for cytology and SE diagnosis. The *IL1 β* gene expression
36 from the group without SE was higher when compared to those cows with SE at
37 14 DIM ($P= 0.0009$). The gene expression of *IL8* was different at 14 DIM between
38 groups ($P< 0.001$), still, it was more expressed at 14 DIM when compared to 35
39 DIM ($P= 0.0011$). No differences for *IL6* and *CCL5* gene expression were
40 observed between groups. In conclusion, crossbreed dairy cows without SE have
41 a more efficient immune response at 14 DIM, with greater expression of cytokines
42 *IL1 β* and *IL8* when compared to cows with SE. Also, the gene expression of these
43 cytokines can be considered as a potential tool for the early diagnosis of SE.

44 **Keywords:** Cattle; Chemokines; Cytokines; Uterine diseases; Innate immunity;
45 Interleukins;

46

47 **Introduction**

48 In dairy cows, a satisfactory reproductive performance is essential for
49 increasing the productivity and profitability. However, many factors can decrease
50 cows reproductive performance (Dubuc et al., 2010; Galvão, 2012; Leblanc et al.,
51 2002; Sheldon; Cronin; Bromfield, 2019).

52 Subclinical endometritis (SE) is considered one of the diseases that most
53 affect dairy cows decreasing the reproductive performance during the postpartum
54 period. The SE is characterized by endometrium inflammation in the absence of
55 clinical signs, usually after 35 days postpartum (DPP), being diagnosed by
56 endometrial cytology technique (Kasimanickam et al., 2004; Leblanc, 2008;
57 Sheldon; Cronin; Bromfield, 2019). This inflammatory disease negatively alters
58 the uterine environment, affecting embryo implantation and changing the
59 production and concentration of steroid hormones. Also, it delays uterine
60 involution, increases calving conception interval, the number of services and
61 conception failures (Kasimanickam et al., 2004; Gilbert et al., 2005; Leblanc,
62 2008; Madoz et al., 2014; Wagener; Gabler; Drillich, 2017).

63 Beyond clinical signals as loss in body condition score (BCS) and milk
64 production reduction, the SE also affects the innate immune system,
65 compromising animal's response against injuries (Herath et al., 2009; Raliou et
66 al., 2019; Sheldon; Cronin; Bromfield, 2019). The innate immune system
67 encompasses several mechanisms of resistance and elimination of pathogens

68 through non-specific responses, such as the release of inflammatory cytokines
69 and chemokines. These signaling molecules are responsible for the activation
70 and migration of defense cells, which phagocytes and eliminates pathogens
71 (Kumar et al., 2009; Takeuchi and Akira, 2010).

72 In cows diagnosed with SE, the expression of inflammatory cytokines in
73 the endometrium and blood is altered, contributing to the formation of an
74 aggressive environment to the embryo and, consequently, reducing reproductive
75 performance (Herath et al., 2009; Fischer et al., 2010; Gabler et al., 2010;
76 Kasimanickam et al., 2013; Kasimanickam; Kasimanickam; Kastelic, 2014;
77 Raliou et al., 2019).

78 According to Galvão et al. (2011), during the postpartum period, changes
79 in expression and circulating levels of inflammatory cytokines can compromise
80 the response to pathogens and lead to the occurrence of endometritis. Still, a few
81 weeks during postpartum, a high expression and persistence of cytokines in the
82 endometrium is directed associated with SE (Fischer et al., 2010; Gabler et al.,
83 2010; Galvão et al., 2011).

84 Considering that reproductive performance and fertility are reduced in
85 animals diagnosed with SE, in addition to an increase in costs, a better
86 knowledge of the mechanisms involving the innate immune response is required.

87 In this experiment we hypothesis that crossbreed dairy cows with SE in
88 the postpartum period have an alteration in inflammatory cytokines gene
89 expression compared to cows without SE. For this, the aim of this study was to
90 evaluate the gene expression of *IL1 β* , *IL6*, *IL8* and *CCL5* at 14 and 35 days in
91 milk (DIM) in the endometrium from crossbreed dairy cows without and with SE
92 diagnosed at 35 DIM.

93

94 **Materials and Methods**

95 **Experimental design, animals and management**

96 The study was conducted at the Dairy Cattle Sector of Gloria Experimental
97 Dairy Farm from Federal University of Uberlândia (Uberlândia, Minas Gerais,
98 Brazil), approved by the Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia
99 (CEUA/UFU, protocol number 007/14)

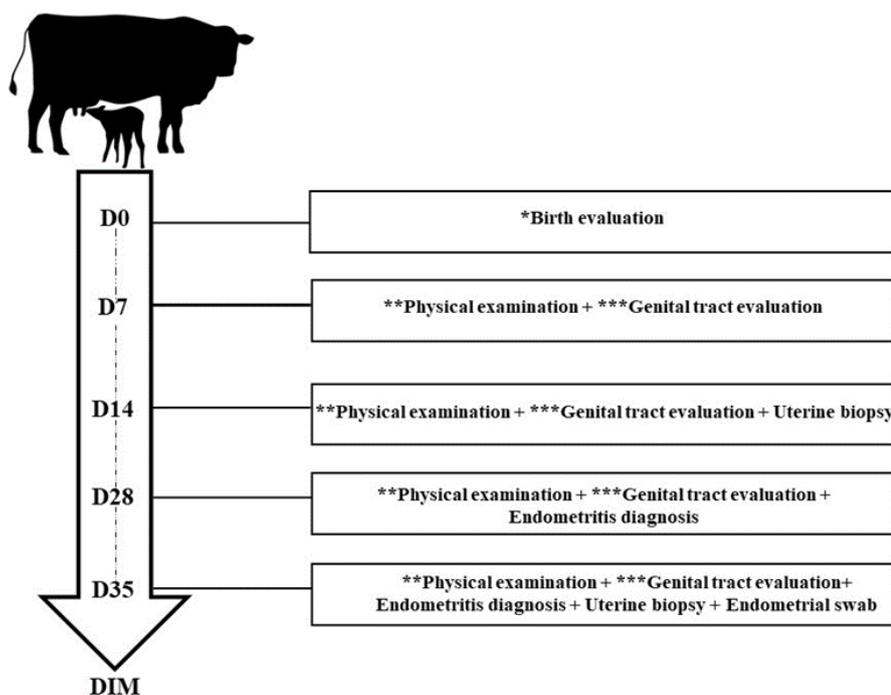
100 Crossbreed dairy cows (n=12), Holstein x *Gir* (1/2 x 7/8) with 21.6
 101 kg/cow/day of milk production, without any clinical disease during postpartum
 102 were used in this experiment. For that, animals were divided into two groups
 103 according to the SE diagnosis at 35 DIM as follows: Group 1- cows without SE
 104 (n=5) and Group 2- cows with SE (n=7).

105 During spring/summer the animals were kept under rotational grazing
 106 system (*Brachiaria decumbens*), while in autumn/winter they were fed with
 107 sorghum silage. In addition, during all seasons, the animals were supplemented
 108 with 1 kg of concentrate (24% of protein) for each 3 kg of milk produced. All cows
 109 had *ad libitum* access to water and mineral salt. The animals were annually
 110 vaccinated against foot-and-mouth disease, rabies, brucellosis, clostridiosis and
 111 leptospirosis, in addition to the periodic examination for tuberculosis, brucellosis
 112 and leptospirosis.

113

114 **Animals monitoring and samples collection**

115 During postpartum, the animals were weekly evaluated at seven, 14, 28
 116 and 35 DIM. Physical examination and evaluation of female reproductive tract
 117 were performed as showed in Figure 1.



118

119 **Figure 1.** Postpartum evaluation of crossbreed dairy cows according to days in milk
 120 (DIM).

121 *Birth evaluation: data related do dystocia, birth assistance, retained placenta and
122 metabolic disorders. **Physical examination: body temperature, heart, respiratory and
123 ruminal rates; BCS. ***Genital tract evaluation: uterine and ovarian evaluation, vaginal
124 discharge evaluation, metritis diagnosis (until D14).

125

126 The physical examination was made according to Radostits (2000), being
127 evaluated: body temperature; heart, respiratory and ruminal rates. Also, the BCS
128 was classified from a scale to 1 from 5 with subunits of 0.25 (Edmonson et al.,
129 1989).

130 The reproductive tract examination consisted of rectal palpation,
131 ultrasound and vaginal discharge evaluation. Rectal palpation was performed to
132 monitor uterine location, involution and consistency. For the ultrasound
133 examination (DP-2200VET®, Mindray, Shenzhen, China) the body and uterine
134 horns diameters were measured, in addition to horns symmetry and the presence
135 of intrauterine fluid. Vaginal discharge evaluation was performed with
136 Metrichack® (Metrichack®, Simcro, New Zealand). The classification of the
137 discharge was in scores according to Sheldon et al. (2006).

138 At 35 DIM endometrial swabs were collected by endometrial cytobrush
139 technique to diagnose SE and evaluate endometrial cytology. At 14 and 35 DIM
140 endometrial samples were collected using sterile scissors for uterine biopsy
141 (Hauptner®, Germany). The endometrial fragments were stored in eppendorf®
142 microtubes frozen in liquid nitrogen (-196°C) and later stored in ultra-freezers at
143 – 80 °C until processing and analysis for qRT-PCR.

144

145 **Sample processing**

146 **Endometrial cytology**

147 The samples were collected by cytobrush technique and were rolled on
148 microscope slides. After that, they were stained using the Rapid Panotic kit
149 (Laborclin®, Pinhais, Brazil), according to the manufacturer's recommendations.
150 Readings were made under an optical microscope at 40X magnification. A total
151 of 100 cells were counted and the percentages of polymorphonuclear (PMN) cells
152 and epithelial cells was recorded. The diagnosis of subclinical endometritis was
153 defined in animals that had more than 10% of neutrophils in each slide at 35 DIM
154 (Kasimanickam et al., 2004).

155

156 RNA extraction and reverse transcription

157 The RNA extraction from endometrial tissue samples was performed on
158 the Maxwell[®] 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA) using the Maxwell[®]
159 16 LEV Simply RNA Tissue Kit (AS1340, Promega, Madison RNA Extraction
160 Kit) WI, USA), according to the manufacturer's instructions.

161 Endometrial fragments were individually transferred to 200 μ L microtubes
162 with homogenization solution, and macerated using Pellet Pestles[®] (Sigma
163 Aldrich). After tissue homogenizing, 200 μ L of lysis buffer were added to each
164 microtube, vortexed, centrifuged and the supernatants were removed and
165 placed in their respective wells inside the cartridges (individual plastic support
166 for each sample, available in the kit). Then, the other reagents were added and
167 the Maxwell removable platform was prepared to be inserted into the Maxwell[®]
168 16 device, where the RNAs were mechanically extracted.

169 After extraction, using the QuantiFluor[®] RNA System Kit (E3310,
170 Promega, Madison, WI, USA), the total RNA was quantified in the Quantus[™]
171 Fluorometer according to the manufacturer's instructions. All microtubes
172 containing the extracted RNAs were stored in an ultra-freezer at - 80°C.

173 For the reverse transcription, the QuantiNova[™] Reverse Transcription Kit
174 (205410, QIAGEN, Hilden, Germany) was used, following the manufacturer's
175 instructions. Initially, for each sample, 15 μ L Mix 1 (2 μ L gDNA removal, 8 μ L of
176 RNase free water and 5 μ L of the sample) was incubated in a thermocycler for
177 2 minutes at 45C and after that, 5 μ L of Mix 2 was added (4 μ L RT Mix and 1
178 μ L RT Enzyme), being properly homogenized and incubated in a thermocycler
179 for 3 minutes at 25C for annealing step; for 10 minutes at 45 °C for reverse
180 transcription step and for another 5 minutes at 85 °C for enzyme reverse
181 transcriptase denaturation and inactivation of the reaction.

