

ARTUR CEZAR DE CARVALHO FERNANDES

Efeito de infusões intravenosas e intramamárias de lipopolissacarídeo (LPS) sobre parâmetros inflamatórios, reprodutivos e metabólicos em novilhas e vacas da raça holandesa

**RECIFE
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

ARTUR CEZAR DE CARVALHO FERNANDES

Efeito de infusões intravenosas e intramamárias de lipopolissacarídeo (LPS) sobre parâmetros inflamatórios, reprodutivos e metabólicos em novilhas e vacas da raça holandesa

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Lúcio Esmeraldo Honório de Melo
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Co-orientador:

Prof. Dr. Luis Ronaldo Aoki Cerri
University of British Columbia - CA.

**RECIFE
2016**

Ficha catalográfica

F363e Fernandes, Artur Cezar de Carvalho
Efeitos de infusões intravenosas e intramamárias de lipopolissacarídeo (LPS) sobre parâmetros inflamatórios, metabólicos e reprodutivos em novilhas e vacas da raça holandesa /
Artur Cezar de Carvalho Fernandes. – Recife, 2016.
147 f. : il.

Orientador: Lúcio Esmeraldo Honório de Melo.
Tese (Doutorado em Programa de Pós- Graduação em
Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2016.
Referências.

1. Haptoglobina 2. Inflamação 3. TNF- α 4. Genes endometriais
5. BHB 6. NEFA I. Melo, Lúcio Esmeraldo Honório de,
orientador
II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**EFEITO DE INFUSÕES INTRAVENOSAS E INTRAMAMÁRIAS DE
LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS,
REPRODUTIVOS E METABÓLICOS EM NOVILHAS E VACAS DA RAÇA
HOLANDESA**

Tese de Doutorado elaborada por

ARTUR CEZAR DE CARVALHO FERNANDES

Aprovada em 24/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. Lúcio E. H. Melo
Orientador – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof Dr. Claudio Coutinho Bartolomeu
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE
Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes – UAG

Prof. Dr. Huber Rizzo
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Paulo Fernandes de Lima
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE
Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária

Prof. Dr. Júlio César dos Santos Nascimento
Centro Universitário Maurício de Nassau
Programa de Pós-graduação em Zootecnia

Dedico esta conquista aos meus pais
Francisco Erialdo Pimentel e Maria do
Socorro de Carvalho Fernandes ...

... e à minha esposa Talita Lins de Carvalho
aos quais expresso eterna gratidão pelo apoio
incondicional.

Agradecimentos

Não distante de meus agradecimentos diários, chego ao fim desta jornada agradecendo primeiramente a Deus pelas dificuldades que me ajudaram a superar e pelo dom de acreditar em um sonho a ser construído.

Agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta participaram da construção e execução deste que considero não apenas um projeto de doutorado, mas da forma como ocorreu, considero um projeto de vida.

Aos meus pais, Pimentel e Socorro que nunca mediram esforços para dar condições aos filhos de lutarem pelos seus sonhos, e sempre desprenderam amor e carinho para nos ensinar valores imensuráveis na vida de um homem.

Não poderia deixar de agradecer aquela que há mais de uma década segue ao meu lado, sempre me fazendo olhar para frente, Talita Carvalho minha esposa. Me viu um pré-vestibulando, me acompanhou como graduando, me orientou para seguir ao mestrado e tomou para si o desafio de largarmos tudo no Brasil e seguir para a experiência da qual voltamos com a certeza da firmeza onde estávamos construindo nosso alicerce. Obrigado por tudo Tá, Te amo!

Aos meus irmãos Livio, Diogo e Marcelo pela amizade, pela disposição incondicional em ajudar e pelo desejo de torcer juntos por nossas conquistas. Sempre bom ter alguém por perto em quem confiar e compartilhar derrotas e conquistas.

No âmbito acadêmico começo agradecendo ao meu orientador Lúcio Melo, acima de tudo pela amizade de quase uma década, e retribuo muito do que conquistei academicamente. Agradeço ainda pelo apoio incondicional durante todas as fases de orientação. Muitas foram as etapas vencidas juntos e muitos foram os momentos de crescimento, resultado do acompanhamento durante toda a graduação e os seis anos de pós-graduação. Sem dúvida uma pessoa fundamental em minha formação.

Ao Prof. Ronaldo Cerri que abriu as portas para realização do Doutorado Sanduíche na Universidade da British Columbia, e que com seu jeito humano de tratar as pessoas, sempre se colocou à disposição para ajudar desde a constituição do projeto, até as atividades desenvolvidas no Canadá. Ronaldo, muito obrigado por tudo! Assim como à Mayra pela receptividade e carinho que nos ajudaram levar a vida fora do país.

Agradeço aos colegas de pós-graduação Natália, Marlon, Luiz, Renata, Tamyres, Priscila e outros tantos no Brasil que fizeram parte desta caminhada. Aos colegas da UBC, Bruna, Augusto, Saeideh e Tracy, que muito ajudaram durante as atividades no Canadá. À Audrey, meu muito obrigado pela ajuda imensurável nas atividades laboratoriais.

Agradeço ainda à UFRPE à quem devo todos os passos dessa jornada acadêmica que se iniciou em 2004. À CAPES pelo apoio financeiro na realização do doutorado tanto no Brasil, como no Canadá, através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE). E a todos que fazem o UBC *Dairy Research Center*.

“Orai como se tudo dependesse de Deus, e
trabalhai como se tudo dependesse de vós”

Santo Inácio de Loyola
Fundador da Ordem dos Jesuítas

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da resposta inflamatória na expressão gênica endometrial e no metabolismo energético em novilhas e vacas. Inicialmente, foi estabelecido um protocolo para indução de um perfil pró-inflamatório sistêmico, com base em múltiplas infusões de LPS. Posteriormente, 22 novilhas foram sincronizadas, inseminadas (D0) e divididas em grupo controle (sol. salina) e LPS, iniciando as infusões no D2. O grupo LPS recebeu infusões intravenosas (IV) de solução salina + LPS (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 mg/Kg). Além da avaliação da temperatura retal, foram analisadas as concentrações plasmáticas de TNF- α , haptoglobina (Hp), progesterona, AGNE, e BHB, além das avaliações leucométricas. No D15, foram realizadas as biópsias endometriais, e posterior análise por qRT-PCR de genes relacionados ao adesão celular, sistema imunológico e desenvolvimento embrionário. As infusões de LPS estabeleceram um perfil pró-inflamatório caracterizado pelo aumento da temperatura ($P < 0,05$), dos níveis de TNF- α ($P = 0,05$) e de Hp ($P < 0,01$), além de alteração na contagem diferencial de leucócitos. Não foi observada alteração nos parâmetros metabólicos. Em relação ao grupo controle, o grupo LPS apresentou menor expressão de IDO ($P = 0,04$; *fold* = 0,48) e PTX3 ($P = 0,01$; *fold* = 0,38), e uma expressão elevada de MX1 ($P = 0,02$; *fold* = 2,85). Em um segundo trabalho, para avaliar a influência da resposta inflamatória sobre o metabolismo energético de vacas em lactação, 20 vacas foram divididas em grupos controle (10 mL sol. Salina) e LPS (25 μ g LPS/10 mL sol. salina). Foi avaliada a contagem de células somáticas (CCS), a produção leiteira, temperatura reticular, além dos níveis sorológicos de Hp, TNF- α , AGNE e BHB. No grupo LPS foi observado o aumento da CCS ($P < 0,0001$), queda da produção ($P < 0,05$), além do aumento da temperatura reticular ($P < 0,005$) e aumento da concentração da Hp ($P < 0,0001$). Verificou-se aumento de AGNE no dia nove e de BHB nos dias nove ($P < 0,005$) e 10 ($P = 0,05$). Com a realização dos presentes trabalhos concluiu-se inicialmente o protocolo utilizado no primeiro trabalho induziu um marcante perfil pró-inflamatório, porém, com limitado efeito na expressão dos genes relacionados ao sistema imunitário, o que sugere uma possível explicação para a sub-fertilidade relacionadas a alterações fisiopatológicas em vacas leiteiras. Adicionalmente, considerando a resposta inflamatória induzida pelo LPS intramamário, foi possível observar evidências da relação da resposta inflamatória com o metabolismo energético de vacas em lactação, e reafirmar a participação de mediadores inflamatórios na fisiopatogenia de enfermidades metabólicas em vacas de leite.

Palavras chave: Haptoglobina, inflamação, TNF- α , Genes endometriais, BHB, AGNE.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the effects of the inflammatory response over endometrial gene expression and energy metabolism in heifers and cows. Initially, a protocol to induce a systemic pro-inflammatory profile was established based on multiple LPS infusions. Subsequently, 22 heifers were synchronized, inseminated (D0) and divided into control group (Saline sol.) and LPS, infusions started on D2. LPS group received intravenous infusions (IV) with saline solution + LPS (0.1; 0.25; 0.5; 0.75; 1.0; 1.25 mg / kg). Were analyzed the rectal temperature, plasma concentrations of TNF- α , haptoglobin (Hp), progesterone, AGNE and BHB, beside leucometrics analysis. On D15, the endometrial biopsies were performed, and subsequent analysis by qRT-PCR of genes related to cell adhesion, immune system and embryonic development. LPS infusions established a pro-inflammatory profile characterized by increase of temperature ($P < 0.05$), TNF- α ($P = 0.05$) and Hp ($P < 0.01$), and effects on the differential leukocyte count. There was no change in metabolic parameters. The LPS group showed lower expression of IDO ($P = 0.04$; fold=0.48) and PTX3 ($P = 0.01$; fold=0.38), and high expression of MX1 ($P = 0.02$; fold=2.85). Was concluded that the induced pro-inflammatory profile showed a strong but limited effect on gene expression related to immune system, suggesting a possible explanation for sub-fertility related pathophysiological changes in dairy cows. In the second study, to evaluate the influence of the inflammatory response on the energy metabolism of dairy cows, 20 cows were divided into control group (10 mL saline sol.) and LPS (25 ug LPS/10ml saline sol.). Was evaluated the somatic cell count, milk production, reticular temperature, as well the serum levels of Hp, TNF- α , AGNE and BHB. In LPS group was observed increased SCC ($P < 0.0001$), decrease of production ($P < 0.05$), and increased reticular temperature ($P < 0.005$), as well an increase of Hp concentration ($P < 0.0001$). Was observed increase on AGNE on day nine and BHB on day nine ($P < 0.005$) and ten ($P = 0.05$). Was concluded that the induced pro-inflammatory profile showed a strong but limited effect on gene expression related to immune system, suggesting a possible explanation for sub-fertility related pathophysiological changes in dairy cows. Aditonally, considering the inflammatory response induced by LPS intramammary infusions, were observed evidences of the relationship of the inflammatory response with the energy metabolism of dairy cows, and reaffirmed the participation of inflammatory mediators in the pathogenesis of metabolic diseases in dairy cows.

Keywords: Haptoglobin, inflammation, TNF- α , Endometrial genes, BHB, AGNE.

Gráficos e figuras

Capítulo I

- Figura 1 Diagrama do experimento 1: Com base nos protocolos de infusão de LPS (A e B) as novilhas receberam infusões em diferentes doses ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10. Foram realizadas colheitas diárias para dosagem de haptoglobina plasmática, além de análises leucométricas (L) nos dias 0, 1, 2, 5, 8, 11 e 14. De forma complementar, o comportamento das novilhas foi monitorado (IceTag™, IceRobotics Ltd, Midlothian, Scotland, UK) por 21 dias, desde o dia -7 até o 14º dia do experimento. 112
- Figura 2 Diagrama do experimento 2; As novilhas receberam inicialmente 100 μg de GnRH (Fertiline; Vetoquinol, Lavaltrie, Quebec) via intramuscular (IM), juntamente à aplicação do dispositivo intravaginal de P4 - CIDR (Zoetis Canada Inc., Kirkland, QC). Sete dias depois o CIDR foi removido e 250 μg de cloprostenol (Estrumate, PGF_{2 α} , MSD Animal Health Ltd., New Zealand) foi aplicado IM. Após dois dias foi administrada a última injeção de GnRH (IM), e a inseminação realizada após 16 horas. 112
- Gráfico 1 Temperatura retal média no período de seis horas após a infusão de LPS intravenosa. *A e B > C (p < 0,05) e ** B = C (p = 0,062). 113
- Gráfico 2 Níveis plasmáticos médios de haptoglobina durante o período do experimento, considerando a primeira infusão de LPS no dia 0. *A e B > C (p \leq 0,05); **A > C (p=0,05) e B > A (p=0,01); ***B > A e C (p<0,01); [†]B > C (p=0,05); [‡]A e B = C (p=0,08); [°]A > C (p=0,03) e B = C (p=0,09); ^fB = C (p=0,09). 114
- Gráfico 3 Apresentação da dinâmica da resposta leucométrica (cel/mm³) durante o período experimental . (A) - Leucócitos totais; (B) - Linfócitos; (C) - Neutrófilos; (D) Bastonetes e (E) - Monócitos. 114
- Gráfico 4 Avaliação do comportamento das novilhas com base no tempo médio diário (min) que os animais permaneceram em estação (*standing bout*) ou deitados (*lying bouts*), durante o período do experimento. 116
- Gráfico 5 Temperatura retal média no período de seis horas após a infusão de LPS intravenosa (*P<0.01). 116
- Gráfico 6 Níveis médios plasmáticos de haptoglobina durante o período do experimento, considerando o início da infusão de LPS no dia 2 (*P<0.01). 116

- Gráfico 7 Níveis plasmáticos médios de TNF- α nos dias -1, 4, 8, 11 e 13 do experimento, considerando o início da infusão de LPS no dia 2 (*P = 0.05; **P = 0.01; ***P = 0.04). 117
- Gráfico 8 Apresentação da dinâmica da resposta leucométrica (cel/mm³) nos grupos CON e LPS, durante o período experimental . (A) - Leucócitos totais; (B) - Linfócitos; (C) - Neutrófilos; (D) - Bastonetes; (E) - Eosinófilos; (F) - Monócitos (*p=0,01; **p<0,05; ***p<0,01). 117
- Gráfico 9 Transcrições de genes endometriais expressos diferentemente após repetidas infusões de LPS (*P = 0,02, **P = 0,01 , ***P \leq 0,03). 119

Capítulo II

- Figura 1 Organograma experimental (IA - Inseminação artificial; - Infusões intramamária de LPS (25 μ g em 10mL) e solução salina estéril (10 mL); - Colheita de leite para avaliação da produção diária e CCS; - Colheita de amostras sorológicas). 143
- Gráfico 1. Produção leiteira durante o período experimental após infusões intramamárias de LPS realizadas nos dias 5 e 10 (*P<0,05). 143
- Gráfico 2. Contagem de células somáticas (CCS) nos grupos LPS e controle durante o período experimental (*P<0,001). 143
- Gráfico 3. Avaliação das infusões intramamárias de LPS (25 μ g de LPS de *E. coli* cepa 0111:B4) realizadas no dia 5 (A) e no dia 10 (B) (*P<0,05; **P<0,001; ***P<0,005). 144
- Gráfico 4. Concentração sorológica de haptoglobina durante o período experimental (*P<0,005). 145
- Gráfico 5. Concentração sorológica de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) nos grupos LPS e controle (*P<0,05). 145
- Gráfico 6. Concentração sorológica de β -hidroxibutirato (BHB) nos grupos LPS e controle (*P<0,05; **P=0,053). 146

Lista de tabelas

Capítulo I

Tabela 1	Sequência dos primers para análise da transcrição realizada em amostras do endométrio	120
Tabela 2	Os genes analisado foram agrupados de acordo com sua função endométrio durante o início da gestação	122
Tabela 3	Níveis plasmáticos médios de progesterone (ng/mL) nos dias -1, 3, 6, 9 e 11, bem como de IFN-tau (intensidade de banda) no D15 após a IA, que não apresentaram diferenças entre os grupos LPS e CON.	123

Capítulo II

Tabela 1	Concentração sorológica de fator de necrose tumoral (TNF- α) nos grupos LPS e controle.	146
----------	---	-----

Lista de abreviaturas

- Acetil-CoA - Acetilcoenzima A
- ACTH - Hormônio adenocorticotrófico
- AGNE - Ácidos graxos não esterificados
- APC - polipose adenomatosa coli
- BEN - Balanço energético negativo
- BHB - Beta-hidroxibutirato
- BMP - proteína morfogenética óssea
- CACC - Canadian Animal Care Council
- CBG - Globulina de ligação aos corticosteróides
- CCS - Contagem de células somáticas
- CD14 - Receptor de membrana
- CDH1 - Caderina-E
- CL - Corpo lúteo
- CLD4 - Claudina 4
- CMS - Consumo de matéria seca
- CON - Grupo controle
- COX-2 - ciclo-oxigenase 2
- Ct - *cycle threshold*
- CXCL10 - C-X-C quimiocina 10
- CXCL10 - C-X-C quimiocina 10
- DAMP - Damaged Associated Molecular Pattern
- DKK - *Dickkopf-related proteins*
- E₂ – 17β-estradiol.
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EL - Epitélio luminal
- ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMMPRIN - *Extracellular matrix metalloproteinase inducer*

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

GAF – Fator ativador Gama

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GLYCAM-1 - Molécula de adesão celular dependente de glicosilação 1

GnRH – Hormônio liberador de gonodotrofinas

GSK3 - Glicogênio sintase quinase 3

HECA-452 - Anticorpo

HP - Eixo hipotalâmico-pituitário

HPA - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

Ig - Imunoglobulina

IM - Intramuscular

IV - Via endovenosa

IA - Inseminação artificial

IDO - *Indoleamine 2, 3-dioxygenase*

IFN-t - Interferon tau

IGHG1 - *Immunoglobulin heavy chain gamma*

IL - Interleucina 1

IM-CON - Grupo controle para avaliação da infusão intramamária de LPS

IM-LPS - Grupo que recebeu o LPS via intramamária

INF- α - Interferon alpha

IRF - Fatores reguladores de Interferon

ISG - Genes estimulados por INF (*IFN-stimulated genes*)

ISGF3 - *IFN-t-stimulated gene factor 3*

SELL - L-selectina

LGALS3BP - *Lectin galactoside soluble 3 binding protein*

LH - Hormônio luteinizante

LIF - Fator de inibição da leucemia

LIFR - *Leukemia inhibitory factor receptor*

LPS - Lipopolissacarídeo

LPS-A e LPS-B – Grupos que receberam LPS no experimento 1

LTC4 – Leucotrieno C4

MB - Mastite bovina

MECA-79 - Anticorpo

MHC - *Major histocompatibility complex*

MMP - *Matrize metalloproteinases*

MSX1 - *Msh homeboxe 1*

MX - *Myxovirus Resistance Protein*

MX1 e MX2 - *Myxovirus*

MYH - *Myosin heavy chain*

MYL12A - *Myosin light chain*

NK - células *Natural Killer*

P4 - Progesterona

PAMP - *Pathogen Associated Molecular Patterns*

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PFA - Proteínas de fase aguda

PGE₂ - Prostaglandina E

PGF_{2α} - Prostaglandina F_{2α}

PTX3 - Pentraxin 3

qRT-PCR - PCR quantitativa em tempo real

RELN – Gene Reelin

RFA - Resposta de fase aguda

RNA - Ácido ribonucleico

RNAlater – Estabilizante de RNA

RNA_m - RNA mensageiro

SAM – Eixo simpático-adrenomedular

SERPINA14 - *Serine peptidase inhibitors 14*

SERPING1 (SERPINA14) - *Serine peptidase inhibitors 14*

SLPI - *Secretory leukocyte protease inhibitor*

SNC - sistema nervoso central

SPP1 - *Secreted Phosphoprotein 1*

STAT - Sinal transdutor e ativador de transcrição

SYBR Green mix - Sonda colorimétrica para RT-PCR

TBS – Solução tampão fosfato-salina (*Phosphate buffered saline*)

TBST – Solução de TBS com 1% de Tween 20

TCF - fator potencializador linfóide

TIMP - *Tissue inhibitor of metalloproteinases*

TLR4 - *Toll-like receptors*

TNF- α - Fator de necrose tumoral

TRD - *T cell receptor delta*

Trp - L-triptofano

UBC - University of British Columbia

VLDL – *Very low density lipoprotein*

Wnt - *Wnt signaling pathway*

Lista de símbolos e unidades de medida

α	Alfa
t	Tau
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
Ca^{2+}	Íon cálcio
D	Dia
μg	Micrograma
Kg	Kilograma
mL	Mililitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
g	Gramma
min	Minuto
nm	Nanometro
MHz	Megahertz
mm	Milimetro
%	Por cento
mg	Miligrama
μl	Microlitro
mM	Milimol
mg	Miligrama
ng	Nanograma
Mg^{++}	Magnésio
U/mL	Unidades por mililitro

AM Antes do meio dia

PM Após o meio dia

Sumário

1. Introdução	20
2. Revisão de Literatura	23
2.1 Aspectos imunológicos da mastite bovina	23
2.2 A inflamação como um fator de estresse e seus efeitos sobre os tecidos reprodutivos	24
2.3 Aspectos imunológicos da fase inicial da gestação e do reconhecimento materno-fetal	27
2.3.1 Remodelamento endometrial e desenvolvimento embrionário	28
2.4 Genes relacionados à receptividade endometrial	30
2.4.1 Genes relacionados à resposta imune	30
2.4.2 Genes relacionados à adesão celular	35
2.4.3 Genes associados ao crescimento e desenvolvimento embrionário	40
2.5 Metabolismo energético em vaca de leite	44
2.5.1 O metabolismo energético no período de transição	44
2.5.2 Resposta inflamatória e o metabolismo energético	45
2.6 Indução da resposta inflamatória por infusão de lipopolissacarídeo	48
3. Referências Bibliográficas	51
4. Capítulo I	
Efeitos da resposta inflamatória induzida por infusões intravenosas de LPS sobre a expressão gênica endometrial e o metabolismo energético de novilhas Holandesas	84
Introdução	85
Material e métodos	89
Resultados	97
Discussão	100
Conclusão	106
Referências	106
Gráficos, figuras e tabelas	113
5. Capítulo II	
Avaliação de aspectos inflamatórios e metabólicos após infusão intramamária de LPS em vacas em lactação	125
Introdução	127
Material e métodos	129
Resultados	132

Discussão	134
Conclusão	139
Referências	139
Gráficos, figuras e tabelas	144

1. Introdução

Atualmente há uma grande pressão sobre a pecuária leiteira, inclusive à nível mundial, que resulta no elevado padrão genético dos animais e em níveis de produção cada vez maiores. Inevitavelmente, há neste cenário uma maior exigência sobre o manejo nutricional, considerando a maior demanda energética requerida, bem como sobre o manejo sanitário, considerando a maior incidência de enfermidades no período de transição. Além disso, outro importante elemento na cadeia produtiva do leite, que sofre as consequências dos altos índices de produção é o manejo reprodutivo. Nesse contexto, o modelo da resposta inflamatória da mastite causada por bactérias gram-negativas, vem sendo bastante utilizado em estudos que objetivam esclarecer a relação entre a inflamação e os baixos índices de fertilidade (HANSEN et al., 2004), bem como a participação da mastite na predisposição de importantes alterações metabólicas, como por exemplo à cetose e à lipidose hepática (AMETAJ et al., 2005; ECKERSALL e BELL, 2010).

Na esfera reprodutiva, um dos principais entraves econômicos da bovinocultura de leite está nas perdas embrionárias precoces, que ocorrem principalmente entre os dias oito e 21 após a fertilização (ROCHE et al., 1981; DUNE et al., 2000), fazendo do período embrionário e dos fenômenos que ocorrem durante o mesmo, aspectos críticos para a obtenção de bons índices reprodutivos. Na bovinocultura de leite a taxa de concepção média entre os dias 27-31 após a inseminação artificial é de 35 a 45% (SANTOS et al., 2004b; SARTORI et al., 2010). Esta expressiva taxa de perda embrionária pode estar associada a alterações homeostáticas necessárias no suporte da produção leiteira (SARTOTI et al., 2002; CERRI et al., 2012) e ainda a processos inflamatórios secundários à exigência produtiva, dentre eles a mastite (SANTOS et al., 2004a).

Além dos efeitos das endotoxinas sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, que leva ao atraso na ovulação, à anovulação, à ausência do comportamento de estro, e consequentemente, um maior intervalo entre o parto e primeira IA (SUZUKI et al., 2001; LAVON et al., 2008), a resposta inflamatória está ainda relacionada à uma maior taxa de serviço e um maior intervalo entre estros, o que sugere a ocorrência de morte embrionária (BARKER, et al., 1998; SANTOS, et al., 2004a). Nesse contexto, alguns mediadores inflamatórios como as interleucinas (IL), o fator de necrose tumoral (TNF- α), o óxido nítrico (ON) e à prostaglandina (PGF2 α) são apontados como fatores

limitantes do desenvolvimento embrionário, podendo causar ainda, a morte do embrião (SOTO et al., 2003; HANSEN et al., 2004).

Apesar do conhecimento sobre a interferência de mediadores inflamatórios na fertilidade, afetando direta ou indiretamente o eixo neuroendócrino ou o embrião, alguns questionamentos sobre a relação entre os mediadores inflamatórios e o útero continuam sem resposta, evidenciando a necessidade de estudos voltados para o comportamento do endométrio diante desses mediadores, sobretudo os mecanismos moleculares relacionados à imunotolerância necessária para a implantação do concepto. Desta forma, torna-se importante a compreensão da interação concepto-maternal para o estabelecimento e manutenção da gestação, onde ocorre uma complexa regulação e diferenciação da expressão gênica endometrial, sob efeito principalmente da progesterona (P4), do estradiol (E2) e do interferon-tau (IFN-t) (SPENCER et al., 2008, WALKER et al., 2010). Este último, produzido pelas células do trofoblasto durante a fase de alojamento embrionário, favorece a receptividade uterina ao concepto, através da inibição da luteólise e consequente manutenção de níveis satisfatórios de P4, além de regular importantes genes no endométrio (IFN-stimulated genes – ISG) (HANSEN et al., 1999; SPENCER et al., 2008; BROOKS et al., 2014). A ação do INF-t e da P4 promove a diferenciação do padrão de expressão de genes relacionados à remodelação celular, adesão e implantação, orientação e polarização celular e ao transporte de lípidios e glicose (BAUERSACHS et al., 2006; FORDE et al., 2010).

Cerri et al. (2012) observaram que genes endometriais relacionados ao sistema imunológico como, por exemplo, o MX1, MX2, CXCL10, PTX3, SERPING1 (SERPINA14), foram expressos em maior quantidade no 17º dia de gestação, enquanto que genes associados à adesão celular e remodelação tecidual apresentaram uma baixa expressão, neste mesmo período. Adicionalmente, foi observado que a lactação exerceu efeitos negativos sob o padrão de expressão endometrial sinalizando possível relação entre a lactação e perdas gestacionais precoces. Adicionalmente, Walker et al. (2012) demonstraram que vacas consideradas sub-férteis apresentaram uma menor expressão de genes relacionados a tolerância imunológica ao embrião, assim como de genes relacionados à prevenção da luteólise e ao suporte do desenvolvimento embrionário.

Além do impacto da inflamação na reprodução, considerá-la um fator predisponente a enfermidades metabólicas tem sido alvo de diferentes estudos, e nesse contexto faz-se necessário compreender o importante papel desenvolvido simultaneamente pelo metabolismo hepático na resposta inflamatória e no metabolismo

energético de vacas em lactação. A filtração das endotoxinas e mediadores inflamatórios produzidas em diferentes locais de inflamação, ocorre no fígado (AMETAJ et al., 2005), onde tem início a resposta de fase aguda caracterizada pela produção das proteínas de fase aguda como por exemplo a haptoglobina e a amilóide sérica A (CECILIANE et al., 2012), e associada ainda à diminuição do consumo de matéria seca, bem como a alterações no metabolismo dos lipídios e da glicose.

Estudos *in vivo* demonstraram que a exposição de vacas a citocinas pró-inflamatórias, como o interferon- α (via oral) e o TNF- α (subcutâneo), resultaram respectivamente em elevados níveis plasmáticos de corpos cetônicos duas semanas antes do parto e no acúmulo de triglicerídeo hepático no final da lactação (BRADFORD et al., 2009; TREVESI et al., 2009). Além disso, foram observados efeitos negativos na expressão de importantes genes hepáticos relacionados à produção de glicose, o que pode expor vacas em lactação a um quadro de hipoglicemia, resultando em mobilização da gordura corpórea e inevitavelmente, em níveis elevados de AGNE e aumento na produção de corpos cetônicos pelo fígado, como por exemplo o beta-hidroxibutirato (BHB) (JIANG et al., 2008; BRADFORD et al., 2009). Desta forma, a literatura sugere a resposta inflamatória como possível agente precursor de manifestações clínicas de grande importância na pecuária leiteira, a exemplo da cetose e da lipidose hepática.

Diante do exposto, este estudo objetivou: 1) estabelecer, por meio de repetidas infusões intravenosas de lipopolissacarídeo (LPS), um protocolo de indução de resposta pró-inflamatória sistêmica em novilhas Holandesas não-lactantes; 2) avaliar os efeitos deste protocolo na expressão de genes endometriais de novilhas não-lactantes no 15º dia de gestação, bem como sobre o metabolismo energético das mesmas; e por fim 3) avaliar os efeitos da resposta inflamatória induzida por infusões intramamárias de LPS, sobre o metabolismo energético de vacas em lactação.

2. Revisão de Literatura

2.1 Aspectos imunológicos da mastite bovina

A elevada produção leiteira exigida pelo mercado mundial, associada à situação sanitária a qual os rebanhos leiteiros são submetidos comprometem os mesmos em seus aspectos produtivos e sanitários (FOURICHON et al., 1999). Nesse contexto, insere-se a mastite como uma afecção de grande incidência no mundo, que além de comprometer a qualidade e produção de leite, gera altos custos com tratamentos e serviços veterinários (DEGO, et al., 2002; AKERS e NICKERSON, 2011).

A mastite bovina caracteriza-se pela resposta inflamatória da glândula mamária causada por alterações metabólicas, fisiológicas, traumas, ou mais frequentemente por micro-organismos patogênicos infecciosos ou ambientais (JAVIER OVIEDO-BOYSO, et al., 2007), que ascendem via canal do teto e se multiplicam no interior da glândula mamária (DEGO, et al., 2002). Uma vez que os micro-organismos ascendem o canal do teto, a multiplicação bacteriana ocorre de forma progressiva no teto, cisterna da glândula e por fim, nos tecidos responsáveis diretamente pela produção do leite (AKERS e NICKERSON, 2011).

