

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec
Curso de Bacharelado em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso



**Avaliação da expressão de genes associados à fertilidade no útero e oviduto
de bovinos desafiados com lipopolissacarídeo (LPS)**

Giuliana de Avila Ferronato

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F397a Ferronato, Giuliana de Avila

Avaliação da expressão de genes associados à fertilidade no útero e oviduto de bovinos desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) / Giuliana de Avila Ferronato ; Márcio Nunes Corrêa, orientador. — Pelotas, 2019.

49 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Endotoxemia. 2. Inflamação. 3. Doenças subclínicas. 4. Expressão gênica. I. Corrêa, Márcio Nunes, orient. II. Título.

CDD : 636.214

Giuliana de Avila Ferronato

Avaliação da expressão de genes associados à fertilidade no útero e oviduto de bovinos desafiados com lipopolissacarídeo (LPS)

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Nunes Corrêa

Pelotas, 2019

Giuliana de Avila Ferronato

**Avaliação da expressão de genes associados à fertilidade no útero e oviduto
de bovinos desafiados com lipopolissacarídeo (LPS)**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28 de novembro de 2019.

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Márcio Nunes Corrêa (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

.....
M.^a Andressa Stein Maffi
Mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Aos cientistas e jovens pesquisadores que acreditam
e lutam pela ciência no Brasil.

Agradecimentos

À Nossa Senhora dos Navegantes, a qual sou devota, e a Deus por iluminarem os meus caminhos. Obrigada por me fazerem sentir grata!

Aos meus pais, Patrícia e Ari, por sempre me incentivarem a seguir meu coração, pois me ensinaram que nada mais importante do que fazer o que gostamos. Obrigada por me fazerem sentir livre!

Ao meu namorado Guilherme pelo carinho e suporte nesses dias difíceis e de muita tensão. Obrigada por me fazer sentir querida e amada!

Aos meus amigos da Biotecnologia, em especial ao meu grupo preferido, a panela da panela, por todas as palavras acolhedoras dos quais estavam passando pelo mesmo que eu. Obrigada por não me deixarem sentir sozinha!

A todos os meus amigos queridos que adquiri durante outras caminhadas, por serem essenciais e me mostrarem o valor de uma amizade. Obrigada pelos momentos alegres!

Ao Joao Rincón, por toda a paciência, ajuda e dedicação. Obrigada por me fazer crescer!

Ao meu orientador Márcio Nunes Corrêa, pela confiança e ensinamentos. Obrigada por me mostrar a importância de lutarmos por nossos objetivos!

Ao NUPEEC, por me acolher nessa grande família, especialmente às gurias da zootecnia por todo companheirismo. Obrigada por me ensinar o significado de trabalhar em equipe!

À UFPEL, por ser uma instituição forte e reconhecida. Obrigada pelo ensino público e de qualidade!

Aos órgãos de fomento, principalmente o CNPq e a FAPERGS, pelos recursos e bolsa de pesquisa durante a graduação. Obrigada por acreditar na pesquisa e mostrar sua importância!

A todos que contribuíram para esse trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada!

Resumo

FERRONATO, Giuliana de Avila. **Avaliação da expressão de genes associados à fertilidade no útero e oviduto de bovinos desafiados com lipopolissacarídeo (LPS)**. 2019. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

As doenças subclínicas, infecciosas ou metabólicas, apesar de não apresentarem sinais clínicos, podem ocasionar em um aumento de LPS na corrente sanguínea, denominado endotoxemia, que mesmo em concentrações menores do que nas doenças clínicas, já é capaz de causar efeitos deletérios. O LPS é uma endotoxina presente na parede celular das bactérias gram-negativas, como a *E. coli*, que é capaz de gerar uma resposta imune nos animais através dos receptores celulares TLR4. Essas endotoxemias estão relacionadas com redução da fertilidade em rebanhos de bovinos leiteiros, porém o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não é bem elucidado. Nesse sentido, o objetivo do estudo foi identificar os possíveis mecanismos moleculares no oviduto e útero pelos quais as endotoxemias podem influenciar a fertilidade em bovinos. Para isso 16 novilhas de raças europeias (Hereford/Angus), clinicamente saudáveis, foram submetidas a um protocolo de sincronização baseado em progesterona (P4) e estradiol (E2), e divididas uniformemente em dois grupos: o grupo LPS (n=8) que recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) contendo 0,5 µg/kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich® Missouri, EUA) via intravenosa, com intervalo de 24 horas; e o grupo controle (n=8) que recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) com o mesmo intervalo de tempo. A temperatura corporal foi aferida com intervalos de 4 horas, por termômetros digitais implantados via intravaginal. Quatro dias após a primeira aplicação de LPS foi coletado os tecidos de oviduto e útero para avaliação da expressão dos genes *TLR4* e *TNF* em ambos tecidos, de *CASP3* e *IGF2* somente no oviduto e de *IL1β*, *PTGS2* e *NANOG* no útero. Como resultados, obtivemos um aumento de temperatura 4 horas após cada aplicação de LPS e uma redução significativa na expressão dos genes *PTGS2* e *NANOG* no útero, enquanto que os demais genes avaliados não apresentaram alteração. Com isso, pode-se concluir que o desafio com duas doses de LPS alterou a expressão de genes relacionados com a qualidade uterina, porém não dos genes avaliados no oviduto.

Palavras-chave: Endotoxemia. Doenças subclínicas. Reprodução. Inflamação.

Abstract

FERRONATO, Giuliana de Avila. **Evaluation of fertility-associated gene expression in uterus and oviduct of bovine challenged with lipopolysaccharide (LPS)**. 2019. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Subclinical diseases, infectious or metabolic, although not presenting signs of illness, can cause an increase in LPS in the bloodstream, called endotoxemia, which is even capable of causing deleterious effects even at lower concentrations than in clinical diseases. LPS is an endotoxin present in the cell wall of gram-negative bacteria, such as *E. coli*, which is capable of generating an immune response in animals through TLR4 cell receptors. These endotoxemia are related to reduced fertility in dairy cattle herds, but the mechanism by which this occurs is not yet well understood. In this sense, the objective of the study was to identify the possible molecular mechanisms in the oviduct and uterus by which endotoxemia may influence fertility in cattle. Sixteen clinically healthy European heifers (Hereford/Angus) were submitted to a synchronization protocol based on progesterone (P4) and estradiol (E2), and divided evenly into two groups: the LPS group (n=8) who received two applications of 2 ml saline (0.9% NaCl) containing 0.5µg/kg body weight of 24-hour LPS (Sigma Aldrich® Missouri, USA) intravenously; and the control group (n=8) that received two applications of 2 mL of saline solution (0.9% NaCl) with the same time interval. Body temperature was measured at 4-hour intervals by intravaginally implanted digital thermometers. Four days after the first application of LPS, the oviduct and uterus tissues were collected to evaluate *TLR4* and *TNF* gene expression in both tissues, *CASP3* and *IGF2* only in the oviduct and *IL1β*, *PTGS2* and *NANOG* in the uterus. As a result, we obtained a temperature increase 4 hours after each application of LPS and a significant reduction in the expression of *PTGS2* and *NANOG* genes in the uterus, while the others genes did not change. Thus, it can be concluded that the challenge with two doses of LPS altered the expression of genes related to uterine quality, but not the genes evaluated in the oviduct.

Keywords: Endotoxemia. Subclinical diseases. Reproduction. Inflammation.

Lista de Figuras

Figura 1	Estrutura da molécula de lipopolissacarídeo (LPS).....	18
Figura 2	Delineamento experimental, demonstrando o protocolo de sincronização da onda folicular e os tratamentos utilizados (duas infusões de 0,5 µg/kg de LPS ou 0,9% de solução salina).....	26
Figura 3	Temperatura corporal de novilhas desafiadas ou não com duas doses de LPS (0,5µg/kg de peso corporal) com intervalo de 24h.....	30
Figura 4	Expressão relativa dos genes (A) <i>TLR4</i> , (B) <i>TNF</i> , (C) <i>HSPA1A</i> , (D) <i>CASP3</i> e (F) <i>IGF2</i> no oviduto de novilhas desafiadas ou não com duas doses de LPS (0,5µg/kg de peso corporal) com intervalo de 24h.....	31
Figura 5	Expressão relativa dos genes (A) <i>TLR4</i> , (B) <i>TNF</i> , (C) <i>IL1β</i> , (D) <i>HSPA1A</i> , (E) <i>PTGS2</i> e (F) <i>NANOG</i> no útero de novilhas desafiadas ou não com duas doses de LPS (0,5µg/kg de peso corporal) com intervalo de 24h.....	32

Lista de Tabelas

Tabela 1	Lista de sequência dos primers utilizados nas análises de expressão gênica.....	28
----------	---	----

Sumário

1	Introdução	11
2	Objetivos	12
2.1	Objetivo geral.....	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	Revisão de Literatura	13
3.1	Importância da Pecuária no Brasil	13
3.2	Período de transição.....	14
3.3	Principais doenças em bovinos e perdas econômicas	15
3.4	LPS e endotoxemia	18
3.5	Inflamação	20
3.6	Oviduto	21
3.7	Útero	23
4	Metodologia.....	25
4.1	Animais e instalações	255
4.2	Sincronização da onda folicular e tratamentos	255
4.3	Avaliação da temperatura corporal	266
4.4	Coleta de tecidos	266
4.5	Extração de RNA	266
4.6	PCR em tempo real para análises de expressão gênica	277
4.7	Análises estatísticas	29
5	Resultados	300
5.1	Efeitos do LPS na temperatura corporal	300
5.2	Efeito do LPS na expressão de genes no oviduto	300
5.3	Efeito do LPS na expressão de genes no útero.....	311
6	Discussão.....	333
7	Considerações finais	388
	Referências	39

1 Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador de carnes do mundo (ABIEC, 2019), e o 3º maior produtor de leite a nível mundial (RESENDE et al., 2019). Com isso, a pecuária possui grande importância econômica para o país, visto que o setor da carne contribui com 8,7% no PIB nacional (ABIEC, 2019) e o de leite contribui com cerca de 2,0% (CARVALHO e ROCHA, 2019). Contudo ainda existem alguns fatores que podem reduzir a lucratividade desse setor, principalmente para os produtores, como é o caso das doenças endotoxêmicas (MCDUGALL et al., 2011; GUIMARAES et al., 2017; NING et al., 2018).

As endotoxemias são caracterizadas pelo aumento de toxinas na corrente sanguínea. Essas toxinas são liberadas por bactérias quando ocorre sua multiplicação ou desintegração celular, como é o caso dos lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular das bactérias gram-negativas, que possuem a capacidade de desencadear resposta inflamatória no organismo (BERTANI e RUIZ, 2018). Em bovinos, existe uma série de doenças relacionadas com endotoxemia por bactérias gram-negativas (principalmente com LPS), sendo elas tanto infecciosas, como a endometrite e a mastite (SHELDON et al., 2002), ou metabólicas, como a acidose ruminal (STEFANSKA et al., 2018).

Estas doenças podem aparecer de forma clínica ou subclínica, na qual não existem sinais evidentes e podem passar despercebidas nos rebanhos. No entanto, ambas as formas podem ocasionar perdas econômicas nas propriedades (GUIMARAES et al., 2017), visto que estão associadas com redução da produção e qualidade de leite e também com redução de fertilidade (MCDUGALL et al., 2011; NING et al., 2018). A rentabilidade das fazendas pecuárias está altamente associada com a fertilidade das fêmeas, pois a produção tanto de leite quanto de carne está ligada com o nascimento de bezerros saudáveis (VALLE et al., 2000). Entretanto, o LPS possui ação em todo trato reprodutivo das fêmeas e por isto, a ocorrência de endotoxemias nos rebanhos tem sido associada com menor fertilidade em várias espécies, incluindo em bovinos (BIDNE et al., 2018).

O oviduto é o órgão que conecta o ovário ao útero, possuindo a função de transporte dos gametas, neste local ocorre a capacitação do espermatozoide para a penetração no oócito, a fecundação e também o desenvolvimento inicial do embrião até a fase de 16 células (MOORE et al., 2013). Estudos *in vitro* mostram que em coelhos, o LPS pode induzir uma resposta imune no oviduto, através do aumento da expressão de mediadores inflamatórios, como *IL-1B* e *TNF α* (IBRAHIM et al., 2015; MENCHETTI et al., 2018). Além disso, estudos *in vitro* utilizando células epiteliais do oviduto bovino também associam o LPS com redução da expressão de genes associados com capacitação espermática e qualidade do ambiente para desenvolvimento do embrião (*OVGP1* e *IGF2*), e também com o aumento de genes que desencadeiam apoptose e estresse oxidativo (*CASP3* e *SOD*) (IBRAHIM et al., 2015).

Após o estágio de 16 células, o oviduto transporta o embrião até o útero, onde ocorre a implantação no endométrio para que ele se desenvolva até o nascimento (MOORE et al., 2013), sendo assim, o processo de implantação é essencial para a prenhez. Entretanto, o LPS tem sido relacionado com a alteração da expressão de genes relacionados a esse processo no útero de vacas (*MMP19*, *EMMPRIN* e *SELL*) e de camundongos (*NANOG*, *OCT4* e *SOX2*) (XIAO et al., 2017; CAMPOS et al., 2018). Além disso, o LPS pode aumentar a expressão dos mediadores inflamatórios *TNF α* , *IL-6*, *IL-8* e *IL-1 β* no útero de bovinos (HERATH et al., 2006; CRONIN et al., 2012).