182 At the end of the procedure, the cDNA obtained from each sample was
183 quantified in the Quantus[™] Fluorometer using the Quantifluor[™] ssDNA System
184 kit (E3190, Promega, Madison, WI, USA) and stored in a freezer at - 20°C.

185

186 Real-time polymerase chain reaction qRT-PCR

187 The sequences of the target genes used were obtained through the
188 database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and to
189 select the best primer, the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) was
190 used.

191 The genes selected for expression evaluation were *IL1 β* , *IL6*, *IL8* (CXCL8)
192 and *CCL5*, from which the primer sequences were made by EXXTEND (Paulínia,
193 São Paulo, Brazil). The primers used to amplify the genes were shown in Table
194 1. To determine the endogenous gene to be used, two genes were tested,
195 GAPDH and SUZ12. The SUZ12 was selected due to the better result with the
196 samples. The primer efficiency curve was performed with four points and a 1:2
197 dilution factors, with a concentration of 0.2 μ L of primer and 37.5 ng / μ L of the
198 sample.

199

200 **Table 1-** Forward and reverse primers sequence with their respective references

| Gene (<i>Bos taurus</i>) | Primer direction | Primer sequence 5' - 3' | NCBI reference |
|------------------------------|------------------|-------------------------|----------------|
| <i>IL1β</i> | Forward | ACGAGTTTCTGTGTGACGCA | NM_174093.1 |
| | Reverse | TGCAGAACACCACTTCTCGG | |
| <i>IL6</i> | Forward | GGGCTCCCATGATTGTGGTA | NM_173923.2 |
| | Reverse | GTGTGCCCAGTGGACAGGTT | |
| <i>CXCL8</i> | Forward | CACATTCCACACCTTTCCAC | NM_173925 |
| | Reverse | CCTTCTGCACCCACTTTTC | |
| <i>CCL5</i> | Forward | CTTTGCCTATATCTCCCGCC | NM_175827 |
| | Reverse | TCTCGCACCCACTTCTTCTC | |
| <i>SUZ12</i> | Forward | GAAGATGGAGAAGTGGAACA | NM_001205587.3 |
| | Reverse | GACGGAGAGGTAAACAAGTATC | |

201

202 For PCR, the QuantiNova™ SYBR Green PCR Kit (208052, QIAGEN,
203 Hilden, Germany) was used. A 96-well Axygen® PCR-96 AB-C plates (Axygen
204 Scientific, Union City, CA, USA) were used to mix each sample, using 5 μ L of
205 SYBR Green, 1 μ L of QNRox Reference Dye, 0.2 μ L of forward primer, 0.2 μ L of

206 reverse primer, 1.6 μ L of RNase free water and 2 μ L of cDNA from the sample,
207 in a total of 10 μ L of reaction.

208 The quantification of *IL1 β* , *IL6*, *IL8* and *CCL5* genes expression were
209 performed by the Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Applied
210 Biosystems, Foster, CA, USA), using the threshold cycles (Ct) comparative
211 method. The amplifications were made in duplicate with a negative control for
212 each gene and the reaction conditions were determined in a previously
213 standardized cycles: 50 $^{\circ}$ C for 2 min, 95 $^{\circ}$ C for 2 minutes, 40 cycles at 95 $^{\circ}$ C for
214 15 seconds and 60 $^{\circ}$ C for 1 minute.

215

216 **Statistical Analyses**

217 Data and graphics were performed by GraphPad Prism 6 statistical
218 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Cows were considered
219 as an experimental unit. Data were tabulated initially in Excel spreadsheets and
220 descriptive statistics were presented as mean, standard deviation, standard error
221 of the mean and percentage.

222 Gene expression values were separated according to the groups (without
223 and with SE) within the moments in which the samples were collected by uterine
224 biopsy (14 and 35 DIM), so that the two-way ANOVA and Bonferroni's Multiple
225 Comparison post-test could be performed. Clinical examination, female
226 reproductive system evaluation and endometrial cytology variables were
227 assessed by the Mann Whitney test or the T test of unpaired samples. Statistical
228 significance was defined as $P \leq 0.05$

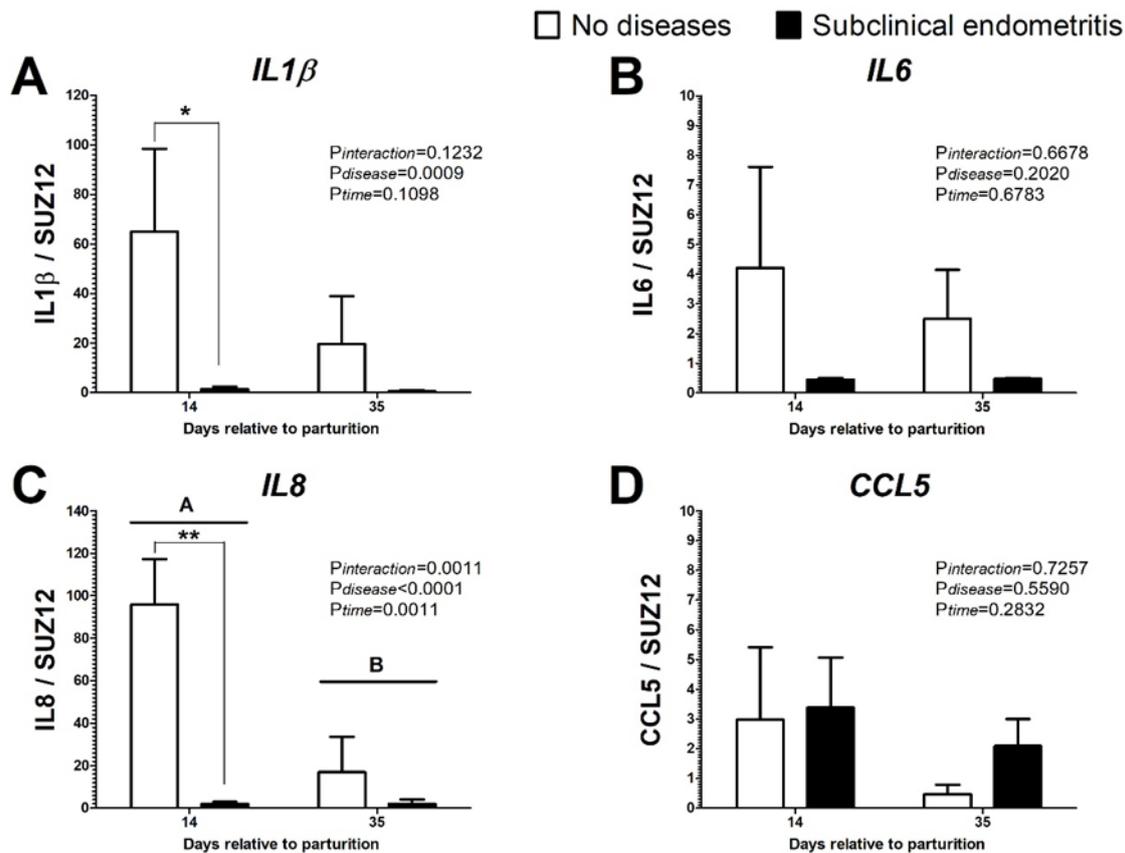
229

230 **Results**

231 For SE evaluation at 35 DIM, the PMN percentage in the cytology was 1.41
232 ($\pm 2.62\%$) and 41.71 ($\pm 22.84\%$; $P = 0.0054$), for group without SE and group with
233 SE respectively.

234 There was no difference in the BCS between groups without SE and with
235 SE at 14 DIM ($P = 0.610$) and 35 DIM ($P = 0.609$). Body temperature also did not
236 differ between groups at 14 DIM ($P = 0.943$) and 35 DIM ($P = 0.942$). Moreover,
237 when uterine and ovarian conditions were explored no differences were observed
238 between groups in none of the moments evaluated.

239 The gene expression of *IL1 β* was higher in group without SE when
 240 compared to group with SE at 14 DIM ($P= 0.0009$). When the gene expression of
 241 *IL8* was evaluated, a significance difference was also observed between groups
 242 ($P< 0.001$), with a greater expression in cows without SE at 14 DIM ($P= 0.0011$).
 243 When *IL6* and *CCL5* gene expression was evaluated, no difference was observed
 244 between groups, neither at the time samples were collected (14 versus 35 DIM)
 245 (Figure 2).



246
 247 **Figure. 2.** Relative expression of gene transcripts *IL1 β* , *IL6*, *IL8* and *CCL5* from
 248 endometrial samples at 14 and 35 DIM, according to the groups: 1) without SE and 2)
 249 with SE. The results were presented as mean and standard error of the mean and
 250 analyzed by the Two-way ANOVA Test with a significance level of $P < 0.05$ (* $P < 0.01$;
 251 ** $P < 0.001$).

252 Discussion

253 In the present study, endometrium gene expression of *IL1 β* , *IL6*, *IL8* and
 254 *CCL5* was evaluated at 14 and 35 DIM from clinical healthy crossbred dairy cows
 255 that did or did not developed SE in the postpartum period. Our main findings were
 256 that crossbred dairy cows without SE had high gene expression of *IL1 β* and *IL8*

257 at 14 DIM when compared to cows with SE, with a decrease in this expression at
258 35 DIM. In addition, crossbreed dairy cows with SE did not show considerable
259 gene expression of *IL1 β* and *IL8* at 14 DIM, with persistent inflammatory cells in
260 the endometrium at 35 DIM, observed by cytobrush evaluation.

261 The incidence of SE in dairy cows varies according to animal breed. In
262 Brazil it is frequently associated in crossbreed cows (Holstein x *Gir*) during the
263 postpartum period, affecting around 26% (Carneiro et al., 2014) and 27,49%
264 (Buso et al., 2018) from the herd. In Holstein cows the occurrence of SE is higher
265 (30 a 53%) (Kasimanickam et al., 2004; Gilbert et al., 2005; Leblanc, 2008), as
266 well as it causes negative effects on reproductive performance. Pure Holstein
267 with SE have reproduction rates negatively affected, as pregnancy rate decrease
268 and calving-conception interval increase (Kasimanickam et al., 2004; Gilbert et
269 al., 2005; Leblanc, 2008; Sheldon; Cronin; Bromfield, 2019), what is not
270 frequently observed in crossbreed dairy cows (Carneiro et al., 2014; Buso et al.,
271 2018).

272 In cows with uterine diseases, the failure to activate the immune response
273 in the first days during postpartum may be due to other pre-existing factors, such
274 as negative energy balance, dry matter intake reduction in the peripartum,
275 endometritis remnants and other diseases (Wathes et al., 2009; Turner et al.,
276 2016; Sheldon; Cronin; Bromfield, 2019). Under these conditions, the immune
277 system is not well regulated, causing an unbalance in proinflammatory cytokines
278 production (Takeuchi and Akira, 2010; Galvão et al., 2011; Blander and Sander,
279 2012). In the present study, the metabolic profile was not evaluated, however,
280 none of the animals had any clinical metabolic disease, such as ketosis and
281 hypocalcemia that could be related to inflammatory endometrium gene
282 expression.

283 When the reproductive system was evaluated (presence or absence of
284 symmetry, presence of intrauterine fluid and vaginal secretion characteristics), no
285 differences were observed between animals without and with SE. It could be
286 stated that clinical evaluations made by observational parameters are not
287 sufficient to give an accurate diagnosis if the animal will develop or not SE. These
288 observations are in accordance with the definitions of SE, that were established
289 by Kasimanickam et al. (2004) and Sheldon et al. (2006), they characterized that
290 a precise diagnosis of SE is checked by the inflammation of the endometrium

291 verified through the proportion of neutrophils in the absence of clinical signs,
292 based on this we aimed to focus on SE diagnosis by checking the proportion of
293 neutrophils from each cow relating these findings to immune mediators
294 endometrium gene expression.