Estruturas anatômicas são consideradas de fundamental importância na proteção da glândula mamária frente a agentes infecciosos. O primeiro obstáculo é a pele do teto, que mantendo-se íntegra, limita a colonização de micro-organismos da própria pele e do ambiente (RAINARD e RIOLLET, 2006). O canal do teto representa a segunda barreira anatômica da glândula, e sua importância está associada ao fato que a via ascendente é a principal forma de infecção dos agentes causadores da mastite (CARNEIRO, 2006). Nesse contexto, o processo de ordenha, bem como o período de intervalo entre as mesmas, compreendem o período de maior susceptibilidade para se instalar a infecção, devido à flacidez do esfíncter do teto, que apenas uma ou duas horas após a ordenha retoma o tônus muscular fechando novamente o canal (KEHRLI e HARP, 2001; AKERS e NICKERSON, 2011).

Além das barreiras anatômicas, os fatores solúveis e as células da imunidade inata da glândula mamária, são considerados de grande importância por atuarem em caso de falha nas barreiras anatômicas (KOLB, 2002). Os fatores solúveis apresentam atividades microbicidas, atuando principalmente de três formas: 1) com atividade hidrolítica sobre as estruturas microbianas, como por exemplo, a lisozima; 2) ligando-se a elementos essenciais, como o ferro, no metabolismo dos micro-organismos, a exemplo

da lactoferrina; 3) através da atividade líticas sobre a membrana celular microbiana, com por exemplo, as proteínas do sistema complemento (LINDE et al., 2008).

Uma vez ocorrendo falha nas barreiras anatômicas e solúveis, os micro-organismos instalam-se na glândula mamária. A partir deste momento, mediadores imunológicos atuam de forma ativa no combate aos agentes infecciosos (RIOLLET et al., 2000), dentre os quais, as citocinas merecem destaque por regularem as atividades das células que participam da imunidade inata e específica (TIZARD, 2002).

A ação das citocinas na fisiopatologia da glândula mamária vem sendo bastante estudada, principalmente as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12) e o fator de necrose tumoral- α (TNF α) (SORDILLO et al., 1997). As mesmas vêm sendo consideradas marcadores imunológicos da glândula mamária e de grande importância no diagnóstico e prognóstico da mastite (ALLUWAIMI, 2004).

2.2 A inflamação como um fator de estresse e seus efeitos sobre os tecidos reprodutivos

O conceito de estresse está associado a fatores que levam a uma redução no potencial de expressão genética de um indivíduo, e ainda à inabilidade de um animal de se relacionar harmoniosamente com o ambiente. Atualmente, o estresse está intimamente relacionado à subfertilidade e vem sendo estudado como um fator de impacto negativo na eficiência reprodutiva de gado de leite (DOBSON & SMITH, 2000). No manejo desses animais, dois tipos de estresse combinam-se comumente, o físico (altas temperaturas, restrição hídrica e/ou calórica, descarga elétrica, cirurgia, dor e doenças) e o psicológico (medo, mudança de manejo e/ou de ambiente, inserção em um novo grupo, isolamento) (GRANDIN, 1997, 1998; LYNCH, 2010). Independentemente do tipo de estresse ao qual os animais são submetidos, a resposta neuroendócrina estimulada pelo fator estressante leva à ativação dos eixos hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e simpático-adrenomedular (SAM), e conseqüentemente à produção de glucocorticoides (cortisol) e catecolaminas (adrenalina e noradrenalina).

Da mesma forma que não é fácil definir estresse, classificá-lo como crônico ou agudo também não é algo simples, principalmente ao considerar que existem diferentes formas de estresse. Porém, ao considerar o estímulo clássico ao estresse e seus efeitos sobre os eixos HPA e SAM, o estresse crônico está relacionado à predominância da resposta do eixo HPA com conseqüente aumento dos níveis de cortisol (resposta passiva). Por outro lado, a resposta ao estresse agudo está associada à elevada

responsividade do eixo SAM, caracterizada pela produção das catecolaminas, sendo conhecida como resposta ativa (*active fight/flight*) (KOOLHAAS et al., 1999; COHEN, 2000; SUSAN & CARYL, 2007).

Inserido em um conceito amplo de estresse, o processo inflamatório passa a ser considerada pelo organismo como um fator estressante, podendo ser também classificada como crônico ou agudo. Neste caso, a resposta ao estresse está associada à produção de citocinas e proteínas de fase aguda (PFA), que podem, direta ou indiretamente, ativar o eixo HPA e estimular a resposta clássica ao estresse, resultando na liberação do cortisol. Assim, a inflamação crônica caracteriza-se pelo aumento moderado, porém constante, de citocinas e PFA, ao passo que, a inflamação aguda está associada à elevação dos níveis plasmáticos das citocinas pró-inflamatórias e PFA, seguido da redução a níveis basais uma vez cessado o estímulo (ANDREASEN et al., 2008).

A estreita relação entre o eixo hipotalâmico-pituitário (HP) com o sistema nervoso central (SNC), e ainda com os hormônios e mediadores que controlam diferentes sistemas fisiológicos, demonstra a importância deste eixo na resposta ao estresse. Paralelamente, ao considerar a importância do eixo HP também sobre a fisiologia da reprodução, pode-se considerar que a resposta ao estresse poderá também interferir no controle neuroendócrino da reprodução (MOBERG, 1985). Neste sentido, surgiu a necessidade de elucidar de que forma o estresse pode interferir no crescimento folicular, na ovulação, na produção dos hormônios reprodutivos e ainda, no comportamento de cio em vacas de leite (MORRIS et al., 2011). Considerando que a ação de mediadores inflamatórios resulte na liberação de cortisol, caracterizando um feedback negativo com o objetivo de cessar a resposta imunológica, evidências apontam para a relação entre a resposta inflamatória e alterações em parâmetros reprodutivos como a qualidade e o desenvolvimento de oócitos e embriões, a função ovariana e o ambiente uterino. Uma vez desafiado imunologicamente por bactérias gram-negativas ou mesmo por infusões de endotoxinas, são produzidas citocinas como a IL-1, IL-6 e TNF- α , além de mediadores como PGF_{2 α} e o óxido nítrico (ON), entre outros. Nesse contexto um baixo desempenho reprodutivo pode estar associado ao fato que o TNF- α interfere na maturação dos oócitos bovinos (SOTO et al., 2003 a) e ainda, estudos têm demonstrado alterações em embriões cultivados em meios sobre influência do TNF- α , PGF_{2 α} , ou ON, resultando em elevado número de apoptose celular ou apresentando um

insatisfatório desenvolvimento embrionário para o estágio de blastocisto (PAMPFER et al., 1994; CHEN et al., 2001; SOTO et al., 2003b).

A mastite vem sendo bastante estudada e associada à diminuição do desempenho reprodutivo de rebanhos leiteiros (BARKER et al., 1998; SANTOS et al., 2004), e neste sentido Moore et al. (1991) evidenciaram a associação epidemiológica entre a mastite e alterações no intervalo interestro, em uma propriedade com elevada frequência de casos de mastite por bactérias gram-negativas. Em 2001, estudo realizado por Schrick et al. com vacas diagnosticadas com de mastite e vacas saudáveis, demonstrou que os animais com infecção necessitaram de um maior número de inseminações artificiais para se confirmar a gestação, comparado ao grupo de vacas que não apresentaram a mesma, o que reforça o trabalho de Barker et al. (1998). Nesse contexto, o mecanismo pelo qual a mastite compromete a capacidade reprodutiva em vacas ainda é pouco esclarecido (SOTO et al., 2003 a,b).

Para que um ciclo ovulatório ocorra com sucesso faz-se necessária a sincronização de uma série de eventos neuroendócrinos que ocorrem sobre a influência do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal. Durante a fase de desenvolvimento folicular a produção de GnRH (*gonadotrophin-release hormone*) controla a liberação de FSH (*follicle stimulating hormone*), responsável pelo recrutamento e desenvolvimento dos folículos, e de LH (*luteinizing hormone*), responsável pela ovulação. O crescimento folicular leva ao aumento na concentração de estrógeno (E_2), o que resulta em feedback positivo à nível de hipotálamo, seguido do pico pré-ovulatório de GnRH e LH (HAFEZ, 2004).

A principal influência do estresse sobre a atividade ovariana está associada à redução dos pulsos de GnRH/LH, devido a um inadequado suporte de LH. Desta forma, haverá um crescimento lento dos folículos, bem como diminuição da produção de E_2 , e consequente efeitos sobre a ovulação, podendo gerar ausência ou atraso da mesma (DOBSON e SMITH, 2000).

Nesse contexto, Morris et al. (2011), considerando a laminite como um fator de estresse, demonstrou que 21% das vacas com esta afecção falharam na manifestação do cio ou não ovularam. Além disso, 29% desses animais, ao serem submetidos ao protocolo de sincronização de cio, não produziram um folículo funcional. As falhas citadas foram associadas à redução da frequência do pulso de LH, baixa concentração de estradiol ou baixa reponsividade ao mesmo, e à ausência do pico de LH.

Adicionalmente, Dobson e Smith (2000) demonstraram que uma vez ativado o eixo HPA em resposta ao estresse, há uma redução no pulso de GnRH/LH, expondo assim, o ovário a um suporte inadequado de LH. Diferentes situações podem levar a diferentes formas de interferência sobre o controle de GnRH/LH como por exemplo, durante um estresse crônico ou casos severos de laminitite, onde o pulso de GnRH/LH estimulará o crescimento folicular, não sendo porém suficiente para manter o desenvolvimento do mesmo e levar à ovulação.

Além dos efeitos sobre os ovários, os processos infecciosos e suas complexas respostas inflamatórias podem interferir na eficiência reprodutiva afetando o ambiente uterino e o desenvolvimento de conceptos. Diante de um desafio imunológico, citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, o TNF- α , são produzidas e orquestram a resposta imune. Além disso, o TNF α afeta a função uterina desenvolvendo um importante papel na regulação da produção de PGF_{2 α} (MIYAMOTO et al., 2000). Skarzynski et al. (2000) sugeriram que a ação do TNF α sobre as células do estroma uterino estimula a produção de PGF_{2 α} , iniciando assim a luteólise na espécie bovina, seguido de um feedback positivo entre a PGF_{2 α} uterina e a oxitocina proveniente do CL. Assim, o elevado nível de TNF α podem ser seguido do aumento nos níveis de PGF_{2 α} , por vezes suficiente para iniciar a luteólise e conseqüentemente levar à perda embrionária precoce, quando ocorrendo em vacas prenhes (STAPLES et al., 2003).

Outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 a IL-2, podem ser expressas no endométrio e são também consideradas fatores luteolíticos provenientes de processos infecciosos. Bany e Kennedy (1995) demonstraram evidências da produção de prostaglandina induzida pela IL-1, através do aumento da expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), uma importante enzima envolvida na síntese de PGF_{2 α} . Além disso, Leung et al. (2001), evidenciaram a capacidade da IL-2 em estimular PGF_{2 α} durante a fase luteal tardia.

Desta forma, fica claro o amplo estudo dos efeitos da inflamação sobre o controle neuroendócrino, assim como sobre os ovários, o que não é visto na mesma proporção sobre o ambiente uterino, mais especificamente em relação à expressão gênica uterina.

2.3 Aspectos imunológicos da fase inicial da gestação e reconhecimento materno-fetal

Na perspectiva do desenvolvimento de uma prenhez com sucesso, o sistema reprodutivo, em particular o útero, precisa estar preparado e em sincronia com o

embrião recém-formado, propiciando um rápido crescimento no início da fase embrionária. Adicionalmente, a resposta do endométrio à sinalização da gestação, por parte do concepto, é de fundamental importância para a inibição da luteólise e a manutenção dos níveis de P4.

Nesta fase inicial da gestação, a resposta imunológica desempenha um importante papel atuando no estabelecimento da mesma ou, em consequência de sua ativação inapropriada, pode comprometer a fertilidade (HANSEN, 2011). A ação da imunidade adquirida, no combate a antígenos provenientes dos conceptos, é um exemplo clássico da atuação do sistema imune de forma a comprometer a fertilidade em vacas de leite (MENGE, 1969).

Além da resposta estimulada pelo concepto, reconhecido pelo sistema imune como um agente estranho ao organismo, o processo inflamatório instalado diretamente no trato reprodutivo, também está associado à diminuição da fertilidade, a exemplo do que discutiram em seus trabalhos Rozeboom et al. (2000) e Alghamdi et al. (2004), induzindo a resposta inflamatória através da infusão uterina de LPS ou espermatozoides mortos. Diante do desafio imunológico, algumas moléculas produzidas podem comprometer o desenvolvimento embrionário, como por exemplo, a $PGF_{2\alpha}$, o $TNF\alpha$ e o ON. De acordo como Scenna et al. (2004), $PGF_{2\alpha}$ compromete a capacidade de embriões bovinos de atingir o estágio de blastocisto, e livrar-se da zona pelúcida. Sobre a ação do $TNF\alpha$, dentre outros aspectos, sabe-se que o mesmo induz apoptose em embriões bovinos (SOTO et al., 2003; LOUREIRO et al., 2007) e segundo dados de El-Sayed et al. (2006), embriões que não desenvolveram uma gestação a termo expressaram mais $TNF\alpha$ no momento da transferência, do que aqueles que resultaram em um gestação a termo. Além da responsividade do embrião a diversas moléculas mencionadas, o trofoblasto também apresenta susceptibilidade, muito provavelmente, aos fagócitos, e a ação lítica de células Natural Killer (NK) e de linfócitos ativados pelas mesmas (Yu et al., 1994; Tekin e Hansen 2003).

2.3.1 Remodelamento endometrial e desenvolvimento embrionário

O útero possui diferentes funções como a regulação do ciclo estral, capacitação e transporte de espermatozoides, desenvolvimento embrionário inicial, implantação e suporte da prenhez durante toda a gestação. Desta forma considera-se que o ambiente uterino é responsável pelo crescimento e desenvolvimento do concepto (WILMUT e SALES, 1981; LAWSON et al., 1983; GARRETT et al., 1988), principalmente sob a

ação de hormônios esteroides, citocinas e fatores do crescimento que controlam o processo de diferenciação e proliferação endometrial pré e pós-implantação (CHEN et al., 1999).

O processo de comunicação e nidação concepto-endometrial ocorre a partir do alongamento do blastocisto eclodido e é de fundamental importância no estabelecimento da prenhez. A camada externa do blastocisto é composto por células do trofotoderma, responsáveis pelo processo de implantação que ocorre em três fases: aposição, nidação e penetração no epitélio luminal (EL) do útero (GHARIB-HAMROUCHE et al., 1993; CHAVATTE-PALMER e GUILLOMOT, 2007). Uma fraca ligação entre as células do trofotoderma e o EL do útero caracteriza a primeira fase deste processo. Em seguida o processo de adesão ocorre conferindo maior firmeza na ligação e evitando o deslocamento do blastocisto na luz do útero. Por fim, proteases liberadas pelo embrião degradam o EL e dão início ao processo de decidualização através da diferenciação das células do estroma para células deciduais (ENDERS e SCHLAFKE, 1969). Em ruminantes, a comunicação materno-fetal tem início através da ação do IFN-t, expresso e secretado pelas células do trofotoderma, que sinaliza ao EL do endométrio e modula a cascata de eventos responsáveis pela sobrevivência embrionária. Múltiplos genes estão envolvidos na expressão do IFN-t e estudos *in vivo* demonstraram que o blastocisto bovino apresenta o pico de produção de IFN-t entre os dias 15 e 17 após o cio (ROBERTS et al., 1990; STOJKOVIC et al., 1995; EALY et al., 2001).

O IFN-t tem importante participação na inibição da luteólise, bloqueando a secreção pulsátil de $PGF_{2\alpha}$, que é fisiologicamente estimulada pela ocitocina. Estudos realizados em ovelhas avaliaram os efeitos da infusão sistêmica e intrauterina de IFN-t recombinante e observaram menor expressão de receptores de estrógenos e ocitocina no útero (SPENCER et al., 1999). A ação do IFN-t no útero dá início à uma sequência de transdução envolvendo o sinal transdutor e ativador de transcrição (STAT), bem como os fatores reguladores de Interferon (IRF). Sob o efeito do IFN-t, ocorre nas células do EL do endométrio a fosforilação pela tirosina dos STATs1, 2, 3, 5a/b e 6, e são translocados para o núcleo celular. Além disso, o IFN-t induz a homodimerização do STAT1 que resulta na formação do fator de transcrição GAF (*gamma-activated factor*), assim como a heterodimerização do STAT1 e do STAT2, que associados com o IRF-9 resulta na formação do complexo de fator de transcrição ISGF3 (*IFN-t-stimulated gene factor 3*) (STEWART et al., 2001). Desta forma, as perdas embrionárias, bem como as falhas no estabelecimento da gestação podem ser associadas a falhas na interação

endométrió IFN-t, ou mesmo à uma secreção insuficiente de IFN-t por parte do concepto. Nesse contexto, os níveis de IFN-t vem sendo utilizados como parâmetro para estabelecer a qualidade embrionária (HERNANDEZ-LEDEZMA et al., 1993).

2.4 Genes relacionados à receptividade endometrial

O período que antecede a implantação embrionária é considerado crítico e caracterizado por modificações no ambiente endometrial que possibilita receber o embrião para as fases seguintes de alongamento e implantação. Além disso, uma vez estabelecido o local da implantação são liberados sinais que bloqueiam a luteólise e mantém a secreção de P4. A receptividade endometrial ao embrião está associada a mudanças em diferentes aspectos como supressão do sistema imunológico, morfogênese, desenvolvimento, e implantação.

2.4.1 Genes relacionados à resposta imune

Considerando que o embrião é reconhecido como um elemento estranho ao ambiente uterino, faz-se necessário que o endométrio desenvolva mecanismos que favoreçam a imuno-tolerância, dentre os quais está a modificação da expressão de genes que modulam a resposta imune.

CXCL10 (C-X-C motif chemokine 10)

Dentre as funções das quimiocinas está a atração de leucócitos através da secreção de pequenos polipeptídeos, que se ligam aos receptores de membrana das células. Reconhece-se atualmente que diferentes citocinas participam de processos reprodutivos como a implantação e a ovulação (LUSSO, 2006). A presença de mediadores solúveis como citocinas, quimiocinas e outros fatores são indispensáveis na fase de aposição, durante a implantação embrionária, permitindo a comunicação blastocisto-endometrial (DOMINGUEZ et al., 2003). Estudos realizados por Cerri et al. (2012) demonstrou haver uma expressão onze vezes maior do CXCL10 em vacas gestantes em comparação com vacas não gestantes. Além disso, estudos em ovelhas gestantes demonstrou a presença de RNAm de CXCL10 em monócitos no estroma sub-epitelial. Foi observado ainda a expressão de CXCL10 no lumen uterino de ovelhas, no dia 17, além de localizados receptores de quimiocinas no trofocotoderma (NAGAOKA et al., 2003a; IMAKAWA et al., 2006).

Há evidências de que o CXCL10 potencializa a toxicidade das células T, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatória em camundongos (CAPPELLO et al., 2004; NAKAYAMA et al., 2004; KIM et al., 2005). Além disso, em vacas foi demonstrado que CXCL10 e CXCL11 foram expressos em menor quantidade em animais sub-férteis (WALKER et al., 2012). Em humanos, são geralmente expressos em maior quantidade durante a gestação, e atuam promovendo a tolerância imunológica ao atrair células *natural killer* para o local da implantação (DOMINGUEZ et al., 2003; COX et al., 2008; DOMINGUEZ et al., 2008; LI et al., 2010). Além disso, ocorre a atração das células do trofoblasto para o endométrio, e o gene em questão favorece a atividade de adesão do trofoblasto através do estímulo da expressão de integrina na espécie ruminante (NAGAOKA et al., 2003a; NAGAOKA et al., 2003b; IMAKAWA et al., 2005; IMAKAWA et al., 2006; SPENCER et al., 2008).

PTX3 (*Pentraxin 3*)

As primeiras observações sobre o PTX3 demonstram sua participação como proteína pró-inflamatória, bem como uma molécula envolvida na resposta imune inata (GARLANDA et al., 2005). Walker et al. (2010a) e Cerri et al. (2012) demonstraram haver uma maior expressão do PTX3 nas carúnculas endometriais. A ação do PTX3 se dá pela ativação ou inibição da via clássica do sistema complemento, através da ligação com o c1q (NAUTA et al., 2003; POPOVICI et al., 2008). A infertilidade em camundongos tem sido associada à deficiência de PTX3 (TRANGUCH et al., 2007). Dentre as células que comumente expressam o PTX3 estão o epitélio amniótico, mesoderma coriônico, vilosidades terminais do trofoblasto e o estroma perivascular placentário, e sua expressão aumenta durante a gestação com pico sendo apresentado no parto (ROVERE-QUERINI et al., 2006).

TRD (*T cell receptor delta*)

O mecanismo utilizado pelas células T para reconhecimento de antígeno é similar ao utilizado pelas células B na produção de imunoglobulinas. A classificação das células T maduras se dá através da expressão das cadeias alfa e beta ($\alpha\beta$) ou gama e delta ($\gamma\delta$), elementos esses responsáveis pela ativação celular que ocorre pelo contato direto entre células. As células T $\gamma\delta$ são capazes de indentificar de forma direta, sem a necessidade da apresentação pelo complexo de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* - MHC) (JANEWAY et al., 2001). Pesquisas evidenciam a importância do gene TRD na regulação da interação entre o embrião e o ambiente

materno (SZEKERES-BARTHO et al., 2001) e demonstram haver expressiva presença de células T $\gamma\delta$ no útero de ratas prenhez, comparativamente a ratas não prenhez (HEYBORNE et al., 1992). A capacidade de reconhecer um antígeno sem necessariamente ser processado e posteriormente apresentado pelo MHC, e ainda a necessidade do contato direto entre células para sua ativação, diferentemente das células T $\alpha\beta$, ressaltam a importância da interação entre as células T $\gamma\delta$ e o conceito.

A função imunomoduladora das células T $\gamma\delta$ durante a gestação em humanos está associada ao estímulo à produção de interleucina 10 (IL-10) e do fator de crescimento β 1 (NAGAEVA et al., 2002; MINCHEVA-NILSSON, 2003), importantes moléculas na via da imunossupressão. Em ovelhas, as células T $\gamma\delta$ endometriais apresentaram atividade antibacteriana e imunorreguladora (LEE et al., 1992; NASAR et al., 2002).

Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10, conhecida por sua atividade imunossupressora (FIORENTINO et al., 1989), quando produzida em resposta à presença de patógenos inibe a ação de mediadores pró-inflamatórios associados à resposta inata e adaptativa, além de ser um importante elemento da fase de resolução da inflamação (MOORE et al., 1990). O desenvolvimento crônico de infecções bacterianas e virais vem sendo associados a uma elevada expressão do genes ds IL-10 e adicionalmente, foi observado que alguns vírus produzem sua própria IL-10 (vIL-10) que suprime a resposta imunológica do hospedeiro (O'GARRA e VIEIRA, 2007; TRINCHIERI, 2007; GABRYSOVÁ et al., 2009).

Em humanos a placenta é responsável pela produção de IL-10 durante a gestação e seus valores diminuem momentos antes do parto (PARADOWSKA et al., 1997; SIMPSON et al., 1998). Por outro lado, estudos em bovinos sugerem a ação de proteção da IL-10 sobre embriões em desenvolvimento (IMAKAWA et al., 2005), considerando a elevada expressão no endométrio de vacas no 18º dia de gestação (GROEBNER et al., 2011a). Considerando os efeitos antiinflamatórios da IL-10, sua possível função no útero no início da gestação, está relacionada à regulação da resposta inflamatória induzida pelo conceito (POMINI et al., 1999; HANNA et al., 2006). Além disso, a mesma poderia atuar também como um regulador da atividade do MMP-9, como é observado no início da gestação em mulheres (MEISSER et al., 1999).

IDO (*Indoleamine 2, 3-dioxygenase*)

AIDO, uma importante enzima que atua no catabolismo do triptofano, pode ser encontrada em diferentes tecidos dos mamíferos (HIRATA e HAYAISHI, 1972; COOK et al., 1980; YOSHIDA et al., 1980; YAMAZAKI et al., 1985), e é ativada mediante condições patológicas como em infecções bacterianas e virais (YOSHIDA et al., 1979) e tumores (YOSHIDA et al., 1988), resultando em uma acelerada degradação do triptofano nas células infectadas e tumorais. Munn et al. (1998) demonstraram em ratas que a disfunção daIDO leva à uma resposta mais expressiva das células T sobre o conceito, reforçando que o embrião é reconhecido como elemento estranho que deve ser rejeitado. Adicionalmente, em novilhas prenhes foi observado um aumento de 18 vezes na expressão de RNAm doIDO, associado à diminuição endometrial de l-triptofano e aumento de l-quirunenina entre os dias 12 e 18 de gestação (GROEBNER et al., 2011b).

LIFR (*Leukemia inhibitory factor receptor*)

O fator de inibição da leucemia (LIF) pertence a família da interleucina 6 e é considerada ainda uma citocina pleiotrófica. Dentre as inúmeras células que expressam os receptores de LIF estão os neurônios, os megacariócitos, macrófagos, adipócitos, osteoblastos, além dos rins e células epiteliais do pulmão e de algumas células tumorais provenientes desses tecidos (HILTON, 1992). Em coelhos há evidências da participação do LIFR na comunicação feto-maternal, uma vez que foram identificados LIF e LIFR no útero antes da implantação e em blastocistos (LEI et al., 2004). A presença de LIF e de LIFR tem sido citada ainda em embriões de camundongos (NICHOLS et al., 1996), bovinos (ECKERT e NIEMANN, 1998) e humanos (CHEN et al., 1999). Em células do trofoblasto humano o LIFR está associado ao crescimento do mesmo, além da diferenciação e modificação do ambiente uterino favorecendo a predominância de células fundamentais para a sobrevivência do conceito, as T_{H2} (HOEY e LEVINE, 1988; KOJIMA et al., 1995; PICCINNI et al., 1998; KWAK-KIM et al., 2005). Em ovelhas foi identificada elevada expressão de RNAm de LIF entre os dias 16 e 20 de gestação e através de estudos imunohistoquímicos foi observado uma maior presença do mesmo em epitélio caruncular e intracaruncular, sendo ainda encontrado no epitélio glandular e células do trofoblasto de conceptos com 17 dias (VOGIAGIS et al., 1997).

MX1 e MX2 (*Myxovirus*)

O *MX1* e *MX2* são proteínas intracelulares que desenvolvem atividades de defesa contra vírus, através da formação de vesículas, do transporte intracelular e da

citoquinase (HORISBERGER et al., 1983; HALLER e KOCHS, 2002; RACICOT et al., 2008). Os mesmos são expressos em maior quantidade na fase de pré-implantação no endométrio de vacas (HICKS et al., 2003) e ovelhas (OTT et al., 1998), sob efeito do IFN-t. Dentre as funções do MX1 destaca-se o estímulo ao epitélio glandular, durante a fase de alongamento embrionário, que resulta na secreção de proteínas como a ISG15 (TOYOKAWA et al., 2007). Estudo realizado por Otto et al. (1998) analisou amostras de miométrio, epitélio luminal, epitélio glandular e estroma de ovelhas gestantes entre os dias 13 e 19, e observou uma expressão de *MX1* dez vezes maior do que em ovelhas cíclicas. Adicionalmente, níveis elevados de *MX2* foram observados em amostras de sangue de ovelhas 48-72 horas após o início do alongamento do conceito e da produção de IFN-t (YANKEY et al., 2001). Em vacas, foi observada expressão 15 vezes maior entre os dias 12 e 15 após o cio, em animais gestantes, comparado com vacas não gestantes (HICKS et al., 2003). Ainda na espécie bovina, em linfócitos de sangue periférico de animais gestantes, o RNAm do *MX2* é identificado mais precocemente do que o *MX1*, e expresso em maior quantidade no dia 16 em gestantes, comparado a vacas vazias (GIFFORD et al., 2007).

SLPI (Secretory leukocyte protease inhibitor)

O *SLPI* é produzido por neutrófilos, macrófagos e células epiteliais (BÖHM et al., 1992; JIN et al., 1997; ABE et al., 1991) e está associada à superfície de mucosas, como a do pulmão e da cérvix (FRANKEN et al., 1989). O *SLPI* possui atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, contra vírus e fungos, e ainda apresenta efeito inibitório sobre o lipopolissacarídeo (LPS) (HIEMSTRA et al., 1996; MCNEELY et al., 1995; TOMEE et al., 1997). Em endométrio de porcas foi observado expressão do *SLPI* no epitélio glandular e luminal (REED, 1996), e no endométrio de vacas e éguas o gene também foi identificado durante a gestação (BADINGA et al., 1994). Estudos destacam a produção de *SLPI* pelas células glandulares durante o período de receptividade uterina, ressaltando que há uma maior expressão do mesmo em consequência à ação da P4, e de que há uma expressão elevada durante a fase de implantação (KING et al., 2000; KING et al., 2003; OKULICZ and ACE, 2003).

IGHG1 (Immunoglobulin heavy chain gamma)

A cadeia pesada de imunoglobulina gama (*Immunoglobulin heavy chain gamma-IGHG1*), também conhecida como cadeia de imunoglobulina (Ig) [gama]-1, é uma das mais importantes isoformas produzida pelo sistema imunológico. É constituída por três

cadeias pesadas denominadas CH1, CH2 e CH3 (DEISENHOFER, 1981). Células efetoras como neutrófilos, macrófagos, monócitos e as células *natural killer* (NK), que induzem citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos, apresentam em sua superfície CH2 e CH3 (SCHAEDEL e REITER, 2006). Em vacas prenhes foi identificada relação entre uma maior expressão de RNAm de *IGHG1* e a lactação, e de acordo com os autores há uma possível influência do gene no aumento da atividade de linfócitos B ou no aumento da população de linfócitos B em vacas em lactação (CERRI et al., 2012).

L-selectina (SELL)

A L-selectina é uma proteína ligante expressa pelos neutrófilos, e possui uma baixa capacidade de interação com as células endoteliais, o que permite que os neutrófilos se desloquem ao longo do endotélio para os locais de possível infecção. Avaliações imunohistoquímicas em amostras de útero humano, utilizando os anticorpos MECA-79 e HECA-452, identificaram ampla presença de L-selectina no lúmen epitelial e no epitélio glandular (LAI et al., 2005; SHAMONKI et al., 2006). Ainda em humanos, foi observada elevada expressão no endométrio durante a fase de receptividade à implantação embrionária, o que sugere uma importante interação entre a L-selectina encontrada nos blastocistos e os oligossacarídeos do epitélio endometrial, promovendo o início do processo de implantação embrionária (FUKUDA e SUGIHARA, 2007).