Contudo, os mecanismos pelos quais as endotoxemias diminuem a fertilidade em bovinos ainda não estão totalmente elucidados, existindo poucos estudos em útero e oviduto, sendo deste último apenas em animais modelos ou *in vitro* com células bovinas, necessitando mais estudos *in vivo* em bovinos. Tendo isso em vista, o objetivo deste estudo foi identificar os possíveis mecanismos moleculares no oviduto e útero pelos quais as endotoxemias podem influenciar a fertilidade em bovinos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de genes associados à fertilidade no útero e oviduto de bovinos desafiados com LPS.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito de doses de LPS sobre a temperatura corporal em bovinos.
- Avaliar a expressão de genes associados com inflamação no útero e no oviduto de animais que receberam infusão de duas doses de LPS.
- Analisar o efeito de duas doses de LPS na expressão de genes relacionados com a qualidade do ambiente do oviduto e do útero para o desenvolvimento do embrião.
- Debater os mecanismos, interações e associações entre a expressão de determinados genes no útero e oviduto e o LPS.

3 Revisão de Literatura

3.1 Importância da Pecuária no Brasil

O Brasil detém o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, possuindo 222 milhões de cabeça de gado, estando a Índia em 2º lugar com 187 milhões e os Estados Unidos em 3º com 92,7 milhões (ABIEC, 2019). Isso representa para o país, 597,22 bilhões de reais anuais, ou seja, uma participação de 8,7% no PIB nacional. Esses valores incluem desde os insumos utilizados na produção do gado, investimento em genética, faturamento dos animais, até o total comercializado pelas indústrias e varejos (ABIEC, 2019). Apesar da crise financeira a qual o país se encontra, houve um crescimento de 8,3% no faturamento do setor de pecuária de corte no Brasil em relação ao ano de 2017, sendo o valor de 2018 o maior registro dos últimos 10 anos (ABIEC, 2019).

Por mais que o Brasil seja um grande produtor de carne, é apenas o 6º país no consumo de carne per capita, consumindo 78,11 kg/habitante/ano, ficando atrás dos seus vizinhos Argentina e Uruguai (RITCHIE, 2019). Devido a esses fatores, o Brasil é um grande exportador de carne, chegando a exportar 20% da sua produção, o que representa 14% da exportação mundial de carne (ABIEC, 2019). Os principais compradores são China e Hong Kong, que juntos somam mais de 40% das exportações e geram um faturamento de 2,925 bilhões de dólares. Além disso, o Brasil é o terceiro maior exportador de alimentos do mundo e a pecuária de corte participa com 5,4% das exportações total do país (CNA, 2018).

Além da produção de carne, o Brasil ainda é o 3º maior produtor de leite do mundo, com uma produção total de 33.400 milhões de litros de leite no último ano, estando atrás apenas dos EUA e da Índia (RESENDE et al., 2019). A produção leiteira está presente em praticamente todos os municípios brasileiros, somando 1,3 milhões de produtores nesse setor, que juntos são capazes de gerar mais de 4 milhões de empregos para o país (ARBEX e MARTINS, 2019). A pecuária de leite no Brasil possui um faturamento anual de R\$ 67 bilhões de reais (ARBEX e MARTINS, 2019). E, estima-se que a participação desse setor no PIB consiga chegar aos 2,0%

em 2019, o que ainda é baixo se comparada a 2013 onde a contribuição era de 3,0%. Contudo, a produção de leite vem apresentando queda desde 2015, porém acredita-se que possa voltar a subir esse ano (CARVALHO e ROCHA, 2019).

Além da venda do leite propriamente dito, ele também pode ser transformado para chegar ao mercado na forma de centenas de derivados lácteos diferentes, como queijos e iogurtes. Esses lácteos possuem um consumo de 165 litros/hab/ano no Brasil, que é o país que mais importa esse tipo de alimento, comprando principalmente da Argentina, sendo 99.033 toneladas em 2018 (PILA, 2019). Esse setor enfrenta dificuldades porque o preço nacional é mais alto que o dos outros países exportadores o que não facilita a concorrência nesse mercado (CARVALHO e ROCHA, 2019).

No Rio Grande do Sul o que chama mais atenção é a pecuária leiteira, estando em segundo lugar no Brasil, produzindo 4.552 milhões de litros de leite por ano (ZOCCAL, 2019). Apesar do estado de Minas Gerais ser o maior produtor de leite, com 9 milhões/litro/ano, a região Sul do país é a que detém a maior parte da produção leiteira do país. Os três estados do Sul são responsáveis por 34,2% de todo leite produzido no país, sendo Santa Catarina com uma produção de 2.980 milhões de litros e Paraná de 4.438 milhões de litros (ZOCCAL, 2019). E, quanto à pecuária de corte, o Rio Grande do Sul é o sétimo do Brasil com maior rebanho de bovinos de corte, representando 6,3% do rebanho brasileiro total (ABIEC, 2019).

Com isso, é evidente que a pecuária tanto de corte quanto de leite possui extrema importância para o Brasil e para o Rio Grande do Sul, atendendo as demandas de consumo da população, gerando milhões de empregos e movimentando boa parte da economia nacional.

3.2 Período de transição

O período de transição, também denominado periparto, geralmente é compreendido pelas três semanas pré-parto e três semanas pós-parto. Esse período é considerado como o mais crítico na vida das vacas, pois é quando o organismo passa por variadas alterações hormonais e metabólicas (MORAES et al., 2014). Isso ocorre devido ao fato delas passarem pela mudança da condição gestante e não lactante para lactantes e não gestantes, e, com isso, além da manutenção do seu próprio organismo, elas precisam suprir as necessidades energéticas para o

crescimento final do feto e para a produção do leite após o seu nascimento (ESPOSITO et al., 2014).

As alterações hormonais estão relacionadas com as sinalizações para o parto e para o desenvolvimento da glândula mamária, que são feitas através de hormônios como a progesterona e o estradiol, que acabam desencadeando uma imunossupressão nos animais nesse período (INGVARTSEN, 2006), fazendo com que as células imunes diminuam a sua capacidade de eliminar os patógenos. Já as alterações metabólicas estão relacionadas com a redução da ingestão de matéria seca (IMS) pelas vacas no final da gestação (BAUMAN e BRUCE CURRIE, 1980), que ocorre devido a fatores endócrinos e também pelo próprio espaço ocupado pelo feto, que diminui a disponibilidade para IMS. Porém, justamente nesse período elas necessitam maior demanda de energia, por isso as vacas muitas vezes acabam entrando em déficit energético (NEWMAN et al., 2016), que também acaba ocasionando em imunossupressão dessas fêmeas (HAMMON et al., 2006).

Esses dois fatores contribuem para que as vacas no pós-parto recente estejam com a imunidade diminuída e aliados ao estresse fisiológico do momento do parto fazem com que esses animais fiquem mais suscetíveis ao aparecimento de doenças infecciosas e transtornos metabólicos (FURKEN et al., 2015). As vacas leiteiras são as mais susceptíveis a essas alterações e estresses do periparto, justamente por serem animais de alta produção, necessitando uma maior demanda de energia para produção do leite no pós-parto (GROSS e BRUCKMAIER, 2019). No entanto, os cuidados que devem ser tomados no periparto também se estendem às vacas de corte, visto o manejo nesse período pode propiciar aumento de doenças que ocasionam em transtornos reprodutivos e prejudicar as futuras gestações (PEREZ-BAEZ et al., 2019).

3.3 Principais doenças em bovinos e perdas econômicas

Em vacas leiteiras, 75% das doenças ocorrem durante o pós-parto recente (LEBLANC et al., 2006). Essas doenças podem aparecer de duas maneiras nos animais, de forma clínica onde eles apresentam sinais da enfermidade, ou de forma subclínica, onde não apresentam sinais e podem passar despercebidas no rebanho. Ambas as formas podem ocasionar em consequências na saúde dos animais e, com isso, na produtividade e rendimento da propriedade (GUIMARAES et al., 2017).

Essas formas clínicas e subclínicas podem ocorrer tanto em doenças infecciosas como metabólicas.

Nas doenças infecciosas, apesar da forma clínica apresentar maior severidade, a forma subclínica é a que possui maior importância epidemiológica, porque além de fazer com que os animais produzam menos e tenham redução de fertilidade, não apresentam nenhum sinal evidente de inflamação e enfermidade. Para diagnosticar as infecções subclínicas são necessários exames complementares laboratoriais por cultura e isolamento do microrganismo para correta identificação e tratamento adequado (BIRHANU et al., 2017), o que dificulta ainda mais a sua descoberta. As principais doenças nesse sentido que acometem os rebanhos bovinos são mastite subclínica e endometrite subclínica.

A mastite é uma inflamação na glândula mamária que pode ser causada por inúmeros agentes infecciosos. Estima-se que mais de cem tipos diferentes de bactérias podem ocasionar esta patologia, entre elas estão *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* e *Mycoplasma* spp. (BARREIRO et al., 2018; OMBARAK et al., 2019; VAHANIKKILA et al., 2019). A mastite clínica é caracterizada pelo aparecimento dos sinais de vermelhidão, aumento do quarto de úbere, e possível presença de grumos ou sangue no leite, enquanto a mastite subclínica não possui sinais evidentes. Contudo, devido a maior prevalência, a forma subclínica possui uma maior relevância para os rebanhos, obtendo a prevalência de 37% enquanto que na forma clínica é de 8,3% (GETANEH e GEBREMEDHIN, 2017). A mastite é associada com grandes perdas econômicas (CUNHA et al., 2008) e também com a diminuição de fertilidade (LAVON et al., 2016). No Brasil, um estudo demonstrou que fazendas com produção média de 28 mil litros de leite por mês tiveram perda de 4.800 litros/mês por ocorrência de mastite subclínica, o que representa 17% da produção (CARVALHO et al., 2012), outro estudo também no Brasil, demonstrou que a mastite clínica pode diminuir 18,2%, enquanto que a mastite subclínica pode reduzir 32,3% na produção de leite, sendo a maior causa de prejuízo na propriedade (GUIMARAES et al., 2017).

A endometrite é uma doença crônica definida como uma inflamação que envolve o endométrio e os tecidos glandulares. A sua forma clínica é detectada quando o fluido uterino está purulento ou mucopurulento (SHELDON et al., 2006). Enquanto que a endometrite subclínica é uma doença crônica, diagnosticada pelo aumento da presença de células polimorfonucleares (PMN) na citologia uterina

(MELCHER et al., 2014). Geralmente essa enfermidade advém de traumas mecânicos que favorecem a entrada de agentes patogênicos no útero, as bactérias mais encontradas nessas infecções são *Streptococcus* alfa-hemolítico, *Trueperella pyogenes* e *Escherichia coli* (SENS e HEUWIESER, 2013; PRUNNER et al., 2014).

A endometrite clínica possui uma incidência de 17% (LEBLANC et al., 2002) e a subclínica de 27,5% em bovinos de leite (BUSO et al., 2018) e ambas estão associadas com redução da fertilidade no rebanho (GILBERT et al., 2005; KAUFMANN et al., 2009). MCDOUGALL et al. (2011) demonstraram que, em bovinos, quanto mais alta a porcentagem de PMN presentes na citologia uterina, menor é a taxa de concepção e também é menor a produção de leite, o que gera prejuízos econômicos para a propriedade, visto que a rentabilidade está associada ao nascimento de bezerros saudáveis (VALLE et al., 2000).

As doenças metabólicas também causam impactos econômicos negativos no setor de produção animal (MOSTERT et al., 2018). Dentre elas existe a acidose ruminal, que é um transtorno metabólico muito comum em ruminantes que consomem dietas ricas em concentrados, a sua forma subclínica chega a acometer 44,5% dos animais (FIORENTIN, 2016). O que ocorre nessa enfermidade é uma diminuição do pH ruminal pela fermentação de carboidratos não estruturais, como o amido, que compõem a maioria dos concentrados. A fermentação desses carboidratos é realizada pelas bactérias amilolíticas e é bastante rápida, resultando em um aumento dos níveis de ácidos graxos voláteis, principalmente o propionato e o lactato, os quais promovem uma redução do pH ruminal. Essa diminuição do pH ruminal leva a morte das bactérias que não são adaptadas a esse ambiente ácido. Após isso, os componentes celulares das bactérias podem ser infiltrados para a corrente sanguínea e serem reconhecidos pelas células de defesa, ocasionando em um processo de inflamação (STEFANSKA et al., 2018).

A inflamação pela acidose está relacionada com diminuição na ingestão de matéria seca, redução do peso vivo e menor produção e concentração de gordura e proteína no leite (NING et al., 2018). No entanto, na forma clínica estão presentes os sintomas de inchaço no rúmen, cólicas (inquietação) e perda de apetite, com isso é possível de observar e buscar tratamento. Já a forma subclínica não possui sinais evidentes, dificultando o diagnóstico (MEYER e BRYANT, 2017).

Com isso, observa-se que as doenças na forma subclínica podem passar despercebidas nos rebanhos, mas não na economia da propriedade, estando

relacionadas, assim como a forma clínica, com redução da produção e da qualidade do leite, além de baixa na ingestão de matéria seca e menores taxas de prenhez. Ademais, essas doenças também possuem aumento de custos na produção pelos gastos com diagnósticos e tratamentos (LHERMIE et al., 2018; GUSSMANN et al., 2019). Contudo, os mecanismos pelos quais essas doenças afetam a fertilidade ainda não estão totalmente elucidados, necessitando mais estudos nesta área.