295 In the present study, we evaluated the expression of four different
296 proinflammatory cytokines. The gene expression of *IL1 β* and *IL8* was higher at
297 14 DIM in cows without SE, suggesting an efficient modulation of the innate
298 immune system by healthy animals during the first postpartum days. Similarly,
299 Raliou et al. (2019), showed that healthy Holstein cows had an increase in the
300 expression of proinflammatory cytokines, including *IL8*, in the first week
301 postpartum, decreasing its expression at 45 and 55 DIM. In the early postpartum,
302 a local immune activation is observed in response to eliminate those bacteria
303 originated from calving and to complete endometrium reestablishment (LeBlanc,
304 2008; Sheldon et al., 2006).

305 In the animals with SE, an increase in the expression of *IL1 β* and *IL8* at 14
306 DIM was not observed. The low expression of proinflammatory genes at 14 DIM
307 in crossbreed cows with SE suggests that there was a failure in the activation of
308 the immune response in the first weeks postpartum (Gabler et al., 2010; Galvão
309 et al., 2011). In this study, this response was later activated, as observed by
310 endometrial cytology, where the persistence of inflammatory cells at 35 DIM was
311 noticed even in the absence of proinflammatory cytokines gene expression.

312 In this study, at 35 DIM the expression of *IL1 β* and *IL8* decreased in cows
313 without SE. This result indicates that crossbreed dairy cows without uterine
314 diseases are able to establish an immune response with timely and effective
315 action, being disabled after bacterial elimination. Thus, cows without SE have a
316 greater expression of proinflammatory cytokines at 14 DIM reducing at 35 DIM.

317 Fischer et al. (2010) evaluated the gene expression of *IL6*, *IL8* and *CCL5*
318 of Holstein cows between 21 and 27 DIM. No difference in *IL6* expression levels
319 between healthy animals and in those with uterine diseases was reported by
320 them. Equally, in this study, no differences in *IL6* gene expression between
321 without and with SE groups were observed. On the other hand, Galvão et al.
322 (2011), observed a greater expression of *IL6* in the first and seventh week
323 postpartum in Holstein cows with SE. The *IL6* is a proinflammatory cytokine that
324 corresponds to one of the earliest and most fundamental mechanisms

325 responsible for the release of acute phase proteins, maturation and activation of
326 neutrophils (Hunter and Jones, 2015; Turner et al., 2014). However, little is known
327 about the *IL6* profile during postpartum period, both in healthy cows and in cows
328 with uterine diseases.

329 In this study, no difference in *CCL5* gene expression between cows
330 without and with SE was observed. In contrast, Fischer et al. (2010) and Gabler
331 et al. (2010) observed a higher level of *CLL5* gene expression in Holstein cows
332 with SE between 17 and 27 DIM. We suggest that the divergence in the behavior
333 of this cytokine may be related to the genetic component of the animals evaluated
334 in the present study, since pure Holstein cows are more challenged and suffer
335 more intense changes in the environment than crossbreed cows. Thus, the
336 activation of a more robust immune response, such as greater expression of
337 proinflammatory cytokines and the quantity of inflammatory mediators involved
338 may be necessary for complete bacterial elimination and injury resolution.

339 The evidence in the literature (Fischer et al., 2010; Gabler et al., 2010;
340 Raliou et al., 2019), that proinflammatory cytokines gene analyses such as *IL1 β* ,
341 *IL8* and *CCL5* during the first weeks postpartum, can be used for SE early
342 diagnosis are reaffirmed by the present study.

343 In conclusion, crossbreed dairy cows without subclinical endometritis have
344 a more efficient innate immune response at 14 DIM, evidenced by the greater
345 expression of proinflammatory cytokines *IL1 β* and *IL8*, when compared to cows
346 with subclinical endometritis.

347

348 **Author's contribution statement**

349 AR: Investigation, Methodology, Writing – original draft. PA: Investigation,
350 Methodology. OR: Investigation, Methodology. NF: Investigation, Methodology.
351 RS: Investigation, Methodology, Writing – review and editing. MS: Investigation,
352 Methodology. LC: Writing – review and editing. JPS: Conceptualization, Funding
353 acquisition, Project administration, Writing – review and editing. All authors read
354 and approved the manuscript.

355

356 **Acknowledgments**

357 The authors would like to thank the Research Support Foundation of the
358 State of Minas Gerais - Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
359 (FAPEMIG - APQ-03740-16); the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
360 de Nível Superior (CAPES), for the financial support for the execution of the
361 project and for the scholarships, and to the Conselho Nacional de
362 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the productivity
363 scholarship (JPE Saut).

364

365 **Conflict of interest**

366 The authors declare no conflict of interest.

367

368 **Ethics Approval**

369 The study was conducted at the Dairy Cattle Sector of Gloria Experimental
370 Farm from Federal University of Uberlândia (Uberlândia, Minas Gerais, Brazil),
371 approved by the Ethics Committee of the Federal University of Uberlândia
372 (CEUA/UFU, protocol number 007/14).

373

374 **Data availability statement**

375 The data that support the findings of this study are available from the
376 corresponding author, [JPS], upon reasonable request.

377

378 **References**

- 379 Blander, J.M. and Sander, L.E., 2012. Beyond pattern recognition: Five immune
380 checkpoints for scaling the microbial threat
- 381 Buso, R.R., Campos, C.C., Santos, T.R., Saut, J.P.E. and Santos, R.M., 2018.
382 Retained placenta and subclinical endometritis: Prevalence and relation
383 with reproductive performance of crossbred dairy cows Pesquisa
384 Veterinaria Brasileira, 38, 1–5 (Colegio Brasileiro de Patologia Animal)
- 385 Carneiro, L.C., Ferreira, A.F., Padua, M., Saut, J.P., Ferraudo, A.S. and dos
386 Santos, R.M., 2014. Incidence of subclinical endometritis and its effects on
387 reproductive performance of crossbred dairy cows Tropical Animal Health
388 and Production, 46, 1435–1439
- 389 Davies, D., Meade, K.G., Herath, S., David, P.D., Gonzalez, D., White, J.O.,

- 390 Steven, R.S., O'Farrelly, C. and Martin, I.M., 2008. Toll-like receptor and
391 antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium *Reproductive*
392 *Biology and Endocrinology*, 6
- 393 Dubuc, J., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Walton, J.S. and LeBlanc, S.J., 2010.
394 Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows *Journal of Dairy*
395 *Science*, 93, 5764–5771
- 396 Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T. and Webster, G., 1989. A
397 Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows *Journal of Dairy*
398 *Science*, 72, 68–78
- 399 Fischer, C., Drillich, M., Odau, S., Heuwieser, W., Einspanier, R. and Gabler,
400 C., 2010. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine
401 endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and
402 elevated in case of subclinical or clinical endometritis *Reproduction, Fertility*
403 *and Development*, 22, 818
- 404 Gabler, C., Fischer, C., Drillich, M., Einspanier, R. and Heuwieser, W., 2010.
405 Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in
406 the endometrium of primiparous cows postpartum *Reproductive Biology*
407 *and Endocrinology*, 8 (Reprod Biol Endocrinol)
- 408 Galvão, K.N., 2012. Postpartum uterine diseases in dairy cows *Animal*
409 *Reproduction*, 9, 290–296
- 410 Galvão, K.N., Santos, N.R., Galvão, J.S. and Gilbert, R.O., 2011. Association
411 between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum
412 Holstein cows *Theriogenology*, 76, 290–299
- 413 Gilbert, R.O., Shin, S.T., Guard, C.L., Erb, H.N. and Frajblat, M., 2005.
414 Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of
415 dairy cows *Theriogenology*, 64, 1879–1888
- 416 Herath, S., Lilly, S.T., Santos, N.R., Gilbert, R.O., Goetze, L., Bryant, C.E.,
417 White, J.O., Cronin, J. and Sheldon, I.M., 2009. Expression of genes
418 associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate
419 postpartum uterine disease and fertility *Reproductive Biology and*
420 *Endocrinology*, 7, 55
- 421 Hunter, C.A. and Jones, S.A., 2015. IL-6 as a keystone cytokine in health and
422 disease (Nature Publishing Group)
- 423 Kasimanickam, R., Duffield, T., Foster, R., Gartley, C., Leslie, K., Walton, J.,

- 424 and Johnson, W., 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the
425 detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows
426 *Theriogenology*, 62, 9–23
- 427 Kasimanickam, R., Kasimanickam, V. and Kastelic, J.P., 2014. Mucin 1 and
428 cytokines mRNA in endometrium of dairy cows with postpartum uterine
429 disease or repeat breeding *Theriogenology*, 81, 952-958.e2 (Elsevier Inc.)
- 430 Kasimanickam, R.K., Kasimanickam, V.R., Olsen, J.R., Jeffress, E.J., Moore,
431 D.A. and Kastelic, J.P., 2013. Associations among serum pro- and anti-
432 inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine
433 disease in postpartum dairy cows *Reproductive Biology and Endocrinology*,
434 11, 1–13 (BioMed Central)
- 435 Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S., 2009. Toll-like receptors and innate
436 immunity (*Biochem Biophys Res Commun*)
- 437 LeBlanc, S.J., 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive
438 performance: A review *The Veterinary Journal*, 176, 102–114
- 439 LeBlanc, S.J., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Bateman, K.G., Keefe, G.P., Walton,
440 J.S. and Johnson, W.H., 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical
441 endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows
442 *Journal of Dairy Science*, 85, 2223–2236 (American Dairy Science
443 Association)
- 444 Madoz, L. V., Giuliadori, M.J., Migliorisi, A.L., Jaureguiberry, M. and De la Sota,
445 R.L., 2014. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis
446 of subclinical endometritis in grazing dairy cows *Journal of Dairy Science*,
447 97, 195–201 (*J Dairy Sci*)
- 448 Radostits, O., 2000. *Veterinary Clinical Examination and Diagnosis - 1st Edition*,
449 1st Editio O. Radostits and I. Mayhew (eds), (Canada)
- 450 Raliou, M., Dembélé, D., Düvel, A., Bolifraud, P., Aubert, J., Mary-Huard, T.,
451 Rocha, D., Piumi, F., Mockly, S., Heppelmann, M., Dieuzy-Labaye, I.,
452 Zieger, P., G. E. Smith, D., Schuberth, H.-J., Sheldon, I.M. and Sandra, O.,
453 2019. Subclinical endometritis in dairy cattle is associated with distinct
454 mRNA expression patterns in blood and endometrium *PLOS ONE*, 14,
455 e0220244
- 456 Sheldon, I.M., Cronin, J.G. and Bromfield, J.J., 2019. Tolerance and Innate
457 Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the

- 458 Impact of Endometritis in Dairy Cattle Annual Review of Animal
459 Biosciences, 7, 361–384
- 460 Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S. and Gilbert, R.O., 2006. Defining
461 postpartum uterine disease in cattle Theriogenology, 65, 1516–1530
- 462 Takeuchi, O. and Akira, S., 2010. Pattern Recognition Receptors and
463 Inflammation Cell, 140, 805–820
- 464 Turner, M.D., Nedjai, B., Hurst, T. and Pennington, D.J., 2014. Cytokines and
465 chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease
466 (Elsevier)
- 467 Turner, M.L., Cronin, J.G., Noletto, P.G. and Sheldon, I.M., 2016. Glucose
468 Availability and AMP-Activated Protein Kinase Link Energy Metabolism and
469 Innate Immunity in the Bovine Endometrium PLOS ONE, 11, e0151416
470 (Public Library of Science)
- 471 Wagener, K., Gabler, C. and Drillich, M., 2017. A review of the ongoing
472 discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical
473 endometritis in dairy cows (Elsevier Inc.)
- 474 Wathes, D.C., Cheng, Z., Chowdhury, W., Fenwick, M.A., Fitzpatrick, R., Morris,
475 D.G., Patton, J. and Murphy, J.J., 2009. Negative energy balance alters
476 global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum
477 dairy cows Physiological Genomics, 39, 1–13
- 478

CAPÍTULO 3 – Artigo 2

**(Artigo redigido de acordo com as normas do periódico Reproductive
Biology)**

1 **Efeito da Kisspeptina na resposta imune inata endometrial de bovinos**

2 Amanda Lima Rezende^a; Paula Batista de Alvarenga^b; Oglênia Pereira Ramos^a;
3 Antonio Bertolino Cardoso Neto^a; Nádia Simarro Fagundes^c; Ricarda Maria dos
4 Santos^d; Marcelo José Barbosa Silva^e; Gustavo Guerino Macedo^f; João Paulo
5 Elsen Saut^{a,d}

6 ^aLarge Animal Health Laboratory - LASGRAN. Avenida Mato Grosso, nº 3289 -
7 Bloco 2S - Umuarama Campus - Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. CEP 38405-
8 314.