2.4.2 Genes relacionados à adesão celular

LGALS3BP (*Lectin galactoside soluble 3 binding protein*)

O gene *LGALS3BP*, estimulado pela ação do IFN- γ , é responsável pela codificação de proteínas de adesão da matriz celular, além de ligar-se à integrina $\beta 1$, colágeno e fibronectina (SASAKI et al. 1998). Além disso, o mesmo pode ligar-se à galectina 1, 3 e 7, promovendo a adesão entre células por meio da ligação das moléculas de galectina aos componentes da matriz extracelular (INOHARA et al., 1996; SASAKI et al., 1998). Por meio de hibridização *in situ* foi observada elevada expressão em áreas do epitélio luminal do útero, o que sugere a relação do *LGALS3BP* com o processo de adesão do conceito (WALKER et al., 2010b). Adicionalmente, em trabalho realizado por Okumu et al. (2011) foi possível observar menor expressão de *LGALS9* e *LGALS3BP* em novilhas prenhez e não prenhez até o 13º dia, sendo observado porém, aumento significativo no 16º dia apenas nas novilhas prenhes.

TIMP-2 (*Tissue inhibitor of metalloproteinases*)

A *TIMP-2* é um inibidor de proteinase e através do controle da atividade das metaloproteinases, regula a integridade da matriz extracelular. Dentre os quatro diferentes tipos de *TIMPS*, a *TIMP-2* possui a habilidade de ativar a metaloproteinase-2 da matriz (*MMP2*), através da formação de um complexo constituído com o pró-*MMP2* e o *MMP* de membrana tipo 1 (STRONGIN et al., 1995). Estudos demonstram uma elevada expressão no endométrio de vacas entre os dias 13 e 19 do ciclo estral (LEDGARD et al., 2009). Em meados da fase luteal ocorre um aumento na expressão de *TIMP2*, que ocorrendo na região de transição entre as células epiteliais e do estroma, pode levar à ativação do *MMP2*, através da ativação do complexo *TIMP2/MMP14/pro-MMP2* (CURRY e OSTEEEN, 2003). Dessa forma, o *TIMP2* estimula as *MMP2* que são responsáveis pela liberação de fatores do crescimento facilitando a receptividade uterina durante o período que o embrião está alongando.

CDH1 (Caderina-E)

Durante o processo de adesão celular a presença do *CDH1* é de fundamental importância na manutenção da diferenciação celular e na manutenção da estrutura normal do tecido epitelial. Além disso, a caderina-E é responsável pela interação do complexo catenina-citoesqueleto no espaço citoplasmático e dos dímeros de caderina-E com as células vizinhas (TAKEICHI, 1995). Estudo realizado por Reardon et al. (2012) evidenciou a existência de diferentes funções do *CDH1* e apontou o mesmo como um elemento crítico na regulação da formação e desenvolvimento uterino. Inicialmente apontou-se que úteros neonatos sem a expressão do *CDH1* não apresentam as glândulas endometriais, resultando na disfunção da implantação embrionária e decidualização endometrial. Além disso, foi identificada ainda a habilidade do *CDH1* em controlar a orientação celular, através da alteração da direção da proliferação celular e da apoptose. Através de estudos por meio da inativação dos genes *CDH1* e *Trp53* no útero, observou-se uma interrupção na regulação do ciclo celular resultando em um desenvolvimento anormal do útero. A expressão do *CDH1* no interior das células bi-nucleadas do trofoblasto no placentoma de bovinos, sugere a importância do mesmo no processo de transição da implantação para a placentação (NAKANO et al., 2005).

CLD4 (Claudina 4)

Consideradas importantes moléculas de adesão, as claudinas estão envolvidas com a adesão entre células em epitélios simples e de múltiplas camadas. Em relação à *CLD4*, a mesma parece estar envolvida com a adesão entre as células endometriais,

regulando, por exemplo, a permeabilidade do epitélio (TSUKITA e FURUSE, 2002). Foi observado em bovinos uma elevada expressão de *CLD4* durante a fase inicial da gestação (BAUERSACHS et al., 2006), bem como durante a fase luteal do ciclo estral (MITKO et al., 2008). Em humanos, estudos realizados por meio da técnica de microarranjo evidenciaram uma elevada expressão de RNAm do mesmo na fase de implantação (CARSON et al., 2002; KAO et al., 2002; BORTHWICK et al., 2003; RIESEWIJK et al., 2003).

EMMPRIN (*Extracellular matrix metalloproteinase inducer*)

Conhecido como indutor de metaloproteinase da matriz extracelular, o *EMMPRIN* codifica uma glicoproteína da superfície da membrana celular (MIYAUCHI et al., 1990; MIYAUCHI et al., 1991). A mesma tem participação em diferentes processos biológicos como na metástase tumoral (MURAMATSU e MIYAUCHI, 2003), na ovulação (SMEDTS e CURRY, 2005), no ciclo menstrual (NOGUCHI et al., 2003) e no processo de implantação embrionária e placentação (KUNO et al., 1998; CHEN et al., 2007; MISHRA et al., 2010). Estudos tem sugerido que a expressão do *EMMPRIN* resulta na ativação de MMPs, porém, sem efeitos na expressão de TIMPs, de forma a favorecer a produção e ativação de MMPs (CAUDROY et al., 2002; CHEN et al., 2009; GIBSON et al., 2011). A idéia de que o *EMMPRIN* atua no suporte à implantação embrionária e na placentogênese vem sendo sustentada com base em estudos que evidenciam a expressão do mesmo na interface materno-fetal em endométrio de bovinos (MISHRA et al., 2010; MISHRA et al., 2012).

GLYCAM-1 (*Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1*)

O *GlyCAM-1* é uma glicoproteína responsável pela adesão celular dependente da reação de glicosilação, geralmente presente em vênulas endoteliais de linfonodos periféricos e mesentéricos (LASKY et al., 1992). Nos linfonodos o *GlyCAM-1* atua como ligante para as moléculas de adesão presentes na superfície dos leucócitos, a selectina-L. Através da ligação entre o *GlyCAM-1* e a selectina-L, ocorre a ativação das integrinas $\beta 1$ e $\beta 2$, resultando na firme adesão entre a integrina e a fibronectina para que ocorra o extravasamento dos linfócitos na linfa secundária (ROSEN, 1993; HWANG, 1996; GIBLIN et al., 1997; DWIR et al., 2001). Estudos apontam para influência da P4 sobre o padrão de expressão deste gene, evidenciando uma possível participação no processo de implantação embrionária (SPENCER, 1999), uma vez que em lavados uterinos de ovelhas prenhes, foi identificado um padrão de expressão diferenciado entre

os dias 11 e 13 (baixa expressão) e os dias 15 e 17 (elevada expressão) (SPENCER et al., 2004).

SPP1 (*Secreted Phosphoprotein 1*)

SPP1 é uma glicoproteína, pertencente ao grupo das integrinas, que apresentam-se ativadas geralmente em processos como a mineralização óssea, metástase tumoral, resposta imunológica mediada por células, inflamação e a angiogênese (BUTLER et al., 1996; WEBER e CANTOR, 1996; GIACHELLI e STEITZ, 2000; DENHARDT et al., 2001). Esta glicoproteína apresenta afinidade a grande variedade de receptores de integrina presentes na superfície celular, e muitos desses receptores interferem na habilidade de adesão das células. Desta forma, tal interação pode comprometer o contato direto entre as células, a adesão entre as células e a matriz extracelular, os leucócitos, as células do músculo liso, quimiotaxia das células endoteliais, a sobrevivência das células endoteliais e epiteliais, e a migração de células tumorais (SINGH et al., 1990; SENGER et al., 1994; HU et al., 1995; LIAW et al., 1995; SMITH et al., 1996; DENDA et al., 1998; KATAGIRI et al., 1999). A importância do *SPP1* na implantação embrionária em ovelhas tem sido referenciada (Johnson et al., 2000), e nesse sentido, Gray et al., (2002) demonstraram que ovelhas UGKO (não possuem as glândulas endometriais) não apresentam a expressão deste gene. Adicionalmente, sabe-se que o *SPP1* é secretado por células do oviduto, contudo, há evidências de que não há estímulos da P4 nesta secreção (GABLER et al., 2003). Por fim, uma importante função desenvolvida pelo *SPP1* está associada à interação com as integrinas $\alpha\beta 3$ presentes no epitélio luminal e no trofotoderma do concepto (JOHNSON et al., 2001).

MMP19 (*Matrix metalloproteinases 19*)

As metaloproteinases da matriz (MMPs) celular são endopeptídeos considerados dependentes da presença do zinco e através da degradação de moléculas extracelular, atuam na degradação na matriz extracelular. Nesse contexto as MMPs estão diretamente envolvidas com a fisiologia de processos como o desenvolvimento embrionário e a remodelação tecidual, estando envolvidas ainda como a proliferação celular, migração, diferenciação, angiogênese, apoptose e defesa do hospedeiro (VISSE e NAGASE, 2003). A *MMP19*, uma MMP específica, é expressa em diferentes tecidos em humanos como a glândula mamária, a placenta, os pulmões, o pâncreas, os ovários dentre outros (PENDÁS et al., 1997). Há evidências de sua atividade durante o crescimento folicular,

ovulação e regressão do corpo lúteo, ao considerar sua expressão nas células da teca e da granulosa (MURRAY, 1995; SADOWSKI et al., 2003; JO e CURRY, 2004).

As metaloproteinases da matriz celular desenvolvem importante função no processo que possibilita a invasão das células do trofoblasto no endométrio, principalmente através da degradação da matriz extracelular (CURRY e OSTEEEN, 2003). A literatura atual ressalta a importância do *MMP19* no processo de fixação embrionária em bovinos (BAUERSACHS et al., 2008), e ao demonstrar uma elevada expressão endometrial dos genes *MMP-2*, *MMP-13*, *MMP-19* e *FURIN*, entre os dias 16 e 19 de gestação, ressalta sua participação no reconhecimento materno da prenhez e no início da implantação embrionária (MAMO et al., 2011).

SERPINA14 (*Serine peptidase inhibitors 14*)

Na superfamília de inibidores de proteases estão as serpinas, que desenvolve entre outras funções a ligação de moléculas de DNA (GRIGORYEV e WOODCOCK, 1998; IRVING et al., 2002), formação do eixo dorso-ventral e imunorregulação em drosófilas e em outros insetos (LEVASHINA, 1999; LIGOXYGAKIS et al., 2003), desenvolvimento embrionário em nematódeos (PAK et al., 2004) e controle da apoptose (RAY et al., 1992).

Foi observado em ovinos, que a formação do complexo entre a *SERPINA14* e as imunoglobulinas A e M atua de forma a prevenir a ação mediada por anticorpos contra o conceito semi-alogênico (HANSEN e NEWTON, 1988). Em bovinos, a avaliação da expressão gênica endometrial demonstrou elevados níveis de expressão do RNAm da *SERPINA14* durante o estro, sob influência de elevados níveis de E₂, o que não foi observado na fase do diestro, sob influência da P4 (BAUERSACHS et al., 2005; MITKO et al., 2008b). Por outro lado, quando comparadas vacas prenhes e não prenhes no 18º dia, foi observada uma maior expressão de RNAm da *SERPINA14* durante a fase de pré-implantação (KLEIN et al., 2006). A *SERPINA14* é secretado pelo endométrio, sob o estímulo da P4, em bovinos, ovinos e suínos (ING et al., 1989; MATHIALAGAN and Hansen, 1996; TEKIN et al., 2005). A *SERPINA14* tem efeito direto sobre o conceito, principalmente quando o mesmo começa a crescer, nutrindo e controlando o desenvolvimento do mesmo, e ainda através de ação proteolítica e da supressão da resposta imunológica maternal, garantindo a manutenção da gestação. A mesma está envolvida ainda na inibição da proliferação dos linfócitos em ovinos durante os dias 13 e 15 do ciclo estral, entre os dias 15 e 50 da gestação (ULBRICH et al., 2009).

MYH9 & MYH10 (*Myosin heavy chain*)

A cadeia pesada de miosina possui três diferentes proteínas chamadas IIA, IIB e IIC e que são codificadas respectivamente pelos genes *MYH9*, *MYH10*, e *MYH14* (SAEZ et al., 1990; SIMONS et al., 1991; LEAL et al., 2003). A miosina II, presente em diversos tecidos, apesar de apresentar marcante similaridade na sequência de aminoácidos de suas cadeias (GOLOMB et al., 2004), possui diferentes habilidades no que diz respeito a suas atividades motoras, de interações moleculares e de distribuição celular (KOLEGA, 1998; WYLIE e CHANTLER, 2001; SANDQUIST et al., 2006; ZHOU e WANG, 2008; VICENTE-MANZANARES et al., 2009). O *MYH10* está envolvido com a exocitose, processo fundamental para a secreção de importantes moléculas para o mecanismo de migração celular dos mamíferos (MOCHIDA et al., 1994; TAKAGISHI et al., 2005). Por outro lado, o *MYH9* auxilia na endocitose de receptores de quimiocinas em linfócitos T (REY et al., 2007). Por fim, pesquisas apontam para a participação do *MYH9* e do *MYH10* em etapas fundamentais da invasão, difusão e migração celular (BETAPUDI et al., 2006).

MYL12A (*Myosin light chain*)

A *MYL12A* também pertence à família da miosina II e codifica um componente do complexo da miosina que não pertence ao sarcômero, com função regulatória sobre as ligações do íon cálcio, sendo importante no mecanismo de transdução de sinais, formação de citoesqueleto, divisão celular e partição cromossômica (MAGLOTT et al., 2011). A exemplo da cadeia pesada de miosina, a cadeia leve também possui três elementos denominados: cadeia leve reguladora de miosina 12A (*MYL12A*), cadeia leve reguladora de miosina 12B (*MYL12B*) e cadeia leve reguladora de polipeptídeo 9 (*MYL9*) (GRANT et al., 1990). À nível celular, cadeias leves reguladoras codificadas por *MYL12A* e *MYL12B* são fundamentais para manter a estabilidade do MHC II (PARK et al., 2011).

2.4.3 Genes associados ao crescimento e desenvolvimento embrionário

Via de sinalização *Wnt* (*Wnt signaling pathway*)

Durante a embriogênese e o desenvolvimento embrionário uma importante via de sinalização é a sinalização *Wnt*, responsável por direcionar a polarização, a proliferação e determinar a orientação celular (LOGAN e NUSSE, 2004). Há relatos de que a ocorrência de defeitos observados já ao nascimento, cânceres e outras doenças, podem estar associados a mutações nesta via de sinalização (CLEVERS, 2006). A via

de sinalização *Wnt* é dividida em *Canonical wnt signalling* e *non-canonical wnt signalling*, sendo esta última composta pelas vias *wnt polarity*, *Wnt-Ca²⁺* e *Wnt-atypical protein kinase C* (SEMENOV et al., 2007; GRIGORYAN et al., 2008). A via de sinalização *Canonical wnt*, é responsável pelo controle da programação da expressão gênica do desenvolvimento embrionário, regulando a quantidade de co-ativador transicional de β -catenina. Uma vez havendo a indisponibilidade de receptores de *Wnt*, a proliferação celular é controlada em consequência da inibição da sinalização *Wnt*, através da degradação da β -catenina. Tal processo de degradação se dá pela ativação de um complexo constituído pela proteína estrutural axin, pelo produto do gene *adenomatous polyposis coli (APC)* que possui função de supressão tumoral, pela caseína quinase 1 e ainda pela glicogênio sintase quinase 3 (*GSK3*) (HE et al., 2004).

A degradação contínua da β -catenina, inviabiliza sua chegada ao núcleo celular, pela ação do fator ligante de DNA de células T / fator potencializador linfóide (*TCF/LEF*), promovendo a supressão dos genes-alvo da via de sinalização *Wnt*. Por outro lado, após a ativação da via *Wnt*/ β -catenina ocorre a transdução de sinais por meio da ligação entre os ligantes de *Wnt* e receptores transmembrana denominados *Frizzled (Fz)* e seu co-receptor, um receptor de lipoproteína de baixa densidade relacionado à proteína 6 (*LRP6*), ou receptor similar como o *LRP5*. Uma vez formado o complexo *Wnt-Fz-LRP6*, e com a participação da proteína estrutural *Dishevelled (Dvl)*, ocorre a fosforilação do *LRP6* e, conseqüentemente, a ativação e o recrutamento do complexo da proteína axin aos seus receptores. Esse evento compete diretamente com o processo de fosforilação da β -catenina mediado pela axin e com isso ocorre o acúmulo da β -catenina e sua migração para o núcleo celular para a formação do *TCF/LEF* e ativação da expressão dos genes-alvo da via de sinalização *Wnt*.

Algumas proteínas possuem ação inibitória sob a *Wnt*, dentre elas a *DKK1* e *DKK2* (Dickkopf-related proteins) (SEMENOV et al., 2001). Inicialmente, o *DKK1* tem sido reconhecido por estimular a atividade organizacional de embriões de *Xenopus* (gênero de rã aquática). O mesmo é expresso especificamente na porção anterior do mesendoderma (Endoderma + mesoderma) e sua expressão ocorrendo simultaneamente a proteínas inibidoras da morfogenética óssea (*Bone morphogenetic protein - BMP*) levam a formação de ectopias (GLINKA et al., 1998). Estudos em peixe-zebra, demonstram a participação do *DKK1* em partes do processo de gastrulação embrionária (HASHIMOTO et al., 2000; SHINYA et al., 2000), e uma vez expresso em excesso, promove o desenvolvimento neuronal anterior.

Na ausência de ligante da via *Wnt* ocorre a degradação da β -catenina, por meio da ação de um complexo que tem como importante elemento a *AXIN*. A mesma possui dois homologos que apresentam diferentes funções, que são a *AXIN1* e a *AXIN2*. A diminuição da expressão da *AXIN1* em ratos levou à morte embrionária prematura, devido a deformidades induzidas pela duplicação do eixo antero-posterior do eixo corporal, como consequência da atividade excessiva na via *canonical Wnt* (GLUECKSOHN-SCHOENHEIMER, 1949; ZENG e SCHULTZ, 2003). A *AXIN2* apresenta uma relação de retroalimentação com a via *canonical Wnt*, uma vez que a mesma induz a expressão da *AXIN2*, e após expressa a mesma sinaliza células com atividade na via *Wnt* (JHO et al., 2002; LUSTIG et al., 2002). Sobre a *AXIN2* foi observado também atividade inibitória sob o a via *Wnt*, uma vez que camundongos sem a *AXIN2* evidenciaram o crescimento de tecido específico resultando em má formação do crânio (YU et al., 2005) e dos dentes (LAMMI et al., 2004). Outros elementos com função na diferenciação tecidual e na organogênese são as glicoproteínas denominadas *WNTs* (CADIGAN e NUSSE, 1997). A expressão de *WNT3* tem sido relatada de forma discreta nas regiões dorsal e lateral do diencéfalo, no cordão espinhal dorsal de embriões em meados da gestação em ratos e em cérebro de adultos (ROELINK e NUSSE, 1991; PARR et al., 1993). Uma vez detectada a expressão do *WNT3* no estágio de gastrulação de ratos foi possível determinar a participação deste gene na produção do endoderma e do mesoderma (LIU et al., 1999).

Um outro importante ligante da via *Wnt* é o *WNT2*, sobre o qual há relatos de sua interação com o receptor *FZD4* nas células da granulosa em ratos (RICKEN et al., 2002). Além disso, também é descrito na literatura a interação direta entre *WNT2* e *FZD4* em células endoteliais hepáticas (KLEIN et al., 2008). Um outro receptor indentificado para o *WNT2* é o *FZD8* e sua ativação vem sendo estudada em células de câncer de pulmão (BRAVO et al., 2013).

MSX1 (*Msh homeobox 1*)

O gene *MSX1* (*Murine homeobox 1*), codifica proteínas que suprimem o processo de transcrição (CATRON et al., 1993; CATRON et al., 1995). Sua expressão tem sido relatada em diferentes partes do embrião, como no tubo neural, nos botões dos membros, e em derivados da crista neural cranial (HILL et al., 1989; ROBERT et al., 1989; ROBERT et al., 1991; LYONS et al., 1992). Considerando que a interação epitélio-mesenquimal é um aspecto comum às regiões citadas acima, a interferência do *MSX1* nesses tecidos em específico passa a ser considerada (WANG e SASSOON,

1995). Estudo realizado por Satokata e Maas, (1994) demonstrou que a remoção do *MSXI* leva a uma série de anormalidades no desenvolvimento, dentre as quais merece destaque seus efeitos deletérios nas estruturas crânio-faciais.

Há evidências de uma elevada expressão do *MSXI* no epitélio uterino de ratas adultas, seguida porém, de uma menor expressão após a fase de implantação, de forma a regular a morfologia epitelial do útero, bem como manter a responsividade do útero adulto aos fatores morfogenéticos e de desenvolvimento endometrial (PAVLOVA et al., 1994). Em vacas foi identificada uma baixa expressão no endométrio e nos placentomas após 60 dias de gestação (ISHIWATA et al., 2003). Ainda em bovinos, estudo *in vitro* demonstrou que a supressão do *MSXI* está associada à deficiência da maturação dos oócitos e da taxa de clivagem embrionária, além de afetar a expressão de inúmeros genes com função importante no desenvolvimento do oócito e do embrião no período de pré-implantação (TESFAYE et al., 2010).

RELN

Este gene é envolvido no desenvolvimento embrionário de mamíferos, e de forma precoce pode ser identificado em embriões de ratos 9,5 dias após a fecundação (IKEDA e TERASHIMA, 1997). É observada uma elevada concentração nos primeiros dias pós-natal, que declina, apresentando baixo valor em adultos. Além disso foi observada atividade do *RELN* em diferentes regiões embrionárias como no cordão espinhal (Yip et al., 2000), na camada granular abaixo da pia-máter em córtex fetal humano (Meyer and Wahle, 1999) e no desenvolvimento do corpo estriado em ratos. Camundongos portadores de mutação no gene *RELN* apresentaram ataxia e andar cambaleante, além disso esses animais podem desenvolver inúmeras anormalidades durante o desenvolvimento, como por exemplo, a inversão da laminação cortical, posicionamento anormal dos neurônios e orientação anormal de corpos celulares e fibras (FALCONER, 1951; EARLY e DEFECT, 1979).

As mutações no gene *RELN* em humanos causam lisencefalia e malformações cerebelares (HONG et al., 2000). Cerri et al. (2012) demonstraram haver uma diminuição na expressão do *RELN* em vacas lactantes prenhes, aproximadamente metade da expressão observada em vacas lactantes não prenhes, associando a menor expressão gênica ao desenvolvimento imaturo de embriões e falhas na gestação.

2.5 Metabolismo energético em vaca de leite

2.5.1 O metabolismo energético no período de transição

O período de transição entre o final da gestação e o início da lactação, está compreendido no período de três semanas pré e três semanas pós-parto e caracteriza-se pela mudança na demanda energética do animal e por constantes alterações fisiológicas, nutricionais, metabólicas e imunológicas (SORDILLO e RAPHAEL, 2013). Concomitantemente ao aumento da demanda energética ocorre a diminuição da consumo de matéria seca (CMS) resultando invariavelmente em balanço energético negativo (BEN) (BRADFORD, 2011). A diminuição da CMS em cerca de 20 a 30% (PARK et al., 2001) nas semanas que antecedem o parto é associada principalmente à elevados níveis de hormônios esteróides na corrente sanguínea (GRUMMER et al., 2004), devendo ser considerado ainda o aspecto multifatorial deste fenômeno, ressaltando a co-participação de fatores como metabólitos sanguíneos, corticosteróides, leptina, insulina, peptídeos intestinais e neuropeptídeos (INGVARTSEN e ANDERSEN, 2000).

Neste período, o perfil hormonal caracteriza-se por uma contínua diminuição nas concentrações de insulina até o momento do parto, acompanhada pelo aumento da somatotrofina no início da lactação. Paralelamente observa-se uma queda nos níveis da progesterona no momento do parto, e um aumento transitório nos níveis de estrógeno e glicocorticóide (GRUMMER, 1995).

A elevada demanda energética associada à baixa CMS resulta na diminuição dos níveis glicêmicos e da insulinemia, e conseqüentemente na mobilização da gordura corpórea (SORDILLO e RAPHAEL, 2013). Nesse sentido, diante da necessidade do equilíbrio dos níveis glicêmicos, em um primeiro momento o organismo eleva a síntese de glicose no fígado e diminui a oxidação da glicose nos tecidos periféricos, como por exemplo nos músculos. Posteriormente, ocorre a mobilização das reservas de gordura corpórea resultando na liberação de ácidos graxos não esterificados (AGNE) na circulação sanguínea (OVERTON, 2003). Os níveis circulantes de AGNE devem atender a demanda energética do organismo, porém, não ultrapassar sua capacidade de metabolização do mesmo pelo fígado (HERDT, 2000), sob o risco de resultar em acúmulo de triglicerídeo hepático e comprometimento da gliconeogênese no fígado, mecanismo fundamental na manutenção da homeostase (OVERTON, 2003).

Além da liberação de AGNE, a mobilização da gordura depositada nos adipócitos resulta ainda na liberação de glicerol, um importante elemento na produção

de triglicerídeos e de glicose via gliconeogênese (CONTRERAS e SORDILLO, 2011). O AGNE liberado é transportado na corrente sanguínea pela albumina, podendo ser utilizado como fonte de energia pelo tecido periférico, para produção da gordura do leite na glândula mamária, ou ainda, ser re-esterificado no fígado, transformado em triglicerídeo e incorporado à lipoproteínas de baixo peso molecular (VLDL) (BLOCK, 2010; EMERY et al., 1992). Os níveis plasmáticos de AGNE oscilam de acordo com o período gestacional e de lactação, podendo ser encontrado entre o final da lactação e o início do período seco valores médios de 0,2 mM/L. A partir da segunda semana antes do parto os níveis plasmáticos começam a aumentar e os valores máximos podem ser observados entre o parto e 10 dias após o mesmo, com concentrações médias superiores à 0,75 mM/L, a depender do grau de mobilização dos lipídios. Em animais que apresentam a cetose, os valores são superiores à 1,0 mM/L (ADEWUYI et al., 2005).

A β -oxidação do AGNE ocorre nas mitocôndrias e produz a acetilcoenzima A (Acetil-CoA), um importante substrato para a produção do ATP no ciclo de *Krebs*. A energia proveniente desse processo é fundamental para a gliconeogênese, que irá fornecer energia para o organismo, principalmente para a musculatura cardíaca e esquelética (BELL, 1995). A acetil-CoA é também utilizada diretamente como fonte de energia principalmente pelo fígado, e ainda pelos rins e intestino delgado (ADEWUYI et al., 2005). Porém, se a produção de acetil-CoA superar a capacidade de aproveitamento do mesmo pelo ciclo de *krebs*, ou mesmo não houver oxaloacetato suficiente para facilitar a entrada do acetil-CoA no ciclo de *Krebs*, o metabolismo do acetil-CoA é redirecionado para a produção dos corpos cetônicos acetoacetato, acetona e beta-hidroxibutirato (BHB) (BLOCK, 2010; SORDILLO e RAPHAEL, 2013).

2.5.2 Resposta inflamatória e o metabolismo energético

A relação entre o metabolismo energético e a inflamação vem sendo bastante estudada, com ênfase sobre os efeitos negativos das alterações metabólicas na resposta imunológica durante o período de transição em vaca de leite (SORDILLO e RAPHAEL, 2013; ZARRIN et al., 2014) e principalmente pela ocorrência concomitante de alterações metabólicas e doenças infecciosas comumente observadas (HEREDIA et al., 2012). Por outro lado, a relação inversa onde a resposta inflamatória predispõe alterações metabólicas vem também sendo estudada (TREVISI et al., 2009; BRADFORD et al., 2009) e aponta os mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 e IFN- α) como responsáveis por alterações metabólicas como elevados níveis de corpos cetônicos

circulantes e acúmulo de triglicerídeo hepático. Contudo, as alterações metabólicas secundárias à resposta às toxinas de bactérias gram-negativas podem ocorrer antes mesmo da produção do TNF- α , considerada um das primeiras citocinas produzidas em uma resposta de fase aguda (FONG e LOWRY, 1990; STEIGER et al., 1993), sugerindo não haver a necessidade de um aumento sistêmico deste mediador, mas um estímulo local a partir da produção de citocinas pró-inflamatórias (MARTINET et al., 1988; MILLER et al., 1997).

As bactérias gram-negativas estão entre as principais causas de infecções comuns em vacas de leite como por exemplo na septicemia neonatal, na mastite, na pneumonia e na metrite séptica pós-parto (WALDRON et al., 2003), e a resposta diante desses microorganismos ocorre pela reação do hospedeiro à endotoxina bacteriana (LPS), (LUDERITZ et al., 1984) sendo mediada primariamente por citocinas (WALDRON et al., 2003). A resposta do hospedeiro frente ao LPS pode ser caracterizada, dentre outras formas, pelo desequilíbrio no metabolismo de carboidratos, gordura, proteína e minerais (KLASING et al., 1988), independentemente da diminuição da CMS (STEIGER et al., 1999; WALDRON et al., 2003).

Jiang et al. (2008) demonstram uma menor expressão de genes associados à produção de glicose em vacas submetidas a mastite induzida por endotoxina. Nesse contexto, uma menor produção de glicose durante a lactação pode levar o animal a uma maior taxa de mobilização de gordura, ao aumento na concentração de AGNE e consequente aumento na produção hepática de corpos cetônicos. Evidências apontam para a estreita relação entre a resposta inflamatória de fase aguda e o sistema nervoso central (HOPKINS, 2007), através da ativação do eixo HPA pelas citocinas pró-inflamatórias e consequente produção de cortisol. Adicionalmente, Kumsta et al. (2007) observaram que a baixa expressão hepática da CBG (*corticosteroid-binding globulin*), uma importante proteína responsável por ligar-se ao cortisol circulante e mantê-lo inativo, está associada à atividade de IL-1 e IL-6, resultando em uma maior quantidade de cortisol ativo (livre da CBG) circulante.

Estudos realizados por Waldon et al. (2003) demonstraram que vacas em lactação que receberam LPS (IV) apresentaram alteração nos níveis plasmáticos de insulina, glucagon e diminuição na relação insulina:glucagon. A capacidade do pâncreas em produzir os hormônios reguladores da produção de glicose pode ser alterada pela ação de citocinas ou outros mediadores inflamatórios como o óxido nítrico (SPINAS et

al., 1999; ANDERSON et al., 2001) ou mesmo pelo aumento na concentração plasmática de glicocorticóides. Neste sentido, elevados níveis de glicose após desafios com LPS podem ser justificados inicialmente pela glicogenólise hepática, e sua posterior manutenção pela gliconeogênese (STEIGER et al., 1993; MIZOCK, 1995).