3.4 LPS e endotoxemia

Os lipopolissacarídeos (LPS) são os principais componentes presentes na parede celular externa das bactérias gram-negativas. Eles possuem a função de auxiliar na resistência bacteriana contra os antibióticos, por isso as bactérias gram-negativas apresentam mais resistência aos antimicrobianos que as gram-positivas, podendo apresentar tratamento mais difícil (SHARMA et al., 2019; TIAN et al., 2019). Além disso, o LPS facilita com que a bactéria passe pelas barreiras do sistema imune do organismo e também as protegem de eventuais estresses que elas possam sofrer no ambiente (BERTANI e RUIZ, 2018). A estrutura do LPS é formada por um domínio hidrofóbico conhecido como lipídeo A, um oligossacarídeo não repetitivo e um polissacarídeo distal (antígeno O) (WIEGAND e PFLUGMACHER, 2005), como apresentado na figura 1.

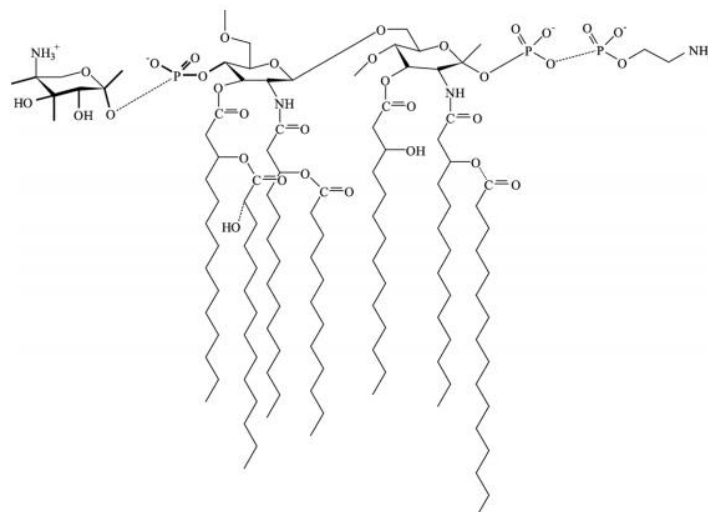


Figura 1: Estrutura da molécula de lipopolissacarídeo (LPS). Fonte: WIEGAND e PFLUGMACHER (2005).

O antígeno O é altamente mutável, sendo o responsável pela variabilidade existente entre os lipopolissacarídeos, o que confere a maior resistência dessas bactérias (HASSAN et al., 2019; PEREZ-BURGOS et al., 2019). Já o lipídeo A é uma

estrutura altamente conservada e com isso é capaz de ser reconhecido pelas células do organismo através dos receptores celulares do tipo toll 4 (TLR4, do inglês *toll like receptor 4*) (PARK e LEE, 2013). As principais células que reconhecem o LPS são os macrófagos e as células dendríticas (MURPHY, 2014), que fazem parte do sistema imune inato, no entanto outros tipos de células também expressam o *TLR4*, logo também são capazes de reconhecer o LPS e desencadear uma resposta inflamatória, dentre elas encontram-se as células da granulosa, células endometriais, células epiteliais e do oviduto, (HERATH et al., 2006; HERATH et al., 2007; MENCHETTI et al., 2018).

O reconhecimento do LPS inicia pela ligação da Proteína ligante ao LPS (LBP, do inglês *Lipopolysaccharide binding protein*), a qual tem a função de transformar os agregados de LPS em monômeros e apresenta-los para a proteína CD14 (do inglês *cluster of differentiation 14*) que se liga com a MD-2 (do inglês *myeloid differentiation factor 2*), ambas CD14 e MD-2 podem estar presentes na forma solúvel na circulação ou ancoradas à membrana das células (CRUZ-MACHADO, 2010). Esse complexo de proteínas é responsável por carrear o LPS ao TLR4, que normalmente está ligado também à MD-2, formando o complexo TLR4-MD-2 (PARK e LEE, 2013). A partir desse reconhecimento do LPS se desencadeiam as vias de sinalização necessárias para a transcrição de genes de mediadores inflamatórios que participam no processo de resposta imune (CRUZ-MACHADO, 2010).

Devido a essas características, o LPS é denominado como um dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*), que são moléculas reconhecidas pelas células emitindo os primeiros sinais de infecção (MURPHY, 2014). O LPS pode ser reconhecido por células endoteliais de diferentes tecidos e pelas células de defesa, onde a principal resposta pelo sistema imune inato se dá através da ativação dos macrófagos que secretam maiores quantidades dos mediadores inflamatórios denominados citocinas. Devido a essas características, e aliado ao fato de ser uma molécula bem caracterizada e de fácil manipulação, o LPS é utilizado em inúmeros experimentos, principalmente com a finalidade de mimetizar a inflamação que ocorre em doenças que acarretam em endotoxemias (XIAO et al., 2017; CAMPOS et al., 2018; NING et al., 2018), ou seja, que geram um aumento de PAMPs na corrente sanguínea.

As endotoxemias podem ocorrer tanto em doenças infecciosas quanto em metabólicas e resultam em intensas respostas imunológicas. As endotoxemias por LPS têm sido relacionadas com inflamação ovariana em mulheres (TREMELLEN et al., 2015), com redução no número de folículos primordiais em bovinos (BROMFIELD e SHELDON, 2013), mudança nos níveis de hormônios importantes para a prenhez em camundongos, como a progesterona (P4) (AGRAWAL et al., 2013), redução das taxas de maturação de oócitos bovinos *in vitro* (BROMFIELD e SHELDON, 2011) e menores taxas de clivagem e de blastocistos em embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos de vacas desafiadas com LPS (ROTH et al., 2015).

Além das doenças explanadas no outro tópico como fontes de endotoxemia no organismo, também existem outros transtornos que levam ao aumento de PAMPs, como o LPS, na corrente sanguínea. Um exemplo é o estresse térmico, onde o aumento de temperatura em suínos está relacionado com aumento de 200% dos níveis de endotoxinas no soro, indicando que o estresse térmico pode reduzir a integridade da parede do trato intestinal, aumentando a circulação destas endotoxinas (PEARCE et al., 2012). Outro fator relacionado com endotoxemia é o nutricional, estudos realizados em camundongos demonstraram que dietas ricas em carboidrato aumentam os níveis de LPS no plasma sanguíneo (AMAR et al., 2008), além disso, um estudo em humanos evidenciou que pessoas diabéticas com obesidade também apresentaram maiores níveis de LPS no plasma sanguíneo (HAWKESWORTH et al., 2013). Em bovinos, a retenção de placenta é uma afecção com prevalência de cerca de 15% (BUSO et al., 2018), que se caracteriza como uma falha da expulsão das membranas fetais após o parto e que também está relacionada com aumento do risco de infecções uterinas, sendo assim também é associada com endotoxemia (ZEBELI et al., 2011).

3.5 Inflamação

Inflamação é a resposta do organismo frente às infecções ou injúrias, que ocorrem a fim de reparar os danos causados nos tecidos e eliminar os patógenos. As endotoxemias são capazes de gerar respostas inflamatórias intensas no organismo. Após o reconhecimento pelo TLR4, o LPS desencadeia um processo inflamatório através de dois diferentes mecanismos: a via Myd88 (do inglês *myeloid differentiation protein*) dependente ou Myd88 independente. Na Myd88 dependente,

é necessário o complexo LPS-LBP-CD14 para reconhecimento pelo TLR4 e o que ocorre é a translocação do fator de transcrição fator nuclear kappa B (NF- κ B) no núcleo, que aumenta a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias (JANSSENS e BEYAERT, 2002). Já a Myd88 independente não necessita das proteínas LBP e CD14 para o reconhecimento do LPS pelo TLR4, e essa via induz a fosforilação e dimerização do fator regulador de interferon 3 (IRF-3) e leva à produção de IFN- β (KAWAI et al., 2001).

As citocinas pró-inflamatórias são pequenas proteínas ou peptídeos envolvidos na emissão de sinais entre as células durante uma resposta imune, como, por exemplo, as interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 e o TNF α . A IL-1 β e IL-6 possuem como uma de suas funções ativarem os linfócitos e o TNF α aumenta a permeabilidade dos vasos para permitir maior entrada de imunoglobulinas G e outros componentes (MURPHY, 2014). A presença dessas citocinas, principalmente a IL-6, age no fígado estimulando a secreção das proteínas de fase aguda (PFAs), como a amilóide sérico A (SAA), haptoglobina (Hp) e proteína C reativa (PCR) (BODE et al., 2012).

As PFAs são produzidas pelos hepatócitos, para dar suporte à resposta imune, possuindo algumas funcionalidades como ser um dos fatores que podem estimular o aumento da temperatura corporal, induzindo febre nos animais. Isso ocorre a fim de aumentar o metabolismo das células de defesa e melhorar a resposta inflamatória (GABAY e KUSHNER, 1999). Uma resposta sistêmica exacerbada com produção de citocinas além do necessário pode ser prejudicial para o organismo, podendo ocasionar em lesões de órgãos alvos (BONE, 1996), devido a isso o organismo produz citocinas que são anti-inflamatórias, que possuem a capacidade de reduzir e inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias e que são secretadas para minimizar os efeitos prejudiciais destas. Como principais exemplos de citocinas anti-inflamatórias temos a IL-4 e a IL-10 (UCEYLER et al., 2006).

3.6 Oviduto

O oviduto, também chamado de tubas uterinas, é um órgão do sistema reprodutor das fêmeas, e em bovinos possui um comprimento de 14 a 21 cm e um diâmetro de 3 a 4 mm (BONATO et al., 2015). Os ovidutos são condutos sinuosos que possuem a função de transportar os gametas femininos e masculinos, sendo nele que ocorre a fecundação. Após a ovulação, o complexo cumulus-oócito (COC)

é liberado para o oviduto, onde pode permanecer por até três dias até encontrar o espermatozoide, ou é eliminado. O espermatozoide, por sua vez, necessita ser capacitado pelas células endoteliais do oviduto para poder fecundar o oócito (GRIFFITHS et al., 2008). Além disso, o fluido do oviduto fornece o ambiente fisiológico e bioquímico ideal para o embrião antes da implantação, inclusive secreta fatores que influenciam na clivagem embrionária (GANDOLFI e MOOR, 1987).

O embrião permanece no oviduto até o estágio de 16 células e durante esse tempo o órgão realiza contração muscular fazendo com que o embrião se movimente até chegar ao útero para que se implante no endométrio (LI e WINUTHAYANON, 2017). Com isso, o oviduto é um órgão indispensável para dar início à gestação. As células epiteliais do oviduto secretam fatores que protegem o embrião de estresses ambientais, oxidativos e térmicos (LI e WINUTHAYANON, 2017). Possuem capacidade de desencadear resposta imune inata através da expressão de TLR4 (MENCHETTI et al., 2018), como também expressam genes ligados à ação antioxidante como *GPX4* (do inglês *glutathione peroxidase 4*), *SOD1* (do inglês *superoxide dismutase 1*) e *SOD2* (do inglês *superoxide dismutase 2*) e também proteínas relacionadas com a proteção celular ao choque térmico e a estresses, como a HSPA1A e HSPB1, antigamente denominadas por HSP70 e HSP25 (MARIANI et al., 2000).

Um estudo demonstrou que coelhos desafiados com LPS via intracervical apresentaram aumento da expressão de *IL1 β* e *TNF* no oviduto (MENCHETTI et al., 2018), indicando a capacidade dessas células em responder frente a possíveis patogenias. Corroborando com isso, um estudo *in vitro* em células epiteliais do oviduto bovino (BOEC, do inglês *bovine oviductal epithelial cell*) também aponta maior expressão de *IL1 β* e *TNF* em resposta ao LPS e, além disso, demonstrou aumento da *CASP3*, envolvida no processo de apoptose, e também maior expressão de *SOD*, relacionado à resposta ao estresse oxidativo (IBRAHIM et al., 2015). O mesmo estudo *in vitro* também indicou uma diminuição da expressão de *OVGP1* e *IGF2*, que são genes relacionados com capacitação espermática pelo oviduto e desenvolvimento e qualidade embrionária (KILLIAN, 2004; ALGARRA et al., 2018). Ademais, um experimento realizado *ex vivo* expôs ovidutos bovinos ao LPS e observou um retardo na motilidade dos espermatozoides, bem como um aumento na velocidade de transporte de partículas e na frequência de batimento dos cílios (O'DOHERTY et al., 2016), onde os autores sugerem que esse aumento seja pelo

aumento do fluxo de fluidos como resposta do hospedeiro ao possível invasor. Esses resultados demonstram a complexidade desse órgão, no entanto existe uma carência de estudos em relação a ele, principalmente em bovinos, sendo encontrados apenas experimentos *in vitro* ou em outras espécies que são utilizadas como modelo.

3.7 Útero

O útero é um órgão que pertence ao sistema reprodutor das fêmeas. Ele é um órgão oco formado por três camadas, sendo o perimétrio, o miométrio e o endométrio, que é a camada mais interna. O útero é um dos órgãos mais importantes para o processo de prenhez, pois é no endométrio que ocorre a implantação do embrião para o seu completo desenvolvimento até o nascimento. O órgão desenvolve vasos sanguíneos exclusivos para a nutrição do feto e se desenvolve e aumenta de tamanho conforme suas necessidades (MOORE et al., 2013).