9 ^bProfessor at Pitágoras University of Uberlândia and UNIPAC Uberlândia,
10 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

11 ^cProfessor at Pitágoras University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais,
12 Brazil.

13 ^dProfessor at Faculty of Veterinary Medicine (FAMEV), Federal University of
14 Uberlândia, Km 78 BR 050 highway, Campus Glória, Uberlândia, Minas Gerais
15 38410-337, Brazil.

16 ^eDepartment of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University
17 of Uberlândia (ICBIM-UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

18 ^fProfessor at Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, Federal University
19 of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

20 * Corresponding author:

21 E-mail address: jpsaut@ufu.br (J.P.E. Saut)

22

23 **RESUMO**

24 A kisspeptina, neuropeptídeo conhecido por sua potente ação estimulatória do
25 hormônio liberador de gonadotrofina (GNRH) e regulação do eixo reprodutivo, é
26 capaz de modular a função das células do sistema imune, com possível
27 regulação na interação destes dois sistemas. A hipótese do estudo foi que a
28 kisspeptina possui efeito direto na regulação da resposta imune inata
29 endometrial, na síntese e expressão gênica de mediadores inflamatórios.
30 Objetivou-se avaliar o papel modulatório da kisspeptina na resposta imune inata
31 endometrial de fêmeas bovinas. Para tanto, foram realizados cinco experimentos
32 e utilizado o total de 24 tratos reprodutivos de fêmeas bovinas nulíparas,
33 coletados em abatedouro comercial, para processamento através da técnica de

34 cultivo de endométrio *ex vivo*. Os tratamentos utilizados no cultivo dos explantes
35 endometriais de regiões caruncular e intercaruncular consistiram de kisspeptina
36 (Kp 10^{-5} M; Kp 10^{-6} M; Kp 10^{-7} M), antagonista p234 (p234 10^{-5} M; p234 10^{-7} M;
37 p234 10^{-9} M), progesterona (5ng/mL) e dexametasona (5ng/mL), desafiados ou
38 não com $1\mu\text{g/mL}$ lipopolissacarídeo (LPS), nos tempos de 12 e 24 horas de
39 cultivo. Foram avaliadas a expressão gênica das citocinas IL6, IL1 β e a
40 concentração das citocinas IL6, IL1 β e IL8, pelas técnicas de qRT-PCR e ELISA,
41 respectivamente. Não houve diferença na expressão gênica das citocinas IL1 β
42 e IL6 e na produção de IL6, IL1 β e IL8 em nenhum dos tratamentos realizados
43 com diferentes concentrações de kisspeptina. Concluiu-se que a kisspeptina não
44 apresentou efeito modulatório sobre a resposta imune inata do endométrio
45 bovino quando se utilizou o modelo de cultivo endometrial *ex vivo*.

46 **Palavras-chave:** citocinas; endométrio; interleucina 6; interleucina 1 β ;
47 interleucina 8; neuropeptídeo

48

49 1. INTRODUÇÃO

50 As infecções uterinas apresentam elevada incidência no pós-parto de
51 vacas leiteiras e estão associadas diretamente à queda de produtividade e
52 eficiência reprodutiva dos animais [1–4].

53 A resposta do sistema imune e a reação inflamatória são imprescindíveis
54 para detecção e eliminação de patógenos causadores das doenças uterinas no
55 pós-parto de vacas leiteiras. Porém, essa resposta deve ser pontual e
56 equilibrada, pois uma sinalização inflamatória prolongada e exacerbada promove
57 efeitos indesejáveis, como a ocorrência de condições inflamatórias crônicas
58 [3,5]. A endometrite crônica e endometrite subclínica, frequentemente
59 observadas no pós-parto de vacas leiteiras, podem ser decorrentes deste
60 desequilíbrio na sinalização [6–8].

61 Em condições fisiológicas, existem mecanismos reguladores que
62 dimensionam a proporção da resposta inflamatória, com o objetivo de responder
63 à invasão bacteriana na sua fase inicial e conter a mesma quando os patógenos
64 são eliminados [9–11]. No entanto, especialmente em situações de desordens
65 pré-existentes, como em vacas leiteiras em acentuado balanço energético

66 negativo (BEN) e com histórico de endometrite, observa-se uma ativação
67 desregulada da resposta inflamatória, com níveis alterados das quimiocinas e
68 citocinas pró-inflamatórias, como a IL1, IL6, IL8 e CCL5 [3,6,12].

69 Na busca por mecanismos alternativos que visem a regulação da
70 inflamação, estudos recentes tem investigado o papel de imunomoduladores,
71 como a interleucina 8 bovina recombinante (rbIL-8) [13,14], o fator estimulador
72 das colônias de granulócitos bovinos (pegbovigastim) [15–17] e os ácidos graxos
73 poli-insaturados como o ômega 3 [18,19], na restauração da função imune e
74 recuperação da função dos neutrófilos no pós-parto [13,14,16,17].

75 Em consonância com este cenário, recentemente tem sido investigado o
76 papel da kisspeptina na resposta imune e imunotolerância [20–22]. De acordo
77 com estes autores, a kisspeptina atua estimulando a produção de interleucinas
78 anti-inflamatórias e promovendo a inibição de quimiocinas que potencializam o
79 recrutamento dos neutrófilos [20–22].

80 A kisspeptina é um neuropeptídeo conhecido por sua potente ação
81 estimulatória do hormônio liberador de gonadotrofina (GNRH), promovendo
82 liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e, especialmente, do hormônio
83 luteinizante (LH), sendo responsável por regular centralmente a função ovariana
84 e o ciclo estral [23–25]. De acordo com outros autores [22], além de atuar na
85 regulação dos sistemas reprodutivo e imunológico isoladamente, estudos
86 indicam que a kisspeptina também atue na regulação da interação destes
87 sistemas [21,22].

88 Sabendo que as células epiteliais e estromais do endométrio bovino são
89 capazes de reconhecer e desencadear uma resposta imune contra agentes
90 infecciosos como bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e gram-positivas
91 *Trueperella pyogenes* [12,26–29]. Além disso, que esta resposta imune é
92 regulada pelos hormônios ovarianos estradiol e progesterona [27,30,31] e que a
93 Kisspeptina participa da regulação da atividade funcional das células do sistema
94 imune, com modulação da função dos linfócitos T, células T regulatórias,
95 neutrófilos e células natural killer (NK), durante a gestação em mulheres e
96 roedores [22], a hipótese deste estudo foi de que a kisspeptina modularia a
97 resposta imune inata do endométrio bovino frente ao desafio com
98 lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli*. O objetivo deste estudo foi avaliar o papel

99 modulatório da kisspeptina na resposta imune inata endometrial de fêmeas
100 bovinas utilizando como modelo experimental o cultivo de explantes de
101 endométrio bovino *ex vivo*.

102

103 **2. METODOLOGIA**

104 *2.1 Animais e local de execução*

105 O estudo foi conduzido no Laboratório de Saúde em Grandes Animais
106 (LASGRAN) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de
107 Uberlândia (FAMEV/UFU). Foram utilizados 24 tratos reprodutivos (útero e
108 ovários) de novilhas $\frac{1}{2}$ sangue Aberdeen Angus x Nelore, coletados em
109 abatedouro comercial no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

110 *2.3 Delineamento experimental*

111 Neste estudo foram conduzidos cinco experimentos (figura 1), sendo eles:

112 - Experimento 1, objetivou-se avaliar o efeito do tempo-resposta (12 e 24 horas)
113 e dose-resposta (10^{-5} M, 10^{-6} M e 10^{-7} M) da exposição de Kisspeptina, na
114 expressão gênica de *IL1 β* e *IL6* em cultivos *ex vivo* das duas regiões do
115 endométrio, regiões intercaruncular (n = 6) e caruncular (n = 6);

116 - Experimento 2, objetivou-se avaliar o efeito da pré-exposição (0 – 24 h) com
117 Kisspeptina (Kp 10^{-5} M; Kp 10^{-6} M; Kp 10^{-7} M) no cultivo *ex vivo* da região
118 intercaruncular (n = 6) do endométrio frente ao desafio com 1 μ g/mL LPS (24 -
119 48 h), em um estudo do tipo dose-resposta determinado por meio da dosagem
120 da concentração das citocinas IL6, IL1 β e IL8 no sobrenadante do meio de
121 cultivo.

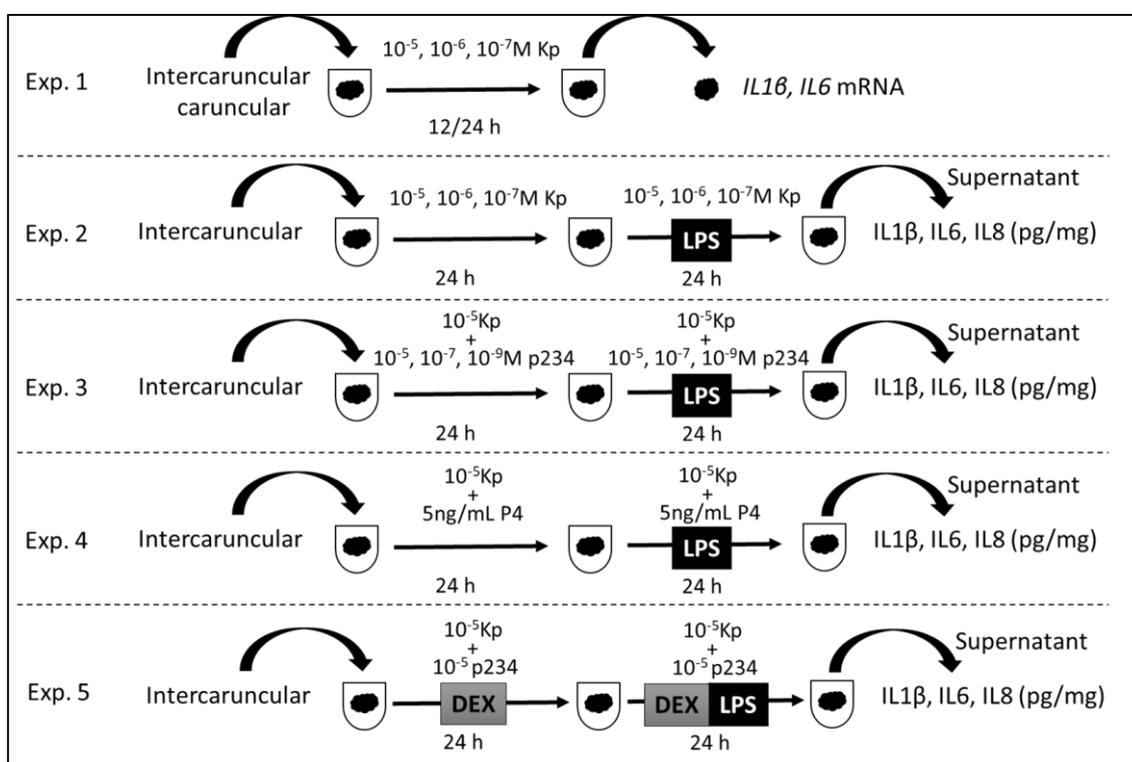
122 - Experimento 3, objetivou-se avaliar o efeito da pré-exposição (0 – 24 h) da
123 kisspeptina (10^{-5} M) associada ou não ao seu antagonista p234 (10^{-5} M; 10^{-7} M;
124 10^{-9} M) no cultivo *ex vivo* da região intercaruncular (n = 6) do endométrio frente
125 ao desafio com 1 μ g/mL LPS (24 – 48 h), em um estudo do tipo dose-resposta
126 determinado por meio da dosagem da concentração das citocinas IL6, IL1 β e IL8
127 no sobrenadante do meio de cultivo;