Novilhas desafiadas com injeções intravenosas de LPS também demonstraram alterações no metabolismo da gordura e de carboidratos, sendo observada uma primeira etapa caracterizada por elevados níveis plasmáticos de cortisol e de glicose, seguida de indícios de um deficit energético com baixo níveis de glicose plasmática e aumento da lipólise (STEIGER et al., 1993). A resposta lipolítica caracteriza-se pelo aumento nos níveis plasmáticos de glicerol e de ácidos graxos livres, e dentre os principais mediadores estão os elevados níveis de cortisol, ACTH e de catecolaminas, associado ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático (STEIGER et al., 1993).

A resposta lipolítica ao estímulo inflamatório resulta no aumento dos níveis plasmáticos de AGNE e na diminuição do BHB, contudo, a explicação para esta relação ainda encontra informações incompletas na literatura. Por um lado, o aumento nos níveis de AGNE está associado aos níveis elevados do glicocorticóides, das catecolaminas e à diminuição da CMS (WALDRON et al., 2003), porém, estudos demonstram o aumento dos níveis plasmáticos de AGNE em consequência à aplicação i.v. de TNF- α recombinante em novilhas independente da diminuição na CMS (KUSHIBIKI et al., 2002; WALDRON et al., 2003). Acerca do BHB, sabe-se que a cetogênese hepática é a principal fonte deste metabólito durante o período de BEN, contudo, em vacas com equilibrado balanço energético esta função cetogênica é exercida principalmente pelo epitélio ruminal, por meio do metabolismo do butirato (WALDRON et al., 2003). Neste sentido estudos observaram uma diminuição nos níveis plasmáticos de BHB em vacas e novilhas após injeções (i.v.) de LPS (HUNTANEN et al., 1993; STEIGER et al., 1993; WALDRON et al., 2003), porém com justificativas controversas sobre o fenômeno. Waldron et al. (2003) ao observar esta alteração em vacas em lactação e com status energético equilibrado, sugeriram uma alteração na atividade cetogênica ruminal, não necessariamente à nível de disfunção epitelial, mas pela diminuição da CMS e conseqüentemente menor disponibilidade do butirato. Por outro lado, os estudos de Huntanen et al. (1993) e Steiger et al. (1993) enfatizam os efeitos inibitórios do LPS sobre a atividade cetogênica hepática, em consequência à uma menor CMS, e adicionalmente, apontam para a possibilidade da menor concentração de BHB ocorrer em virtude de maiores estímulos ao uso dos corpos

cetônicos pelo organismo ou ainda pelos efeitos inibitórios de mediadores inflamatório como o TNF- α e a IL-1 sobre a cetogênese hepática (MENON et al., 1992).

2.6 Indução da resposta inflamatória por infusão de lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS) é um constituinte da membrana de bactérias gram-negativas, como por exemplo, a *Escherichia coli* e a *Pasteurella multocida*, produzido durante o crescimento e morte bacteriano. O mesmo, também conhecido como uma endotoxina, é responsável por promover a resposta inflamatória, através do estímulo à produção de citocinas inflamatórias, quando da ocorrência de uma infecção por esse tipo de bactérias (BURVENICH, 1983; SHUSTER et al., 1993). A estrutura do LPS é composto basicamente de três partes: o O-polissacarídeo, responsável por conferir a soro-especificidade às diferentes bactérias; a porção lipídica, responsável pela toxicidade da parede celular e conhecida como “*lipid A*”; e uma terceira porção constituída por açúcares como hexoses, hexaminas e heptoses, que fazem a ligação entre a porção O-polissacarídeo e a “*lipid A*” (CALLAHAN e YATES, 2014).

A extração do LPS de bactérias gram-negativas pode ser realizada de cinco formas diferentes, resultando em produtos com diferentes capacidades antigênicas. Os dois principais métodos amplamente utilizados para extração de LPS, que conferem satisfatória capacidade antigênica aos produtos, são: o *boivin*, a base de ácido tricloroacético, que proporciona elevada capacidade antigênica ao LPS extraído, em decorrência da elevada concentração protéica; e o *Westphal*, método a base de água e fenol resultando em um produto rico em peptídeos, ácidos nucleicos e resíduos de açúcar, provenientes da bactéria utilizada para extração (BURVENICH, 1983). Dentre os sorotipos de *E. Coli* utilizados com frequência em estudos de indução de resposta inflamatória (O55:B5 e O111:B4), o sorotipo O111:B4 vem sendo amplamente aplicado em pesquisa, principalmente por sua imunogenicidade (ROSE e SEMRAD, 1992; CARROLL et al., 2009; PLESSERS et al., 2015)

Considerando a capacidade antigênica do LPS, o mesmo vem sendo cada vez mais utilizado na indução de resposta inflamatória, possibilitando avaliar diferentes aspectos associados a processo inflamatórios e infecciosos, desde a atividade das citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda em diferentes modelos de indução (BIENIEK et al. 1998; BLUM, 2000; JEFFERY, et al. 2009; PLESSERS, et al. 2014), até aspectos mais específicos como a análise de expressão gênica em camundongos

submetidos a indução de mastite por LPS (ZENG, et al. 2006) ou a relação do LPS com a resposta inflamatória ovariana, podendo prejudicar a progressão meiótica do oócito em bovinos (JOHN e SHELDON, 2012). Indivíduos quando expostos a ação do LPS, seja por via intravascular ou extravascular, apresentam inevitavelmente o início de uma reação a princípio não específica, mas organizada e bem orquestrada, através da resposta de fase aguda (RFA), com o objetivo de controlar a infecção (BAUMANN e GAULDIE, 1994; PLESSER, et al. 2015).

Embora amplamente referenciada como resposta de fase aguda, Ceciliani et al. (2012) ressaltam que esta reação pode também ser reconhecida como resposta inflamatória sistêmica, considerando que tal característica pode acompanhar um processo agudo, bem como, em parte, um processo crônico, podendo ainda atingir diferentes órgãos e tecidos. Dentre os aspectos de uma RFA, alguns são bastante evidentes como a febre, a leucocitose e a produção de proteínas de fase aguda (MURATA et al., 2004). A reação inflamatória tem seu início através de estímulos externos (*Pathogen Associated Molecular Patterns* - PAMP) ou internos (*Damaged Associated Molecular Pattern* - DAMP) ao organismo, reconhecidos pelo sistema imunológico. Neste caso o LPS atua como um PAMP e é reconhecido por elementos do sistema imune inato (CECILIANI et al., 2012). O processo de reconhecimento dos PAMPs pelo sistema imune inato inicia quando proteínas com afinidade ao LPS se ligam ao mesmo e direcionam-o a macrófagos e outras células de defesa, que expressam o receptor de membrana CD14. Uma vez ativado o complexo CD14-LPS o mesmo interage com o receptor de membrana TLR4, responsável por ativar no interior das células o fator nuclear κ B (NF- κ B) produzindo uma cascata de reações intracelular, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que regulam a resposta inflamatória (CECILIANI et al., 2012; PLESSERS et al., 2015).

Uma vez desafiado pelo LPS, o sistema imunológico responde de forma similar a resposta do organismo frente às infecções bacterianas (gram-negativas), que caracterizam-se pela produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , a IL-1 e a IL-6, além de mediadores inflamatórios como os metabólitos do ácido arcadônico, o ON e os radicais livres, responsáveis pela letargia, desconforto respiratório, febre, hipotensão e taquicardia, além de causar diarreia, alterações leucométricas e no sistema de coagulação sanguínea (CULLOR, 1992; WALDRON et al., 2003; CONTI et al., 2004; PLESSERS et al., 2015). Plessers et al. (2015) ressaltam a precocidade do aparecimento dos sinais de desconforto respiratório como a dispnéia, os estertores

pulmonares e a tosse, após a administração intravenosa de LPS, mesmo antes do aumento sistêmico das citocinas e outros mediadores inflamatórios. A rápida apresentação dos sinais respiratórios justifica-se pelo pulmão está entre os órgãos-alvo das endotoxinas nos bovinos (OHTSUKA et al., 1997; PREAS et al., 2001), e pela ação dos macrófagos intravasculares pulmonares (MIPs) que apresentam uma elevada capacidade de reação às endotoxinas, resultando na produção local de mediadores inflamatórios como o TNF- α e de metabólitos do ácidos aracdônicos (WINKLER et al., 1988; SINGH et al., 2004). Dentre esses mediadores está o tromboxano A₂, responsável por alterações como aumento da pressão na artéria pulmonar e diminuição da complacência pulmonar, que juntos resultam no desenvolvimento da dispnéia, observado minutos após a infusão i.v. de LPS (ESBENSHADE et al., 1982; OLSON e BROWN, 1986; PLESSERS et al., 2015).

3. Referências bibliográficas

- ABE, T. N.; KOBAYASHI, K.; YOSHIMURA, B. C.; TRAPNELL, H.; KIM, R. C.; HUBBARD, M. T.; BREWER, R. C.; THOMPSON, R. G. CRYSTAL. Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. **The Journal of clinical investigation**, 87(6), 2207–15, 1991.
- ADAMS, A.E.; OLEA-POPELKA, F.J.; ROMAN-MUNIZ, I.N. Using temperature-sensing reticular boluses to aid in the detection of production diseases in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, 96, 1549-1555, 2013.
- ADEWUYI, A.A.; GRUYS, E.; VAN EERDENBURG, F.J.C.M. Non esterified fatty acids (AGNE) in dairy cattle. A review. **Veterinary Quarterly**, 27(3), 117-126, 2005.
- AHMADZADEH, A.; FRAGO, F.; SHAFII, B.; DALTON, J.C.; PRICE, W.J.; MCGUIRE, M.A. Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive performance of Holstein cows. **Animal Reproduction Science**. 112, 273-282, 2009.
- AKERS, R.M. e NICKERSON, S.C. Mastitis and its impact on structure and function in the ruminant mammary gland. **J. Mammary Gland Biol**, 2, 1-4. 2011.
- AKOLEKAR, R.; CASAGRANDE, D.; LIVANOS, P.; TETTEH, A.; NICOLAIDES, K. H. Maternal plasma pentraxin 3 at 11 to 13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. **Prenatal diagnosis**, 29(10), 934-938, 2009.
- ALGHAMDI, A.S.; FOSTER, D.N.; TROEDSSON, M. H. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. **Reproduction**, 127, 593-600, 2004.
- ALLUWAIMI, A.M. The cytokine of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. **Research in Veterinary Science**, 77, 211-222, 2004.
- ALLUWAIMI, A.M.; LEUTENEGGER, C.M.; FARVER, T.B.; ROSSITTO, P.V.; SMITH, W.L.; CULLOR, J.S. The Cytokine Markers in Staphylococcus aureus Mastitis of Bovine Mammary Gland. **Journal of Veterinary Medicine**, 50, 105–111. 2003.
- AMETAJ, B.N.; BRADFORD, B.J.; BOBE, G.; NAFIKOV, R.A.; LU, Y.; YOUNG, J.W.; BEITZ, D.C. Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. **Can. J. Anim. Sci.** 58, 165–175. 2005.
- ANDERSSON, A. K.; FLODSTROM, M.; SANDLER, S. Cytokine- induced inhibition of insulin release from mouse pancreatic β - cells deficient in inducible nitric oxide synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 281, 396-403, 2001.

ANDREASEN, A. S.; KRABBE, K. S.; KROGH-MADSEN, R.; TAUDORF, S.; PEDERSEN, B. K.; MØLLER, K. Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. **Current Medicinal Chemistry Journal**, 15(17), 1697-705, 2008.

ARCK, P. C.; FERRICK, D. A.; STEELE-NORWOOD, D.; CROITORU, K.; CLARK, D. A. Murine T cell determination of pregnancy outcome: I. Effects of strain, alphabeta T cell receptor, gammadelta T cell receptor, and gammadelta T cell subsets. **American journal of reproductive immunology**, 37, 492-502, 1997.

BADINGA, L.; MICHEL, F. J.; FIELDS, M. J.; SHARP, D. C.; R. C. SIMMEN. Pregnancy-associated endometrial expression of antileukoproteinase gene is correlated with epitheliochorial placentation. **Molecular reproduction and development**, 38, 357-63, 1994.

BANY, B. M. e KENNEDY, T.G. Interleukin-1 β regulates prostaglandin production and cyclooxygenase activity in sensitized rat endometrial stromal cells in vitro. **Biology of Reproduction**, 53, 126–132, 1995.

BARKER, A.R.; SCHRICK, F.N.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, 81, 1285-1290, 1998.

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 e diabetes**, 116, 371-84, 2008.

BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; GROSS, K.; SCHMIDT, S. E. M.; MEYER, H. H. D.; EINSPIANIER, R.; WENIGERKIND, H.; VERMEHREN, M.; BLUM, H.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. **Journal of molecular endocrinology**, 34, 889-908, 2005.

Bauersachs, S.; Ulbrich, S. E.; Gross, K.; Schmidt, S. E. M.; Meyer, H. H. D.; Wenigerkind, H. Vermehren, M.; Sinowatz, F.; Blum, H.; Wolf, E. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. **Reproduction**, 132, 319-31, 2006.

BAUMANN, H. e GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol**, 74–80, 1994.

BEL, A. W. e BAUMAN, D. E. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. 197(2), 265-278, 1997.

BETAPUDI, V.;LICATE, L. S.; EGELHOFF, T. T. Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration. **Cancer research**, 66, 4725–33, 2006.

BLOCK E. Transition Cow Research – What Makes Sense Today? In: High Plains Dairy Conference. Amarillo, Texas. 2010

BÖHM, B.; AIGNER, T.; KINNE, R.;BURKHARDT, H. The serine-protease inhibitor of cartilage matrix is not a chondrocytic gene product. **European journal of biochemistry**, 207, 773-9, 1992.

BONNET, B. N.; MARTIN, S. W.; GANNON, V. P. J. et al. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. **Can. J. Vet. Res.**, 55, 168-173, 1991.

BORTHWICK, J. M.;CHARNOCK-JONES, D. S.;TOM, B. D.;HULL, M. L.;TEIRNEY, R.; PHILLIPS, S. C.;SMITH, S. K. Determination of the transcript profile of human endometrium. **Molecular human reproduction**, 9, 19-33, 2003.

BRADFORD, B. J. The Role of Inflammation in Metabolic Disorders. In: Mid-South Ruminant Nutrition Conference. Grapevine, Texas. 2011.

BRADFORD, B. J.; MAMEDOVA, L. K.; MINTON, J. E.; DROUILLARD, J. S. and JOHNSON, B. J. Daily injection of tumor necrosis factor- α increases hepatic triglycerides and alters transcript abundance of metabolic genes in lactating dairy cattle. **Journal of Nutrition**, 139(8):1451-1456, 2009.

BRAVO, D. T.; YANG, Y. L; KUCHENBECKER, K.; HUNG, M.S.;Xu, Z.;JABLONS, D. M.;YOU, L. Frizzled-8 receptor is activated by the Wnt-2 ligand in non-small cell lung cancer. **BMC cancer**, 13, 316, 2013.

BURVENICH, C. **Mammary blood flow in conscious lactating goats in various physiological and pathological (mastitis) conditions**. Ph.D. Thesis, Ghent University, Belgium, 1983.

BURVENICH, C.;BANNERMAN, D. D.;LIPPOLIS, J. D.;PEELMAN, L.;NONNECKE, B. J.; KEHRLI, Jr.; PAAPE, M. J. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to Escherichia coli infections during the transition period. **J. Dairy Sci**, 90 (E. Suppl.), 39–54, 2007.

BUTLER, W.;RIDALL, A; MCKEE, M. **Osteopontin**. In Principles of Bone Biology. In: p. 167–181, 1996.

CADIGAN, K. M.; NUSSE, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. **Genes & Development**, 11, 3286-3305, 1997.

- CALLAHAN, G. N.; YATES, R. M. **Basic veterinary immunology**. Colorado University Press. 2014. ISBN 978-1-60732-218 4
- CAPPELLO, P.; CAORSI, C.; BOSTICARDO, M.; De ANGELIS, S.; NOVELLI, F.; FORNI, G.; GIOVARELLI, M. CCL16/LEC powerfully triggers effector and antigen-presenting functions of macrophages and enhances T cell cytotoxicity. **Journal of leukocyte biology**, 75,135-42, 2004.
- CARNEIRO, D.M.V.F. **Efeito do uso de um selante interno de tetos na profilaxia de novas infecções intramamárias no período seco e no pós-parto**. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pósgraduação em Ciências Veterinárias, Centro Agro-Veterinário – Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC. Lages, SC. 2006.
- CARROLI, J.A.; REUTER, R.R.; CHASE Jr., C.C.; COLEMAN, S.W.; RILEY, D.G.; SPIERS, D.E.; ARTHINGTON, J.D.; GALYEAN, M.L. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. **Innate Immunol**, 15, 81-89, 2009.
- CARSON, D. D.; LAGOW, E.; THATHIAH, A.; AL-SHAMI, R.; FARACH-CARSON, M. C.; VERNON, M.; YUAN, L.; FRITZ, M. A.; LESSEY, B. Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. **Molecular human reproduction**, 8, 871-9, 2002.
- CASTIGLIONI, M. T.; SCAVINI, M.; CAVALLIN, R.; PASI, F.; ROSA, S.; SABBADINI, M. G.; ROVERE-QUERINI, P. Elevation of plasma levels of the long pentraxin 3 precedes preeclampsia in pregnant patients with type 1 diabetes. **Autoimmunity**, 42, 296–8, 2009.
- CATRON, K. M., ILER, N.; ABATE, C. Nucleotides flanking a conserved TAAT core dictate the DNA binding specificity of three murine homeodomain proteins. **Molecular and cellular biology**, 13, 2354-65, 1993.
- CATRON, K. M.; ZHANG, H.; MARSHALL, S. C.; INOSTROZA, J. A.; WILSON, J. M.; ABATE, C. Transcriptional repression by Msx-1 does not require homeodomain DNA-binding sites. **Molecular and cellular biology**, 15, 861-71, 1995.
- Caudroy, S.; Polette, M.; Nawrocki-Raby, B.; Cao, J.; Toole, B. P.; Zucker, S.; Birembaut, P. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. **Clinical & experimental metastasis**, 19, 697-702, 2002.
- CECILIANI, F.; CERONB, J. J.; ECKERSALLC, P. D.; SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of proteomics**, 75, 4207-4231. 2012.
- CECILIANI, F.; CERONB, J.J.; ECKERSALLC, P. D.; SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of proteomics**, 75, 4207-4231, 2012.

- CERRI, R. L. A.; THOMPSON, I. M.; KIM, I. H.; EALY, A. D.; HANSEN, P. J.; STAPLES, C. R.; Li, J. L.; SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W. Effects of lactation and pregnancy on gene expression of endometrium of Holstein cows at day 17 of the estrous cycle or pregnancy. **Journal of dairy science**, 95, 5657–75, 2012.
- CETIN, I.; COZZI, V.; PAPAGEORGHIU, A. T.; MAINA, V.; MONTANELLI, A.; GARLANDA, C.; THILAGANATHAN, B. First trimester PTX3 levels in women who subsequently develop preeclampsia and fetal growth restriction. **Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica**, 88, 846-9, 2009.
- CETIN, I.; COZZI, V.; PASQUALINI, F.; NEBULONI, M.; GARLANDA, C.; VAGO, L.; PARDI, G.; MANTOVANI, A. Elevated maternal levels of the long pentraxin 3 (PTX3) in preeclampsia and intrauterine growth restriction. **American journal of obstetrics and gynecology**, 194, 1347-53, 2006.
- CHAVATTE-PALMER, P.; M. GUILLOMOT. Comparative implantation and placentation. **Gynecologic and obstetric investigation**, 64:166–74, 2007.
- CHEN, H. F.; SHEW, J. Y.; HO, H. N.; HSU, W. L.; YANG, Y. S. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in preimplantation embryos. **Fertility and sterility**, 72, 713-9, 1999.
- CHEN, H.W.; W.S. JIANG, AND C.R. TZENG. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. **Fertil. Steril.**, 75, 1163, 2001.
- CHEN, L.; BELTON, R. J.; NOWAK, R. A. Basigin-mediated gene expression changes in mouse uterine stromal cells during implantation. **Endocrinology**, 150, 966-76, 2009.
- CHEN, L.; NAKAI, M.; BELTON, R. J.; NOWAK, R. A. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinases during mouse embryonic development. **Reproduction**, 133, 405-14, 2007.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, 162(1), 156-159, 1987.
- CLEVERS H. Wnt/b-catenin signaling in development and disease. **Cell**, 127, 469-480, 2006.
- COHEN, J. I. Stress and mental health: a biobehavioral perspective. **Issues Ment Health Nurs**, 21, 185-202, 2000.
- COLES, E. H. **Patología Clínica Veterinaria**. 3. Ed. São Paulo: Manole, 914 p. 1984.
- CONTI, B.; TABAREAN, I.; ANDREI, C.; BARTFAI, T. Cytokines and fever. **Frontiers in Bioscience**, 9, 1433–1449, 2004.

CONTRERAS, G. A. e SORDILLO, L. M. Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 34, 281-289, 2011.

COOK, J. S.; POGSON, C. I.; SMITH, S. A. Indoleamine 2,3-dioxygenase. A new, rapid, sensitive radiometric assay and its application to the study of the enzyme in rat tissues. **The Biochemical journal**, 189, 461-466, 1980.

COX, J. H.; DEAN, R. A.; ROBERTS, C. R.; OVERALL, C. M. Matrix metalloproteinase processing of CXCL11/I-TAC results in loss of chemoattractant activity and altered glycosaminoglycan binding. **The Journal of biological chemistry**, 283, 19389-19399, 2008.

CULLOR, J. S. Shock attributable to bacteremia and endotoxemia in cattle: Clinical and experimental findings. **J. Am. Vet. Med. Assoc**, 200, 1894-1902, 1992.

CURRY, T. E. e K. G. OSTEEEN. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. **Endocrine reviews**, 24, 428-465, 2003.

DAVIDSON, J.A.; TIEMANN, U.; BETTS, J.G.; HANSEN, P.J. DNA synthesis and prostaglandin secretion by bovine endometrial cells as regulated by interleukin-1. **Reprod Fertil Dev**, 7, 1037-1043, 1995.

DEGO, O.K.; VAN DIJK, J.E.; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine Staphylococcus aureus mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. **Vet Quart**, 24, 181-198, 2002.

DEISENHOFER, J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-Å resolution. **Biochemistry**, 20, 2361-2370, 1981.

DENDA, S.; REICHARDT, L. F.; MÜLLER, U. Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin alpha8 beta1 and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. **Molecular biology of the cell**, 9, 1425-35, 1998.

DENHARDT, D. T.; NODA, M.; O'REGAN, A. W.; PAVLIN, D.; BERMAN, J. S. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. **The Journal of clinical investigation**, 107, 1055-1061, 2001.

DOBSON, H. e SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, 60-61, 743-752, 2000.

DOMINGUEZ, F.; MARTÍNEZ, S.; QUIÑONERO, A.; LORO, F.; HORCAJADAS, J. A.; PELLICER, A.; SIMÓN, C. CXCL10 and IL-6 induce chemotaxis in human trophoblast cell lines. **Molecular human reproduction**, 14, 423-30, 2008.

DOMINGUEZ, F.;PELLICER, A.;SIMON, C. The chemokine connection: hormonal and embryonic regulation at the human maternal-embryonic interface--a review. **Placenta**, 24, 48-55, 2003. Suplemento 2.

DONI, A.;MICHELA, M.; BOTTAZZI, B.; PERI, G.; VALENTINO, S.; POLENTARUTTI, N.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. Regulation of PTX3, a key component of humoral innate immunity in human dendritic cells: stimulation by IL-10 and inhibition by IFN-gamma. **Journal of leukocyte biology**, 79, 797-802, 2006.

DWIR, O.; KANSAS, G. S.; ALON, R. Cytoplasmic anchorage of L-selectin controls leukocyte capture and rolling by increasing the mechanical stability of the selectin tether. **The Journal of cell biology**, 155,145-56, 2001.

EALY, A. D.;LARSON, S. F.; LIU, L.; ALEXENKO, A. P.;WINKELMAN, G. L.;KUBISCH, H. M.; BIXBY, J. A.; ROBERTS, R. M. Polymorphic forms of expressed bovine interferon-tau genes: relative transcript abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products. **Endocrinology**, 142, 2906-2915, 2001.

EALY, A.D.; DROST, M.; HANSEN, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**, 76, 2899–2905. 1993.

EARLY, A. eDEFECT, D. Anatomy and Embryology An Early Developmental Defect in the Cerebral Cortex of the Reeler Mouse, **Anat. Embryol**, 216, 205–216, 1979.

ECKERSALL, P.D. e BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, 185, 23–27, 2010.

ECKERT, J. and NIEMANN, H. RNAm expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF-receptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Molecular human reproduction**, 4, 957-65, 1998.

EL-SAYED A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, E.; SIRARD, M. A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiol Genomics**, 28, 84-96, 2006.

EMERY, R. S.;LIESMAN, J. S.; Herdt, T. H. Metabolism of long-chain fatty acids by ruminant liver.**J. Nutr**, 122, 832-837, 1992.

ENDERS, A. C. eSCHLAFKE, S. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. **The American Journal of Anatomy**, 125, 1–29, 1969.

- ESBENSHADE, A.M.; NEWMAN, J.H.; LAMS, P. M.; JOLLES, H.; BRIGHAM, K.L. Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: lung mechanics and lung fluid balance. **J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol**, 53, 967-976, 1982.
- FALCONER, D. S. Two new mutants, "trembler" and "reeler", with neurological actions in the house mouse (*Mus musculus* L.). **Journal of Genetics**, 50, 192-205, 1951.
- FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **The Journal of experimental medicine**, 170, 2081-2095, 1989.
- FONG, Y. eLOWRY, S. F. Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. **Clin. Immunol. Im- munopathol**, 55, 157-170, 1990.
- FOURICHON, C.; SEEGER, H.; MALHER, X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. **Theriogenology**, 53, 1729-1759, 1999.
- FRANKEN, C.; MEIJER, C. J.; DIJKMAN, J. H. Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 37, 493-498, 1989.
- FUKUDA, M. N. eSUGIHARA, K. Signal transduction in human embryo implantation. **Cell cycle**, 6, 1153-1156, 2007.
- GABLER, C.; CHAPMAN, D.; KILLIAN, G. Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. **Reproduction**, 126, 721-729, 2003.
- GABRYSOVÁ, L; NICOLSON, K. S; STREETER, H. B.; VERHAGEN, J.; SABATOS-PEYTON, C. A.; MORGAN, D. J.; WRAITH, D. C. Negative feedback control of the autoimmune response through antigen-induced differentiation of IL-10-secreting Th1 cells. **The Journal of Experimental Medicine**, 206, 1755-67, 2009.
- GARLANDA, C.; BOTTAZZI, B.; BASTONE, A.; MANTOVANI, A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. **Annual Review of Immunology**, 23, 337-66, 2005.
- GARRETT, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; MORGAN, G. L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, 84, 437-46, 1988.
- GHARIB-HAMROUCHE, N.; CHÊNE, N.; GUILLOMOT, M.; MARTAL, J. Localization and characterization of EGF/TGF-alpha receptors on peri-implantation trophoblast in sheep. **Journal of reproduction and fertility**, 98, 385-92, 1993.
- GIACHELLI, C. M.; STEITZ, S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. Matrix biology. **Journal of the International Society for Matrix Biology**, 19, 615-22, 2000.

GIBLIN, P. A.; HWANG, S. T.; KATSUMOTO, T. R.; ROSEN, S. D. Ligation of L-selectin on T lymphocytes activates beta1 integrins and promotes adhesion to fibronectin. **Journal of Immunology**, 159,3498–507,1997.

GIBSON, A.; ROBINSON, N.; STREIT, A.; SHENG, G.; STERN, C. D. Regulation of programmed cell death during neural induction in the chick embryo. **The International Journal of Developmental Biology**, 55,33–43, 2011.

GIFFORD, C. A.; RACICOT, K; CLARK, D. S.; AUSTIN, K. J.; HANSEN, T. R.; LUCY, M. C.; DAVIES, C. J.; OTT, T. L. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 90, 274–80, 2007.

GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J.K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. **Nature Reviews Immunology**, 5, 243-251, 2005.

GLINKA, A.; WU, W.; DELIUS, H.; MONAGHAN, A. P.; BLUMENSTOCK, C.; NIEHRS, C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. **Nature**, 391, 357–62, 1998.

GLUECKSOHN-SCHOENHEIMER, S. The effects of a lethal mutation responsible for duplications and twinning in mouse embryos. **Journal of Experimental Zoology**, 110,47–76, 1949.

GOLOMB, E.; MA, X; JANA, S. S.; PRESTON, Y. A.; KAWAMOTO, S.; SHOHAM, N. G; GOLDIN, E.; CONTI, M. A.; SELLERS, J. R.; ADELSTEIN, R. S. Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. **The Journal of Biological Chemistry**, 279, 2800–8, 2004.

GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. **Journal Animal Science**, 75, 249-257, 1997.

GRANDIN, T. Review: Reducing handling stress improves both productivity and welfare. **Animal Science**, 14, 1-10, 1998.

GRANT, J. W.; TAUBMAN, M. B.; CHURCH, S. L.; JOHNSON, R. L.; NADAL-GINARD; B. Mammalian nonsarcomeric myosin regulatory light chains are encoded by two differentially regulated and linked genes. **The Journal of Cell Biology**, 111,1127–35,1990.

GRAY, C. A.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. **Reproduction**, 124, 289–300, 2002.

GREEN, D.; BRINK, D.R.; BAUER, M.L.; Characterization of feed intake and estradiol-17b during gestation and lactation in twin-bearing ewes. **Small Ruminant Research**, 13, 153–8,

1994.

GRIGORYAN, T.; WEND, P.; KLAUS, A.; BIRCHMEIER, W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: Conditional loss- and gain-of-function mutations of b-catenin in mice. **Genes Development**, 22, 2308–2341, 2008.

GRIGORYEV, S. A.; WOODCOCK, C. L. Chromatin structure in granulocytes. A link between tight compaction and accumulation of a heterochromatin-associated protein (MENT). **The Journal of Biological Chemistry**, 273, 3082–9, 1998.

GROEBNER, A. E.; SCHULKE, K.; SCHEFOLD, J. C.; FUSCH, G.; SINOWATZ, F.; REICHENBACH, H. D.; WOLF, E.; MEYER, H. H. D.; ULBRICH, S. E. Immunological mechanisms to establish embryo tolerance in early bovine pregnancy. **Reproduction, Fertility, and Development**, 23, 619–32, 2011a.

GROEBNER, A. E.; SCHULKE, K.; SCHEFOLD, J. C.; FUSCH, G.; SINOWATZ, F.; REICHENBACH, H. D.; WOLF, E.; MEYER, H. H. D.; ULBRICH, S. E. Immunological mechanisms to establish embryo tolerance in early bovine pregnancy. **Reproduction, Fertility, and Development**, 23, 619–32, 2011b.