Após o parto, o útero fica mais susceptível à entrada de patógenos e as vacas ficam com o sistema imune debilitado por uma série de fatores, fazendo com que as infecções uterinas ocorram majoritariamente no pós-parto recente (SHELDON et al., 2002). Essas doenças são classificadas como metrite, endometrite clínica e endometrite subclínica, dependendo da existência ou não de sinais clínicos e da injúria do tecido, sendo todas relacionadas com inflamação do endométrio (SHELDON et al., 2006). Além disso, outras fontes de endotoxemia também estão relacionadas com inflamação do endométrio, CAMPOS et al. (2018) demonstraram que a aplicação intramamária de LPS, simulando a inflamação gerada pela mastite, também aumenta no endométrio a expressão de genes ligados à resposta imune.

As células estromais e as células epiteliais do endométrio são capazes de expressar o *TLR4* e os seus coreceptores *CD14* e *MD-2* (HERATH et al., 2006) e com isso reconhecer o LPS. Esse reconhecimento também é capaz de ativar a via *MYD88* dependente para ocorrer a produção e secreção de citocinas (CRONIN et al., 2012). Sendo as endotoxemias relacionadas com o aumento da expressão de *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8* e *TNF α* no endométrio de bovinos (HERATH et al., 2006; CRONIN et al., 2012). Além disso, foi evidenciado que existe uma correlação positiva entre a severidade da infecção uterina e os níveis circulantes de LPS no plasma (MATEUS et al., 2003), mostrando que existe uma infiltração dessa molécula nesses casos, e

que com isso a endotoxemia no útero pode ser capaz de gerar uma resposta sistêmica.

Um estudo realizado com duas infusões de LPS intramamário em bovinos de leite, com cinco dias de intervalo entre as aplicações, além de mostrar aumento na expressão de genes que atuam como mediadores inflamatórios no endométrio, também demonstrou um aumento de genes associados com a adesão celular, sendo eles *MMP19*, *EMMPRIN* e *SELL* também no endométrio (CAMPOS et al., 2018). Esses estão relacionados ao remodelamento do tecido do endométrio no período de pré-implantação do embrião, e auxiliam na correta fixação do embrião (BAUERSACHS et al., 2008; MISHRA et al., 2012; BAI et al., 2015).

Outro estudo realizado em camundongos desafiados com LPS demonstrou um aumento na expressão de genes relacionados com a pluripotência das células, envolvidos no processo de regeneração do endométrio, sendo eles *NANOG*, *SOX2* e *OCT4* (XIAO et al., 2017). Ambos os estudos demonstram que o LPS pode aumentar a expressão de genes associados com a adesão do embrião ao endométrio e com a correta regeneração do endométrio, o que ocorre através de um possível mecanismo compensatório, devido à importância desses genes para o início da gestação (BAI et al., 2015; XIAO et al., 2017). Corroborando com isso, um estudo realizado *in vitro* com explantes de endométrio também demonstrou que o LPS foi capaz de aumentar a expressão de uma série de genes envolvidos no processo de implante do embrião (GUO et al., 2019).

O endométrio uterino também possui a função de sintetizar a prostaglandina E_2 (PGE_2) e a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), que são importantes na regulação do corpo lúteo (POYSER, 1995). Sendo assim, elas são essenciais para a manutenção da prenhez e para a regulação do ciclo ovariano, a produção tanto de PGE_2 quanto de $PGF_{2\alpha}$ é regulada pela enzima Ciclo-oxigenase-2 (COX2) (AROSH et al., 2002). Nesse sentido, foi evidenciado que ocorre um aumento dos níveis PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ secretados pelo endométrio em resposta a desafios com LPS, devido ao processo de inflamação, e também existe um aumento da expressão de *PTGS2*, que resulta na enzima COX2 (HERATH et al., 2006). O aumento dos níveis de prostaglandina E_2 pode gerar uma interrupção da luteólise, prolongando período de corpo lúteo, causando alterações no ciclo ovariano (HERATH et al., 2006).

3 Metodologia

4.1 Animais e instalações

O experimento foi realizado em uma fazenda comercial pertencente ao frigorífico Espinilho, localizada no município de São Lourenço do Sul, no Rio Grande do Sul, Brasil. Foram utilizadas 16 novilhas de corte de raça europeia (Hereford/Angus), clinicamente saudáveis, com média de 14 meses de idade, pesando aproximadamente 330 kg, manejadas em sistema de confinamento intensivo. O fornecimento da dieta ocorria duas vezes ao dia com uma proporção de 60% volumoso e 40% concentrado, também era disponibilizado água à vontade. Todos os procedimentos realizados no estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil (Protocolo 9364).

4.2 Sincronização da onda folicular e tratamentos

O delineamento experimental (Figura 2) ocorreu da seguinte forma, quatorze dias antes de iniciar o experimento (D -14) os animais iniciaram um protocolo hormonal para sincronização da onda folicular, onde receberam uma dose intramuscular (i.m) de 25 mg de PGF_{2α} (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil). No dia zero do experimento (D0) foi realizada a colocação intravaginal do dispositivo liberador de progesterona (1g de P4, CIDR®, Zoetis®), mais uma injeção de 2 mg de Benzoato de estradiol (Gonadiol, Zoetis®) e 25 mg de PGF_{2α} (Lutalyse®, Zoetis) via i.m.

Os animais foram distribuídos uniformemente em dois grupos: o grupo LPS (n=8) que recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) contendo 0,5 µg/kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich® Missouri, EUA) via intravenosa, com intervalo de 24 horas, ou seja, no D1 e D2 do experimento; e o grupo controle (n=8) que recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) com o mesmo intervalo de tempo. A dose definida para esse experimento foi baseada no estudo de WALDRON et al. (2003), onde essa foi a menor dose utilizada capaz de gerar uma resposta imune sistêmica.

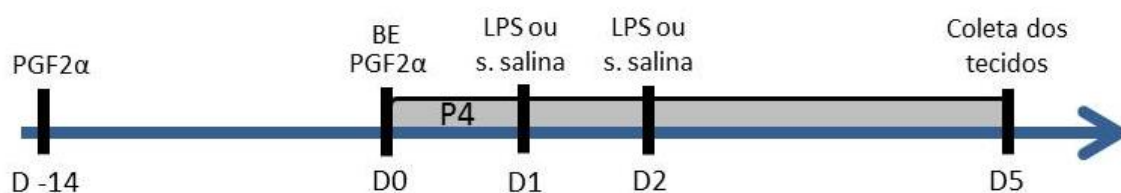


Figura 2. Delineamento experimental, demonstrando o protocolo de sincronização da onda folicular e os tratamentos utilizados (duas infusões de 0,5 µg/kg de LPS ou 0,9% de solução salina).

4.3 Avaliação da temperatura corporal

A temperatura corporal foi aferida desde a hora 0 até a hora 48 do experimento, com intervalos de 4 horas entre si, através de termômetros digitais data logger (Ibutton®, Thermochron, Whitewater, USA), implantados via intravaginal acoplados junto ao CIDR. Sendo considerado como hora 0 (H0) o momento da primeira aplicação do LPS, no D1.

4.4 Coleta de tecidos

Os animais foram abatidos no dia 5 do experimento no frigorífico Espinilho, onde foram feitas as coletas de tecidos do útero e oviduto. As amostras foram colocadas em criotubos, homogeneizadas com um mixer em 0,5mL de Trizol (Sigma Aldrich® Missouri, EUA) e armazenadas em nitrogênio líquido até serem transferidas para o freezer -80°C onde permaneceram até a extração de RNA para análises de expressão gênica.

4.5 Extração de RNA

O RNA total das amostras de oviduto e útero foi extraído usando trizol associado a um sistema de purificação por coluna, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram descongeladas e acrescentadas mais 0,5mL do Trizol, em seguida foram homogeneizadas no vórtex e passadas para um novo tubo do tipo eppendorf de 1,5mL. Foi feita uma primeira centrifugação de 12.000xg por 5 minutos à 4°C para retirar excedentes de tecido que não haviam sido completamente macerados, com isso o sobrenadante foi passado novamente para outros tubos. Para a separação do RNA foi adicionado 200µL de Clorofórmio (Sigma Aldrich® Missouri, EUA) ao lisado, que foram agitados por 15 segundos no vórtex e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. Depois foram centrifugados a

12.000xg por 15 minutos à 4°C para separação das fases, a parte aquosa contendo o RNA foi retirada e colocada em novos tubos.

A precipitação do RNA foi realizada adicionando Isopropanol (Sigma Aldrich® Missouri, EUA) gelado sendo o volume o dobro do retirado da fase aquosa (900µL de Isopropanol). Após isso, foi feita uma incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e foi centrifugado a 12.000xg por 10 minutos à 4°C, o RNA precipitado formou pellets visíveis em todas as amostras. Para lavagem do RNA foi removido o sobrenadante e adicionado Etanol (Sigma Aldrich® Missouri, EUA) a 75%, na mesma quantidade que havia sido adicionada de Isopropanol, passou por agitação no vórtex e foi centrifugado a 7.000xg por 5 minutos.

Para a secagem dos pellets o Etanol foi retirado cuidadosamente com a pipeta e os tubos eppendorfs ficaram abertos por 10 minutos secando a temperatura ambiente. O RNA foi eluído em 100µL de água ultra pura para a realização da sua purificação, o qual foi feito utilizando o kit comercial baseado em colunas RNeasy Cleanup (Qiagen®, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente a isso, a concentração e pureza do RNA foi medida utilizando o Nanodrop Lite (Thermo Fischer Scientific Inc.®, Waltham, MA, EUA), e foram diluídas para 200ng para a síntese do cDNA.

4.6 PCR em tempo real para análises de expressão gênica

O cDNA foi realizado utilizando o kit iScript Synthesis (BIORAD®, Hercules, CA, EUA) e conduzido com 1000ng de RNA total em uma reação de 20µL. As amostras foram incubadas à 25°C por 5 minutos, 42°C por 20 minutos e 95°C por 1 minuto. Após isso o cDNA foi diluído para uma concentração de 5ng/µL, e foi realizada a PCR em tempo real utilizando GoTaq (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega, Madison, WI, USA) com um volume de reação de 15µL, sendo esses 5µL da GoTaq, 0,75µL de cada primer (5µM), 4,5µL de água ultra pura e 4µL de cDNA (20ng), sendo cada amostra realizada em duplicata.

As reações ocorreram no termociclador EcoT^M Real-Time PCR System (Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA) sendo realizado 1 ciclo de 45°C por 2 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final da reação foi realizada a curva de dissociação (Melting) para checagem da amplificação de um único produto de PCR. Os genes do *RN18S1* (inglês *18S ribosomal RNA*) e *GAPDH*

(do inglês *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) foram utilizados como controle endógeno no útero e no oviduto.

As análises de expressão gênica foram realizadas utilizando genes alvos ligados à resposta inflamatória, reconhecimento do LPS e estresse térmico no útero e oviduto: *IL-1 β* (do inglês *interleukin 1 beta*), *TNF* (do inglês *tumor necrosis fator*), *TLR4* (do inglês *toll like receptor 4*) e *HSPA1A* (do inglês *heat shock protein family A (Hsp70) member 1A*), qualidade do ambiente do oviduto: *CASP3* (do inglês *caspase 3*) e *IGF2* (do inglês *insulin like growth factor 2*), e qualidade do ambiente uterino: *PTGS2* (do inglês *prostaglandin-endoperoxide synthase*) e *NANOG* (do inglês *nanog homeobox*). As sequências dos primers utilizados estão listadas na tabela 1.

A expressão relativa foi calculada a partir da equação $2^{A-B}/2^{C-D}$ (em que A é o valor limiar do ciclo [Ct] para o gene de interesse na primeira amostra do controle; B, o valor de Ct para o gene de interesse na amostra analisada; C, o valor de Ct para o gene H2A na primeira amostra do controle e D, o número Ct para o gene H2A na amostra analisada). A primeira amostra do controle foi expressa como 1,00 por esta equação, e todas as outras amostras foram calculadas em relação a este valor. Depois disso, os resultados do grupo controle (Solução salina i.v.) foram ponderadas, e todos os outros resultados foram divididos pelo valor médio da expressão relativa no grupo controle, para se obter a mudança na expressão dos genes de interesse em comparação com o grupo de controle (*fold change*) (MASTERNAK et al., 2005).

Tabela 1 – Lista de sequência dos primers utilizados nas análises de expressão gênica.