128 - Experimento 4, objetivou-se avaliar o efeito da adição do hormônio
129 progesterona (P4) associado a Kisspeptina (10^{-5} M) na pré-exposição (0 – 24 h)

130 de cultivos endometriais *ex vivo* da região intercaruncular (n = 6) e sua resposta
 131 frente ao desafio com LPS (24 – 48 h), na concentração das citocinas IL6, IL1 β
 132 e IL8 no sobrenadante do meio de cultivo;

133 - Experimento 5, objetivou-se comparar a resposta da pré-exposição (0 – 24 h)
 134 de Kisspeptina (10^{-5} M) associado ou não ao seu antagonista p234 (10^{-5} M), com
 135 o hormônio dexametasona no cultivo *ex vivo* da região intercaruncular (n = 6)
 136 frente ao desafio com LPS (24 – 48 h), determinado por meio da dosagem da
 137 concentração das citocinas IL6, IL1 β e IL8 no sobrenadante do meio de cultivo.

138



139

140 **Figura 1.** Delineamento experimental.

141 2.4 Coleta e processamento das amostras

142 Os tratos reprodutivos de novilhas não gestantes foram coletados no
 143 abatedouro e imediatamente acondicionados em caixas térmicas refrigeradas e
 144 conduzidos ao Laboratório para análise e processamento do material em um
 145 período máximo de duas horas. Os úteros foram avaliados e selecionados para
 146 coleta de fragmentos de endométrio denominados “explantes”, das regiões
 147 caruncular e intercaruncular, para cultivo *in vitro*.

148 Após a seleção dos úteros, iniciou-se o processamento individual de cada
149 peça. A superfície externa do útero foi lavada com álcool 70 % e com o auxílio
150 de uma tesoura estéril foi realizada uma incisão longitudinal no corno uterino
151 *ipsilateral* ao ovário com corpo lúteo, ou o que apresentava folículo de maior
152 diâmetro. Com a exposição do endométrio, este foi lavado com solução de
153 Dulbecco's phosphate-buffered (D-PBS; Sigma-Aldrich®, Dorset, UK)
154 suplementado com 50 UI/mL de penicilina, 50 µg/mL estreptomicina (Sigma-
155 Aldrich®) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich). Utilizando um *punch*
156 estéril de 8 mm próprio para biópsia (KRUUSE®, Langeskov, Denmark), foram
157 retirados os explantes de regiões carunculares (experimento 1) e de regiões
158 intercarunculares (experimento 1, 2 e 3), sendo estes inseridos em 25 ml de
159 solução de Hank's Balanced Salt (HBSS; Sigma-Aldrich®) suplementada com 50
160 UI/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B
161 (Penicilin 10,000 IU/mL, Streptomycin 10,000 µg/mL and Anphotericin B 25
162 µg/mL – 100x Antibiotic-Antimycotic, Gibco®, New York, United States). Para o
163 experimento 1, além dos explantes retirados para o cultivo, foi retirado um
164 explante a mais de cada região (caruncular e intercaruncular), os quais foram
165 acondicionados em microtubos contendo 0,5 mL de RNAlater® (Sigma-
166 Aldrich®), para posterior análise da expressão gênica.

167 Na sequência, os explantes destinados ao cultivo foram imersos na
168 mesma solução de Hank's suplementada, por mais duas vezes, já no interior da
169 cabine de segurança biológica, para então serem transferidos para placas de
170 cultura celular de 24 poços (Free from DNase, RNase and pyrogens, K12-24,
171 Kasvi®, Curitiba, Brazil).

172 Para o experimento 1, foram utilizados o total de seis tratamentos reprodutivos,
173 dos quais foram obtidos quatro explantes de cada região do endométrio
174 (caruncular e intercaruncular) de cada tratamento. Cada poço da placa de cultivo
175 recebeu 1 mL de seu respectivo tratamento, desta forma, cada explante foi
176 submetido a um tratamento distinto. Os tratamentos foram os seguintes: três
177 concentrações distintas de kisspeptina (GenScript Biotech®, NJ, US), sendo 1)
178 Kp 10⁻⁵ M; 2) Kp 10⁻⁶ M e, 3) Kp 10⁻⁷ M, além de um controle (veículo). Estes
179 tratamentos se repetiram para cada região do endométrio (caruncular e
180 intercaruncular) de cada útero, como também para o tempo de cultivo de 12 h ou

181 24 h. As placas de cultura foram levadas para estufa de CO₂ (PHCbi®,
182 Singapura) à temperatura de 37 °C, onde permaneceram por 12 ou 24 horas.

183 Para o experimento 2 foram utilizados o total de seis tratos reprodutivos,
184 dos quais foram obtidos oito explantes de região intercaruncular do endométrio
185 de cada trato. Os explantes foram tratados nas primeiras 24 h com diferentes
186 concentrações de Kissseptina (estudo dose-resposta): kissseptina 1 (Kp 10⁻⁵ M),
187 kissseptina 2 (Kp 10⁻⁶ M), kissseptina 3 (Kp 10⁻⁷ M) e controle (veículo). As
188 placas de cultura foram levadas para estufa de CO₂ (PHCbi®, Singapura) à
189 temperatura de 37 °C, onde permaneceram por 24 horas.

190 No experimento 3, foram utilizados o total de seis tratos reprodutivos, dos
191 quais foram obtidos oito explantes de região intercaruncular do endométrio de
192 cada trato. Os explantes foram tratados nas primeiras 24 h com diferentes
193 concentrações do antagonista p234 (estudo dose-resposta): antagonista 1 (10⁻⁵
194 M), antagonista 2 (10⁻⁷ M), antagonista 3 (10⁻⁹ M), e controle (veículo), sendo em
195 cada um destes tratamentos adicionados, após 2 horas de cultivo em estufa de
196 CO₂, kissseptina (Kp 10⁻⁵ M). Com o término do procedimento, as placas foram
197 levadas para estufa de CO₂ à temperatura de 37 °C, onde permaneceram por 24
198 horas.

199 Decorridas 24 horas de cultivo (0 – 24 h), nos experimentos 2 e 3, as
200 placas foram retiradas da estufa de CO₂ e levadas para cabine de segurança,
201 onde o sobrenadante de cada poço foi retirado e descartado. Em seguida, foram
202 refeitos os mesmos tratamentos e adicionado em metade deles 1 µg/mL de LPS
203 derivado de *E. coli* 0111:B4 (L2880, Sigma Aldrich®). Após serem preenchidas
204 com os novos meios, as placas foram levadas para estufa de CO₂ à temperatura
205 de 37 °C, onde permaneceram por mais 24 horas (24 – 48 h).

206 Para o experimento 4 foram utilizados o total de seis tratos reprodutivos,
207 dos quais foram obtidos seis explantes de região intercaruncular do endométrio
208 de cada trato. No primeiro dia de cultivo (0 – 24 h) foram estabelecidos os
209 seguintes tratamentos: Kissseptina (Kp 10⁻⁵ M), Kp 10⁻⁵ M + 5ng/mL P4 e
210 controle (veículo). Decorridas 24 horas de cultivo, as placas foram retiradas da
211 estufa de CO₂ e levadas para cabine de segurança, onde o sobrenadante de
212 cada poço foi retirado e descartado. Em seguida, cada poço recebeu um novo

213 tratamento e metade dos poços foi desafiado com 1 µg/mL LPS. Após serem
214 preenchidas com os novos meios, as placas foram levadas para estufa de CO₂
215 à temperatura de 37 °C, onde permaneceram por mais 24 horas (24 – 48 h).

216 Para o experimento 5 foram utilizados o total de seis tratamentos reprodutivos,
217 dos quais foram obtidos oito explantes de região intercaruncular do endométrio
218 de cada trato. No primeiro dia de cultivo (0 – 24 h) foram realizados os seguintes
219 tratamentos: Kisspeptina (Kp 10⁻⁵ M), antagonista p234 (5 x 10⁻⁵ M) e
220 dexametasona (5ng/mL), antagonista p234 (5 x 10⁻⁵ M) e kisspeptina (10⁻⁵ M),
221 e controle (veículo). No tratamento simultâneo do antagonista p234 (5 x 10⁻⁵ M)
222 e kisspeptina (10⁻⁵ M), primeiramente foi colocado o antagonista p234 e após
223 30 minutos acrescentada a kisspeptina. Decorridas 24 horas de cultivo, as
224 placas foram retiradas da estufa de CO₂ e levadas para cabine de segurança,
225 onde o sobrenadante de cada poço foi retirado e descartado. Em seguida, cada
226 poço recebeu um novo tratamento e metade dos poços foi desafiado com 1
227 µg/mL LPS. Após serem preenchidas com os novos meios, as placas foram
228 levadas para estufa de CO₂ à temperatura de 37 °C, onde permaneceram por
229 mais 24 horas (24 – 48 h).

230 De acordo com cada experimento, após 12 horas (Exp. 1), 24 horas
231 (Exp. 1) e 48 horas (Exp. 2 - 5), as placas foram retiradas da estufa de CO₂ e
232 levadas para cabine de segurança, onde o sobrenadante de cada poço foi
233 retirado e congelado, para posterior análise das citocinas IL6, IL1β e IL8 através
234 da técnica de ELISA. Todos os explantes foram pesados e os explantes
235 pertencentes ao experimento 1 foram armazenados em microtubos contendo 0,5
236 mL de RNA later (Invitrogen – Thermo Scientific®, Rockford, US) para avaliação
237 da expressão gênica de IL1β e IL6.

238 *2.5 Técnica de qRT-PCR*

239 A extração do RNA das amostras de tecido endometrial do experimento
240 1 foi realizada no aparelho Maxwell® 16 Instrument (Promega®, Madison, WI,
241 USA), utilizando o Kit de extração de RNA de tecido Maxwell® 16 LEV Simply
242 RNA Tissue Kit (Referência: AS1340, Promega®, Madison, WI, USA),
243 conforme as instruções do fabricante.