GRUMMER, R. R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **J Anim Sci**, 73, 2820-2833, 1995.

GRUMMER, R.; BERTICS, R.; LA COUNT, S. J.; SNOW, D. W.; DENTINE, J. A.; STAUFFACHER, M.R. H. Estrogen induction of fatty liver in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 73, 1537–43, 1990.

GRUMMER, R.R.; MASHEK, D.G.; HAYIRLI, A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, 20(3), 447–70, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Animal Reproduction. 7. ed. São Paulo - Brazil: Manole, p. 513, 2004.

HAMEED, K. G.; SENDER, A. G.; KORWIN-KOSSAKOWSKA, A. Public health hazard due to mastitis in dairy cows. **Animal Science Papers and Reports**, 25, 73-85, 2006.

HANNA, N.; BONIFACIO, L.; WEINBERGER, B.; REDDY, P.; MURPHY, S.; ROMERO, R.; SHARMA, S. Evidence for interleukin-10-mediated inhibition of cyclo- oxygenase-2 expression and prostaglandin production in preterm human placenta. **American Journal of Reproductive Immunology**, 55,19–27, 2006.

HANSEN P.J.; SOTO, P.; NATZKE, R.P. Mastitis and fertility in cattle – possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. **American Journal Of Reproductive Immunology**, 51, 294–301, 2004.

- HANSEN, P. J.; NEWTON, G. R. Binding of immunoglobulins to the major progesterone-induced proteins secreted by the sheep uterus. **Archives of biochemistry and biophysics**, 260, 208–17, 1988.
- HANSEN, P.J.; SOTO, P.; NATZKE, R.P. Mastitis and fertility in cattle – possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. **American Journal Of Reproductive Immunology**, 51, 294–301, 2004.
- HANSEN, P.J.; The Immunology of Early Pregnancy in Farm Animals. **Reprod Dom Anim**, 46 (Suppl. 3), 18–30, 2011.
- HASHIMOTO, H.; ITOH, M.; YAMANAKA, Y.; YAMASHITA, S.; SHIMIZU, T.; SOLNICA-KREZEL, L.; HIBI, M.; HIRANO, T. Dkk1 functions in forebrain specification and axial mesendoderm formation. **Developmental biology**, 217, 138–52, 2000.
- HE, X.; SEMENOV, M.; TAMAI, K.; ZENG, X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. **Development**, 131, 1663–77, 2004.
- HERDT, T.H. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract**, 16(2), 215–30, 2000.
- HEREDIA, F.P.; GOMEZ-MARTINEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **Proc. Nutr. Soc**, 71(2), 332–8, 2012.
- HERNANDEZ-LEDEZMA, J. J.; MATHIALAGAN, N.; VILLANUEVA, C.; SIKES, J. D.; ROBERTS, R. M. Expression of bovine trophoblast interferons by in vitro-derived blastocysts is correlated with their morphological quality and stage of development. **Molecular Reproduction and Development**, 36, 1–6, 1993.
- Heyborne, K. D.; Cranfill, R. L.; Carding, S. R.; Born, W. K.; O'Brien, R. L. Characterization of gamma delta T lymphocytes at the maternal-fetal interface. **Journal of Immunology**, 149, 2872–8, 1992.
- Hicks, B. A.; Etter, S. J.; Carnahan, K. G.; Joyce, M. M.; Assiri, A. A.; Carling, S. J.; Kodali, K.; Johnson, G. A.; Hansen, T. R.; Mirando, M. A.; Woods, G. L.; Vanderwall, D. K.; Ott, T. L. Expression of the uterine Mx protein in cyclic and pregnant cows, gilts, and mares. **Journal of Animal Science**, 81, 1552–61, 2003.
- HIEMSTRA, P.; MAASSEN, R.; STOLK, J.; HEINZEL-WIELAND, R.; STEFFENS, G.; DIJKMAN, J. Antibacterial activity of antileukoprotease. **Infect. Immun**, 64, 4520–4524, 1996.
- HILL, R. E.; JONES, P. F.; REES, A. R.; SIME, C. M.; JUSTICE, M. J.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; GRAHAM, E.; DAVIDSON, D. R. A new family of mouse homeo box-

containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1. **Genes and development**, 3, 26–37, 1989.

HILTON, D. J. LIF: lots of interesting functions. **Trends in biochemical sciences**, 17, 72–6, 1992.

HIRATA, F.; HAYAISHI, O. New degradative routes of 5-hydroxytryptophan and serotonin by intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 47, 1112–9, 1972.

HOEY, T.; LEVINE, M. Divergent homeo box proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. **Nature**, 332, 858–61, 1988.

HONG, S. E.; SHUGART, Y. Y.; HUANG, D. T.; SHAHWAN, S. A.; GRANT, P. E.; HOURIHANE, J. O.; MARTIN, N. D.; WALSH, C. A. Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. **Nature genetics**, 26,93–6, 2000.

HOPKINS, S.J. Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural, hormonal collaboration. **Acta Biomed**, 78 (Suppl 1), 231-247, 2007.

HU, D. D.; LIN, E. C.; KOVACH, N. L.; HOYER, J. R.; SMITH, J. W. A biochemical characterization of the binding of osteopontin to integrins alpha v beta 1 and alpha v beta 5. **The Journal of Biological Chemistry**, 270, 26232–8, 1995.

HUHTANEN, P.; MIETTINEN, H.; YLINEN, M. Effect of increasing ruminal butyrate on milk yield and blood constituents in dairy cows fed a grass silage-based diet. **Journal of Dairy Science**, 76, 1114–1124, 1993.

HWANG, S. T. GlyCAM-1, a physiologic ligand for L-selectin, activates beta 2 integrins on naive peripheral lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, 184, 1343–1348,1996.

IKEDA, Y.; TERASHIMA, T. Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, 210:157–72, 1997.

IMAKAWA, K.; IMAI, M.; SAKAI, A.; SUZUKI, M.; NAGAOKA, K.; SAKAI, S.; LEE, S.-R.; CHANG, K.-T.; ECHTERNKAMP, S. E.; CHRISTENSON, R. K. Regulation of conceptus adhesion by endometrial CXC chemokines during the implantation period in sheep. **Molecular Reproduction and Development**, 73, 850–8, 2006.

IMAKAWA, K.; NAGAOKA, K.; NOJIMA, H.; HARA, Y.; CHRISTENSON, R. K. Changes in immune cell distribution and IL-10 production are regulated through endometrial IP-10 expression in the goat uterus. **American Journal of Reproductive Immunology**, 53, 54–64, 2005.

ING, N. H.; FRANCIS, H.; MCDONNELL, J. J.; AMANN, J. F.; ROBERTS, R. M. Progesterone induction of the uterine milk proteins: major secretory proteins of sheep endometrium. **Biology of Reproduction**, 41, 643–54, 1989.

INGVARTSEN, K. L.; ANDERSEN, J. B. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. **Journal of Dairy Science**, 83, 1573–97, 2000.

INOHARA, H.; AKAHANI, S.; KOTHS, K.; RAZ, A. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. **Cancer research**, 56, 4530–4, 1996.

IRVING, J. A.; PIKE, R. N.; LESK, A. M.; . WHISSTOCK, J. C. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. **Genome Research**, 10,1845–64, 2000.

ISHIWATA, H.; KATSUMA, S.; KIZAKI, K.; PATEL, O. V.; NAKANO, H.; TAKAHASHI, T.; IMAI, K.; HIRASAWA, A.; SHIOJIMA, S.; IKAWA, H.; SUZUKI, Y.; TSUJIMOTO, G.; IZAIKE, Y.; TODOROKI, J.; HASHIZUME, K. Characterization of gene expression profiles in early bovine pregnancy using a custom cDNA microarray. **Molecular Reproduction and Development**, 65, 9–18, 2003.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, 348, 1993.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. Garland Science Publishing, 2001.

JAROSZEWSKI, J. J.; SKARZYNSKI, D. J.; HANSEL, W. Nitric oxide as a local mediator of prostaglandin F₂α-induced regression in bovine corpus luteum: an in vivo study. **Experimental Biology and Medicine**, 228, 1057–62, 2003.

JHO, E.; ZHANG, T.; DOMON, C.; JOO, C.-K.; FREUND, J.-N.; COSTANTINI, F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. **Molecular and Cellular Biology**, 22, 1172–83, 2002.

JIANG, L.; SORENSEN, P.; RONTVED, C.; VELLS, L. and INGVARTSEN, K. Gene expression profiling of liver from dairy cows treated intra-mammary with lipopolysaccharide. **BMC Genomics**, 9(1):443. 2008.

JIANG, L.; SORENSEN, P.; RONTVED, C.; VELLS, L.; INGVARTSEN, K. Gene expression profiling of liver from dairy cows treated intra-mammary with lipopolysaccharide. **BMC Genomics**, 9(1), 443, 2008.

Jin, F. Y.; Nathan, C.; Radzioch, D.; Ding, A. Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. **Cell**, 88, 417–26, 1997.

- JO, M.; CURRY, T. E. Regulation of matrix metalloproteinase-19 messenger RNA expression in the rat ovary. **Biology of Reproduction**, 71,1796–806, 2004.
- JOHNSON, G. A.; SPENCER, T. E.; BURGHARDT, R. C.; JOYCE, M. M.; BAZER, F. W. Interferon-tau and progesterone regulate ubiquitin cross-reactive protein expression in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, 62, 622–7, 2000.
- JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; JAEGER, L. A.; KA, H.; GARLOW, J. E.; PFARRER, C.; SPENCER, T. E.; BURGHARDT, R. C. Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. **Biology of Reproduction**, 65, 820–8, 2001.
- KAO, L. C.; TULAC, S.; LOBO, S.; IMANI, B.; YANG, J. P.; GERMEYER, A.; OSTEEEN, K.; TAYLOR, R. N.; LESSEY, B. A.; GIUDICE, L. C. Global gene profiling in human endometrium during the window of implantation. **Endocrinology**, 143, 2119–38, 2002.
- KATAGIRI, Y. U.; SLEEMAN, J.; FUJII, H.; HERRLICH, P.; HOTTA, H.; TANAKA, K.; CHIKUMA, S.; YAGITA, H.; OKUMURA, K.; MURAKAMI, M.; SAIKI, I.; CHAMBERS, A. F.; UEDE, T. CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. **Cancer Research**, 59, 219–26, 1999.
- KEHRLI, M.E.; HARP, J.A. Immunity in the mammary gland. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 17, 3, 495-516, 2001.
- KIM, I. S.; JANG, S.-W.; SUNG, H. J.; LEE, J.-S.; KO, J. Differential CCR1-mediated chemotaxis signaling induced by human CC chemokine HCC-4/CCL16 in HOS cells. **FEBS Letters**, 579, 6044–8, 2005.
- KING, A. E.; CRITCHLEY, H. O. D.; KELLY, R. W. Innate immune defences in the human endometrium. **Reproductive biology and endocrinology: Reproductive Biology and Endocrinology**, 1, 116, 2003.
- KING, A. E.; CRITCHLEY, H. O.; KELLY, R. W. Presence of secretory leukocyte protease inhibitor in human endometrium and first trimester decidua suggests an antibacterial protective role. **Molecular Human Reproduction**, 6, 191–6, 2000.
- KLASING, K. C. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. **Journal of Nutrition**, 118, 1436–1446, 1988.
- KLEIN, C.; BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; EINSPANIER, R.; MEYER, H. H. D.; SCHMIDT, S. E. M.; REICHENBACH, H.-D.; VERMEHREN, M.; SINOWATZ, F.; BLUM, H.; WOLF, E. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. **Biology of Reproduction**, 74, 253–64, 2006.

KLEIN, D.; DEMORY, A.; PEYRE, F.; KROLL, J.; AUGUSTIN, H. G.; HELFRICH, W.; KZHYSKOWSKA, J.; SCHLEDZEWSKI, K.; ARNOLD, B.; GOERDT, S. Wnt2 acts as a cell type-specific, autocrine growth factor in rat hepatic sinusoidal endothelial cells cross-stimulating the VEGF pathway. **Hepatology**, 47, 1018–31, 2008.

KOJIMA, K.; KANZAKI, H.; IWAI, M.; HATAYAMA, H.; FUJIMOTO, M.; NARUKAWA, S.; HIGUCHI, T.; KANEKO, Y.; MORI, T.; FUJITA, J. Expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor in human placenta: a possible role for LIF in the growth and differentiation of trophoblasts. **Human Reproduction**, 10, 1907–11, 1995.

KOLB, A.F. Engineering immunity in the mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, 7, 2, 123-134, 2002.

KOLEGA, J. Cytoplasmic dynamics of myosin IIA and IIB: spatial “sorting” of isoforms in locomoting cells. **Journal of Cell Science**, 111,1,2085–95, 1998.

KOOLHAAS, J. M., S. M. KORTE, S. F. DE BOER, B. J. VAN DER VEGT, C. G. VAN REENEN, H. HOPSTER, I. C. DE JONG, M. A. W. RUIE, AND H. J. BLOKHUIS. Coping styles in animals: Current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience Biobehav**, 23, 925–935, 1999.

KUMSTA, R.; ENTRINGER, S.; HELLHAMMER, D.H.; WUST, S. Cortisol and ACTH responses to psychosocial stress are modulated by corticosteroid binding globulin levels. **Psychoneuroendocrinology**, 32(8-10), 1153-7, 2007.

KUNO, N.; KADOMATSU, K.; FAN, Q. W.; HAGIHARA, M.; SENDA, T.; MIZUTANI, S.; MURAMATSU, T. Female sterility in mice lacking the basigin gene, which encodes a transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin superfamily. **FEBS letters**, 425, 191–4, 1998.

Kushibiki, S.; Hodate, K.; Shingu, H.; Hayashi, T.; Touno, E.; Shi-noda, M.; Yokomizo, Y. Alterations in lipid metabolism induced by recombinant bovine tumor necrosis factor-alpha administration to dairy heifers. **Journal of Animal Science**, 80, 2151–2157. 2002.

KWAK-KIM, J. Y. H.; GILMAN-SACHS, A.; KIM, C. E. T helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures. **Chemical Immunology and Allergy**, 88, 64–79, 2005.

LAI, T.-H.; SHIH, I.-M.; VLAHOS, N.; HO, C.-L.; WALLACH, E.; ZHAO, Y. Differential expression of L-selectin ligand in the endometrium during the menstrual cycle. **Fertility and Sterility**, 83 Supp 1 1, 1297–302, 2005.

LAMMI, L.; ARTE, S.; SOMER, M.; JARVINEN, H.; LAHERMO, P.; THESLEFF, I.; PIRINEN, S.; NIEMINEN, P. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. **American Journal of Human Genetics**, 74,1043–50, 2004.

LASKY, L. A.; SINGER, M. S.; DOWBENKO, D.; IMAI, Y.; HENZEL, W. J.; GRIMLEY, C.; FENNIE, C.; GILLETT, N.; WATSON, S. R.; ROSEN, S. D. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. **Cell**, 69, 927–38, 1992.

Lawrence, M. B.; Springer, T. A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. **Cell** 65,859–873, 1991.

LAWSON, R. A.; PARR, R. A.; CAHILL, L. P. Evidence for maternal control of blastocyst growth after asynchronous transfer of embryos to the uterus of the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, 67, 477–83, 1983.

LEAL, A.; ENDELE, S.; STENGEL, C.; HUEHNE, K.; LOETTERLE, J.; BARRANTES, R.; WINTERPACHT, A.; Rautenstrauss, B. A novel myosin heavy chain gene in human chromosome 19q13.3. **Gene**, 312, 165–71, 2003.

LEDGARD, A. M.; LEE, R. S.-F; PETERSON, A. J. Bovine endometrial legumain and TIMP-2 regulation in response to presence of a conceptus. **Molecular Reproduction and Development**, 7, 665–74, 2009.

LEE, C. S., E. MEEUSEN, K. GOGOLIN-EWENS, and M. R. BRANDON. Quantitative and Qualitative Changes in the Intraepithelial Lymphocyte Population in the Uterus of Nonpregnant and Pregnant Sheep. **American Journal of Reproductive Immunology**, 28:90–96, 1992.

Lei, T.; Yang, Z. Q.; Xia, T.; Gan, L.; Chen, X. D.; Yuan, J. H.; Zhu, Y. Stage-specific expression of leukaemia inhibitory factor and its receptor in rabbit pre-implantation embryo and uterine epithelium during early pregnancy. **Reproduction in Domestic Animals**, 39, 13–8, 2004.

LEUNG, S.T.; CHENG, Z.; SHELDRIK, E.L.; DERECKA, K.; FLINT, A.P.F.; WATHES, D.C. The effects of lipopolysaccharide and interleukins-1a, -2 and -6 on oxytocin receptor expression and prostaglandin production in bovine endometrium. **Journal Endocrinol**, 168, 497–508, 2001.

LEVASHINA, E. A. Constitutive Activation of Toll-Mediated Antifungal Defense in Serpin-Deficient Drosophila. **Science**, 285, 1917–1919,1999.

LI, B.; XU, W.; XU, L.; JIANG, Z.; WEN, Z.; LI, K. XIONG, S. I-TAC is a dominant chemokine in controlling skin intragraft inflammation via recruiting CXCR3+ cells into the graft. **Cellular Immunology**, 260, 83–91, 2010.

- LIAW, L.; LINDNER, V.; SCHWARTZ, S. M.; CHAMBERS, A. F.; GIACHELLI, C. M. Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. **Circulation Research** 77, 665–72, 1995.
- LIGOXYGAKIS, P.; ROTH, S.; REICHHART, J.-M. A serpin regulates dorsal-ventral axis formation in the Drosophila embryo. **Current Biology**, CB 13, 2097–102, 2003.
- LINDE, A. et al. Innate immunity and host defense peptides in Veterinary Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 22, 2, 247-265, 2008.
- LIU, P.; WAKAMIYA, M.; SHEA, M. J.; ALBRECHT, U.; BEHRINGER, R. R.; A. BRADLEY. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. **Nature Genetics**, 22, 361–5, 1999.
- LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 20, 781–810, 2004.
- LOUREIRO, B.; BRAD, A.M.; HANSEN, P.J. Heat shock and tumor necrosis factor- α induce apoptosis in bovine preimplantation embryos through a caspase-9-dependent mechanism. **Reproduction**, 133, 1129–1137, 2007.
- LUDERITZ, O.; TANAMOTO, K.; GALANOS, C.; G. R. MCKENZIE, H. BRADE, U. ZAHNINGER, RIETSCHER, E. T.; KUSUMOTO, S.; SHIBA, T. 1984. Lipopolysaccharides: Structural principles and biologic activities. **Rev. Infect. Dis**, 6, 428–431.
- LUSSO, P. HIV and the chemokine system: 10 years later. **The EMBO journal**, 25, 447–56, 2006.
- LUSTIG, B.; JERCHOW, B.; SACHS, M.; WEILER, S.; PIETSCH, T.; KARSTEN, U.; VAN DE WETERING, M.; CLEVERS, H.; SCHLAG, P. M.; BIRCHMEIER, W.; BEHRENS, J. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. **Molecular and Cellular Biology**, 22, 1184–93, 2002.
- LYNCH, E. M. **Characterisation of physiological and immune-related biomarkers of weaning stress in beef cattle**. Thesis submitted to the National University of Ireland 2010.
- LYONS, G. E.; HOUZELSTEIN, D.; SASSOON, D.; ROBERT, B.; BUCKINGHAM, M. E. Multiple sites of Hox-7 expression during mouse embryogenesis: comparison with retinoic acid receptor RNAm localization. **Molecular Reproduction and Development**, 32, 303–14, 1992.
- MADDEN, K. S.; LIVNAT, S. Catecholamine action and immunologic reactivity. In *Psychoneuroimmunology*, 2nd ed, Academic Press. 1991.
- MAGLOTT, D.; OSTELL, J.; PRUITT, K. D.; TATUSOVA, T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. **Nucleic Acids Research**, 39, D52–7, 2011.

- MAKIMURA, S; SUZUKI, N. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. **Japanese Journal of Veterinary Science**, 44, 15–21. 1982.
- MAMO, S; MEHTA, J. P.; MCGETTIGAN, P.; FAIR, T.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; LONERGAN, P. RNA sequencing reveals novel gene clusters in bovine conceptuses associated with maternal recognition of pregnancy and implantation. **Biology of Reproduction**, 85, 1143–51, 2011.
- MARTINET, Y. K.; YAMAUCHI, R. G. Crystal. Differential expression of the tumor necrosis factor/cachectin gene by blood and lung mononuclear phagocytes. **American Review of Respiratory Disease**. 138, 659–665, 1988.
- MATHIALAGAN, N.; HANSEN, T. R. Pepsin-inhibitory activity of the uterine serpins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 93,13653–8, 1996.
- MCNEELY, T. B.; DEALY, M.; DRIPPS, D. J.; ORENSTEIN, J. M.; EISENBERG, S. P.; WAHL, S. M. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. **The Journal of Clinical Investigation**, 96, 456–64, 1995.
- MEISSER, A.; CHARDONNENS, D.; CAMPANA, A.; BISCHOF, P. Effects of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha, macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor beta on trophoblastic matrix metalloproteinases. **Molecular Human Reproduction**, 5, 252–60, 1999.
- MEMON, R. A.; FEINGOLD, K. R.; MOSER, A. H.; DOERRLER, W.; ADI, S.; DINARELLO, C. A.; GRUNFELD, C. Differential effects of inter-leukin-1 and tumor necrosis factor on ketogenesis. **American Journal of Physiology**, 263, 301-309, 1992.
- MENGE, A.C. Early embryo mortality in heifers isoimmunized with semen and conceptus. **Journal of Reproduction and Fertility**, 18, 67–74, 1969.
- MEYER, G.; WAHLE, P. The paleocortical ventricle is the origin of reelin-expressing neurons in the marginal zone of the foetal human neocortex. **The European journal of Neuroscience**, 11,3937–44, 1999.
- MILLER, A. J.; LUHESHI, G. N.; ROTHWELL, N. J.; HOPKINS, S. J. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. **American Journal of Physiology**, 272, 857–861. 1997.
- MINCHEVA-NILSSON, L. Pregnancy and gamma/delta T cells: taking on the hard questions. **Reproductive biology and endocrinology, RB&E** 1,120, 2003.

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 related extracellular matrix degrading enzymes in the endometrium during estrous cycle and early gestation in cattle. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, 8, 60, 2010.

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. **Domestic Animal Endocrinology**, 42,63–73, 2012.

MITKO, K.; ULBRICH, S. E.; WENIGERKIND, H.; SINOWATZ, F.; BLUM, H.; WOLF, E.; BAUERSACHS, S. Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle. **Reproduction**, 135, 225–40, 2008.

MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D.J.; OKUDA, K. Is tumor necrosis factor a trigger for the initiation of prostaglandin F2a release at luteolysis in cattle? **Biol Reprod**, 62, 1109–1115, 2000.

MIYAUCHI, T.; KANEKURA, T.; YAMAOKA, A.; OZAWA, M.; MIYAZAWA, S. MURAMATASU, T. Basigin, a New, Broadly Distributed Member of the Immunoglobulin Superfamily, Has Strong Homology with Both the Immunoglobulin V Domain and the {beta}-Chain of Major Histocompatibility Complex Class II Antigen. **Journal of Biochemistry**, 107,316–323,1990.

MIYAUCHI, T.; MASUZAWA, Y.; MURAMATSU, T. 1991. The Basigin Group of the Immunoglobulin Superfamily: Complete Conservation of a Segment in and around Transmembrane Domains of Human and Mouse Basigin and Chicken HT7 Antigen. **Journal of Biochemistry**, 110,770–774.

MIZOCK, B. A. Alterations in carbohydrate metabolism during stress: A review of literature. **American Journal of Medicine**, 98,75–84, 1995.

MOBERG, G.P. Influence of stress on reproduction: Measure of well-being. **Animal Stress**, 247-267, 1985.

MOCHIDA, S.; KOBAYASHI, H.; MATSUDA, Y.; YUDA, Y.; MURAMOTO, K.; NONOMURA, Y. Myosin II is involved in transmitter release at synapses formed between rat sympathetic neurons in culture. **Neuron**, 13,1131–1142, 1994.

MOORE, D.A.; CULLOR, J. S.; BONDURANT, R. H.; SISCHO, W. M. Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with altered interestrus intervals in dairy cattle. **Theriogenology**, 36, 257–265, 1991.

- MOORE, K. W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D. F.; TROUNSTINE, M. L.; KHAN, T. A.; MOSMANN, T. R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science**, 248, 1230–4, 1990.
- MORRIS, M.J.; KANEKO, K.; WALKER, S.L.; JONES, D.N.; ROUTLY, J.E.; SMITH, R.F.; DOBSON, H. Influence of lameness on follicular growth, ovulation, reproductive hormone concentrations and estrus behavior in dairy cows. **Theriogenology**, 1, 76(4), 658-68, 2011.
- MUNN, D. H.; ZHOU, M.; ATTWOOD, J. T.; BONDAREV, I.; CONWAY, S. J.; MARSHALL, B.; BROWN, C.; MELLOR, A. L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, 281, 1191–3, 1998.
- MURAMATSU, T.; MIYAUCHI, T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. **Histology and Histopathology**, 18, 981–7, 2003.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal**, 168, 28–40, 2004.
- MURRAY, M. K. Biosynthesis and immunocytochemical localization of an estrogen-dependent glycoprotein and associated morphological alterations in the sheep ampulla oviduct. **Biology of Reproduction**, 47, 889–902, 1992.
- NAGAEVA, O., L. JONSSON, and L. MINCHEVA-NILSSON. Dominant IL-10 and TGF-beta RNAm expression in gammadeltaT cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. **American Journal of Reproductive Immunology**, 48, 9–17, 2002.
- NAGAOKA, K.; NOJIMA, H.; WATANABE, F.; CHANG, K.; CHRISTENSON, R.; SAKAI, S.; IMAKAWA, K. Regulation of blastocyst migration, apposition, and initial adhesion by a chemokine, interferon gamma-inducible protein 10 kDa (IP-10), during early gestation. **The Journal of Biological Chemistry**, 278, 29048–56, 2003b.
- NAGAOKA, K.; SAKAI, A.; NOJIMA, H.; SUDA, Y.; YOKOMIZO, Y.; IMAKAWA, K.; SAKAI, S.; CHRISTENSON, R. K.. A chemokine, interferon (IFN)-gamma-inducible protein 10 kDa, is stimulated by IFN-tau and recruits immune cells in the ovine endometrium. **Biology of Reproduction**, 68, 1413–21, 2003a.
- NAKANO, H.; SHIMADA, A.; IMAI, K.; TAKAHASHI, T.; HASHIZUME, K. The cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-catenin in bovine trophoblasts during binucleate cell differentiation. **Placenta**, 26, 393–401, 2005.

- NAKAYAMA, T.; KATO, Y.; HIESHIMA, K.; NAGAKUBO, D.; KUNORI, Y.; FUJISAWA, T.; YOSHIE, O. Liver-expressed chemokine/CC chemokine ligand 16 attracts eosinophils by interacting with histamine H4 receptor. **Journal of immunology**, 173,2078–83, 2004.
- NASAR, A.; RAHMAN, A.; MEEUSEN, E. N. T.; LEE, C. S. Peri-partum changes in the intraepithelial lymphocyte population of sheep interplacentomal endometrium. **American journal of reproductive immunology**, 47, 132–41, 2002.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of dairy cattle**. National Academy Press. 7th ed., Washington, DC. 2001.
- NAUTA, A. J.; BOTTAZZI, B.; MANTOVANI, A.; SALVATORI, G.; KISHORE, U.; SCHWAEBLE, W. J.; GINGRAS, A. R.; TZIMA, S.; VIVANCO, F.; EGIDO, J.; TIJSMA, O.; HACK, E. C.; DAHA, M. R.; ROOS, A. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. **European Journal of Immunology**, 33, 465–73, 2003.
- NAUTA, A. J.; de HAIJ, S.; BOTTAZZI, B.; MANTOVANI, A.; BORRIAS, M. C.; ATEN, J.; RASTALDI, M. P.; DAHA, M. R.; VAN KOOTEN, C.; ROOS, A. Human renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. **Kidney International**, 67, 543–53, 2005.
- NICHOLS, J.; DAVIDSON, D.; TAGA, T.; YOSHIDA, K.; CHAMBERS, I.; SMITH, A. Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor RNAs in early mouse embryogenesis. **Mechanisms of Development**, 57, 123–31, 1996.
- NOGUCHI, Y.; SATO, T.; HIRATA, M.; HARA, T.; OHAMA, K.; ITO, A. Identification and characterization of extracellular matrix metalloproteinase inducer in human endometrium during the menstrual cycle in vivo and in vitro. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 88, 6063–72, 2003.
- O'Garra, A.; Vieira, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. Nature reviews. **Immunology**, 7, 425–8, 2007.
- OHTSUKA, H.; OHKI, K.; TANAKA, T.; TAJIMA, M.; YOSHINO, T.; TAKAHASHI, K. Circulating tumor necrosis factor and interleukin-1 after administration of LPS in adult cows. **J. Veterinary Medicine and Science**, 59, 927–929, 1997.
- OKULICZ, W. C.; ACE, C. I. Temporal regulation of gene expression during the expected window of receptivity in the rhesus monkey endometrium. **Biology of Reproduction**, 69, 1593–9, 2003.
- OKUMU, L. A.; FAIR, T.; SZEKERES-BARTHO, J.; O'DOHERTY, A. M.; CROWE, M. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; FORDE, N. Endometrial expression of progesterone-induced

blocking factor and galectins-1, -3, -9, and -3 binding protein in the luteal phase and early pregnancy in cattle. **Physiological Genomics**, 43,903–10, 2011.

OLSON, N.C.; BROWN, T.T. Dexamethasone-induced attenuation of cardiopulmonary dysfunction in endotoxemic calves. **Am. J. Vet.**, 47, 2187–2192. 1986.

OTT, T. L.; YIN, J.; WILEY, A. A.; KIM, H. T.; GERAMI-NAINI, B.; SPENCER, F T. E.; BARTOL, F.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Effects of the estrous cycle and early pregnancy on uterine expression of Mx protein in sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, 59,784–94, 1998.

OVERTON, T. R. Managing the Metabolism of Transition Cows. 6th Western Dairy Management Conference. 2003

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCO'N, J. J.; CAJERO-JUA'REZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, 54, 399 – 409, 2007.

PAK, S. C.; KUMAR, V.; TSU, C.; LUKE, C. J.; ASKEW, Y. S.; ASKEW, D. J.; MILLS, D. R.; BRÖMME, D.; SILVERMAN, G. A. SRP-2 is a cross-class inhibitor that participates in postembryonic development of the nematode *Caenorhabditis elegans*: initial characterization of the clade L serpins. **The Journal of Biological Chemistry**, 279,15448–59, 2004.