Gene	Sequência 5' → 3'	Número de acesso	Referência
<i>CASP3</i>	F: TGCAGAAGTCTGACTGGAAAACCCA AAC	NM_001077840.1	(ILHA et al., 2015)
	R: TCATCCTCAGCACCCTGTCTGTCTC		
<i>PTGS2</i>	F: TTTGACCCAGAGCTGCTTTT	NM_174445.2	(DA ROSA et al., 2016)
	R: GAAAGACGTCAGGCAGAAGG		
<i>GAPDH</i>	F: GATTGTCAGCAATGCCTCCT	NM_001034034.2	(ROVANI et al., 2017)
	R: GGTCATAAGTCCCTCCACGA		
<i>HSPA1A</i>	F: GGGGAGGACTTCGACAACAG	NM_203322.3	Este estudo
	R: GAAGTCGATGCCCTCGAACA		
<i>IGF2</i>	F: ACCCTCCAGTTTGTCTGTGG	NM_001367627.1	(PARRAGUEZ et al., 2013)
	R: ACACATCCCTCTCGGACTTG		
<i>IL-1β</i>	F: GAGAGGGTTTCCATTCTGAAGT	NM_174093.1	(ROVANI et al., 2017)
	R: CATCAGCACTTCTCAAATCGAAGA		

<i>NANOG</i>	F: AGTCCCAAACAAAAGCTCTCAAGT R: AGAACACAGTCCGCATCTTCTG	NM_001025344.1	Este estudo
<i>RN18S1</i>	F: CCTTCCGCGAGGATCCATTG R: CGCTCCCAAGATCCAACACTAC	NR_036642.1	(ROVANI et al., 2017)
<i>TLR4</i>	F: CTTGCGTACAGGTTGTTCTAA R: CTGGGAAGCTGGAGAAGTTATG	NM_174198.6	CAMPOS et al. (2017)
<i>TNF</i>	F: AGCACAGAAAGCATGATCCG R: CTGATGAGAGGGAGGCCATT	NM_173966.3	CAMPOS et al. (2017)

4.7 Análises estatísticas

A análise estatística da temperatura corporal foi realizada utilizando ANOVA de Medidas Repetida no software NCSS 2004 (NCSSNumber Cruncher Statistical Systems. Kaysville, Utah). E, a análise de expressão gênica foi realizada utilizando test t no GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Foi considerado como diferença estatística valores de $P < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Efeitos do LPS na temperatura corporal

O grupo LPS apresentou maior temperatura corporal 4 horas após cada um dos desafios ($P < 0,05$), ou seja, nas horas 4 e 28 do experimento (figura 3). Na hora 4 a temperatura do grupo LPS foi de $39,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$ enquanto que a do grupo controle foi de $39,1 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Na hora 28, a temperatura do grupo LPS e do controle foram, respectivamente, de $40,4^\circ\text{C} \pm 0,3^\circ\text{C}$ e $39,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

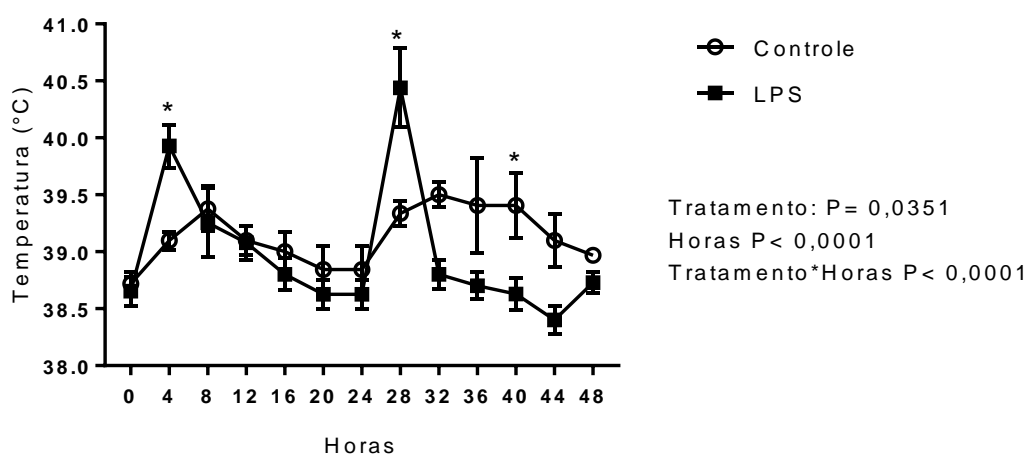


Figura 3. Temperatura corporal de novilhas desafiadas ou não com duas doses de LPS ($0,5\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) com intervalo de 24h.

Contudo, o grupo LPS obteve menor temperatura 16 horas após o segundo desafio ($P < 0,05$). Ou seja, na hora 40 do experimento, onde a temperatura do grupo LPS foi de $38,6 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e a do grupo controle de $39,4 \pm 0,3^\circ\text{C}$.

5.2 Efeito do LPS na expressão de genes no oviduto

O desafio das duas doses de LPS em novilhas não apresentou efeito na expressão dos genes *TLR4*, *TNF*, *IL1 β* , *HSPA1A*, *CASP3* e *IGF2* ($P > 0,05$) no oviduto, figura 4.

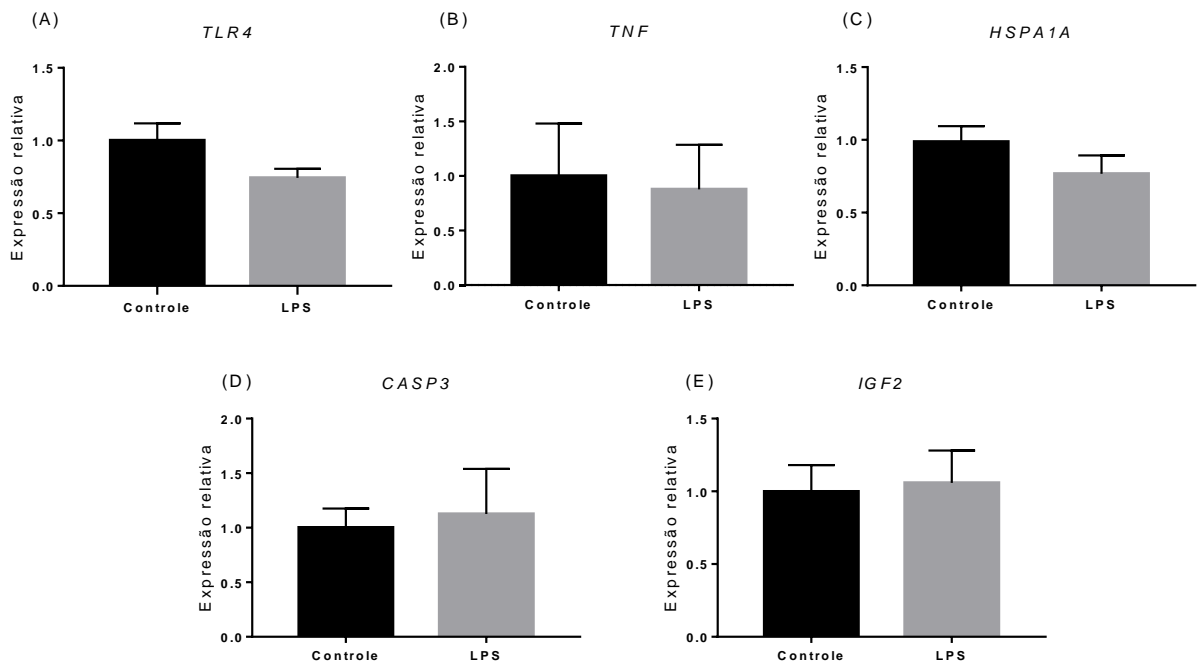


Figura 4. Expressão relativa dos genes (A) *TLR4*, (B) *TNF*, (C) *HSPA1A*, (D) *CASP3* e (F) *IGF2* no oviduto de novilhas desafiadas (n=8) ou não (n=8) com duas doses de LPS (0,5µg/kg de peso corporal) com intervalo de 24h.

5.3 Efeito do LPS na expressão de genes no útero

Foi observado um efeito do tratamento nos genes relacionados à qualidade do ambiente uterino em animais desafiados com o LPS, sendo uma diminuição de 50% na expressão de *PTGS2* ($P=0,024$) e de 92% na expressão de *NANOG* ($P=0,020$). No entanto, não foi observada influência das doses de LPS ($P>0,05$) nos genes relacionados ao reconhecimento do LPS, *TLR4*, inflamação, *TNF* e *IL-1 β* , e estresse térmico, *HSPA1A* no útero dos animais.

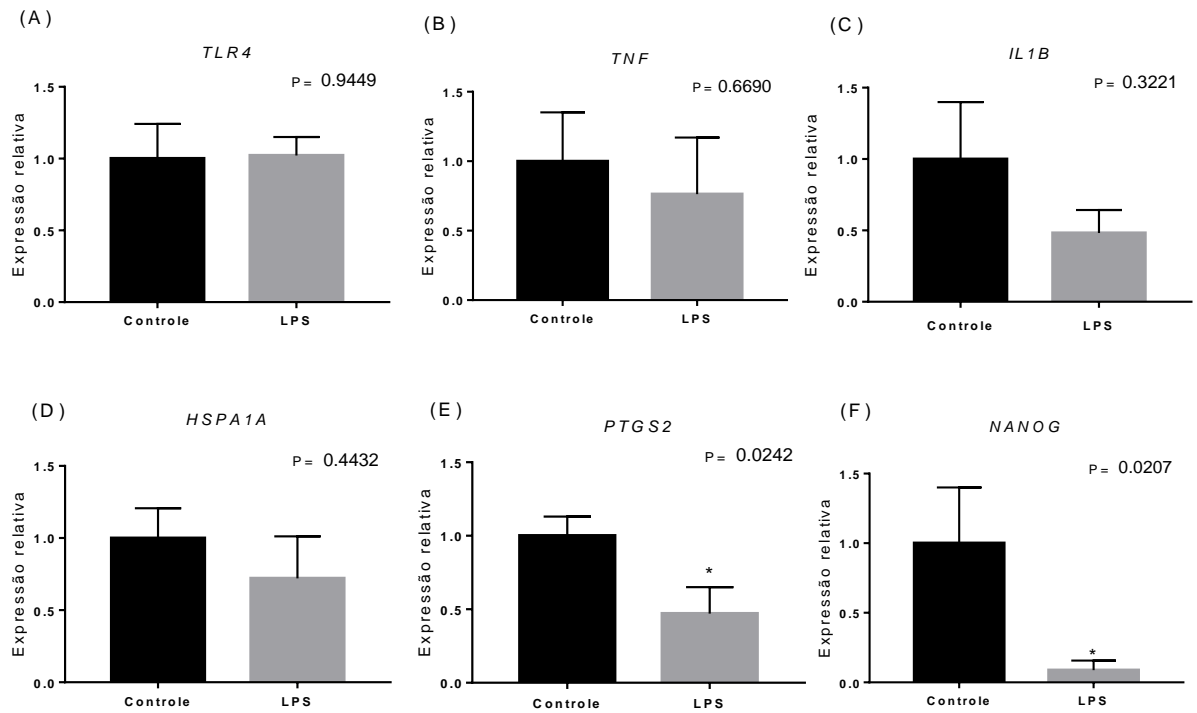


Figura 5. Expressão relativa dos genes (A) *TLR4*, (B) *TNF*, (C) *IL1β*, (D) *HSPA1A*, (E) *PTGS2* e (F) *NANOG* no útero de novilhas desafiadas (n=8) ou não (n=8) com duas doses de LPS (0,5μg/kg de peso corporal) com intervalo de 24h.

6 Discussão

Neste estudo, a inflamação que é gerada pelo aumento de LPS na corrente sanguínea em doenças clínicas ou subclínicas, sejam elas infecciosas ou metabólicas, foi mimetizada através da aplicação de duas doses de LPS, onde buscamos avaliar o seu efeito na expressão de genes ligados à resposta imune e qualidade do ambiente para gestação, nos tecidos de oviduto e útero.

Os resultados de temperatura corporal demonstram que as doses de LPS utilizadas foram suficientes para gerar uma resposta imune sistêmica nos animais, suportado pelo aumento de temperatura 4 horas após cada aplicação do tratamento, como demonstrado em outros estudos que utilizaram o LPS para simular inflamação, porém em diferentes doses (CAMPOS et al., 2017; FERNANDES et al., 2019). Nesses momentos, 4 horas após o tratamento, a temperatura do grupo LPS configura como de febre, sendo maior que 39,6°C (ZEBELI et al., 2013). Contudo, a temperatura do grupo controle também se elevou comparado com o início do experimento, indicando um estresse desses animais possivelmente pelo manejo, porém a temperatura média mais alta do grupo controle foi de 39,5°C, estando ainda dentro dos valores fisiológicos, enquanto que a do grupo LPS foi de 40,4°C, indicando febre elevada. Por outro lado, o grupo LPS apresentou uma maior temperatura após a segunda aplicação do que após a primeira, o que sugere um desenvolvimento de sensibilização ao LPS, e devido também à presença de pequenas doses da molécula pela aplicação anterior, gerando uma resposta mais intensa, conforme sugerido por FERNANDES et al. (2016). Além disso, os animais do grupo LPS, apresentaram menor temperatura corporal do que o grupo controle na hora 40, isto provavelmente ocorreu por uma resposta compensatória do organismo. Em um primeiro momento a endotoxemia leva o hospedeiro a desenvolver uma resposta inflamatória, envolvendo citocinas que estimulam a febre, e em um segundo momento há uma resposta compensatória, envolvendo o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, com liberação de vasopressinas e outras moléculas que limitam a febre e em alguns casos este mecanismo pode causar uma hipotermia (GIUSTI-PAIVA, 2003).