244 Os explantes armazenados em RNA later foram transferidos
245 individualmente para microtubos contendo 200 µL de solução de

246 homogêinização, onde foram macerados com auxílio do Pellet Pestles® (Sigma
247 Aldrich®). Após a homogêinização do tecido na solução, foram adicionados 200
248 µL de tampão de lise em cada microtubo, os quais foram agitados em vórtex e
249 centrifugados e os sobrenadantes retirados e colocados nos seus respectivos
250 poços dentro das *cartridges* (suporte plástico individual para cada amostra,
251 disponível no kit). Em seguida, foram adicionados os demais reagentes e
252 preparada a plataforma removível do Maxwell para ser inserida no interior do
253 aparelho Maxwell® 16, onde foi realizada a extração mecânica dos RNAs.

254 Após a extração, utilizando o Kit QuantiFluor® RNA System (Referência:
255 E3310, Promega®, Madison, WI, USA), o RNA total foi quantificado no aparelho
256 Quantus™ Fluorometer segundo as instruções do fabricante. Todos os
257 microtubos contendo os RNAs extraídos foram armazenados em ultra freezer
258 a -80 °C.

259 Para a transcrição reversa, foi utilizado o Kit QuantiNova™ Reverse
260 Transcription Kit (Referência: 205410, QIAGEN, Hilden, Alemanha) seguindo
261 as recomendações do fabricante. Inicialmente, para cada amostra, 15 µL Mix 1
262 (2 µL gDNA removal, 8 µL de água RNase free e 5 µL da amostra) foi incubado
263 em termociclador por dois minutos a 45 °C e após isso, adicionados 5 µL do
264 Mix 2 (4 µL RT Mix e 1 µL RT Enzyme), sendo devidamente homogêinizados e
265 incubados em termociclador por três minutos a 25 °C para etapa de
266 anelamento, por 10 minutos a 45 °C para etapa da transcrição reversa e por
267 mais cinco minutos a 85 °C para desnaturação da enzima transcriptase reversa
268 e inativação da reação. Ao final do procedimento, o cDNA obtido de cada
269 amostra foi quantificado no aparelho Quantus™ Fluorometer utilizando o kit
270 Quantifluor™ ssDNA System (Referência: E3190, Promega®, Madison, WI,
271 USA) e armazenado em freezer a -20 °C.

272 As sequências dos genes alvos utilizados foram obtidas através do
273 banco de dados da National Center for Biotechnology Information – (NCBI) e
274 para seleção do melhor primer, utilizou-se o programa Basic Local Alignment
275 Search Tool (BLAST). Os primers utilizados para amplificação dos genes IL1β
276 e IL6 estão na tabela 1. Para a determinação do gene endógeno a ser utilizado,
277 foram testados dois genes, o GAPDH e o SUZ12, sendo o GAPDH escolhido
278 devido ao melhor resultado com as amostras em questão. A curva de eficiência

279 dos primers foi realizada com quatro pontos e fator de diluição 1:2, sendo
280 estabelecida a concentração de 0,2 µL de primer e de 37,5 ng/µL da amostra.

281

282 **Tabela 1.** Sequência dos primers *forward* e *reverse* com suas respectivas referências.

| Gene (<i>Bos taurus</i>) | Direção do primer | Sequência do primer 5' - 3' | Referência NCBI |
|----------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------|
| IL1β | <i>Forward</i> | ACGAGTTTCTGTGTGACGCA | NM_174093.1 |
| | <i>Reverse</i> | TGCAGAACACCACTTCTCGG | |
| IL6 | <i>Forward</i> | GGGCTCCCATGATTGTGGTA | NM_173923.2 |
| | <i>Reverse</i> | GTGTGCCCAGTGGACAGGTT | |
| GAPDH | <i>Forward</i> | GGTCACCAGGGCTGCTTTTA | NM_001034034.2 |
| | <i>Reverse</i> | TTCCCGTTCTCTGCCTTGAC | |

283

284 Para reação em cadeia da polimerase, utilizou-se o Kit QuantiNova™
285 SYBR Green PCR (Referência: 208052, QIAGEN, Hilden, Alemanha). Foram
286 utilizadas placas de 96 poços Axygen® PCR-96 AB-C (Axygen Scientific, Union
287 City, CA, USA) e para confecção do Mix de cada amostra, foram utilizados: 5 µL
288 de SYBR Green, 1 µL de QNRox Reference Dye, 0,2 µL de primer *forward*, 0,2
289 µL de primer *reverse*, 1,6 µL de água livre de RNase e 2 µL de cDNA da amostra,
290 totalizando 10µL de reação.

291 A quantificação da expressão relativa dos genes IL1β e IL6 foram
292 realizadas pelo aparelho Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System
293 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA), através do método comparativo de
294 *threshold cycles* (Ct). As amplificações foram conduzidas em duplicata com um
295 controle negativo para cada gene e as condições da reação foram determinadas
296 em ciclos previamente padronizados: 50 °C por dois minutos, 95 °C por 2
297 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto, totalizando
298 aproximadamente duas horas.

299 2.6 Técnica de Elisa

300 O método de ELISA foi utilizado para determinação das citocinas
301 presentes no sobrenadante. As concentrações de IL6, IL1β e IL8 foram
302 mensuradas de acordo com as instruções do fabricante incluídas nos kits de

303 ELISA específicos para cada citocina (Thermo Scientific® Bovine IL6 Reagent
304 Kit; Rockford, US; Thermo Scientific® Bovine IL1 β Reagent Kit; Rockford, USA;
305 Human IL-8/CXCL8 ELISA Kit, DuoSet, R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA).

306 A leitura da densidade óptica foi realizada nas absorvâncias de 450 e 550
307 nm, através do aparelho EspectraMax M2 / M2^e (Molecular Devices Corporation,
308 San Jose, CA, USA), utilizando o programa SoftMax Pro Software (Molecular
309 Devices Corporation).

310 Após a leitura da densidade óptica, os resultados foram transferidos para
311 planilha de Excel, onde os valores obtidos pela leitura de 550 nm foram
312 subtraídos dos valores da leitura de 450 nm. Em seguida, os resultados obtidos
313 foram lançados no programa MyAssays Analysis Software Solutions®, para
314 análise e obtenção dos valores referentes à produção das interleucinas em
315 pg/mL.

316 *2.7 Análise estatística*

317 Para análise estatística e confecção dos gráficos foi utilizado o programa
318 estatístico GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e
319 o fator útero foi considerado como unidade experimental. Os dados foram
320 tabulados em planilhas do programa Microsoft Excel e a estatística descritiva
321 apresentada em média e erro padrão da média.

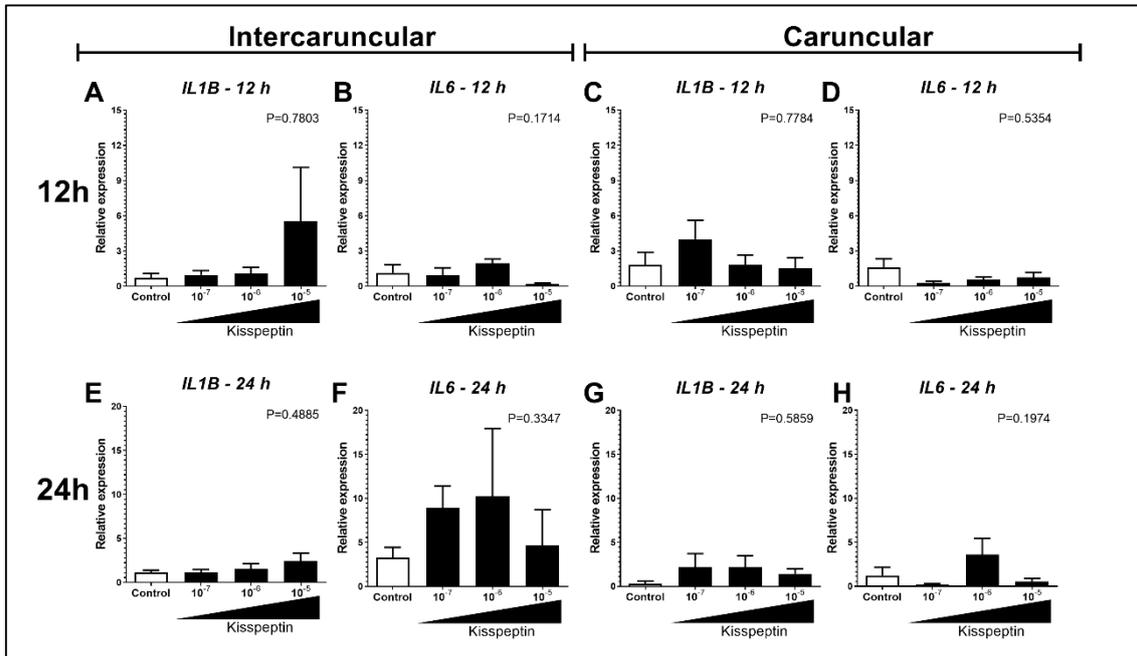
322 Na avaliação da expressão gênica das citocinas inflamatórias IL1 β e IL6
323 de explantes cultivados em diferentes momentos, regiões e concentrações de
324 Kisspeptina, os dados foram submetidos ao Teste de Kolmogorov-Smirnov para
325 determinar se os grupos apresentavam ou não distribuição paramétrica e
326 utilizou-se o Teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico) em todas as análises.
327 Nas análises para avaliação das concentrações das citocinas de explantes com
328 pré-exposição (Kp, p234, dexametasona, progesterona) e pós-desafio com LPS,
329 utilizou-se o Teste de *Two-way* ANOVA com pós-teste de Comparação Múltipla
330 de Bonferroni. O nível de significância para os testes foi de 95 % ($P < 0,05$).

331 **3. RESULTADOS**

332 Não houve diferença na expressão gênica das citocinas *IL1 β* e *IL6* nos
333 tratamentos realizados com diferentes concentrações de kisspeptina (10^{-5} M, 10^{-

334 10^{-6} M e 10^{-7} M), nas duas regiões (intercaruncular e caruncular) e nos dois tempos
 335 de cultivo (12 e 24 horas) de explantes endometriais de bovinos (Figura 2).

336

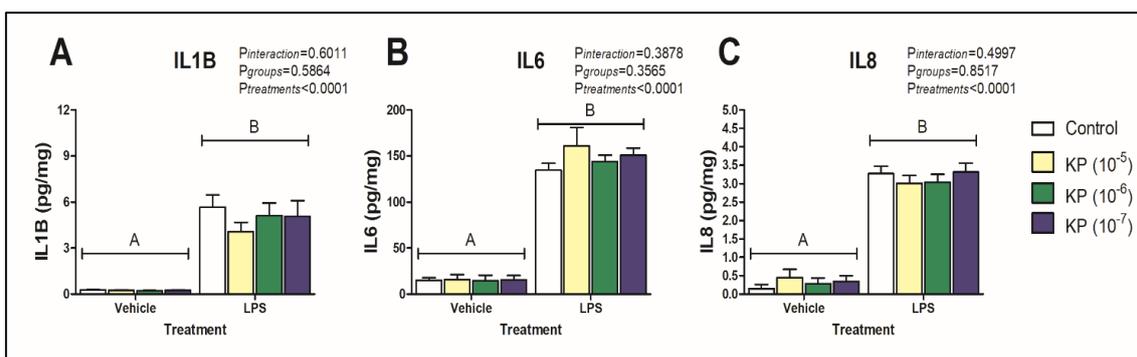


337

338 **Figura 2.** Expressão relativa dos transcritos dos genes IL1 β e IL6 obtidas de explantes
 339 de regiões intercaruncular e caruncular do endométrio bovino, cultivados com diferentes
 340 concentrações de kisspeptina (10^{-5} M, 10^{-6} M e 10^{-7} M), por 12 e 24 horas. Os resultados
 341 estão apresentados em média + erro padrão da média e analisados pelo Teste de
 342 Kruskal-Wallis, com nível de significância de $P < 0,05$.