PAMPFER, S.; WUU, Y.D.; VANDERHEYDEN, I. DE HERTOOGH, R. Expression of tumor necrosis factor-b (TNF-b) receptors and selective effect of TNFb on the inner cell mass in mouse blastocyst. **Endocrinology**, 134, 206, 1994.

PARADOWSKA, E.; BLACH-OLSZEWSKA, Z.; GEJDEL, E. Constitutive and induced cytokine production by human placenta and amniotic membrane at term. **Placenta**, 18,441–6, 1997.

PARK, A.F., SHIRLEY, J.E.; DEFRAIN, J.M.; TITGEMEYER, E.C.; FERDINAND, E.E.; COCHRAN R.C.; et al. Changes in rumen capacity during the periparturient period in dairy cows. **J Dairy Sci**, 84 (Suppl 1),82, 2001.

PARK, I.; HAN, C.; JIN, S.; LEE, B.; CHOI, H.; KWON, J. T.; KIM, D.; KIM, J.; LIFIRSU, E.; PARK, W. J.; PARK, Z. Y.; KIM, D. H.; CHO, C. Myosin regulatory light chains are required to maintain the stability of myosin II and cellular integrity. **The Biochemical Journal**, 434,171–80, 2011.

PAVLOVA, A.; BOUTIN, E.; CUNHA, G.; SASSOON, D. Msx1 (Hox-7.1) in the adult mouse uterus: cellular interactions underlying regulation of expression. **Development**, 120,335–345, 1994.

PENDÁS, A. M.; KNÄUPER, V.; PUENTE, X. S.; LLANO, E.; MATTEI, M. G.; APTE, S.; MURPHY, G.; LÓPEZ-OTÍN, C. Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. **The Journal of Biological Chemistry**, 272,4281–6, 1997.

PICCINNI, M. P.; BELONI, L.; LIVI, C.; MAGGI, E.; SCARSELLI, G.; ROMAGNANI, S. Defective production of both leukemia inhibitory factor And type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. **Nature medicine**, 4,1020–4, 1998.

PLESSERS, E.; WYNS, H.; WATTEYN, A.; PARDON, B.; BACKER, P.; CROUBELS, S. Characterization of an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in calves with respect to the acute-phase response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 163, 46–56, 2015.

POMINI, F.; CARUSO, A.; CHALLIS, J. R. Interleukin-10 modifies the effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on the activity and expression of prostaglandin H synthase-2 and the NAD⁺-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in cultured term human villous trophoblast a. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 84, 4645–51, 1999.

POPOVICI, R. M.; KRAUSE, M. S.; JAUCKUS, J.; GERMEYER, A.; BRUM, I. S.; GARLANDA, C.; STROWITZKI, T.; VON WOLFF, M. The long pentraxin PTX3 in human endometrium: regulation by steroids and trophoblast products. **Endocrinology**, 149, 1136–43, 2008.

PREAS, H.L.; JUBRAN, A.; VANDIVIER, R.W.; REDA, D.; GODIN, P.J.; BANKS, S.M.; TOBIN, M.J.; SUFFREDINI, A.F.; Effect of endotoxin on ventilation and breath variability: role of cyclooxygenase pathway. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 164, 620–626, 2001.

PRETHEEBAN, T.; GORDON, M.; SINGH, R.; RAJAMAHENDRAN, R. Comparison of expression levels of candidate genes in endometrium of dairy heifers and lactating dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, 91, 255–264, 2011.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, 37, 3, 369 – 400, 2006.

RAY, C. A.; BLACK, R. A.; KRONHEIM, S. R.; GREENSTREET, T. A.; SLEATH, P. R.; SALVESEN, G. S.; PICKUP, D. J. Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. **Cell**, 69, 597–604, 1992.

REARDON, S. N.; KING, M. L.; MACLEAN, J. A.; MANN, J. L.; DEMAYO, F. J.; LYDON, J. P.; HAYASHI, K. CDH1 is essential for endometrial differentiation, gland

development, and adult function in the mouse uterus. **Biology of Reproduction**, 86, 141, 1–10, 2012.

REED, K. L. Porcine endometrial glandular epithelial cells in vitro: transcriptional activities of the pregnancy-associated genes encoding antileukoproteinase and uteroferrin. **Biology of Reproduction**, 55, 469–477, 1996.

REY, M., VALENZUELA-FERNÁNDEZ, A.; URZAINQUI, A.; YÁÑEZ-MÓ, M.; PÉREZ-MARTÍNEZ, M.; PENELA, P.; MAYOR, F.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Myosin IIA is involved in the endocytosis of CXCR4 induced by SDF-1alpha. **Journal of Cell Science**, 120, 1126–33, 2007.

RIBEIRO, M.G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M.C. Pathogenic microorganisms, somatic cell count and drug residues evaluation in organic bovine milk. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, 29(1), 52-58, 2009.

RICKEN, A.; LOCHHEAD, P.; KONTOGIANNEA, M.; FAROOKHI, R. Wnt signaling in the ovary: identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 RNAs. **Endocrinology**, 143, 2741–9, 2002.

RIESEWIJK, A.; MARTÍN, J.; VAN OS, R.; HORCAJADAS, J. A.; POLMAN, J.; PELLICER, A.; MOSSELMAN, S.; SIMÓN, C. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. **Molecular Human Reproduction**, 9, 253–64, 2003.

RIOLLET, C. et al. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 7, 2, 161-167, 2000.

ROBERT, B.; LYONS, G.; SIMANDL, B. K.; KUROIWA, A.; BUCKINGHAM, M. The apical ectodermal ridge regulates Hox-7 and Hox-8 gene expression in developing chick limb buds. **Genes & development**, 5, 2363–74, 1991.

ROBERT, B.; SASSOON, D.; JACQ, B.; GEHRING, W.; BUCKINGHAM, M. Hox-7, a mouse homeobox gene with a novel pattern of expression during embryogenesis. **The EMBO journal**, 8, 91–100, 1989.

ROBERTS, R. M.; FARIN, C. E.; CROSS, J. C. Trophoblast proteins and maternal recognition of pregnancy. **Oxford reviews of reproductive biology**, 12, 147–80, 1990.

ROSE, M.L.; SEMRAD, S.D.; Clinical efficacy of tirilazad mesylate for treatment of endotoxemia in neonatal calves. **American Journal of Veterinary Research**, 53, 2305–2310, 1992.

- ROSEN, S. D. Robert Feulgen Lecture. L-selectin and its biological ligands. **Histochemistry**, 100, 185–91, 1993.
- ROVERE-QUERINI, P.; ANTONACCI, S.G.; DELL'ANTONIO, A.; ANGELI, G.; ALMIRANTE, E. D.; CIN, L.; VALSECCHI, C.; LANZANI, M. G.; SABBADINI, C.; DOGLIONI, A. A.; MANFREDI, CASTIGLIONI, M. T. Plasma and tissue expression of the long pentraxin 3 during normal pregnancy and preeclampsia. **Obstetrics and Gynecology**, 108, 148–55, 2006.
- ROZEBOOM, K.J.; TROEDSSON, M.H.; HODSON, H.H.; SHURSON, G.C.; CRABO, B.G.; The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. **Journal Animal Science**, 78, 443–448, 2000.
- SADOWSKI, T.; DIETRICH, S.; KOSCHINSKY, F.; SEDLACEK, R.; Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. **Molecular Biology of the Cell**, 14, 4569–80, 2003.
- SAEZ, C. G.; MYERS, J. C.; SHOWS, T. B.; LEINWAND, L. A. Human nonmuscle myosin heavy chain RNAm: generation of diversity through alternative polyadenylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 87, 1164–8, 1990.
- SANDQUIST, J. C.; SWENSON, K. I.; DEMALI, K. A.; BURRIDGE, K.; MEANS, A. R. Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A and B during cell rounding and migration. **The Journal of Biological Chemistry**, 281, 35873–83, 2006.
- SANTOS, J.E.P.; CERRI, R.L.A.; BALLOU, M.A.; HIGGINBOTHAM, G.E.; KIRK, J.H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, 80, 31-45, 2004.
- SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R.L.A.; GALVÃO, K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, 82–83, 513–535, 2004.
- SASAKI, T., C. BRAKEBUSCH, J. ENGEL, TIMPL. R. Mac-2 binding protein is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which self-assembles into ring-like structures and binds beta1 integrins, collagens and fibronectin. **The EMBO journal**, 17,1606–13, 1998.
- SATOKATA, I.; MAAS, R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. **Nature genetics**, 6, 348–56, 1994.

SCENNA, F.N.; EDWARDS, J.L.; ROHRBACH, N.R. et al. Detrimental effects of prostaglandin F₂ α on preimplantation bovine embryos. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, 73, 215-226, 2004.

SCHAEDEL, O.; REITER, Y. Antibodies and their fragments as anti-cancer agents. **Current pharmaceutical design**, 12, 363–78, 2006.

SCHRICK, F.N.; HOCKETT, M.E.; SAXTON, A.M.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. **Journal of Dairy Science**, 84, 1407–1412, 2001.

SEMĚNOV, M. V.; TAMAI, K.; BROTT, B. K.; KÜHL, M.; SOKOL, S.; HE, X. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. **Current biology**, 11, 951–61, 2001.

SENGER, D. R.; PERRUZZI, C. A.; PAPADOPOULOS-SERGIU, A.; VAN DE WATER, L. Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. **Molecular Biology of the Cell**, 5, 565–74, 1994.

SHAMONKI, M. I.; KLIGMAN, I.; SHAMONKI, J. M.; SCHATTMAN, G. L.; HYJEK, E.; SPANDORFER, S. D.; ZANINOVIC, N.; ROSENWAKS, Z. Immunohistochemical expression of endometrial L-selectin ligand is higher in donor egg recipients with embryonic implantation. **Fertility and sterility**, 86, 1365–75, 2006.

SHINYA, M.; ESCHBACH, C.; CLARK, M.; LEHRACH, H.; FURUTANI-SEIKI, M. Zebrafish Dkk1, induced by the pre-MBT Wnt signaling, is secreted from the prechordal plate and patterns the anterior neural plate. **Mechanisms of Development**, 98, 3–17, 2000.

SHUSTER, D. E.; HARMON, R. J. Lactating cows become partially refractory to frequent intramammary endotoxin infusions: recovery of milk yield despite a persistently high somatic cell count. **Research in Veterinary Science**, 51, 272-277, 1991.

SIMONS, M.; WANG, M.; MCBRIDE, O. W.; KAWAMOTO, S.; YAMAKAWA, K.; GDULA, D.; ADELSTEIN, R. S.; WEIR, L. Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes. **Circulation research**, 69, 530–9, 1991.

SIMPSON, K. L.; KEELAN, J. A.; MITCHELL, M. D. Labor-associated changes in interleukin-10 production and its regulation by immunomodulators in human choriodecidua. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 83, 4332–7, 1998.

SINGH, B.; PEARCE, J.W.; GAMAGE, L.N.A.; JANARDHAN, K.; CALDWELL, S.; Depletion of pulmonary intravascular macrophages inhibits acute lung inflammation, **American Journal of Physiology**, 286, 363–372, 2004.

SINGH, R. P.; PATARCA, R.; SCHWARTZ, J.; SINGH, P.; CANTOR, H. Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation 1 (Eta-1) protein and murine macrophages in vitro and its effect upon macrophages in vivo. **The Journal of experimental medicine**, 171,1931–42, 1990.

SKARZYNSKI, D.J.; MIYAMOTO, Y; OKUDA, K. Production of prostaglandin f(2alpha) by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor alpha: cell type specificity and intracellular mechanisms. **Biology of Reproduction**, 62(5), 1116-20, 2000

SKARZYNSKI, D.J.; MIYAMOTO, Y.; OKUDA, K. Production of prostaglandin F 2a by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor a: cell type specificity and intracellular mechanisms. **Biology of Reproduction**, 62, 1116–1120, 2000.

SKARZYNSKI, D.J.; MIYAMOTO, Y.; OKUDA, K. Production of prostaglandin F 2a by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor a: cell type specificity and intracellular mechanisms. **Biology of Reproduction**, 62, 1116-1120, 2000.

SLEBODZINSKI, A.B.; MALINOWSKI, E.; LIPCZAK, W. Concentrations of triiodothyronine (T3), tumor necrosis factor-a (TNF-a) and interleukin-6 (IL-6) in milk from healthy and naturally infected quarters of cows. **Research in Veterinary Science**, 72, 17–21, 2002.

SMEDTS, A. M.; CURRY, T. E. Expression of basigin, an inducer of matrix metalloproteinases, in the rat ovary. **Biology of Reproduction**, 73, 80–7, 2005.

SMITH, L. L.; CHEUNG, H. K.; LING, L. E.; CHEN, J.; SHEPPARD, D.; PYTELA, R.; GIACHELLI, C. M. Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. **The Journal of Biological Chemistry**, 271,28485–91,1996.

SORDILLO, L. M.; RAPHAEL, W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 29, 267–278, 2013.

SORDILLO, L.M. et al. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, 80, 8, 1851-1865, 1997.

SOTO, P.; NATZKE, R.P.; HANSEN, P.J. Identification of possible mediators of embryonic mortality cause by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F2 α , and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. **American Journal Of Reproductive Immunology**, 50, 263, 2003.

SOTO, P.; NATZKE, R.P.; HANSEN, P.J (b). Identification of Possible Mediators of Embryonic Mortality Caused by Mastitis: Actions of Lipopolysaccharide, Prostaglandin F2 α , and the Nitric Oxide Generator, Sodium Nitroprusside Dihydrate, on Oocyte Maturation and

Embryonic Development in Cattle. **American Journal of Reproductive Immunology**, 50, 263–272, 2003.

SOTO, P.; NATZKE, R.P.; HANSEN, P.J. (a). Actions of tumor necrosis factor- α on oocyte maturation and embryonic development in cattle. **American Journal of Reproduction and Immunology**, 50,3 80–388, 2003.

SPENCER, T. E., STAGG, A. G.; OTT, T. L.; JOHNSON, G. A.; RAMSEY, W. S.; BAZER, F. W. Differential effects of intrauterine and subcutaneous administration of recombinant ovine interferon tau on the endometrium of cyclic ewes. **Biology of Reproduction**, 61, 464–70, 1999.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Reproduction**, 128, 657–68, 2004.

SPENCER, T. E.; SANDRA, O.; WOLF, E. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. **Reproduction**, 135, 165–179, 2008.

SPINAS, G. A. The dual role of nitric oxide in islet β -cells. *News Physiol. Soc.* 14, 49–54, 1999.

STAPLES, C. R.; DO AMARAL, B.; SILVESTRE, F.; CALDARI-TORRES, C.; CULLENS, F. M.; BADINGA, L.; THATCHER, W. W. Immune System Responses to Diseases/Disorders in the Dairy Animal and Potential Effects of Essential Fatty Acids. Department of Animal Sciences - University of Florida, Gainesville, 2003

STEIGER, M.; SENN, M.; ALTREUTHER, G.; WERLING, D.; SUTTER, F.; KREUZER, M.; LANGHANS, W. Effect of a Prolonged Low-Dose Lipopolysaccharide Infusion on Feed Intake and Metabolism in Heifers. **J. Animal Science**, 77, 2523–2532, 1999.

STEWART, M. D.; STEWART, D. M.; JOHNSON, G. A.; VYHLIDAL, C. A.; BURGHARDT, R. C.; SAFE, S. H.; YU-LEE, L. Y.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Interferon-tau activates multiple signal transducer and activator of transcription proteins and has complex effects on interferon-responsive gene transcription in ovine endometrial epithelial cells. **Endocrinology**, 142, 98–107, 2001.

STOJKOVIC, M.; WOLF, E.; BÜTTNER, M.; BERG, G. CHARPIGNY, A. SCHMITT, BREM, G. Secretion of biologically active interferon tau by in vitro-derived bovine trophoblastic tissue. **Biology of Reproduction**, 53, 1500–7, 1995.

STRONGIN, A. Y., I. COLLIER, G. BANNIKOV, B. L. MARMER, G. A. GRANT, and G. I. GOLDBERG. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. **The Journal of Biological Chemistry**, 270, 5331–8, 1995.

- SUNDERMAN, F.; NOMOTO, S. Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. **Clin. Chem**, 16, 903–910, 1970.
- SUSAN J. T.; CARYL, A. N. Relationship between stress, eating behavior and obesity. **Nutrition**, 23, 11-12, 887-894, 2007.
- SZEKERES-BARTHO, J.; BARAKONYI, A.; MIKO, E.; POLGAR, B.; PALKOVICS, T. The role of gamma/delta T cells in the feto-maternal relationship. **Seminars in Immunology**, 13, 229–33, 2001.
- TAKAGISHI, Y.; FUTAKI, S.; ITOH, K.; ESPREAFICO, E. M.; MURAKAMI, N.; MURATA, Y.; MOCHIDA, S. Localization of myosin II and V isoforms in cultured rat sympathetic neurones and their potential involvement in presynaptic function. **The Journal of Physiology**, 569, 195–208, 2005.
- TAKEICHI, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. **Current opinion in cell biology**, 7, 619–27, 1995.
- TEKIN, S.; HANSEN, P.J. Lymphocyte-mediated lysis of sheep chorion: susceptibility of chorionic cells to third-party and maternal cytotoxic lymphocytes and presence of cells in the endometrium exhibiting cytotoxicity toward natural-killer cell targets. **Theriogenology**, 59, 787–800, 2003.
- TEKIN, S.; PADUA, M. B.; NEWTON, G. R.; HANSEN, P. J. Identification and cloning of caprine uterine serpin. **Molecular Rreproduction and Development**, 70, 262–70, 2005.
- TESFAYE, D.; REGASSA, A.; RINGS, F.; GHANEM, N.; PHATSARA, C.; THOLEN, E.; HERWIG, R.; UN, C. SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Suppression of the transcription factor MSX1 gene delays bovine preimplantation embryo development in vitro. **Reproduction**, 139, 857–70, 2010.
- THRALL, M.A. **Hematologia e bioquímica clinica veterinária**. São Paulo: Roca, 582p. 2007.
- TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária - Uma introdução**. 6.ed. São Paulo: Roca, 532p. 2002.
- TOMEI, J. F. C.; HIEMSTRA, P. S.; HEINZEL-WIELAND, R.; KAUFFMAN, H. F. Antileukoprotease: An Endogenous Protein in the Innate Mucosal Defense against Fungi. **The Journal of Infectious Diseases**, 176, 740–747, 1997.
- TOYOKAWA, K.; CARLING, S. J.; OTT, T. L. Cellular localization and function of the antiviral protein, ovine Mx1 (oMx1): I. Ovine Mx1 is secreted by endometrial epithelial cells via an “unconventional” secretory pathway. **American journal of Reproductive Immunology**, 57, 13–22, 2007.

- TRANGUCH, S.; CHAKRABARTY, A.; GUO, Y.; WANG, H.; DEY, S. K. Maternal pentraxin 3 deficiency compromises implantation in mice. **Biology of reproduction**, 77, 425–32, 2007.
- TREVISI, E.; AMADORI, M.; BAKUDILA, A. M. and BERTONI, G. Metabolic changes in dairy cows induced by oral, low-dose interferon-alpha treatment. **Journal of Animal Science**, 87(9), 3020-29, 2009.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **The Journal of experimental medicine**, 204, 239–43, 2007.
- TSUKITA, S.; Furuse, M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. **Current opinion in cell biology**, 14, 531–6, 2002.
- ULBRICH, S. E.; FROHLICH, T.; SCHULKE, K.; ENGLBERGER, E.; WALDSCHMITT, N.; ARNOLD, G. J.; REICHENBACH, H.-D.; REICHENBACH, M.; WOLF, E.; MEYER, H. H. D.; BAUERSACHS, S. Evidence for estrogen-dependent uterine serpin (SERPINA14) expression during estrus in the bovine endometrial glandular epithelium and lumen. **Biology of Reproduction**, 81, 795–805, 2009.
- Vicente-Manzanares, M.; Ma, X.; Adelstein, R. S.; Horwitz, A. R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. Nature reviews. **Molecular cell biology**, 10, 778–90, 2009.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, 92, 827–39, 2003.
- VOGIAGIS, D.; FRY, R. C.; SANDEMAN, R. M.; SALAMONSEN, L. A. Leukaemia inhibitory factor in endometrium during the oestrous cycle, early pregnancy and in ovariectomized steroid-treated ewes. **Reproduction**, 109, 279–288, 1997.
- WALDRON, M. R.; NONNECKE, T. B. J.; OVERTON, T. R. Effect of Lipopolysaccharide on Indices of Peripheral and Hepatic Metabolism in Lactating Cows. **J. Dairy Sci.** 86,3447–3459, 2003.
- WALKER, C. G.; LITTLEJOHN, M. D.; MITCHELL, M. D.; ROCHE, J. R.; MEIER, S. Endometrial gene expression during early pregnancy differs between fertile and subfertile dairy cow strains. **Physiological genomics**, 44, 47–58, 2012.
- WALKER, C. G.; MEIER, S.; LITTLEJOHN, M. D.; LEHNERT, K.; ROCHE, J. R.; MITCHELL, M. D.. Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. **BMC genomics**, 11, 474, 2010a.

WALKER, C. G.; MEIER, S.; LITTLEJOHN, M. D.; LEHNERT, K.; ROCHE, J. R.; MITCHELL, M. D. Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. **BMC genomics**, 11, 474, 2010b.

WANG, Y.; SASSOON, D. Ectoderm-mesenchyme and mesenchyme-mesenchyme interactions regulate Msx-1 expression and cellular differentiation in the murine limb bud. **Developmental Biology**, 168, 374–82, 1995.

WEBER, G. F.; CANTOR, H. The immunology of Eta-1/osteopontin. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 7, 241–8, 1996.

WILMUT, I.; SALES, D. I. Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, 61, 179–84, 1981.

WINKLER, G.C. Pulmonary intravascular macrophages in domestic animal species: review of structural and functional properties. **American Journal of Anatomy**, 181, 217–234, 1988.

WISNIEWSKI, H.-G.; VILCEK, J. Cytokine-induced gene expression at the crossroads of innate immunity, inflammation and fertility: TSG-6 and PTX3/TSG-14. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, 15, 129–46, 2004.

WYLIE, S. R.; CHANTLER, P. D. Separate but linked functions of conventional myosins modulate adhesion and neurite outgrowth. **Nature cell biology**, 3, 88–92, 2001.

YU, Z.; CROY, B.A.; KING, G.J. Lysis of porcine trophoblast cells by endometrial natural killer-like effector cells in vitro does not require interleukin-2. **Biology Reproduction**, 51, 1279–1284, 1994.

YAMAZAKI, F.; KUROIWA, T.; TAKIKAWA, O. KIDO, R. Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. **The Biochemical Journal**, 230, 635–8, 1985.

YANKEY, S. J.; HICKS, B. A.; CARNAHAN, K. G.; ASSIRI, A. M.; SINOR, S. J.; KODALI, K.; STELLFLUG, J. N.; OTT, T. L. Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes. **The Journal of Endocrinology**, 170, 7–11, 2001.

YIP, J. W.; YIP, Y. P.; NAKAJIMA, K.; CAPRIOTTI, C. Reelin controls position of autonomic neurons in the spinal cord. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 97, 8612–6, 2000.

YOSHIDA, R.; PARK, S. W.; YASUI, H.; TAKIKAWA, O. Tryptophan degradation in transplanted tumor cells undergoing rejection. **Journal of Immunology**, 141, 2819–23, 1988.

YOSHIDA, R.; NUKIWA, T.; WATANABE, Y.; FUJIWARA, M.; HIRATA, F. HAYAISHI, O. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 203, 343–51, 1980.

YOSHIDA, R.; URADE, Y.; TOKUDA, M.; HAYAISHI, O. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 76, 4084–6, 1979.

YU, H.-M.; JERCHOW, I. B.; SHEU, T.-J.; LIU, B.; COSTANTINI, F.; PUZAS, J. E.; BIRCHMEIER, W.; HSU, W. The role of Axin2 in calvarial morphogenesis and craniosynostosis. **Development**, 133, 1995–2005, 2005.

ZADOKS, R.N.; MIDDLETON, J.R.; MCDOUGALL, S.; KATHOLM, J.; SCHUKKEN, Y.H. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. 1-16. 2011.

ZENG, F.; SCHULTZ, R. M. Gene expression in mouse oocytes and preimplantation embryos: use of suppression subtractive hybridization to identify oocyte- and embryo-specific genes. **Biology of Reproduction**, 68, 31–9, 2003.

ZHOU, M.; WANG, Y.-L.. Distinct pathways for the early recruitment of myosin II and actin to the cytokinetic furrow. **Molecular biology of the cell**, 19, 318–26, 2008.

4. Capítulo I

Efeitos da resposta inflamatória induzida por infusões intravenosas de LPS sobre a expressão gênica endometrial e o metabolismo energético de novilhas Holandesas²

“RESUMO INTERPRETATIVO”

Efeitos da resposta inflamatória induzida por infusões intravenosas de LPS sobre a expressão gênica endometrial e o metabolismo energético de novilhas Holandesas².

Por Fernandes et al. A ocorrência de alterações metabólicas no início da lactação e perdas embrionárias na fase inicial da gestação são considerados fatores limitantes da bovinocultura de leite. Este trabalho objetivou estabelecer um protocolo para induzir um estado sistêmico pró-inflamatório e avaliar seus efeitos sobre a fertilidade de novilhas Holandesas pela análise da expressão gênica endometrial, bem como sobre o metabolismo energético. A resposta inflamatória induzida não alterou os parâmetros metabólicos avaliados, porém foi observada interferência sobre genes associados à resposta imune no endométrio, principalmente relacionados à imunotolerância ao embrião, sugerindo uma possível explicação para a subfertilidade relacionada distúrbios fisiopatológicos em vacas de leite.

Efeitos da resposta inflamatória induzida por infusões intravenosas de LPS sobre a expressão gênica endometrial e o metabolismo energético de novilhas Holandesas²

CABEÇALHO: EFEITOS DA INFLAMAÇÃO NA EXPRESSÃO GÊNICA

ENDOMETRIAL

A.C.C. Fernandes,^{*,†} S. Davoodi,^{*} D. Veira,^{*} M. Ballou,[‡] L.E.H. Melo,[†] R.L.A. Cerri.^{*1}

^{*} Faculty of Land and Food Systems, The University of British Columbia, Vancouver, BC V6T 1Z4

[†] Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, Brazil 52171-900

[‡] Department of Animal and Food Sciences, Texas Tech University, Lubbock, TX 79409

RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da resposta inflamatória induzida por infusões intravenosas (iv) de lipopolissacarídeo (LPS) na expressão gênica endometrial de de novilhas não lactantes na fase lútea tardia, assim como sobre o metabolismo energético das mesmas. Para tanto, após estabelecimento de um protocolo de infusão iv (experimento 1), vinte e duas novilhas (11 meses), foram sincronizadas com o protocolo ovsynch e inseridas no grupo controle (CON; n = 11) que recebeu solução salina estéril iv, ou no grupo LPS (n = 11) submetido a infusões sequenciais de LPS iv (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 mg / Kg) a partir do segundo dia após a IA (D0). A cada infusão de LPS, as temperaturas retais foram mensuradas durante seis horas. Amostras de sangue foram colhidas diariamente, para análise de TNF- α , haptoglobina, progesterona, AGNE, BHB, e ainda para avaliações leucométricas. No D15, as biópsias endometriais foram realizadas e o material mantido a -80°C até a análise por qRT-PCR de 30 genes alvo

¹Corresponding author: R.L.A Cerri, Faculty of Land and Food Systems, University of British Columbia, Vancouver V6T 1Z4, Canada. Tel.: +1-604-822-5056; Fax: +1-604-822-6394, E-mail address: ronaldo.cerri@ubc.ca

²Trabalho editado de acordo com as normas editoriais do periódico Journal of Dairy Science

relacionados ao sistema imunitário, a moléculas de adesão e à receptividade do endométrio. Os dados foram verificados quanto à normalidade e à análise de variância para medidas repetidas utilizando proc *MIXED* e *UNIVARIATE*. Depois de cada injeção de LPS, a temperatura foi maior nas 6 primeiras horas no grupo LPS em relação ao CON ($P < 0,05$). O TNF- α ($P < 0,05$) e a haptoglobina ($P < 0,01$) aumentaram nas novilhas desafiadas. Não houve diferenças na análise de AGNE e BHB ($P > 0,05$). A contagem total de leucócitos não foi diferente entre os tratamentos ($P = 0,29$), porém, a contagem diferencial demonstrou aumento de neutrófilos segmentados, bastonetes e monócitos, e diminuição de linfócitos e eosinófilos no grupo LPS em relação ao grupo CON ($P < 0,01$). As concentrações de progesterona durante o período experimental não diferem entre os tratamentos. Dentre genes avaliados, apenas três transcritos foram expressos diferentemente. Em relação ao grupo CON, no LPS os genes IDO ($P = 0,04$; $Fold = 0,48$) e PTX3 ($P = 0,01$; $Fold = 0,38$) apresentaram uma menor expressão, enquanto que o MX1 ($P = 0,02$; $Fold = 2,85$) foi expresso em maior quantidade. As infusões de LPS induziram um estado pró-inflamatória sistêmico com limitado, mas forte efeito na expressão do gene de transcrições relacionados com o sistema imunitário, o que sugere uma possível explicação acerca da sub-fertilidade relacionadas a alterações fisiopatológicas em vacas leiteiras. Não foi observado efeito sobre o metabolismo energético.

Palavras-chave: Endométrio, inflamação, fertilidade, LPS, AGNE, BHB.

INTRODUÇÃO

Parcela considerável das perdas econômicas que comprometem a bovinocultura leiteira está associada a processos infecciosos e alteração metabólicas frequentemente observados no período de transição, assim como a perdas embrionárias precoces, que ocorrem, principalmente, entre os dias 8 e 21 após a fertilização (Roche et al., 1981; Dune et al., 2000). Desta forma, julga-se necessário conhecer os efeitos de diferentes

alterações fisiopatológicas sob o período embrionário, que de acordo com o Comitê de Nomenclatura Reprodutiva em Bovinos (1972), estende-se desde a fecundação até a fase final da diferenciação embrionária, por volta do 42º dia.

Na bovinocultura de leite a taxa de fertilização média é de 80 a 90%, porém, aos 60 dias após fertilização, apenas 35% confirmam a prenhez (Santos et al., 2004b; Sartori et al., 2010). Esta taxa expressiva de perda embrionária pode está associada a alterações homeostáticas necessárias no suporte da produção leiteira (Sartoti et al., 2002; Cerri et al., 2012) e ainda a processos inflamatórios secundários à exigência produtiva, dentre eles a mastite (Santos et al., 2004a).