Apesar do aumento de temperatura, as condições experimentais não afetaram a expressão de *TLR4* no oviduto e nem no útero no momento avaliado, sendo este o principal receptor de reconhecimento do LPS pelas células do organismo (HERATH et al., 2006; MENCHETTI et al., 2018). Contudo, experimentos *in vitro* em células do oviduto ou do endométrio reportaram aumento na expressão de *TLR4* 24 horas após o desafio com LPS (SWANGCHAN-UTHAI et al., 2012; IBRAHIM et al., 2015), como também em um estudo que avaliou a própria infiltração do LPS na corrente sanguínea por acidose e evidenciou aumento da expressão de *TLR4* no útero (BILAL et al., 2016). Além disso, MENCHETTI et al. (2018), observaram em coelhos desafiados com LPS, um aumento de *IL1 β* nos tecidos de oviduto e útero e de *TNF* somente no oviduto, porém HERATH et al. (2006); CRONIN et al. (2012) reportaram *in vivo* no endométrio, aumento da expressão dos mediadores inflamatórios *IL1 β* , *IL6*, *IL8* e *TNF*. Contudo, CRONIN et al. (2012) mostram que quando é feito *knockdown* do gene do *TLR4* ocorre ao mesmo tempo uma diminuição de mediadores inflamatórios, como *IL1 β* , *IL6* e *IL8*, indicando que os receptores *TLR4* estão diretamente relacionados com a indução da inflamação. Isso corrobora nossos resultados, pois nas condições do nosso experimento, o LPS não afetou na expressão de *TLR4* no oviduto e nem no útero, e como consequência disso, os mediadores inflamatórios *TNF* e *IL1B* também não foram alterados. Isto pode ter ocorrido pelo curto tempo de exposição dos animais ao LPS, que apesar de gerar uma resposta sistêmica, não foi o suficiente ocasionar efeito em tecidos específicos como o útero e oviduto, ou também, ao contrário disso, pode ter ocorrido pelo tempo entre a última aplicação de LPS e a coleta dos tecidos. Um exemplo disso pode ser o trabalho apresentado por SWANGCHAN-UTHAI et al. (2012), que demonstrou *in vitro* em células endometriais que frente à exposição ao LPS a expressão de *TNF* aumenta na primeira hora e de *IL6* se eleva seis horas após a indução, sendo que em 24 horas esses níveis já retornaram ao normal, porém vale ressaltar que *in vitro* existe uma exposição muito maior das células ao LPS o que torna alguns parâmetros diferentes dos encontrados *in vivo*.

No oviduto, não houve influência das doses de LPS aplicadas na expressão dos genes *CASP3* e *IGF2*. A *CASP3* é uma das principais enzimas que induzem a apoptose das células (CROWLEY e WATERHOUSE, 2016), já o *IGF2* pode ser considerado como um marcador da qualidade do ambiente materno para o

desenvolvimento embrionário inicial, visto que está associado com maior número de células em blastocistos e melhor taxa de nascimento de bezerros saudáveis (NEIRA et al., 2010). Ao contrário do nosso estudo, existiu um aumento na expressão de *CASP3* frente a um estímulo com LPS em células do oviduto bovino *in vitro* (IBRAHIM et al., 2015) e *ex vivo* (O'DOHERTY et al., 2016), demonstrando a relação do LPS com morte celular. Da mesma forma, o gene *IGF2* foi estudado *in vitro* em células do oviduto bovino, e foi evidenciada uma redução na sua expressão pelo desafio com LPS (IBRAHIM et al., 2015), indicando que as endotoxemias podem reduzir a qualidade do ambiente materno do oviduto. Contudo esses resultados não foram observados *in vivo* no presente trabalho, podendo ser por conta da dose utilizada não ter sido suficiente, pelo tempo de exposição ou pelo tempo decorrido entre a aplicação do LPS e a coleta das amostras de oviduto.

No útero, o desafio com as duas doses de LPS reduziu pela metade a expressão de *PTGS2*, que resulta na enzima COX2. A COX2 é capaz de converter o ácido araquidônico em prostaglandina H sintase 2 (PGH2), que por sua vez é a precursora da biossíntese de vários prostanóides, incluindo a prostaglandina E2 (PGE_2) e a prostaglandina F 2α ($PGF_{2\alpha}$) (HELLIWELL et al., 2004). É evidenciado em estudos tanto *in vivo* em bovinos e em outras espécies quanto em *ex vivo* com tecidos bovinos, que o LPS é capaz de desregular a produção de prostaglandinas via reconhecimento por TLR4, aumentando a secreção de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ pelas células endometriais (MATEUS et al., 2003; HERATH et al., 2006; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2010). Além disso, a indução por LPS também estimula a expressão de *PTGS2* e alguns estudos indicam uma correlação entre a expressão de *PTGS2* com a concentração de PGE_2 e de $PGF_{2\alpha}$ no sangue ou em explantes de endométrio bovino (HERATH et al., 2006; SILVA et al., 2008). Altas concentrações de PGE_2 no lúmen uterino estão relacionadas com atraso na involução uterina e severidade e persistência das doenças infecciosas em bovinos (SLAMA et al., 1991; MATEUS et al., 2003; SILVA et al., 2008), corroborando com isso, em estudos *in vitro* existe uma dose-dependência entre a concentração de LPS aplicada e a secreção de PGE_2 (HERATH et al., 2006). A duração do ciclo ovariano e também a manutenção da prenhez, está relacionada diretamente com a presença do corpo lúteo ativo, contudo ele é regulado pela PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ (POYSER, 1995). A secreção de $PGF_{2\alpha}$ induz a regressão do corpo lúteo (luteólise) e, com isso, reinicia uma nova onda folicular no ciclo ovariano, já a PGE_2 é responsável por manter o corpo lúteo

ativo, principalmente durante a gestação, evitando a luteólise (PARENT e FORTIER, 2005). Visto isso, esses trabalhos demonstram que as endotoxemias podem levar a uma luteólise precoce, ocasionando em perdas de gestação, ou por outro lado, estender o tempo de vida do corpo lúteo, retardando o processo de ovulação (OPSOMER et al., 2000). No entanto, no presente estudo, utilizando duas doses de LPS, ocorreu o contrário do encontrado na literatura com outras abordagens de delineamento experimental, houve uma diminuição da expressão de *PTGS2*, o que poderia reduzir a produção de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, visto que a *COX2* é essencial para a produção destas prostaglandinas e que existe uma relação entre o aumento de *COX2* com o também aumento de PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ (MARINI et al., 2016). Essa diferença entre os resultados pode ocorrer justamente pelas divergências entre os próprios estudos, sendo que a maior parte deles foi realizada *in vitro* ou *ex vivo*, e também pode divergir dos estudos *in vivo* devido ao ciclo estral que os animais se encontravam no momento do período experimental, visto que no estudo de MATEUS et al. (2003), as vacas não haviam passado por sincronização hormonal. Além disso, essa redução que ocorreu em nossas análises, também pode desregular a secreção das prostaglandinas e afetar o funcionamento do corpo lúteo, atrasando o ciclo estral ou ocasionando abortos em caso de prenhez, sendo necessárias mais avaliações para confirmar estas hipóteses.

O desafio com LPS também gerou uma redução de 92% na expressão de *NANOG* no útero. Esse gene está associado com a pluripotência celular, sendo importante na regeneração dos tecidos frente a injúrias (JAENISCH e YOUNG, 2008). Além disso, também foi observado que o *NANOG* atua na regulação da resposta inflamatória em células microgliais, através de um possível mecanismo de inibição de fatores pró-inflamatórios (ZHOU et al., 2012). Ao contrário do nosso resultado, em camundongos desafiados com LPS houve um aumento da expressão de *NANOG* com pico às 6 horas após a aplicação e com retorno da sua expressão basal 24h após o desafio (XIAO et al., 2017), isso foi demonstrado igualmente tanto na expressão gênica quanto proteica. A função do *NANOG* em embriões é bem elucidada, um *knockdown* de *NANOG* nos embriões de cabra diminuiu o número de células do trofoblasto (HABIBI et al., 2018), que atua na implantação do embrião no endométrio. Entretanto, no endométrio a função do gene ainda não é clara, sabe-se que as células-tronco estão presentes no endométrio na presença ou não de danos no tecido e podem se diferenciar em células epiteliais ou estromais do endométrio

(TAYLOR, 2004), esse gene pode regular a diferenciação dessas células (CALLONI et al., 2013), promovendo o desenvolvimento normal do endométrio, essencial para a implantação do embrião e para a manutenção da gestação (SPENCER et al., 2004; GARGETT e HEALY, 2011). Tendo isso em vista, no trabalho com camundongos pode ter ocorrido um aumento da expressão de *NANOG* por medida compensatória do endométrio, no entanto, no presente estudo, pelo tempo decorrido entre os desafios e a coleta do endométrio, pode ser que esse mecanismo compensatório não foi o suficiente pelos danos causados ao tecido, o que reduziu a expressão do gene. Essa diminuição de *NANOG* pode trazer prejuízos à manutenção da prenhez, visto que o bom funcionamento do endométrio é essencial para a implantação do embrião (GARGETT e HEALY, 2011). Ademais, em bovinos, foi demonstrada uma relação que quanto mais jovens os animais maior a expressão de *NANOG* no endométrio (LUPICKA et al., 2015), e no presente estudo foram utilizadas novilhas, demonstrando que ainda assim a expressão do gene foi reduzida em 92%.

7 Considerações finais

Este foi o primeiro estudo *in vivo* em bovinos que utilizou duas doses de LPS, com intervalo de 24 horas entre si, para avaliação da expressão de genes ligados à qualidade do ambiente do oviduto e do útero, importantes para recebimento de uma possível prenhez. Como resultados, obtivemos uma redução da expressão dos genes *PTGS2* e *NANOG* no útero, resultado também inédito em experimentos com LPS, demonstrando que as endotoxemias podem ter efeito prolongado/retardatório no organismo, quando os mecanismos de compensação não são suficientes. Esse resultado é de grande valia, visto que mesmo com apenas duas doses de LPS, demonstrou que as endotoxemias podem afetar a capacidade de regeneração do endométrio e, além disso, pode causar prejuízos na viabilidade do corpo lúteo, influenciando o andamento do ciclo estral e com isso no bom funcionamento das técnicas reprodutivas aplicadas nas propriedades, afetando nas taxas de prenhez dos rebanhos. Além disso, vale ressaltar que os animais estão em exposição constante ao LPS e nesse experimento, isso foi representado por apenas 2 doses repetidas, indicando que por ocorrência natural esses casos podem ser até mesmo agravados. No entanto, neste trabalho não foi possível observar ação do LPS nos genes avaliados no oviduto (*CASP3* e *IGF2*) e nem de genes ligados à inflamação em ambos tecidos no momento avaliado. Contudo, as únicas duas doses administradas foram o suficiente para estimular uma inflamação sistêmica, sustentada pelo aumento de temperatura corporal 4 horas após cada aplicação de LPS. A fim de confirmar nossos resultados obtidos neste trabalho e também de tentar traçar as rotas pelas quais eles ocorreram, iremos realizar mais análises futuramente, como expressão de mais genes ligados à qualidade no oviduto (*OVGP1* e *SOD*), à implantação de embriões no endométrio (*SELL*, *EMMPRIN* e *MMP19*), e também relacionados com expressão de *NANOG* (*OCT4* e *SOX2*).

Referências

ABIEC. BeefReport: Perfil da Pecuária no Brasil. 2019.

AGRAWAL, V.; JAISWAL, M.K.; JAISWAL, Y.K. Lipopolysaccharide-induced modulation in the expression of progesterone receptor and estradiol receptor leads to early pregnancy loss in mouse. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 21, n. 4, p. 337-44, 2013.

ALGARRA, B.; MAILLO, V.; AVILÉS, M.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; RIZOS, D.; JIMÉNEZ-MOVILLA, M. Effects of recombinant OVGp1 protein on in vitro bovine embryo development. **J Reprod Dev**, v. 64, n. 5, p. 433-443, 2018.

AMAR, J.; BURCELIN, R.; RUIDAVETS, J.B.; CANI, P.D.; FAUVEL, J.; ALESSI, M.C.; CHAMONTIN, B.; FERRIERES, J. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. **The American journal of clinical nutrition**, v. 87, n. 5, p. 1219-23, 2008.

ARBEX, W.; MARTINS, P.C. O leite e o protagonismo na Revolução 4.0. **Anuário Leite - Embrapa**, 2019.

AROSH, J.A.; PARENT, J.; CHAPDELAINE, P.; SIROIS, J.; FORTIER, M.A. Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. **Biol Reprod**, v. 67, n. 1, p. 161-9, 2002.

BAI, R.; KUSAMA, K.; SAKURAI, T.; BAI, H.; WANG, C.; ZHANG, J.; KUSE, M.; IDETA, A.; AOYAGI, Y.; OKUDA, K.; IMAKAWA, K. The Role of Endometrial Selectins and Their Ligands on Bovine Conceptus Attachment to the Uterine Epithelium During Peri-Implantation Period. **Biol Reprod**, v. 93, n. 2, p. 46, 2015.

BARREIRO, J.R.; GONCALVES, J.L.; GRENFELL, R.; LEITE, R.F.; JULIANO, L.; SANTOS, M.V. Direct identification of bovine mastitis pathogens by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in pre-incubated milk. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 49, n. 4, p. 801-807, 2018.

BAUERSACHS, S.; MITKO, K.; ULBRICH, S.E.; BLUM, H.; WOLF, E. Transcriptome studies of bovine endometrium reveal molecular profiles characteristic for specific stages of estrous cycle and early pregnancy. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v. 116, n. 7, p. 371-84, 2008.

BAUMAN, D.E.; BRUCE CURRIE, W. Partitioning of Nutrients During Pregnancy and Lactation: A Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. **Journal of dairy science**, v. 63, n. 9, p. 1514-1529, 1980.

BERTANI, B.; RUIZ, N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.