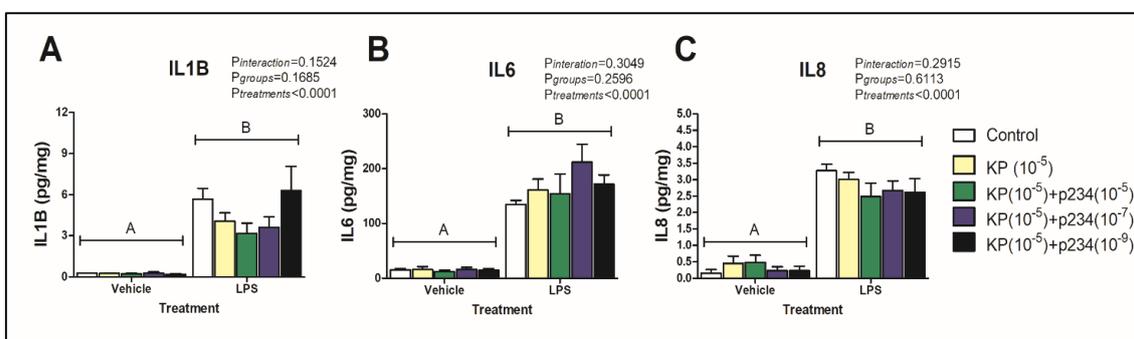
343 Na figura 3 observou-se aumento significativo ($P < 0,001$) na produção de
 344 IL1 β , IL6 e IL8 em resposta ao desafio com LPS (1 μ g/mL) independente da
 345 concentração da pré-exposição (0 - 24h) com Kp (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} M) (Figura 2).
 346 Porém, não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratamentos
 347 após o desafio com LPS (24 – 48 h).

348



349 **Figura 3.** Resposta das interleucinas 1 β , 6 e 8 de cultivos de região intercaruncular do
 350 endométrio bovino, tratados com diferentes concentrações de kisspeptina (KP) e
 351 submetidos ao desafio com lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados estão apresentados
 352 em média + erro padrão da média e analisados por *Two-way* ANOVA e pós-teste de
 353 Comparação Múltipla de Bonferroni, com nível de significância de $P < 0,05$.

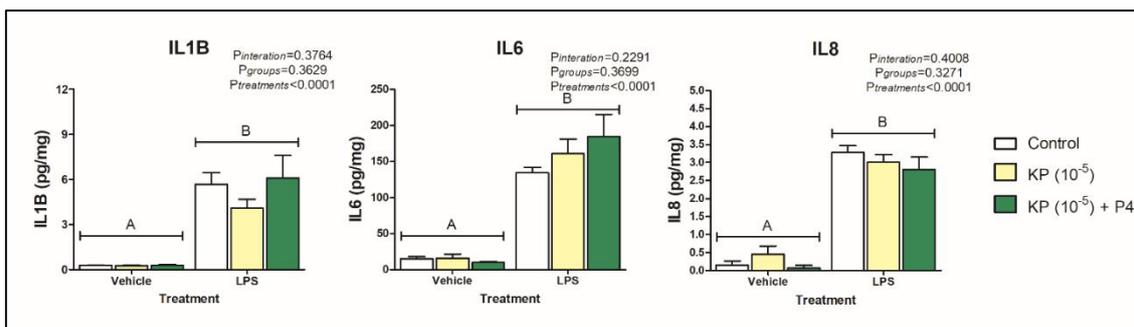
354 Na figura 4, ao se utilizar o antagonista p234 (10^{-5} M, 10^{-7} M e 10^{-9} M
 355 associado com 10^{-5} M Kp) na pré-exposição (0 – 24 h) e pós-desafio com 1 μ g/mL
 356 LPS (24 – 48 h), também se observaram aumentos significativos na produção de
 357 IL1 β , IL6 e IL8 decorrente do estímulo ao LPS, mas não houve diferença entre
 358 os grupos experimentais.



359

360 **Figura 4.** Resposta das interleucinas 1 β , 6 e 8 de cultivos de região intercaruncular de
 361 endométrio bovino, tratados com kisspeptina (10^{-5} M), associados a diferentes
 362 concentrações do antagonista p234 (10^{-5} M, 10^{-7} M e 10^{-9} M) por 24 h e submetidos ao
 363 desafio com lipopolissacarídeo (LPS) por 24 h. Os resultados estão apresentados em
 364 média + erro padrão da média e analisados por *Two-way* ANOVA e pós-teste de
 365 Comparação Múltipla de Bonferroni, com nível de significância de $P < 0,05$.

366 Na avaliação do efeito da pré-exposição (0 – 24 h) em associação do
 367 hormônio progesterona (5ng/mL) com Kisspeptina (10^{-5} M) e posteriormente
 368 desafiado com LPS (1ng/mL) por 24 horas (24 – 48 h) não houve diferença entre
 369 os grupos controle, Kp e Kp + P4 na produção das citocinas IL β , IL6 e IL8 (Figura
 370 5).

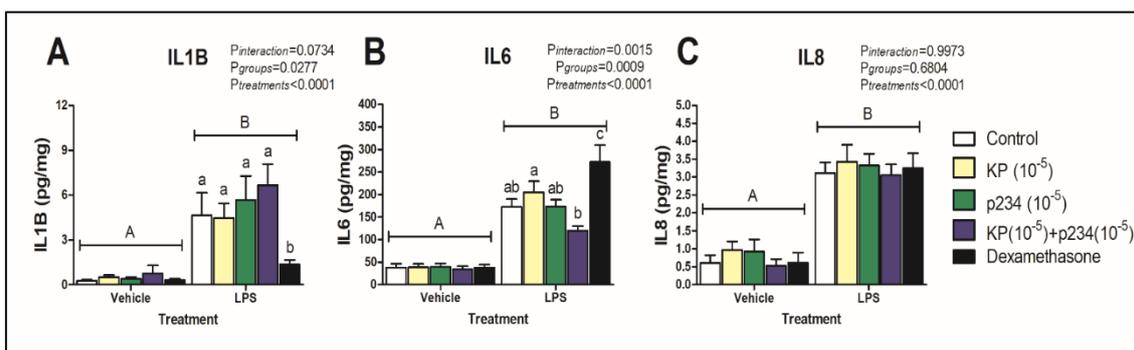


371

372 **Figura 5.** Resposta das interleucinas 1 β , 6 e 8 de cultivos de região intercaruncular do
 373 endométrio bovino, tratados com kisspeptina (KP) associada ou não a progesterona (P4)
 374 e submetidos ao desafio com lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados estão
 375 apresentados em média + erro padrão da média e analisados por Two-way ANOVA e
 376 pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni, com nível de significância de $P < 0,05$.
 377

378 Na avaliação do efeito do tratamento de dexametasona em comparação
 379 aos outros tratamentos (controle; Kp 10⁻⁵ M; p234 10⁻⁵ M e Kp 10⁻⁵ M + p234 10⁻⁵
 380 M) por 24 horas (0 – 24h) quando desafiados com LPS (1ng/mL) por mais 24
 381 horas (24 – 48 h), verificou-se diferença significativa com redução de IL1 β e
 382 aumento de IL6. Não foi observada diferença para a concentração de IL8
 383 (Figura 6).

384



385

386 **Figura 6.** Resposta das interleucinas 1 β , 6 e 8 de cultivo da região intercaruncular do
 387 endométrio bovino, tratados com kisspeptina (10⁻⁵ M), antagonista p234 (10⁻⁵ M) e
 388 dexametasona por 24 h e submetidos ao desafio com lipopolissacarídeo (LPS) por 24
 389 h. Os resultados estão apresentados em média + erro padrão da média e analisados
 390 por Two-way ANOVA e pós-teste de Comparação Múltipla de Bonferroni, com nível de
 391 significância de $P < 0,05$.

392

393 4. DISCUSSÃO

394 A diferença observada na produção das citocinas IL β , IL6 e IL8 quando
395 desafiadas com LPS de *E. coli* evidenciaram o estímulo promovido na resposta
396 imune inata do endométrio bovino, com aumento expressivo da produção destas
397 interleucinas pró-inflamatórias, validando a eficácia do modelo experimental de
398 cultivo de explantes de endométrio bovino *ex vivo*. Estes resultados corroboram
399 com os descritos na literatura [27,28], que identificaram os mesmos efeitos nas
400 concentrações destas três citocinas pró-inflamatórias, evidenciando a
401 participação do endométrio na resposta imune, por meio da produção das
402 interleucinas, responsáveis pela sinalização e ativação das células de defesa do
403 organismo e resposta inflamatória. Este estudo também reforçou o efeito
404 imunossupressor do hormônio dexametasona na redução da produção de IL1 β
405 e aumento de IL6 descrito nos modelos de cultivos endometriais *ex vivo* de
406 fêmeas bovinas [28].

407 De acordo com os resultados encontrados neste estudo, a hipótese
408 proposta foi rejeitada, pois a kisspeptina não apresentou o efeito
409 imunomodulador esperado na resposta imune inata do endométrio bovino, uma
410 vez que não foram observadas alterações na expressão gênica e na produção
411 das citocinas IL1 β , IL6 e IL8 frente ao desafio com 1 ng/mL de LPS de *E. coli*,
412 quando realizados os tratamentos com diferentes concentrações do
413 neuropeptídeo e em tempos distintos de exposição. As concentrações de
414 kisspeptina utilizadas neste estudo foram semelhantes as utilizadas por outros
415 autores, as quais foram suficientes para proporcionar melhora significativa nas
416 taxas de maturação oocitária na produção de embriões *in vitro* de suínos [32] e
417 bovinos [33].

418 Em outros estudos [20,21], verificou-se que durante a gestação em
419 mulheres e roedores, as células do sistema imunológico como linfócitos T,
420 células T regulatórias, neutrófilos e células NK, expressam receptores de
421 membrana específicos para kisspeptina, sendo moduladas pelo neuropeptídeo.
422 Nestes trabalhos, a kisspeptina atuou estimulando a produção da interleucina 10
423 em cultivo celular de linfócitos T CD4+, conhecida por seu efeito anti-inflamatório,
424 além de inibir a produção da interleucina 17, que dentre seus mecanismos de
425 ação está a secreção de quimiocinas que potencializam o recrutamento dos

426 neutrófilos [20–22]. Desta forma, além de atuar no eixo reprodutivo, a kisspeptina
427 mostrou-se capaz de regular a atividade e função das células do sistema imune
428 [22].

429 A divergência encontrada entre estes resultados [20–22] e o do presente
430 estudo, sugere que a kisspeptina deve atuar sob as células do sistema imune de
431 maneira distinta, de acordo com as condições do organismo e os desafios
432 presentes, como por exemplo, o evidenciado durante a gestação [20–22]. No
433 entanto, as especificidades destas condições e os seus fatores estimulatórios
434 precisam ser estabelecidos em futuros experimentos.

435 De acordo com literatura, tanto a kisspeptina como a progesterona atuam
436 ativamente na formação da imunotolerância materna durante a gestação, tendo
437 ação direta na secreção de citocinas e controle da atividade funcional das células
438 do sistema imune de mulheres [34–36]. Neste contexto, o presente estudo
439 investigou a resposta imune do endométrio bovino através dos tratamentos com
440 kisspeptina e progesterona, buscando avaliar o efeito do hormônio esteroide
441 sobre a atividade imunomoduladora da kisspeptina. Os resultados do presente
442 estudo mostraram que a progesterona, na concentração de 5ng/mL durante 24
443 h, não interferiu na resposta imune inata uterina, uma vez que não reduziu a
444 secreção das citocinas pró-inflamatórias avaliadas. Diferente de outros autores
445 [30,37] em estudos *in vivo*, que mostraram o efeito negativo deste hormônio na
446 resposta imune, suprimindo a resposta inflamatória e aumentando a
447 predisposição a doenças.