Aspectos relacionados ao metabolismo energético como os ácidos graxos não esterificados (AGNE), o β -hidroxibutirato (BHB), a glicose, a insulina, o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), dentre outros, tem sido associados a diferentes efeitos sobre a fertilidade em vacas primíparas e múltíparas (Wathes et al., 2007; Ospina et al., 2010).

Considerando que o período de desenvolvimento folicular ocorra em média em quarenta dias, e que o período de espera voluntário para a realização da primeira inseminação (IA) pós-parto seja de 60 dias, evidências demonstram que o desenvolvimento dos folículos selecionados para ovular no início do período de serviço ocorra sobre o efeito do balanço energético negativo (BEN) (Ospina et al., 2010). Nesse contexto, o BEN tem sido associado à redução da taxa de fertilização e ao aumento no período de espera voluntária, no intervalo entre estros e na fase lútea (Taylor et al., 2003). Além dos efeitos deletérios sobre o ovário, o BEN também tem sido associado ao comprometimento do processo de involução uterina pós-parto, o que pode resultar em uma maior exposição do endotélio à resposta inflamatória e danos teciduais (Ospina et al., 2010).

Além das alterações metabólicas, a resposta inflamatória também vem sendo associada ao comprometimento da fertilidade em vacas de leite, com base em pesquisas que apontam a inflamação da glândula mamária como um fator de risco para a subfertilidade, e correlacionam os efeitos sobre os tecidos uterinos ao período estral no qual o processo infeccioso se instala (Barker, et al., 1998; Santos et al., 2004a).

Sua ocorrência antes da inseminação artificial (IA) pode resultar em atraso na ovulação, anovulação, ausência do comportamento de estro e, conseqüentemente um maior intervalo entre o parto e primeira IA (Suzuki et al., 2001; Lavon et al., 2008). Nesse contexto, o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal sofre interferência da resposta à endotoxina bacteriana, que inibe a liberação das gonadotrofinas, e conseqüentemente compromete o aporte do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) para a ovulação, além de interferir na maturação dos oócitos, na foliculogênese e na função luteal (Suzuki et al., 2001; Hansen et al., 2004).

Por outro lado, a ocorrência da mastite entre a IA e a confirmação da gestação, está relacionada à uma maior taxa de serviço e um maior intervalo entre estros, o que sugere a ocorrência de morte embrionária (Barker, et al., 1998; Santos, et al., 2004a). Nesse contexto, alguns mediadores inflamatórios como as interleucinas, o fator de necrose tumoral (TNF- α), o óxido nítrico e a prostaglandina (PGF_{2 α}) são apontados como fatores limitantes do desenvolvimento embrionário, podendo causar ainda, a morte embrionária (Soto et al., 2003; Hansen et al., 2004).

Apesar do conhecimento sobre a interferência de mediadores inflamatórios na fertilidade, afetando direta ou indiretamente o eixo neuroendócrino ou o embrião, alguns questionamentos sobre a relação entre tais mediadores e o útero continuam sem resposta, evidenciando a necessidade de estudos voltados para o comportamento do endométrio diante desses mediadores, e mais precisamente sobre os mecanismos

moleculares envolvidos nos processos relacionados à imunotolerância ao processo de implantação do conceito.

Assim, faz-se necessário compreender a importância da interação concepto-maternal para o estabelecimento e manutenção da gestação, onde ocorre uma regulação e diferenciação complexa da expressão gênica endometrial, sob efeito principalmente da progesterona (**P4**), estradiol (**E₂**) e do interferon-tau (**IFN-t**) (Spencer et al., 2008, Walker et al., 2010). O IFN-t, produzido pelas células do trofoblasto durante a fase de alojamento embrionário, favorece a receptividade uterina ao conceito, através da inibição da luteólise e consequente manutenção de níveis satisfatórios de P4, além de regular genes importantes no endométrio (*IFN-stimulated genes – ISG*) (Hansen et al., 1999; Spencer et al., 2008; Brooks et al., 2014). A ação do INF-t e da P4 promove a diferenciação do padrão de expressão de genes relacionados a remodelação celular, adesão e implantação, orientação e polarização celular e ao transporte de lipídio e glicose (Bauersachs et al., 2006; Forde et al., 2010).

Cerri et al. (2012) observaram que genes endometriais relacionados ao sistema imunológico como, por exemplo, o MX1, MX2, CXCL10, PTX3, SERPING1 (SERPINA14), apresentaram níveis elevados de expressão no 17º dia de gestação, enquanto que genes associados à adesão celular e remodelamento tecidual apresentaram uma baixa expressão, neste mesmo período. Adicionalmente, foi observado que a lactação exerceu efeitos negativos sob o padrão de expressão endometrial sinalizando possível relação entre a lactação e perdas gestacionais precoces. Além disso, Walker et al. (2012) demonstraram que vacas consideradas sub-férteis apresentaram uma menor expressão de genes relacionados à tolerância imunológica ao embrião, e aqueles relacionados a prevenção da luteólise e suporte para desenvolvimento embrinário.

Este estudo objetivou: 1) estabelecer, por meio de infusões intravenosas de lipopolissacarídeo (**LPS**), um protocolo de indução de resposta pró-inflamatória

sistêmica em novilhas Holandesas não-lactantes, e 2) avaliar seus efeitos sobre a expressão de genes endometriais de novilhas não-lactantes no 15º dia de gestação, bem como sobre os níveis plasmáticos de AGNE e BHB.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no centro de educação e pesquisa em gado de leite da Universidade da Columbia Britânica, em Agassiz, Canadá (*Dairy Education and Research Centre at the University of British Columbia*), de acordo com as práticas preconizadas pelo *Canadian Animal Care Council* (CACC, 2009), e aprovado pelo comitê local de bem-estar animal. Dividido em dois momentos complementares, o experimento 1 objetivou estabelecer o protocolo de indução de resposta inflamatória, a ser utilizado no experimento 2, o qual avaliou a interferência da resposta inflamatória na expressão de genes endometriais de novilhas no 15º dia de gestação e no metabolismo energético.

Experimento 1

Animais e delineamento experimental. Inicialmente, com o objetivo de avaliar o perfil da resposta inflamatória frente a diferentes estímulos, treze novilhas nulíparas não lactantes, criadas no sistema de *free stall* e com idade média de 11 meses, foram divididas em grupo controle (CON, n=3) e grupos LPS-A (n=5) e LPS-B (n=5), submetidos a protocolos distintos de infusão intravenosa (i.v.) de LPS de *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) a cada 48 h por 12 dias. Considerando como D₀ o primeiro dia de infusão, novilhas do grupo CON receberam infusões de 2 mL de solução salina; o grupo LPS-A foi submetido às doses 0,1; 0,1; 0,25; 0,25; 0,5; 0,75 µg/Kg, e o LPS-B, 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 µg/Kg em 2 mL de solução salina (Figura 1). A temperatura retal foi aferida após cada infusão, por seis horas, com

intervalo de uma hora entre as aferições, e foi realizada a pesagem das novilhas nos dias 0, 7 e 14.

As amostras de sangue foram colhidas, diariamente pela manhã e previamente às infusões, através da veia ou artéria coccígea medial, em tubos *Vacutainer* de 10 mL contendo EDTA (Becton & Dickinson Vacutainer systems, Rutherford, NJ). Posteriormente foram centrifugadas a 2.000 g por 15 min para obtenção do plasma e armazenadas a -80°C para posterior avaliação dos níveis plasmáticos de haptoglobina. Adicionalmente, foram realizadas avaliações leucométrica (Cole, 1984; Jain, 1993; Trall, 2007) nos dias 0, 1, 2, 5, 8, 11 e 14.

Para a quantificação plasmática da haptoglobina utilizou-se o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*, com base na formação do complexo haptoglobina-hemoglobina, estimando a diferença de atividade de peroxidase no plasma (Makimura e Suzuki, 1982). A reação colorimétrica foi avaliada através do leitor de ELISA (Gemini™ EM; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) configurado para leitura de comprimento de onda de 450 nm.

Considerando a interferência da resposta inflamatória no comportamento dos animais, as novilhas foram monitoradas por 21 dias através de sensores de atividade locomotora (IceTag™, IceRobotics Ltd, Midlothian, Scotland, UK.) acoplados na lateral do membro posterior de cada novilha. O monitoramento iniciou oito dias antes da primeira infusão, o que possibilitou estabelecer o comportamento padrão das novilhas, sendo realizado o download do Icetag a cada 7 dias através de software específico (IceTag Analyzer for IceTag™, IceRobotics Ltd, Midlothian, Scotland, UK). Para tanto, os aspectos avaliados foram: frequência com que os animais levantaram e deitaram, o tempo de permanência em estação e em decúbito, bem como o número de passos dados a cada período de duas horas.

Experimento 2

Animais e delineamento experimental. Trinta e três novilhas novilhas não-lactantes, com idade média de onze meses, foram submetidas ao protocolo de sincronização *ovsynch* (Pulsey et al., 1995), em associação com o dispositivo intravaginal de P4, das quais vinte e duas responderam ao protocolo e foram inseminadas no dia 0 (Figura 2). As mesmas foram distribuídas em dois grupos experimentais, os quais a partir do dia 2 passaram a receber infusões i.v, a cada 48 horas, até o 12º dia após a IA. O grupo controle (CON, n=11) foi submetido a infusões de solução salina, enquanto que o grupo LPS (n=11), de acordo com o protocolo LPS-B do experimento 1, recebeu doses crescentes (0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 µg/Kg) de LPS. Após as infusões, a temperatura retal foi aferida a cada hora, durante seis horas.

Amostras de sangue e ultrassonografia retal. As amostras de sangue foram colhidas diariamente, através da veia ou artéria coccígea medial, em tubos *vacutainer* de 10 mL com EDTA (Becton & Dickinson Vacutainer systems, Rutherford, NJ). Nos dias de infusão, as amostras foram colhidas imediatamente antes das mesmas e em seguida centrifugadas a 2.000 g por 15 min para obtenção do plasma e posterior armazenamento a -80°C.

Nesta fase do experimento as análises leucométricas foram realizadas diariamente (Cole, 1984; Jain, 1993; Trall, 2007) e as alíquotas plasmáticas foram submetidas ao ELISA para a determinação das concentrações de TNF- α , haptoglobina e P4.

A quantificação da haptoglobina seguiu a mesma metodologia aplicada ao experimento 1, enquanto que os níveis plasmáticos de TNF- α foram determinados utilizando o kit de ELISA para TNF- α bovino (RayBio®, Gerorgia, USA), que se aplica à avaliação quantitativa do TNF- α em plasma e soro bovino, com leitura realizada à 450 nm. Por fim, os níveis de progesterona foram determinados através de ELISA

competitivo, por meio de um kit comercial (Ovucheck Plasma, Biovet Inc., Quebec, CA).

A avaliação dos parâmetros metabólicos foi realizada com base na análise dos níveis plasmáticos, AGNE e BHB. Foi realizado ensaio enzimático colorimétrico para a quantificação de AGNE (HR Series AGNE-HR, WAKO Diagnostics, Mountain View, CA), com base na reação de acilação da coenzima A (CoA) que resulta em um produto de cor púrpura mensurado colorimetricamente à 550nm. A quantificação do BHB foi determinada por meio de reações de enzima acoplada (β -Hydroxybutyrate Assay Kit, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) resultando em produtos colorimétricos identificados à 450nm, proporcional à quantidade de BHB presente na amostra.

Através de ultrassom portátil (Ibex Pro; E.I. Medical Imaging, Loveland, CO), equipado com uma probe de 7.5 MHz, as novilhas foram acompanhadas durante a realização do *ovsynch*, bem como dois dias após o término do mesmo, para avaliar a resposta das novilhas ao protocolo de sincronização.

A dinâmica folicular em ambos os ovários foi avaliada e os folículos classificados de acordo com o diâmetro, onde < 5 mm, 5-10 mm e > 10 mm, foram considerados pequeno, médio e grande, respectivamente. Após a ovulação, a ultrassonografia foi realizada a cada dois dias para avaliação do diâmetro dos CLs durante o período de infusão do LPS.

Lavado uterino e biopsia endometrial. No 15º dia após a IA, foi realizada coleta de embrião, bem como do fluido uterino para a dosagem do INT-t, seguida da biópsia endometrial. Previamente, as novilhas foram submetidas à anestesia epidural, utilizando 2 mL de lidocaína a 2% (Bimeda-MTC Animal Health Inc., Cambridge, ON), e limpeza completa da genitália externa.

Para lavagem uterina e coleta de embrião, a cervix foi transpassada com o auxílio do cateter de foley (Fr=20), e foi utilizada solução comercial (Bioniche Animal Health Canada Inc., Belleville, ON). Os primeiros 20 mL de fluido uterino recuperado, após passar pelo micro-filtro, foi armazenado em tubos de 50 ml (Fisherbrand™, UK), para posterior dosagem de INT-t.

Imediatamente após a lavagem do útero, deu-se início à biópsia endometrial introduzindo no útero a arma de biópsia (Kevorkian-Young; Fine Surgicals, Hempstead, NY, USA), guiando a mesma para o corno uterino ipsilateral ao CL. Cerca de 100-200 mg de tecido endometrial foi recolhido de cada novilha. O material foi armazenado imediatamente em tubos de 2,0 mL livres de DNase e RNase, contendo RNAlater (QIAGEN, Ambion, TX, USA), para estabilizar o RNA das amostras, e posteriormente estocado à -20°C.

Quantificação de IFN-t no lavado uterino. O IFN-t foi quantificado através da técnica de *Western dot blot*, como descrito por Satterfield et al. (2006). Uma alíquota de 100 µl do lavado uterino de cada novilha foi diluída com 100 µl de solução tampão salina de 10 mM (TBS) e paralelamente, uma membrana de nitrocellulose (Healthcare-Life Sciences, Pittsburgh, PA) foi embebida com TBS e levada ao sistema *dot blot* (BioRad, Hercules, CA), apoiada em um papel filtro de *Whatman*. Os poços foram inicialmente lavados com 200 µl de TBS, para posterior adição das amostras uterinas diluídas, e em seguida, lavados novamente com 200 µl de TBS.

Durante uma hora, a membrana foi mantida à temperatura ambiente para secagem e posteriormente bloqueada com solução a 5% de leite/TBS com 0.1% Tween 20 (TBST). A membrana foi então incubada, à 4°C durante a noite, em soro primário de coelho com anti IFN-t ovino, à uma diluição de 1:1000 em 5% leite/TBST. Foi então realizada mais uma lavagem por 30 minutos em TBST e posteriormente incubada com

conjugado de peroxidase de *horseadish* com anti-IgG de coelho (Thermo Scientific, Waltham, MA) à uma diluição de 1:5.000 diluído em 5% leite/TBST por uma hora, à temperatura ambiente. Por fim, foi realizada outra lavagem por 30 minutos em TBST. A reação ao IFN-t foi detectada utilizando o substrato quimioluminescente (Supersignal West Pico, Thermo Scientific, Waltham, MA) e quantificado por um *software* de análise de imagem (Image Lab 4.1 software, Bio-Rad, Hercules, CA). O resultado foi expresso em valor total relativo de INT-t no fluido uterino, de acordo com o volume de fluido recuperado.

Para avaliação da expressão gênica, foram consideradas prenhes as novilhas que apresentaram concentração de INT-t no fluido uterino, maior que aquela observada no fluido no qual foi recuperado o menor embrião.

Extração de RNA. O RNA total foi extraído das amostras de tecido por meio da associação do TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) e o kit comercial de extração PureLink (Invitrogen, Carlsbad, CA). Foi considerada a relação de 100:1 entre tecido:TRIZOL (mg:mL) para todas as amostras, onde para cada 50-100mg de tecido, foi utilizado 1 mL de TRIzol. O RNA extraído foi avaliado quantitativamente e qualitativamente por espectrofotometria (Nano drop 2000, Thermo scientific, Wilmington, DE).

Design dos primers. As sequências de primers (*forwards* e *reverse*) foram construídas de acordo com sequências de RNAm bovino (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI), através da *Primer Quest PCR* (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Informações como sequência do primer, tamanho de fragmento e identificação do gene estão disponíveis na tabela 1.

Transcriptase reversa e síntese do cDNA. Para o processamento e obtenção dos fragmentos de cDNA (QuantiTect Rev. Transcription Kit, Qiagen), tubos contendo 12,5 µl de solução de RNA das amostras (2.500ng de RNA + água livre de nuclease)

receberam 12,25 µl de solução de DNase (2,5 µl da enzima DNase I, 1,0 µl da reação tampão DNase e 8,75 µl de água livre de nuclease) e em seguida incubadas à 37°C por 10 minutos. Desta forma a contaminação por DNA proveniente do processo de extração de RNA foi minimizada.

Após incubação, 0,25 µL de EDTA foi adicionado a cada tubo, para evitar a utilização de cátions divalentes como Mg^{2+} and Ca^{2+} , pela ação da DNase I, e prevenir ainda, a clivagem do RNA associada aos cátions. Os tubos foram novamente incubados por 10 min, a 75°C.

Uma vez submetidas as amostras à DNase, foi realizado o procedimento de transcrição reversa para síntese do cDNA, através do uso de kit comercial (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para realização da reação de cadeia de polimerase pela transcriptase reversa (RT-PCR), 5 µl de RNA, submetido à ação da DNase I na etapa anterior, foi adicionado a tubos contendo 5 µl de solução reagente contendo 1µl de 10X primers aleatórios, 0,4 µl de 0,8 mM de trifosfato de desoxirribonucleosídeo, 1 µl de 10X buffer, 0,5 µl de 50 U/µl de transcriptase reversa, 0,25 µl de 40,000 U/mL de inibidor de RNase (New England Bio Labs, Ipswich, MA) e 1,85 µl de água livre de nucleases.

Por fim, a solução foi centrifugada à 2.000 rpm a 4°C, posteriormente levadas ao termociclador (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e submetida ao seguinte protocolo: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C, por fim 5 minutos a 85°C e por fim 4°C para finalizar a reação. O produto da reação foi mantido à -20°C até a realização da reação da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Para a análise das transcrições e expressões gênicas, 30 genes foram avaliados considerando seus impactos na receptividade endometrial, adesão celular e resposta imunológica endometrial no 15º dia de gestação (Tabela 2).

A quantificação relativa da transcrição de RNAm foi realizada utilizando a qRT-PCR como descrito previamente por Cerri et al. (2012) e o gene GAPDH foi considerado o controle endógeno normalizando o nível de RNAm de cada gene. Para a realização da qRT-PCR foi preparado uma solução contendo 12,5 µl de SYBR Green mix (QuantiFast SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Valencia, CA), 2 µl de primers (*forward and reverse*), 8 µl de água para PCR (Sigma Aldrich) e 2.5 µl de amostra de cDNA. No procedimento de qRT-PCR (Step One Plus, Applied Biosystems, Foster City, CA) as amostras foram submetidas ao seguinte protocolo: programa de desnaturação realizado à 95°C por 5 minutos, seguido do programa de amplificação constituído por 40 ciclos de três etapas: 95°C por 15 segundos, 60°C por um minuto, e 72°C por 20 segundos. Foram consideradas para análise apenas reações com valores de Ct (*cycle threshold*) menor do que 35 ciclos. As sequências de nucleotídeos utilizadas para amplificar cada gene testado estão apresentadas na tabela 1.

Análises estatísticas. Os resultados da qRT-PCR foram analisados de acordo com os valores médios de Ct para cada transcrição. O valor de Ct do GAPDH, gene de referência, foi calculado e normalizado possibilitando o cálculo dos valores de delta (Δ) Ct, enquanto que mudanças em transcrições específicas e em relativa abundância foram calculadas pelo método delta delta ($\Delta\Delta$) Ct (Livak e Schmittgen, 2001). O procedimento Univariate do software estatístico SAS versão 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) foi utilizado para avaliar os dados quanto a normalidade, e quando necessário transforma-los (*log*). Medidas repetidas foram analisadas utilizando o procedimento *Mixed* do SAS.

RESULTADOS

Experimento 1

A avaliação da temperatura retal demonstrou que os protocolos LPS-A e LPS-B induziram uma resposta febril semelhante atingindo o pico da temperatura, em média, quatro horas após as infusões (Gráfico 1). Em relação ao peso dos animais, não foi observada influência de nenhum dos protocolos estudados ($p = 0,98$).

Foi observada influência dos protocolos LPS-A e LPS-B sobre os níveis plasmáticos de haptoglobina, porém, o protocolo LPS-B demonstrou uma maior capacidade de manter níveis moderadamente elevados em relação ao grupo controle, principalmente no período final do experimento. Tal aspecto está bem caracterizado entre os dias 4 e 7, uma vez que os animais LPS-A apresentaram queda acentuada, por vezes, igualando-se aos valores do grupo controle. Por outro lado, os animais LPS-B, no mesmo período, apresentaram uma queda mantendo valores superiores ao grupo controle, ou tendência em se manter superior (Gráfico 2).

Os protocolos avaliados influenciaram também os valores leucométricos totais de forma discreta e pontual, considerando que durante o experimento, apenas no dia 11 foram observados valores superiores nos animais LPS-A ($p=0,018$) e LPS-B ($p<0,001$), em relação ao controle. No dia 14, foi observada a manutenção da diferença entre os animais LPS-A e o controle ($p=0,015$), porém, não entre LPS-B e o controle ($p=0,9$) (Gráfico 3.A). Em relação aos diferentes tipo celulares, o linfócitos apresentaram-se elevados nas novilhas LPS-B em relação ao grupo controle também no dia 11 ($p=0,031$) (Gráfico 3.B). Os maiores valores de neutrófilos seguidados foram encontrados nos dias 1 e 11, sob efeito principalmente do protocolo LPS-B, tendência seguida sempre pelos animais LPS-A (Gráfico 3C). Os bastonetes apresentaram-se elevados nos animais LPS-A nos dias 1, 5 e 14, enquanto que nas novilhas LPS-B, valores elevados em relação ao controle foram observados apenas nos dias 11 e 14 (Gráfico 3.D) Por fim,

outro grupo celular que merece destaque são os monócitos, que foram observado em maior quantidade nos animais LPS-A (0,003) e LPS-B ($p=0,025$) em relação aos controles, no dia 14 do experimento (Gráfico 3.E).

A avaliação da interferência dos perfis inflamatórios estabelecidos, sobre o comportamento das novilhas, demonstrou que durante alguns períodos do experimento, os animais submetidos ao LPS permaneceram menos tempo deitados do que os animais controle ($p<0,0001$) (Gráfico 4). Porém, ao quantificar os passos realizados, não foi observada diferença entre os três grupos avaliados ($p>0,05$), o que sugere que o tempo a mais que os animais desafiados se apresentaram em estação, não necessariamente desenvolveram atividade ou deslocaram-se, sugerindo uma baixa atividade neste período, podendo está associado à letargia consequente ao estado inflamatório induzido.

Experimento 2

Avaliação da resposta inflamatória e parâmetros metabólicos. O monitoramento da temperatura retal após as infusões de LPS, a exemplo do que foi observado no experimento 1, demonstrou variação significativa ($P<0,05$) dos valores médios entre os grupos CON e LPS, desde a primeira hora após aplicação (CON = $38,5^{\circ}\text{C}$ e LPS = $39,3^{\circ}\text{C}$), até a última aferição, período no qual o grupo CON apresentou temperatura estável de $38,5^{\circ}\text{C}$ e o grupo LPS $38,9^{\circ}\text{C}$. O pico da temperatura atingido pelo grupo LPS ocorreu, em média, entre a 4ª e 5ª hora após as aplicações, atingindo em média $40,05^{\circ}\text{C}$ (Gráfico 5).

Considerando a primeira infusão realizada no D2 do experimento, os níveis plasmáticos de haptoglobina no grupo LPS apresentaram-se superiores aos encontrados no grupo CON ($P < 0,01$), sendo observada esta diferença desde o D3 até o D13, com valores máximos sendo atingidos em média no D4 (Gráfico 6). Comportamento semelhante foi observado nos níveis plasmáticos de TNF- α com valores superiores no

grupo LPS, nos dias 8 ($P = 0,05$), 11 ($P = 0,01$) e 13 ($P = 0,04$), em relação ao CON (Gráfico 7).

Em relação aos valores médios de leucócitos totais, com exceção dos dias 11 e 13, nos quais o grupo LPS apresentou valores médios superiores ($P < 0,01$) aos apresentados pelo CON, não foi observada interferência do LPS nos demais dias do experimento ($p = 0,29$). Apesar de pouco influenciar na contagem de leucócitos totais, o protocolo utilizado alterou a distribuição dos diferentes tipos de leucócitos no grupo LPS em relação ao CON, resultando em uma menor contagem de linfócitos durante o período do experimento ($p < 0,05$), assim como de eosinófilos entre os dias 7 e 12 ($p < 0,05$). Por outro lado, foi observado aumento na contagem de neutrófilos segmentados durante o período do experimento ($p < 0,05$), de bastonetes, a partir do dia 5 ($p < 0,01$), e de monócitos nos dias 7 e 13 do experimento ($p < 0,01$) (Gráfico 8 A-F).

Não foi observada diferença entre as concentrações plasmáticas de AGNE e BHB entre os grupos CON e LPS ($p > 0,05$).

Monitoramento ovariano, progesterona e interferon-tau. O monitoramento ovariano das novilhas previamente à IA certificou a responsividades das mesmas ao protocolo de sincronização e confirmou que não houve alterações pré-ovulatórias. Além disso não foi observada diferença nos diâmetros dos corpos lúteos, durante a realização do experimento.

Os níveis plasmáticos de P4 não apresentaram diferença entre os grupos estudados ($p > 0,05$), assim como os valores de INT-t apresentados pelas novilhas prenhes ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Expressão gênica endometrial. A expressão de genes associados à adesão celular e ao crescimento e desenvolvimento embrionário não sofreram interferência do perfil pró-inflamatório induzido nas novilhas. Porém, dentre os genes associados à resposta imunológica endometrial, os genes PTX3 ($p = 0,01$) e IDO ($p = 0,03$) apresentam uma

expressão aproximadamente duas vezes menor, no grupo LPS em relação ao CON. Enquanto que o gene MX1 ($p = 0,02$) apresentou uma expressão cerca de três vezes maior no LPS, em relação ao CON (Gráfico 9). Os demais genes avaliados para resposta imune endometrial não foram alterados pelo perfil inflamatório induzido.

DISCUSSÃO

Apesar da ampla utilização do LPS na indução de resposta inflamatória, não se encontra na literatura um protocolo estabelecido para indução de uma resposta sistêmica longa e moderada, e que possa interferir no sistema reprodutivo. Desta forma, o protocolo LPS-B foi escolhido considerando que o mesmo, a princípio, melhor se adequou ao perfil pró-inflamatório longo e moderado almejado para o estudo. Neste sentido, será detalhada na discussão a resposta inflamatória induzida pelo protocolo LPS-B, a partir de então referenciado apenas como LPS, bem como sua interferência na expressão gênica endometrial.

Apesar da resposta inflamatória bem caracterizada, apresentando elevados níveis circulantes de TNF- α , não foi observada alteração nos níveis de AGNE e BHB, diferentemente do trabalho de Steiger et al. (1999), que após infusões intravenosas de LPS em novilhas associou o aumento de AGNE à uma maior atividade do sistema nervoso simpático em resposta ao LPS, e baixos níveis de BHB à ação inibitória de TNF- α e IL-1 sobre a cetogênese hepática. Porém, os dados do presente estudo corroboram a afirmação de Yuan et al. (2013), sugerindo que o TNF- α isoladamente não pode ser responsabilizado pela alteração no metabolismo da glicose e de lipídios, devendo-se assim avaliar a variabilidade dos efeitos da inflamação sobre o metabolismo energético considerando o grau de mobilização de gordura (balanço energético) ao qual os animais estão submetidos (Minuti et al., 2015).

O desafio intravenoso com LPS nas novilhas gerou uma resposta imunológica rápida e eficiente, iniciada pela produção de citocinas pirogênicas, como a IL-6 e o

TNF- α (Blatteis, 2007; Jackson et al., 1990), que ao ativarem o centro da febre no hipotálamo, foram responsáveis pela elevação da temperatura retal desde a primeira hora após as infusões, atingindo temperatura máxima média de 40,03°C, quatro horas após. Comportamento semelhante foi observado por Jackson et al, (1990), quando vacas lactantes desafiadas com 100 μ g de LPS i.v, apresentam temperatura retal de 40,3°C, quarto horas e meia após o início do desafio. Da mesma forma observado por Carroll et al. (2009), que induziram um aumento de temperatura de 40,2°C, também quarto horas e meia após a infusão i.v. de 2,5 μ g/Kg de LPS.

A resposta induzida pode ser melhor caracterizada pela avaliação dos níveis plasmáticos de TNF- α e haptoglobina durante o período experimental. O nível plasmático elevado de TNF- α , observado nas novilhas testadas, apontam para uma resposta pró-inflamatória, sob marcante influência dos macrófagos e monócitos que produzem ainda a interleucina-1 beta (IL1- β) e a interleucina-6 (IL-6), induzindo a produção hepática de proteínas de fase aguda (PFA) como a haptoglobina, proteína amiloide sérica A, a ceruloplasmina e a proteína C reativa (Heinrich et al., 1990). A liberação de citocinas pró-inflamatórias são responsáveis ainda por alterações hormonais, metabólicas e bioquímicas, resultando na produção de componentes metabólicos como as prostaglandinas, leucotrienos e o óxido nítrico, além de inúmeras alterações clínicas como febre, anorexia, diarreia, perda de peso, taquicardia, taquipnéia e depressão (Gruys et al., 2005; Eckersall et al., 2010; Elker et al., 2014).

Dentre as PFA de importância para ruminantes, a haptoglobina se destaca como moderadora inflamatória, por sua interação com as células de defesa e os patógenos (Ceciliane et al., 2012). Seus níveis plasmáticos elevam-se consideravelmente diante de processos inflamatórios como mastite, pneumonia, enterite, endocardite, abscessos, além de infecções experimentais (Ohtsuka et al., 2001; Eckersall, 2000).

A forma como esta PFA se apresentou nas novilhas submetidas ao LPS, demonstra inicialmente uma resposta inflamatória aguda com um aumento considerável desde as primeiras vinte e quatro horas do início do experimento, atingindo níveis máximos 48 horas após a primeira infusão. De forma semelhante, Elker et al. (2014), observaram níveis máximos de haptoglobina, 18 horas após injeção de 0,5 µg/Kg de LPS intravenosa em bezerros. O aumento dos níveis plasmáticos de haptoglobina também pode ser observado através da infusão intramamária de LPS, como observou Suojala et al. (2008), vinte e quatro horas após infusão de 1.500 unidades formadoras de colônia. Porém, neste caso os níveis máximos foram observados apenas 60 a 68 horas após a infusão, considerando a necessidade de uma resposta local preceder a resposta sistêmica (Jackson et al., 1990).