BIDNE, K.L.; DICKSON, M.J.; ROSS, J.W.; BAUMGARD, L.H.; KEATING, A.F. Disruption of female reproductive function by endotoxins. **Reproduction**, v. 155, n. 4, p. R169-R181, 2018.

BILAL, M.S.; ABAKER, J.A.; UL AABDIN, Z.; XU, T.; DAI, H.; ZHANG, K.; LIU, X.; SHEN, X. Lipopolysaccharide derived from the digestive tract triggers an inflammatory response in the uterus of mid-lactating dairy cows during SARA. **BMC veterinary research**, v. 12, n. 1, p. 284, 2016.

BIRHANU, M.; LETA, S.; MAMO, G.; TESFAYE, S. Prevalence of bovine subclinical mastitis and isolation of its major causes in Bishoftu Town, Ethiopia. **BMC research notes**, v. 10, n. 1, p. 767, 2017.

BODE, J.G.; ALBRECHT, U.; HAUSSINGER, D.; HEINRICH, P.C.; SCHAPER, F. Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-kappaB-dependent signaling. **European journal of cell biology**, v. 91, n. 6-7, p. 496-505, 2012.

BONATO, D.V.; TAIRA, A.R.; TIRONI, S.M.T.; RIBEIRO, I.P.; CUNHA, M.S.; BORGES, L.P.B.; SCHMITT, T.M.; SANTOS, W.J.D.; SZNICER, P.P.G.; VRISMAN, D.P.; PEREIRA, L.F.; TEIXEIRA, P.P.M. Estudo morfométrico do aparelho reprodutor de vacas na região de Guarapuava-PR. **Investigação**, v. 14, n. 1, p. 23-25, 2015.

BONE, R.C. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. **Critical care medicine**, v. 24, n. 1, p. 163-72, 1996.

BROMFIELD, J.J.; SHELDON, I.M. Lipopolysaccharide initiates inflammation in bovine granulosa cells via the TLR4 pathway and perturbs oocyte meiotic progression in vitro. **Endocrinology**, v. 152, n. 12, p. 5029-40, 2011.

BROMFIELD, J.J.; SHELDON, I.M. Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo. **Biol Reprod**, v. 88, n. 4, p. 98, 2013.

BUSO, R.R.; CAMPOS, C.C.; SANTOS, T.T.; SAUT, J.P.E.; SANTOS, R.M. Retenção de placenta e endometrite subclínica: prevalência e relação com o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras mestiças. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 38, n. 1, p. 1-5, 2018.

CALLONI, R.; CORDERO, E.A.; HENRIQUES, J.A.; BONATTO, D. Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. **Stem cells and development**, v. 22, n. 9, p. 1455-76, 2013.

CAMPOS, C.C.; HARTLING, I.; KAUR, M.; FERNANDES, A.C.C.; SANTOS, R.M.; CERRI, R.L.A. Intramammary infusion of lipopolysaccharide promotes inflammation and alters endometrial gene expression in lactating Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 11, p. 10440-10455, 2018.

CAMPOS, F.T.; RINCON, J.A.A.; ACOSTA, D.A.V.; SILVEIRA, P.A.S.; PRADIEÉ, J.; CORREA, M.N.; GASPERIN, B.G.; PFEIFER, L.F.M.; BARROS, C.C.; PEGORARO, L.M.C.; SCHNEIDER, A. The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle. **Theriogenology**, v. 89, p. 244-249, 2017.

CARVALHO, G.R.; ROCHA, D.T. O leite em 2018 e perspectivas para 2019. **Anuário Leite - Embrapa**, 2019.

CARVALHO, N.L.; BEURON, D.C.; DOS SANTOS, M.V. Impactos econômicos da mastite. **Revista Leite Integral**, 2012.

CNA. Balanço 2018 e Perspectivas 2019. 2018.

CRONIN, J.G.; TURNER, M.L.; GOETZE, L.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. 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. **Biol Reprod**, v. 86, n. 2, p. 51, 2012.

CROWLEY, L.C.; WATERHOUSE, N.J. Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2016, n. 11, 2016.

CRUZ-MACHADO, S.S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFKB **Revista da Biologia - USP**, v. 4, p. 40-43, 2010.

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY, E.J.F.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 60, n. 1, p. 19-24, 2008.

DA ROSA, P.; DAU, A.; DE CESARO, M.P.; DOS SANTOS, J.T.; GASPERIN, B.G.; DUGGAVATHI, R.; BORDIGNON, V.; GONCALVES, P. Mechanistic target of rapamycin is activated in bovine granulosa cells after LH surge but is not essential for ovulation. **Reprod Domest Anim**, v. 51, n. 5, p. 766-73, 2016.

ESPOSITO, G.; IRONS, P.C.; WEBB, E.C.; CHAPWANYA, A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal reproduction science**, v. 144, n. 3, p. 60-71, 2014.

FERNANDES, A.C.C. **Efeito de infusões intravenosas e intramamárias de lipopolissacarídeo (LPS) sobre parâmetros inflamatórios, reprodutivos e metabólicos em novilhas e vacas da raça holandesa**. 2016. 149 f. Tese (Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

FERNANDES, A.C.C.; DAVOODI, S.; KAUR, M.; VEIRA, D.; MELO, L.E.H.; CERRI, R.L.A. Effect of repeated intravenous lipopolysaccharide infusions on systemic inflammatory response and endometrium gene expression in Holstein heifers. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 4, p. 3531-3543, 2019.

FIORENTIN, E.L. **Incidência de transtornos metabólicos subclínicos em bovinos leiteiros na região oeste de Santa Catarina**. 2016. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

FURKEN, C.; NAKAO, T.; HOEDEMAKER, M. Energy balance in transition cows and its association with health, reproduction and milk production. **Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere**, v. 43, n. 6, p. 341-9, 2015.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999.

GANDOLFI, F.; MOOR, R.M. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. **Journal of reproduction and fertility**, v. 81, n. 1, p. 23-8, 1987.

GARGETT, C.E.; HEALY, D.L. Generating receptive endometrium in Asherman's syndrome. **Journal of human reproductive sciences**, v. 4, n. 1, p. 49-52, 2011.

GETANEH, A.M.; GEBREMEDHIN, E.Z. Meta-analysis of the prevalence of mastitis and associated risk factors in dairy cattle in Ethiopia. **Trop Anim Health Prod**, v. 49, n. 4, p. 697-705, 2017.

GILBERT, R.O.; SHIN, S.T.; GUARD, C.L.; ERB, H.N.; FRAJBLAT, M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p. 1879-88, 2005.

GIUSTI-PAIVA, A et al. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, Ribeirão Preto, v. 447, p. 175–180, 2003.

GRIFFITHS, G.S.; MILLER, K.A.; GALILEO, D.S.; MARTIN-DELEON, P.A. Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency. **Reproduction**, v. 135, n. 3, p. 293-301, 2008.

GROSS, J.J.; BRUCKMAIER, R.M. Review: Metabolic challenges in lactating dairy cows and their assessment via established and novel indicators in milk. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v. 13, n. S1, p. s75-s81, 2019.

GUIMARAES, J.L.B.; BRITO, M.; LANGE, C.C.; SILVA, M.R.; RIBEIRO, J.B.; MENDONCA, L.C.; MENDONCA, J.F.M.; SOUZA, G.N. Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. **Prev Vet Med**, v. 142, p. 46-50, 2017.

GUO, Y.; VAN SCHAİK, T.; JHAMAT, N.; NIAZI, A.; CHANROT, M.; CHARPIGNY, G.; VALARCHER, J.F.; BONGCAM-RUDLOFF, E.; ANDERSSON, G.; HUMBLOT, P. Differential gene expression in bovine endometrial epithelial cells after challenge with LPS; specific implications for genes involved in embryo maternal interactions. **PLoS One**, v. 14, n. 9, p. e0222081, 2019.

GUSSMANN, M.; STEENEVELD, W.; KIRKEBY, C.; HOGEVEEN, H.; FARRE, M.; HALASA, T. Economic and epidemiological impact of different intervention strategies for subclinical and clinical mastitis. **Prev Vet Med**, v. 166, p. 78-85, 2019.

HABIBI, R.; HOSSEINI, S.M.; ZADEGAN, F.G.; HAJIAN, M.; OSTADHOSSEINI, S.; VASH, N.T.; NADDAFPOUR, A.; NASR ESFAHANI, M.H. Functional characterization of NANOG in goat pre-implantation embryonic development. **Theriogenology**, v. 120, p. 33-39, 2018.

HAMMON, D.S.; EVJEN, I.M.; DHIMAN, T.R.; GOFF, J.P.; WALTERS, J.L. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 113, n. 1-2, p. 21-9, 2006.

HASSAN, A.A.; COUTINHO, C.P.; SA-CORREIA, I. Burkholderia cepacia Complex Species Differ in the Frequency of Variation of the Lipopolysaccharide O-Antigen Expression During Cystic Fibrosis Chronic Respiratory Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 273, 2019.

HAWKESWORTH, S.; MOORE, S.E.; FULFORD, A.J.C.; BARCLAY, G.R.; DARBOE, A.A.; MARK, H.; NYAN, O.A.; PRENTICE, A.M. Evidence for metabolic endotoxemia in obese and diabetic Gambian women. **Nutr Diabetes**, v. 3, n. 8, p. e83-e83, 2013.

HELLIWELL, R.J.; ADAMS, L.F.; MITCHELL, M.D. Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 70, n. 2, p. 101-13, 2004.

HERATH, S.; FISCHER, D.P.; WERLING, D.; WILLIAMS, E.J.; LILLY, S.T.; DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 562-70, 2006.

HERATH, S.; WILLIAMS, E.J.; LILLY, S.T.; GILBERT, R.O.; DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. **Reproduction**, v. 134, n. 5, p. 683-93, 2007.

IBRAHIM, S.; SALILEW-WONDIM, D.; RINGS, F.; HOELKER, M.; NEUHOFF, C.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TEFAYE, D. Expression pattern of inflammatory response genes and their regulatory micrnas in bovine oviductal cells in response to lipopolysaccharide: implication for early embryonic development. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119388, 2015.

ILHA, G.F.; ROVANI, M.T.; GASPERIN, B.G.; ANTONIAZZI, A.Q.; GONCALVES, P.B.; BORDIGNON, V.; DUGGAVATHI, R. Lack of FSH support enhances LIF-STAT3 signaling in granulosa cells of atretic follicles in cattle. **Reproduction**, v. 150, n. 4, p. 395-403, 2015.

INGVARTSEN, K.L. Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3, p. 175-213, 2006.

JAENISCH, R.; YOUNG, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 567-82, 2008.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. **Trends in biochemical sciences**, v. 27, n. 9, p. 474-82, 2002.

KAUFMANN, T.B.; DRILLICH, M.; TENHAGEN, B.A.; FORDERUNG, D.; HEUWIESER, W. Prevalence of bovine subclinical endometritis 4h after insemination and its effects on first service conception rate. **Theriogenology**, v. 71, n. 2, p. 385-91, 2009.

KAWAI, T.; TAKEUCHI, O.; FUJITA, T.; INOUE, J.; MUHLRADT, P.F.; SATO, S.; HOSHINO, K.; AKIRA, S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 167, n. 10, p. 5887-94, 2001.

KILLIAN, G.J. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. **Animal reproduction science**, v. 82-83, p. 141-53, 2004.

LAVON, Y.; KAIM, M.; LEITNER, G.; BIRAN, D.; EZRA, E.; WOLFENSON, D. Two approaches to improve fertility of subclinical mastitic dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 3, p. 2268-2275, 2016.

LEBLANC, S.J.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E.; BATEMAN, K.G.; KEEFE, G.P.; WALTON, J.S.; JOHNSON, W.H. Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 9, p. 2223-2236, 2002.

LEBLANC, S.J.; LISSEMORE, K.D.; KELTON, D.F.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 4, p. 1267-79, 2006.

LHERMIE, G.; TAUER, L.W.; GROHN, Y.T. The farm cost of decreasing antimicrobial use in dairy production. **PLoS One**, v. 13, n. 3, p. e0194832, 2018.

LI, S.; WINUTHAYANON, W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. **The Journal of endocrinology**, v. 232, n. 1, p. R1-r26, 2017.

LUPICKA, M.; BODEK, G.; SHPIGEL, N.; ELNEKAVE, E.; KORZEKWA, A.J. Identification of pluripotent cells in bovine uterus: in situ and in vitro studies. **Reproduction**, v. 149, n. 4, p. 317-27, 2015.

MARIANI, M.L.; SOUTO, M.; FANELLI, M.A.; CIOCCA, D.R. Constitutive expression of heat shock proteins hsp25 and hsp70 in the rat oviduct during neonatal development, the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of reproduction and fertility**, v. 120, n. 2, p. 217-23, 2000.

MARINI, M.G.; PERRINI, C.; ESPOSTI, P.; CORRADETTI, B.; BIZZARO, D.; RICCABONI, P.; FANTINATO, E.; URBANI, G.; GELATI, G.; CREMONESI, F.;

LANGE-CONSIGLIO, A. Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 14, n. 1, p. 58, 2016.

MASTERNAK, M.M.; AL-REGAIEY, K.A.; DEL ROSARIO LIM, M.M.; BONKOWSKI, M.S.; PANICI, J.A.; PRZYBYLSKI, G.K.; BARTKE, A. Caloric restriction results in decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor superfamily in muscle of normal and long-lived growth hormone receptor/binding protein knockout mice. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 60, n. 10, p. 1238-45, 2005.