448 Pouco ainda se sabe a respeito da ação da kisspeptina na resposta imune
449 inata de bovinos, bem como sob em quais condições este neuropeptídeo atua.
450 Mais estudos são necessários para descobrir o papel exato da kisspeptina na
451 resposta imune e quais as condições e estímulos responsáveis pela ativação e
452 atuação do neuropeptídeo na resposta imune inata uterina.

453 Tendo em vista o impacto das doenças uterinas na fertilidade e eficiência
454 reprodutiva dos animais, evidencia-se a necessidade de buscar outras
455 alternativas para modular a resposta inflamatória, para que esta resposta ocorra
456 de forma pontual e equilibrada, minimizando seus efeitos deletérios. Estudos
457 com a rIL-8 [13,14], o pegbovigastim [15–17] e ômega 3 [18,19], que visam a

458 restauração e modulação da função imune, são exemplos de estudos
459 promissores nesta linha de pesquisa.

460 **CONCLUSÃO**

461 A kisspeptina não apresenta efeito modulatório sobre as citocinas IL1 β ,
462 IL6 e IL8 no endométrio bovino quando se utiliza o modelo de cultivo de órgãos
463 *ex vivo*.

464

465 **AGRADECIMENTOS**

466 Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
467 Minas Gerais (FAPEMIG – Projeto Demanda Universal 01/2016 - APQ-03740-
468 16), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior
469 (CAPES) pelas bolsas de estudos concedidas. O presente trabalho foi realizado
470 com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –
471 Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483 **REFERÊNCIAS**

- 484 [1] Britt JH, Cushman RA, Dechow CD, Dobson H, Humblot P, Hutjens MF,
485 et al. Invited review: Learning from the future—A vision for dairy farms
486 and cows in 2067. *J Dairy Sci* 2018;101:3722–41.
487 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14025>.
- 488 [2] Raliou M, Dembélé D, Düvel A, Bolifraud P, Aubert J, Mary-Huard T, et al.
489 Subclinical endometritis in dairy cattle is associated with distinct mRNA
490 expression patterns in blood and endometrium. *PLoS One*
491 2019;14:e0220244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220244>.
- 492 [3] Sheldon IM, Cronin JG, Bromfield JJ. Tolerance and Innate Immunity
493 Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of
494 Endometritis in Dairy Cattle. *Annu Rev Anim Biosci* 2019;7:361–84.
495 <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115227>.
- 496 [4] Wagener K, Gabler C, Drillich M. A review of the ongoing discussion
497 about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical
498 endometritis in dairy cows. *Theriogenology* 2017;94:21–30.
499 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.02.005>.
- 500 [5] Davies D, Meade KG, Herath S, David PD, Gonzalez D, White JO, et al.
501 Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine
502 endometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 2008;6.
503 <https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-53>.
- 504 [6] Galvão KN, Santos NR, Galvão JS, Gilbert RO. Association between
505 endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein
506 cows. *Theriogenology* 2011;76:290–9.
507 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.006>.
- 508 [7] Galvão KN. Postpartum uterine diseases in dairy cows. *Anim Reprod*
509 2012;9:290–6.
- 510 [8] Pinedo PJ, Galvão KN, Seabury CM. Innate immune gene variation and
511 differential susceptibility to uterine diseases in Holstein cows.
512 *Theriogenology* 2013;80:384–90.
513 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.027>.
- 514 [9] Hawiger J. Innate immunity and inflammation: A transcriptional paradigm.
515 *Immunol Res* 2001;23:99–109. <https://doi.org/10.1385/ir:23:2-3:099>.
- 516 [10] Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*
517 2001;357:1777–89. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7).
- 518 [11] Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and
519 chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory
520 disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2014;1843:2563–82.
521 <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>.
- 522 [12] Noleto PG, Saut JPE, Sheldon IM, Borges AM, Healey GD, Sheldon IM,
523 et al. Short communication: Glutamine modulates inflammatory responses
524 to lipopolysaccharide in ex vivo bovine endometrium. *J Dairy Sci*

- 525 2017;0:526–39. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12023>.
- 526 [13] Zinicola M, Batista CP, Bringhenti L, Meira EBS, Lima FS, McDonough
527 SP, et al. Effects of recombinant bovine interleukin-8 (rbIL-8) treatment on
528 health, metabolism, and lactation performance in Holstein cattle IV:
529 Insulin resistance, dry matter intake, and blood parameters. *J Dairy Sci*
530 2019;102:10340–59. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16337>.
- 531 [14] Zinicola M, Bicalho MLS, Santin T, Marques EC, Bisinotto RS, Bicalho
532 RC. Effects of recombinant bovine interleukin-8 (rbIL-8) treatment on
533 health, metabolism, and lactation performance in Holstein cattle II:
534 Postpartum uterine health, ketosis, and milk production. *J Dairy Sci*
535 2019;102:10316–28. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16335>.
- 536 [15] Zinicola M, Korzec H, Teixeira AGV, Ganda EK, Bringhenti L, Tomazi
537 ACCH, et al. Effects of pegbovigrastim administration on periparturient
538 diseases, milk production, and reproductive performance of Holstein
539 cows. *J Dairy Sci* 2018;101:11199–217. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14869>.
- 541 [16] Canning P, Hassfurther R, TerHune T, Rogers K, Abbott S, Kolb D.
542 Efficacy and clinical safety of pegbovigrastim for preventing naturally
543 occurring clinical mastitis in periparturient primiparous and multiparous
544 cows on US commercial dairies. *J Dairy Sci* 2017;100:6504–15.
545 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12583>.
- 546 [17] Ruiz R, Tedeschi LO, Sepúlveda A. Investigation of the effect of
547 pegbovigrastim on some periparturient immune disorders and
548 performance in Mexican dairy herds. *J Dairy Sci* 2017;100:3305–17.
549 <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12003>.
- 550 [18] A. Hidalgo M, Ratto M, A. Burgos R. Beneficial Effect of Omega-3 Fatty
551 Acids on Immune and Reproductive Endometrial Function.
552 Apolipoproteins, Triglycerides Cholest., IntechOpen; 2020.
553 <https://doi.org/10.5772/intechopen.89351>.
- 554 [19] Masmelijer C, van Leenen K, De Cremer L, Deprez P, Cox E, Devriendt B,
555 et al. Effects of omega-3 fatty acids on immune, health and growth
556 variables in veal calves. *Prev Vet Med* 2020;179.
557 <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104979>.
- 558 [20] Gorbunova OL, Shirshhev S V. The role of kisspeptin in immune tolerance
559 formation during pregnancy. *Dokl Biol Sci* 2014;457:258–60.
560 <https://doi.org/10.1134/S0012496614040085>.
- 561 [21] Shirshhev S V., Gorbunova OL, Orlova EG. Role of Kisspeptin and Leptin
562 in the Development of Immune Reactivity during Pregnancy. *Hum Physiol*
563 2017;43:705–10. <https://doi.org/10.1134/S0362119717060111>.
- 564 [22] Gorbunova OL, Shirshhev S V. Role of Kisspeptin in Regulation of
565 Reproductive and Immune Reactions. *Biochem* 2020;85:839–53.
566 <https://doi.org/10.1134/S0006297920080015>.

- 567 [23] Tena-Sempere M. Kisspeptin signaling in the brain: Recent developments
568 and future challenges. *Mol Cell Endocrinol* 2010;314:164–9.
569 <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.05.004>.
- 570 [24] Gahete MD, Vázquez-Borrego MC, Martínez-Fuentes AJ, Tena-Sempere
571 M, Castaño JP, Luque RM. Role of the Kiss1/Kiss1r system in the
572 regulation of pituitary cell function. *Mol Cell Endocrinol* 2016;438:100–6.
573 <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2016.07.039>.
- 574 [25] Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, Pineda R, Ruiz-Pino F,
575 Pinilla L, et al. Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the
576 control of GnRH secretion in the female rat. *Am J Physiol - Endocrinol*
577 *Metab* 2011;300. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00517.2010>.
- 578 [26] Williams EJ, Herath S, England GCW, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM.
579 Effect of *Escherichia coli* infection of the bovine uterus from the whole
580 animal to the cell. *Animal*, vol. 2, Elsevier; 2008, p. 1153–7.
581 <https://doi.org/10.1017/S1751731108002413>.
- 582 [27] Borges ÁM, Healey GD, Sheldon IM. Explants of Intact Endometrium to
583 Model Bovine Innate Immunity and Inflammation Ex Vivo. *Am J Reprod*
584 *Immunol* 2012;67:526–39. [https://doi.org/10.1111/j.1600-](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01106.x)
585 [0897.2012.01106.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2012.01106.x).
- 586 [28] Saut JPE, Healey GD, Borges AM, Sheldon IM. Ovarian steroids do not
587 affect bovine endometrial cytokine or chemokine responses to
588 *Escherichia coli* or LPS in vitro. *Reproduction* 2014;148:593–606.
589 <https://doi.org/10.1530/REP-14-0230>.
- 590 [29] Carneiro LC, Cronin JG, Sheldon IM. Mechanisms linking bacterial
591 infections of the bovine endometrium to disease and infertility. *Reprod*
592 *Biol* 2016;16. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2015.12.002>.
- 593 [30] Lewis GS. Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Anim.*
594 *Reprod. Sci.*, vol. 82–83, Elsevier; 2004, p. 281–94.
595 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.026>.
- 596 [31] Fischer C, Drillich M, Oda S, Heuwieser W, Einspanier R, Gabler C.
597 Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial
598 epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in
599 case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod Fertil Dev*
600 2010;22:818. <https://doi.org/10.1071/RD09120>.
- 601 [32] Saadeldin IM, Koo OJ, Kang JT, Kwon DK, Park SJ, Kim SJ, et al.
602 Paradoxical effects of kisspeptin: It enhances oocyte in vitro maturation
603 but has an adverse impact on hatched blastocysts during in vitro culture.
604 *Reprod Fertil Dev* 2012;24:656–68. <https://doi.org/10.1071/RD11118>.
- 605 [33] Soares MM, De Cássia Antonino D, Oliveira M, Melo J, Peixoto LR, Maia
606 TS, et al. The role of Kisspeptin in bovine in vitro embryo production.
607 *Semin Agrar* 2018;39:621–30. [https://doi.org/10.5433/1679-](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n2p621)
608 [0359.2018v39n2p621](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n2p621).

- 609 [34] Hu KL, Chang HM, Zhao HC, Yu Y, Li R, Qiao J. Potential roles for the
610 kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation.
611 Hum Reprod Update 2019;25:326–43.
612 <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy046>.
- 613 [35] Shah NM, Lai PF, Imami N, Johnson MR. Progesterone-related immune
614 modulation of pregnancy and labor. Front Endocrinol (Lausanne)
615 2019;10:198. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00198>.
- 616 [36] Al-Kaabi MA, Hamdan FB, Al-Matubsi H. Maternal plasma kisspeptin-10
617 level in preeclamptic pregnant women and its relation in changing their
618 reproductive hormones. J Obstet Gynaecol Res 2020;46:575–86.
619 <https://doi.org/10.1111/jog.14208>.
- 620 [37] Del Vecchio RP, Matsas DJ, Inzana TJ, Sponenberg DP, Lewis GS.
621 Effect of intrauterine bacterial infusions and subsequent endometritis on
622 prostaglandin F₂α metabolite concentrations in postpartum beef cows. J
623 Anim Sci 1992;70:3158–62. <https://doi.org/10.2527/1992.70103158x>.
- 624