MATEUS, L.; LOPES DA COSTA, L.; DINIZ, P.; ZIECIK, A.J. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. **Animal reproduction science**, v. 76, n. 3-4, p. 143-54, 2003.

MCDOUGALL, S.; HUSSEIN, H.; ABERDEIN, D.; BUCKLE, K.; ROCHE, J.; BURKE, C.; MITCHELL, M.; MEIER, S. Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 229-240, 2011.

MELCHER, Y.; PRUNNER, I.; DRILLICH, M. Degree of variation and reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 82, n. 1, p. 57-63, 2014.

MENCHETTI, L.; BARBATO, O.; FILIPESCU, I.E.; TRAINA, G.; LEONARDI, L.; POLISCA, A.; TROISI, A.; GUELFY, G.; PIRO, F.; BRECCHIA, G. Effects of local lipopolysaccharide administration on the expression of Toll-like receptor 4 and pro-inflammatory cytokines in uterus and oviduct of rabbit does. **Theriogenology**, v. 107, p. 162-174, 2018.

MEYER, N.F.; BRYANT, T.C. Diagnosis and Management of Rumen Acidosis and Bloat in Feedlots. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 33, n. 3, p. 481-498, 2017.

MISHRA, B.; KIZAKI, K.; KOSHI, K.; USHIZAWA, K.; TAKAHASHI, T.; HOSOE, M.; SATO, T.; ITO, A.; HASHIZUME, K. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and its expected roles in the bovine endometrium during gestation. **Domest Anim Endocrinol**, v. 42, n. 2, p. 63-73, 2012.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N.; TORCHIA, M.G. **Embriologia Básica**: 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

MORAES, C.; MAIA, L.; LANDIM-ALVARENGA, F.; OBA, E. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO PÓS-PARTO EM BOVINOS. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, 2014.

MOSTERT, P.F.; BOKKERS, E.A.M.; VAN MIDDELAAR, C.E.; HOGVEEN, H.; DE BOER, I.J.M. Estimating the economic impact of subclinical ketosis in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model. **Animal : an international journal of animal bioscience**, v. 12, n. 1, p. 145-154, 2018.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**: 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEIRA, J.A.; TAINTURIER, D.; PENA, M.A.; MARTAL, J. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF-beta1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 595-604, 2010.

NEWMAN, A.; MANN, S.; NYDAM, D.V.; OVERTON, T.R.; BEHLING-KELLY, E. Impact of dietary plane of energy during the dry period on lipoprotein parameters in the transition period in dairy cattle. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**, v. 100, n. 1, p. 118-26, 2016.

NING, L.T.; DONG, G.Z.; AO, C.; ZHANG, D.G.; ERDENE, K.; ZHANG, F.Q.; WEN, J.; ZHANG, T.L. Effects of continuous low dose infusion of lipopolysaccharide on inflammatory responses, milk production and milk quality in dairy cows. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**, v. 102, n. 1, p. e262-e269, 2018.

O'DOHERTY, A.M.; DI FENZA, M.; KOLLE, S. Lipopolysaccharide (LPS) disrupts particle transport, cilia function and sperm motility in an ex vivo oviduct model. **Scientific reports**, v. 6, p. 24583, 2016.

OMBARAK, R.A.; ZAYDA, M.G.; AWASTHI, S.P.; HINENOYA, A.; YAMASAKI, S. Serotypes, Pathogenic Potential, and Antimicrobial Resistance of Escherichia coli Isolated from Subclinical Bovine Mastitis Milk Samples in Egypt. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 72, n. 5, p. 337-339, 2019.

OPSOMER, G.; GROHN, Y.T.; HERTL, J.; CORYN, M.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. **Theriogenology**, v. 53, n. 4, p. 841-57, 2000.

PARENT, J.; FORTIER, M.A. Expression and contribution of three different isoforms of prostaglandin E synthase in the bovine endometrium. **Biol Reprod**, v. 73, n. 1, p. 36-44, 2005.

PARK, B.S.; LEE, J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Exp Mol Med**, v. 45, n. 12, p. e66-e66, 2013.

PARRAGUEZ, V.H.; URQUIETA, B.; PÉREZ, L.; CASTELLARO, G.; DE LOS REYES, M.; TORRES-ROVIRA, L.; AGUADO-MARTÍNEZ, A.; ASTIZ, S.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Fertility in a high-altitude environment is compromised by luteal dysfunction: the relative roles of hypoxia and oxidative stress. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 11, p. 24-24, 2013.

PEARCE, S.C.; MANI, V.; BODDICKER, R.L.; JOHNSON, J.S.; WEBER, T.E.; ROSS, J.W.; BAUMGARD, L.H.; GABLER, N.K. Heat stress reduces barrier function and alters intestinal metabolism in growing pigs¹. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. suppl_4, p. 257-259, 2012.

PEREZ-BAEZ, J.; RISCO, C.A.; CHEBEL, R.C.; GOMES, G.C.; GRECO, L.F.; TAO, S.; THOMPSON, I.M.; DO AMARAL, B.C.; ZENOBI, M.G.; MARTINEZ, N.; STAPLES, C.R.; DAHL, G.E.; HERNANDEZ, J.A.; SANTOS, J.E.P.; GALVAO, K.N. Association of dry matter intake and energy balance prepartum and postpartum with health disorders postpartum: Part I. Calving disorders and metritis. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 10, p. 9138-9150, 2019.

PEREZ-BURGOS, M.; GARCIA-ROMERO, I.; JUNG, J.; VALVANO, M.A.; SOGAARD-ANDERSEN, L. Identification of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis priming enzyme and the O-antigen ligase in *Myxococcus xanthus*: critical role of LPS O-antigen in motility and development. **Molecular microbiology**, v. 112, n. 4, p. 1178-1198, 2019.

PILA, J. **Carta Leite - Lácteos: queda no déficit na balança comercial em 2018**. SCOT Consultoria 2019. Disponível em: <<https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/cartas/49934/carta-leite---lacteos:-queda-no-deficit-na-balanca-comercial-em-2018.htm>>. Acesso em 22 out. 2019.

POYSER, N.L. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 53, n. 3, p. 147-95, 1995.

PRUNNER, I.; POTHMANN, H.; WAGENER, K.; GIULIODORI, M.; HUBER, J.; EHLING-SCHULZ, M.; DRILLICH, M. Dynamics of bacteriologic and cytologic changes in the uterus of postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 82, n. 9, p. 1316-22, 2014.

RESENDE, J.C.; LEITE, J.L.B.; STOCK, L.A.; NARDY, V.P.D.R. Produção e produtividade de leite no mundo **Anuário Leite - Embrapa**, 2019.

RITCHIE, H. **Carne na alimentação: quais países lideram o ranking?** BBC, 2019. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-47125834>>. Acesso em 22 out. 2019

ROTH, Z.; ASAF, S.; FURMAN, O.; LAVON, Y.; KALO, D.; WOLFENSON, D.; LEITNER, G. Subclinical mastitis disrupts oocyte cytoplasmic maturation in association with reduced developmental competence and impaired gene expression in preimplantation bovine embryos. **Reprod Fertil Dev**, 2015.

ROVANI, M.T.; ILHA, G.F.; GASPERIN, B.G.; NOBREGA, J.E., JR.; SIDDAPPA, D.; GLANZNER, W.G.; ANTONIAZZI, A.Q.; BORDIGNON, V.; DUGGAVATHI, R.; GONCALVES, P.B.D. Prostaglandin F2alpha-induced luteolysis involves activation of Signal transducer and activator of transcription 3 and inhibition of AKT signaling in cattle. **Mol Reprod Dev**, v. 84, n. 6, p. 486-494, 2017.

SENS, A.; HEUWIESER, W. Presence of *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes*, alpha-hemolytic streptococci, and coagulase-negative staphylococci and prevalence of subclinical endometritis. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 10, p. 6347-54, 2013.

SHARMA, D.; PRESTON, S.E.; HAGE, R. Emerging Antibiotic Resistance to Bacterial Isolates from Human Urinary Tract Infections in Grenada. **Cureus**, v. 11, n. 9, p. e5752, 2019.

SHELDON, I.M.; LEWIS, G.S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R.O. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516-30, 2006.

SHELDON, I.M.; NOAKES, D.E.; RYCROFT, A.N.; PFEIFFER, D.U.; DOBSON, H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant

follicle selection and follicle growth and function in cattle. **Reproduction**, v. 123, n. 6, p. 837-45, 2002.

SILVA, E.; GAIVAO, M.; LEITAO, S.; AMARO, A.; COSTA, L.L.; MATEUS, L. Blood COX-2 and PGES gene transcription during the peripartum period of dairy cows with normal puerperium or with uterine infection. **Domest Anim Endocrinol**, v. 35, n. 3, p. 314-23, 2008.

SILVA, E.; LEITAO, S.; HENRIQUES, S.; KOWALEWSKI, M.P.; HOFFMANN, B.; FERREIRA-DIAS, G.; DA COSTA, L.L.; MATEUS, L. Gene transcription of TLR2, TLR4, LPS ligands and prostaglandin synthesis enzymes are up-regulated in canine uteri with cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex. **Journal of reproductive immunology**, v. 84, n. 1, p. 66-74, 2010.

SLAMA, H.; VAILLANCOURT, D.; GOFF, A.K. Pathophysiology of the puerperal period: Relationship between prostaglandin E2 (PGE2) and uterine involution in the cow. **Theriogenology**, v. 36, n. 6, p. 1071-1090, 1991.

SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; BAZER, F.W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. **Biol Reprod**, v. 71, n. 1, p. 2-10, 2004.

STEFANSKA, B.; CZLAPA, W.; PRUSZYNSKA-OSZMALEK, E.; SZCZEPANKIEWICZ, D.; FIEVEZ, V.; KOMISAREK, J.; STAJEK, K.; NOWAK, W. Subacute ruminal acidosis affects fermentation and endotoxin concentration in the rumen and relative expression of the CD14/TLR4/MD2 genes involved in lipopolysaccharide systemic immune response in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 2, p. 1297-1310, 2018.

SWANGCHAN-UTHAI, T.; LAVENDER, C.R.; CHENG, Z.; FOULADI-NASHTA, A.A.; WATHES, D.C. Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide. **Biol Reprod**, v. 87, n. 6, p. 135, 2012.

TAYLOR, H.S. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. **Jama**, v. 292, n. 1, p. 81-5, 2004.

TIAN, H.; CHEN, L.; WU, X.; LI, F.; MA, Y.; CAI, Y.; SONG, S. Infectious Complications in Severe Acute Pancreatitis: Pathogens, Drug Resistance, and Status of Nosocomial Infection in a University-Affiliated Teaching Hospital. **Digestive diseases and sciences**, 2019.

TREMELLEN, K.; SYEDI, N.; TAN, S.; PEARCE, K. Metabolic endotoxaemia--a potential novel link between ovarian inflammation and impaired progesterone production. **Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology**, v. 31, n. 4, p. 309-12, 2015.

UCEYLER, N.; VALENZA, R.; STOCK, M.; SCHEDEL, R.; SPROTTE, G.; SOMMER, C. Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. **Arthritis and rheumatism**, v. 54, n. 8, p. 2656-64, 2006.

VAHANIKKILA, N.; POHJANVIRTA, T.; HAAPALA, V.; SIMOJOKI, H.; SOVERI, T.; BROWNING, G.F.; PELKONEN, S.; WAWEGAMA, N.K.; AUTIO, T. Characterisation of the course of *Mycoplasma bovis* infection in naturally infected dairy herds. **Veterinary microbiology**, v. 231, p. 107-115, 2019.

VALLE, E.R.; ANDREOTTI, R.; THIAGO, L.R.L.S. Técnicas de Manejo Reprodutivo em Bovinos de Corte. **Embrapa Gado de Corte**, v. 93, 2000.

WALDRON, M.R.; NISHIDA, T.; NONNECKE, B.J.; OVERTON, T.R. Effect of lipopolysaccharide on indices of peripheral and hepatic metabolism in lactating cows. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 11, p. 3447-59, 2003.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, n. 3, p. 201-218, 2005.

XIAO, L.; SONG, Y.; HUANG, W.; YANG, S.; FU, J.; FENG, X.; ZHOU, M. Expression of SOX2, NANOG and OCT4 in a mouse model of lipopolysaccharide-induced acute uterine injury and intrauterine adhesions. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 15, n. 1, p. 14, 2017.

ZEBELI, Q.; SIVARAMAN, S.; DUNN, S.M.; AMETAJ, B.N. Intermittent parenteral administration of endotoxin triggers metabolic and immunological alterations typically associated with displaced abomasum and retained placenta in periparturient dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 10, p. 4968-83, 2011.

ZEBELI, Q.; SIVARAMAN, S.; DUNN, S.M.; AMETAJ, B.N. Intermittently-induced endotoxaemia has no effect on post-challenge plasma metabolites, but increases body temperature and cortisol concentrations in periparturient dairy cows. **Res Vet Sci**, v. 95, n. 3, p. 1155-62, 2013.

ZHOU, H.; CHEN, S.; WANG, W.; WANG, Z.; WU, X.; ZHANG, Z. Nanog inhibits lipopolysaccharide-induced expression of pro-inflammatory cytokines by blocking NF-kappaB transcriptional activity in rat primary microglial cells. **Molecular medicine reports**, v. 5, n. 3, p. 842-6, 2012.

ZOCCAL, R. Leite nas grandes regiões brasileiras. **Anuário Leite - Embrapa**, 2019.