A dinâmica apresentada pela haptoglobina durante o período do experimento mostra uma diminuição marcante dos níveis plasmáticos a partir de 72 horas após a primeira infusão, porém mantendo níveis moderadamente elevados até o final do tratamento. Esta dinâmica sugere um processo de cronificação da resposta inflamatória, principalmente se considerarmos o status inflamatório crônico como um aumento moderado, porém permanente, de citocinas e mediadores de fase aguda (Krabbe et al., 2004).

Mesmo considerando a dificuldade de se induzir uma resposta inflamatória crônica *in vivo*, os resultados do presente estudo podem ser comparados ao estudo realizado em humanos por Taudorf et al. (2004) que objetivou induzir uma resposta inflamatória sistêmica de baixa intensidade, por meio de infusões em *bolus* de baixas doses de LPS, e elevou em duas a dez vezes os níveis plasmáticos de citocinas, assemelhando-se aos níveis encontrados em processos inflamatórios crônicos em humanos (Erikstrup et al., 2006).

As avaliações leucométricas reafirmam o perfil pró-inflamatório estabelecido nas novilhas desafiadas, ao tempo que, a não diferenciação do número dos leucócitos totais entre os grupos CON e LPS, possibilita classificar como moderada a resposta inflamatória induzida. A maior contagem de neutrófilos segmentados, observada durante o período do experimento no grupo LPS se dá em resposta a ação da IL-1 e do TNF- α na medula óssea, que é estimulada a elevar o número circulante dessas células, contribuindo para uma resposta imunológica eficiente (Yates e Callahan, 2014). Porém, o estímulo contínuo para a produção e liberação de neutrófilos na corrente sanguínea, leva ao esgotamento do estoque de células maduras, e consequente aparecimento na corrente sanguínea dos neutrófilos jovens, os bastonetes. A neutrofilia com desvio à esquerda, como é conhecido o aumento na produção de bastonetes, foi observada nas novilhas desafiadas a partir do quinto dia do experimento, quando as novilhas já haviam recebido a segunda infusão de LPS.

Por outro lado, a exemplo do que foi observado na dinâmica da haptoglobina na fase final do experimento, o leucograma sinaliza um processo de cronificação da resposta induzida, através do aparecimento dos monócitos nos dias sete e doze, acompanhados de quadros de linfopenia e eosinopenia. Este perfil justifica-se pela manutenção da resposta inflamatória, durante um período prolongado, que eleva os níveis de cortisol circulante, na tentativa de minimizar os danos dos mediadores inflamatórios nos diferentes tecidos. De acordo com Travessi e Bertoni (2009), níveis circulantes de glicocorticoides elevados são responsáveis pela diminuição dos níveis circulantes de linfócitos B, T e células *natural killer*, e ainda pelo quadro de eosinopenia. Nesse contexto, tem-se que vacas adultas após longos períodos de estresse, e durante um processo inflamatório ou endotoxemia, apresentam uma inversão na relação neutrófilo:linfócito (Nemi et al., 1993).

Dentre as diversas formas de relacionar as perdas embrionárias precoces com a produção dos mediadores inflamatórios, está a indução prematura da luteólise pela produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Diferentes tecidos, dentre eles o endométrio, são estimulados a produzir $\text{PGF}_{2\alpha}$, pela ação de $\text{TNF}\alpha$ e da $\text{IL1-}\beta$ (Hansen, et al., 2004). Porém, no presente estudo, mesmo com os níveis plasmáticos de $\text{TNF}\alpha$ apresentando valores crescentes, não foi observada diferença nos níveis plasmáticos de P4 entre os grupos CON e LPS, assim como nos diâmetros dos CLs, sinalizando que neste caso não houve interferência na função luteal, pelo menos até o 15º dia de gestação. Nesse contexto, faz-se relevante ressaltar o estudo de Skarzynski et al. (2003), que consideraram como dose dependente o efeito do $\text{TNF}\alpha$ sobre o CL, e que fatores luteolíticos importantes como a $\text{PGF}_{2\alpha}$ e o óxido nítrico (ON) foram produzidos após a infusão de baixa dose de $\text{TNF}\alpha$ (1 μg), resultando em um ciclo estral mais curto. Porém, dose elevada desta mesma citocina (10 μg) resultou no prolongamento do ciclo estral, e estimulou a produção de P4 e PGE_2 (importantes para manutenção do CL), além de inibir a secreção de leucotrieno C_4 (LTC_4), um produto importante da cascata do ácido aracdônico na via de síntese da $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Por fim, na tentativa de melhor entender o comportamento do endométrio, no 15º dia de gestação, diante da ação sistêmica de mediadores pró-inflamatórios, a avaliação da expressão gênica endometrial demonstrou não haver, neste caso, alteração na expressão dos genes associados a adesão celular e desenvolvimento do concepto. Contudo, a alteração no padrão de expressão de genes de proteínas associadas a resposta imunológica, como a indoleamina 2,3-dioxigenase (*IDO*), a Pentraxin-3 (*PTX3*) e proteína mixovírus resistente (*MXI*), que influenciados pelo IFN-t apresentam elevado padrão de expressão no início da gestação, pode sinalizar uma possível alteração no mecanismo de imunotolerância ao embrião e inviabilizar o estabelecimento do mesmo.

Nesse contexto, considerando o conceito um elemento semi-alogênico, o mesmo é protegido na fase de pré-implantação por uma regulação delicada entre as funções pró-inflamatória e antiinflamatória materna (Walker et al., 2010; Groebner et al., 2011). Uma importante via antiinflamatória que auxilia na manutenção no conceito, é a imunossupressão das células T, principalmente sua atividade na interface materno-fetal, através de uma menor disponibilidade do L-triptofano (Trp) (Walker et al., 2010; Groebner et al., 2011). A atividade da enzima *IDO* é responsável pelo catabolismo do Trp, que diminui a disponibilidade do mesmo para as células T, e libera metabólitos (3-OH-Kynurenine e ácido 3-OH-anthranilic) que são responsáveis pela apoptose dessas células. Por este motivo, o endométrio de vacas gestantes apresentam expressão do RNAm do *IDO* elevada, acompanhada de uma maior atividade enzimática, o que viabiliza o processo de implantação (Walker et al., 2010; Groebner et al., 2011; Cerri et al., 2012).

Outra proteína importante no processo de tolerância imunológica é a *PTX3*, que segundo Nauta et al. (2003), pode atuar amplificando a resposta imune inata contra agente invasores e oferecer suporte ao processo de remoção de debris celulares, ou pode proteger determinados tecidos contra a ativação indesejada do sistema complemento. O padrão elevado de expressão do gene *PTX3* no endométrio gravídico de mulheres (Popovici et al., 2008) e de vacas no 17º dia de gestação (Cerri et al., 2012), demonstra a importância do mesmo na modulação da ação do sistema complemento, e a exemplo do *IDO*, torna possível a implantação embrionária.

A expressão aproximadamente três vezes menor dos genes *IDO* e *PTX3*, observada nas novilhas do grupo LPS em relação ao CON, pode sinalizar uma possível ação dos mediadores pró-inflamatório envolvidos na resposta inflamatória sistêmica, sobre o perfil antiinflamatório necessário para estabelecer a imunotolerância ao embrião. Os resultados encontrados ratificam os estudos de Walker et al. (2012) que ao

avaliarem a expressão gênica endometrial no início da gestação de vacas consideradas férteis e sub-férteis, observaram que no grupo de sub-férteis, os genes *IDO* e *PTX3* também foram expressos em menor quantidade do que no grupo de vacas férteis. Neste estudo foi observado ainda que as vacas sub-férteis apresentaram também uma menor expressão de genes relacionados à prevenção da luteólise, desenvolvimento e crescimento embrionário.

Além da supressão de genes responsáveis pelo perfil antiinflamatório endometrial no início da gestação, como o *IDO* e *PTX3*, a desregulação aparente na expressão do *MX1*, expresso aproximadamente 3,5 vezes mais no grupo LPS em relação ao CON, fortalece a idéia de uma possível mudança no perfil imunológico endometrial. Fisiologicamente, sob efeito do IFN- τ , ocorre uma maior expressão do *MX1*, conferindo maior proteção a infecções virais (Hansen et al., 2011) e de acordo com Racicot et al. (2012) o *MX1* está também associado a secreção de proteína para o ambiente uterino.

CONCLUSÃO

O protocolo sugerido foi capaz de induzir uma resposta pró-inflamatória sistêmica, que apesar de efeito limitado sob a expressão gênica endometrial, apresentou efeito considerável sobre a transcrição de genes relacionados ao sistema imune, sugerindo uma possível explicação para a subfertilidade relacionadas a diferentes situações fisiopatológicas em vacas de leite. Conclui-se ainda que na avaliação da interferência de mediadores inflamatórios sobre o metabolismo energético deve ser considerado o estatus energético ao qual o animal está submetido.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a contribuição por parte da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - PDSE), o Conselho Canadense de Pesquisa em Ciências Naturais e Engenharia (NSERC), à UFRPE, ao centro de educação e pesquisa

em gado de leite da Universidade da Columbia Britânica (UBC), (*Dairy Education and Research Centre at the University of British Columbia*). Agradecemos ainda a todos os que auxiliaram na coleta e processamento dos dados.

REFERENCIAS

- Barker, A. R., Schrick, F. N., Lewis, M. J., Dowlen, H. H., Oliver, S. P. 1998. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 81:1285–1290.
- Blatteis, C.M. 2007. The onset of fever: new insights into its mechanism. *Progress in Brain Research.* 162:3-14. doi:10.1016/S0079-6123(06)62001-3.
- Brooks, K., Burns, G. And Spencer, T. E. 2014. Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5:53. doi:10.1186/2049-1891-5-53
- Callahan, G. N. and Yates, R. M. *Basic veterinary immunology.* 2014. 1^a Edition University Press of Colorado.
- Carroll, J. A., Reuter, R. R., Chase, C. C. Jr., Coleman, S. W., Riley, D. G., Spiers, D. E., Arthington, J. D., Galyean, M. L. 2009. Profile of the bovine acute-phase response following an intravenous bolus-dose lipopolysaccharide challenge. *Innate Immunity.* 15:81-89. doi: 10.1177/1753425908099170.
- CCAC. 2009. CCAC guidelines on: The care and use of farm animals in research, teaching and testing. Canadian Council on Animal Care . Ottawa, ON, Canada.
- Ceciliani, F., Ceron, J. J., Eckersall, P. D., Sauerwein, H. 2012. Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics.* 75:4207–4231.
- Chebel, R.C., Santos, J. E. P., Reynolds, J. P., Cerri, R. L. A., Juchem, S. O. and Overton, M. 2004. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 84:239-255.
- Coles, E. H. 1984. *Patología Clínica Veterinaria.* 3th Ed. Manole, São Paulo. Page 914.

- Committee on Bovine Reproductive Nomenclature. 1972. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet.* 62:216–237.
- Dunne, L.D., Diskin, M. G., Sreenan, J. M. 2000. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim. Reprod. Sci.* 58:39–44.
- Eckersall, P. D. 2000. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Révue Méd. Vét.* 151:577-584.
- Eckersall, P. D. and Bell, R. 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal.* 185:23-27.
- Erikstrup, C., Ullum, H., Pedersen, B. K. 2006. Short-term simvastatin treatment has no effect on plasma cytokine response in a human in vivo model of low-grade inflammation. *Clinical and Experimental Immunology.* 144:94-100.
- Groebner, A. E., Schulke, K., Schefold, J. C., Fusch, G., Sinowatz, F., Reichenbach, H. D., Wolf, E., Meyer, H. H. and Ulbrich, S. E. 2011. Immunological mechanisms to establish embryo tolerance in early bovine pregnancy. *Reprod. Fertil. Dev.* 23:619-632.
- Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A. and Koopmans, S. J. 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins, *Journal of Zhejiang University Science.* 6B:1045-1056.
- Hansen, P. J. The Immunology of early pregnancy in farm animals. 2011. *Reproduction in domestic animals.* 46(Suppl. 3):18–30. doi-10.1111/j.1439-0531.2011.01850.
- Hansen, P. J., Soto, P., Natzke, R. P. 2004. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *American Journal of Reproductive Immunology.* 51:294-301.
- Hansen, T. R., Austin, K. J., Perry, D. J., Pru, J. K., Teixeira, M. G., Johnson G. A. 1999. Mechanism of action of interferon - tau in the uterus during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 54:329-339.

- Heinrich, P. C., Castell, J. C. and Andus, T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 265:621-636.
- Jackson, J. A., Shuster, D. E. Silvia, W. J., and Harmon, R. J. 1989. Physiological Responses to Intramammary or Intravenous Treatment with Endotoxin in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 73:627-632.
- Jain, N. C. 1993. *Essentials of veterinary hematology*. 1^a Ed. Lea and Febiger. Philadelphia, USA.
- Jain, N.C. 1993. *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea & Febiger. Philadelphia. Page 348.
- Krabbe, K.S., Pedersen, M., Bruunsgaard, H., 2004. Inflammatory mediators in the elderly. *Experimental Gerontology*. 39:687–699.
- Lavon, Y., Leitner, G., Goshen, T., Braw-Tal, R., Jacoby, S., Wolfenson, D. 2008. Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. *Theriogenology*. 70:956–967.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 25:402-8. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Makimura, S. and Suzuki, N. 1982. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44:15-21.
- Nauta, A. J., Bottazzi, B., Mantovani, A., Salvatori, G., Kishore, U., Schwaeble, W. J., Gingras, A. R., Tzima, S., Vivanco, F., Egido, J., Tijmsma, O., Hack, E. C., Daha, M. R. and Roos, A. 2003. Biochemical and functional characterization of the interaction between pen- traxin 3 and C1q. *Eur. J. Immunol.* 33:465-473.

- Ohtsuka, H., Kudo, K., Mori, K., Nagai, F., Hatsugaya, A., Tajima, M., Tamura, K., Hoshi, F., Koiwa, M. and Kawamura, S. 2001. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis, *Journal of Veterinary Medical Science*. 63:675-678.
- Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T., Overton, T. R. Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1596-1603, 2010.
- Popovici, R. M., Krause, M., Jauckus, S. J., Germeyer, A., Brum, I. S., Garlanda, C., Strowitzki, T. and M. Von Wolff. 2008. The long pen-traxin PTX3 in human endometrium: Regulation by steroids and trophoblast products. *Endocrinology* 149:1136-1143.
- Pretheeban, T., Gordon, M., Singh, R., Rajamahendran, R. 2011. Comparison of expression levels of candidate genes in endometrium of dairy heifers and lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 91:255-264.
- Pursley, J. R., Mee, M. O., Wiltbank, M. C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂alpha and GnRH. *Theriogenology*. 44:915-923.
- Roche, J. F., Bolandl, M.P., McGeady, T.A. 1981. Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *The Veterinary Record*. 109:401-4.
- Santos, J. E. P., Cerri, R. L. A., Ballou, M. A., Higginbotham, G. E. and Kirk, J. H. 2004a. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 80:31-45. doi:10.1016/S0378-4320(03)00133-7
- Santos, J. E. P., Thatcher, W. W., Chebel, R. C., Cerri, R. L. A. and Galvão, K. N. 2004b. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:513-535. doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.015

- Sartori, R., M. R. Bastos, and M. C. Wiltbank. 2010. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 22:151–158.
- Sartori, R., G. J. Rosa, and M. C. Wiltbank. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.* 85:2813-2822.
- Skarzynski, D. J., M. M. Bah., K. M. Deptula., I. Woclawek-Potocka., A. Korzekwa., M. Shibaya., W. Pilawski., and K. Okuda. 2003. Roles of Tumor Necrosis Factor- α of the Estrous Cycle in Cattle: An In Vivo Study. *Biol. Reprod.* 69:1907-1913.
- Soto, P., R. P. Natzke., P.J. Hansen. 2003. Actions of tumor necrosis factor- α on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *American Journal of Reproductive Immunology.* 50:380-388.
- Spencer, T. E., O. Sandra. and E. Wolf. 2008. Genes involved in conceptus–endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction*, 135:165-179.
- Steiger, M., M. Senn., G. Altreuther., D. Werling., F. Sutter., M. Kreuzer., W. Langhans. 1999. Effect of a Prolonged Low-Dose Lipopolysaccharide Infusion on Feed Intake and Metabolism in Heifers. *J. Anim. Sci.* 77, 2523-32.
- Suojala, L., T. Orro., H. Jarvinen., J. Saatsi., S. Pyorala. 2008. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50:18. doi:10.1186/1751-0147-50-18.
- Suzuki, C., Yashioka, S., Iwamura, S., Hirose, H. 2001. Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers. *Domest. Anim. Endocrinol.* 20:267-278.

- Taudorf, S., Krabbe, K. S., Berg, R. M., Pedersen, B. K., Moller, K 2007. Human Models of Low-Grade Inflammation: Bolus versus Continuous Infusion of Endotoxin. *Clinical and Vaccine Immunology*. 14:250-255.
- Taylor, V. J., Beever, D. E., Wathes, D. C. Physiological adaptations to milk production that affect fertility in high yielding dairy cows. In: *Dairying, using science to meet consumer needs*. Br. Soc. Anim. Sci. Occasional Publication No. 29. Nottingham University Press.37–71, 2003.
- Thrall, M.A. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. 1ª Ed. Roca. São Paulo. Page 582.
- Yuan, K., Farney, J. K., Mamedova, L. K., Sordillo, L. M. Bradford, B. J. TNFa Altered Inflammatory Responses, Impaired Health and Productivity, but Did Not Affect Glucose or Lipid Metabolism in Early-Lactation Dairy Cows. *PLoS ONE* 8(11), 2015.
- Walker, C. G., Littlejohn, M. D., Mitchell, M. D., Roche, J. R. and Meier, S. 2012. Endometrial gene expression during early pregnancy differs between fertile and subfertile dairy cow strains. *Physiol Genomics* 44:47–58, doi: 10.1152/physiolgenomics.00254.2010.
- Walker, C. G., Meier, S., Littlejohn, M. D., Lehnert, K., Roche, J. R., Mitchell, M. D. 2010. Modulation of the maternal immune system by the pre-implantation embryo. *BMC Genomics*. 11:474. doi:10.1186/1471-2164-11-474
- Wathes, D.C., Fenwick, M., Cheng,Z., Bourne, N., Llewellyn, S., Morris, D. G., Kenny, D., Murphy, J., Fitzpatrick, R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* 68, 232-241, 2007.

Gráficos, figuras e tabelas

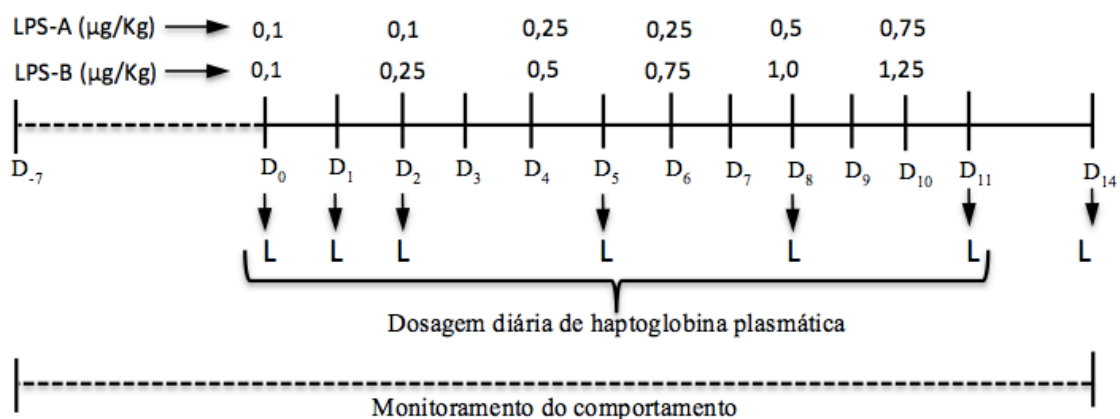


Figura 1. Diagrama do experimento 1; Com base nos protocolos de infusão de LPS (A e B) as novilhas receberam infusões em diferentes doses (µg/Kg) nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10. Foram realizadas colheitas diárias para dosagem de haptoglobina plasmática, além de análises leucométricas (L) nos dias 0, 1, 2, 5, 8, 11 e 14. De forma complementar, o comportamento das novilhas foi monitorado (IceTag™, IceRobotics Ltd, Midlothian, Scotland, UK) por 21 dias, desde o dia -7 até o 14º dia do experimento.

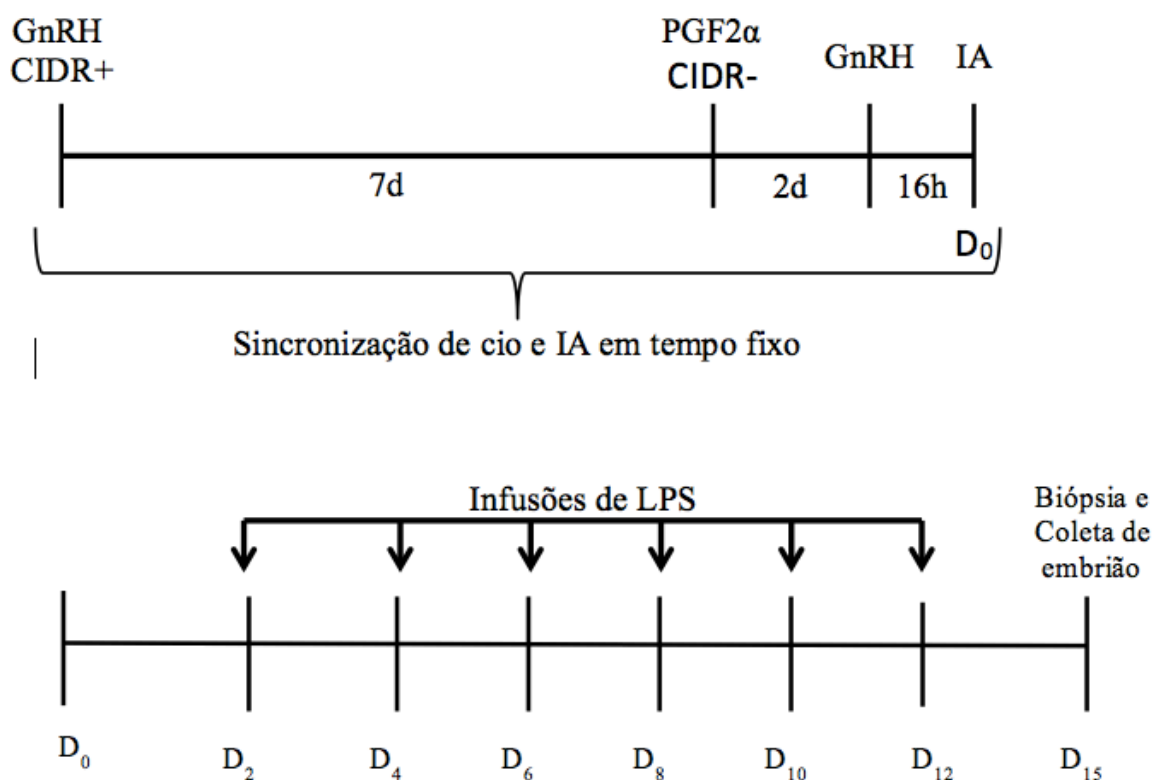


Figura 2. Diagrama do experimento 2; As novilhas receberam inicialmente 100µg de GnRH (Fertiline; Vetoquinol, Lavaltrie, Quebec) via intramuscular (IM), juntamente à aplicação do dispositivo intravaginal de P4 - CIDR (Zoetis Canada Inc., Kirkland, QC). Sete dias depois o CIDR foi removido e 250 µg de cloprostenol (Estrumate, PGF_{2α}, MSD Animal Health Ltd., New Zealand) foi aplicado IM. Após dois dias foi administrada a última injeção de GnRH (IM), e a inseminação realizada após 16 horas. A partir do D₂, as novilhas receberam seis infusões intravenosas de LPS nas dosagens de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 µg/Kg, com intervalos de 48 horas. Por fim no D₁₅ foi realizada a coleta de embrião e de fluido uterino, bem como a biópsia endometrial.

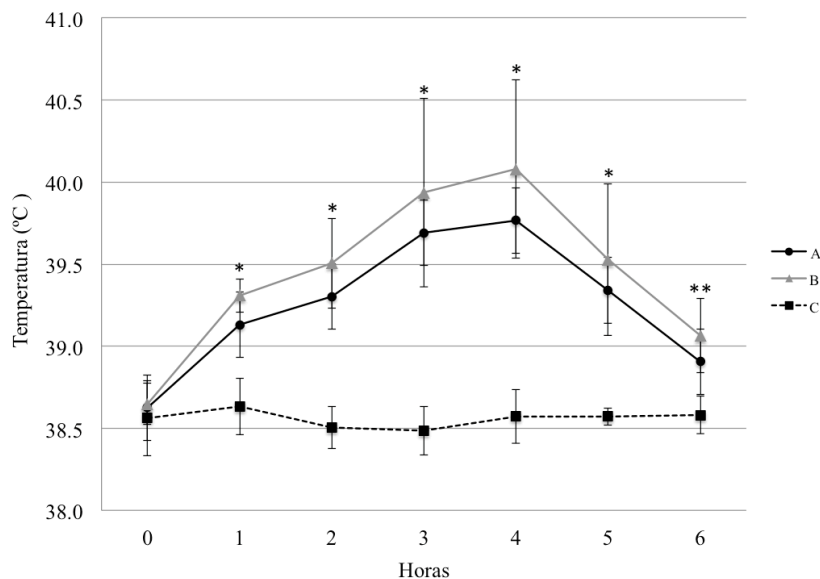


Gráfico 1. Temperatura retal média no período de seis horas após a infusão de LPS intravenosa. *A e B > C (p < 0,05) e ** B = C (p = 0,062).

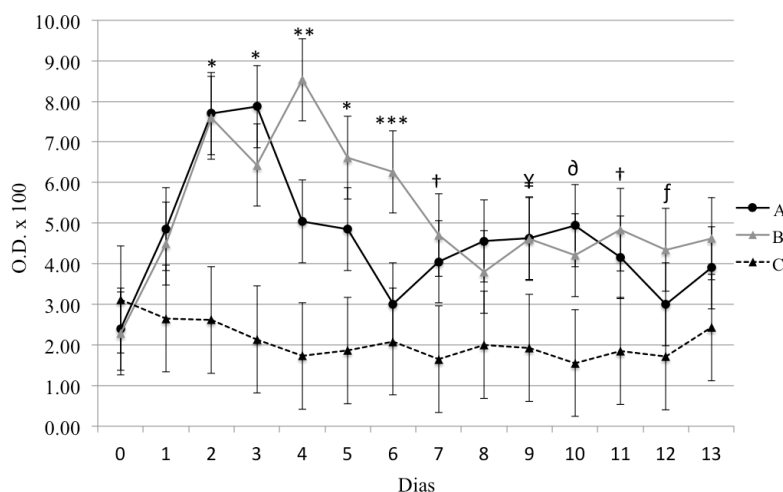
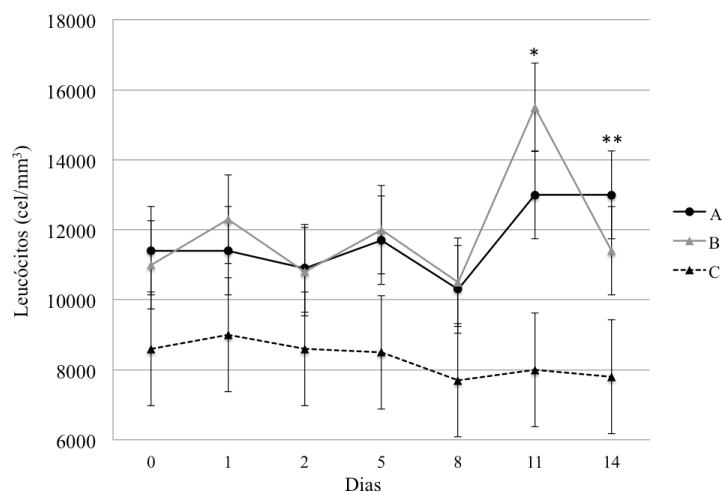
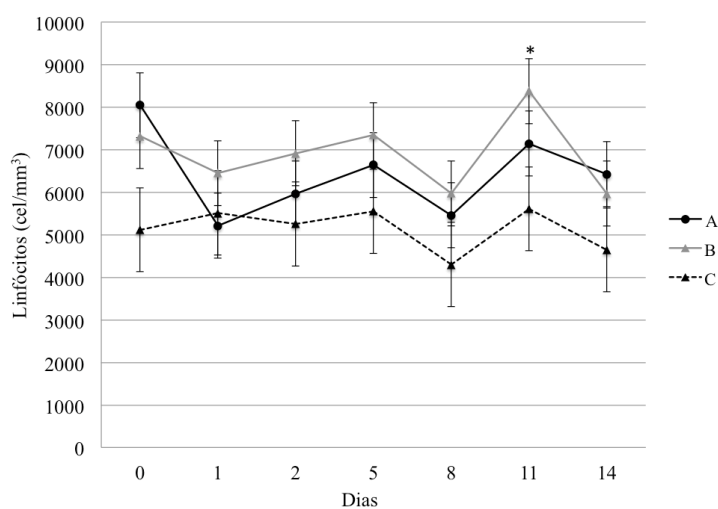


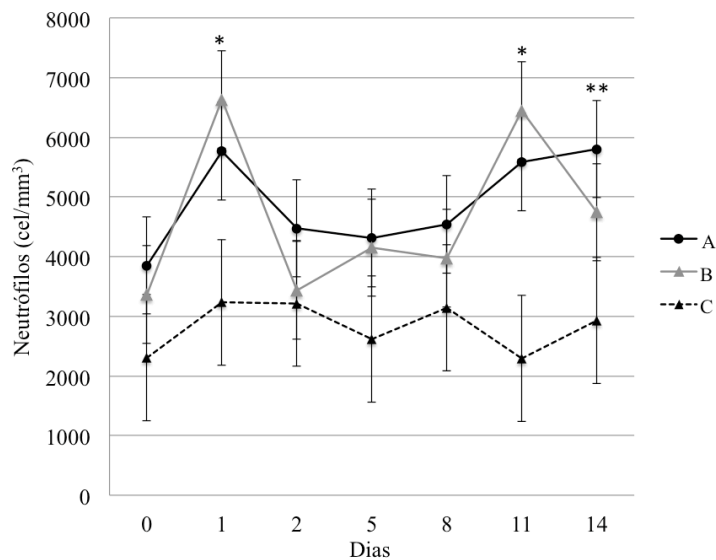
Gráfico 2. Níveis plasmáticos médios de haptoglobina durante o período do experimento, considerando a primeira infusão de LPS no dia 0. * A e B > C ($p \leq 0,05$); ** A > C ($p=0,05$) e B > A ($p=0,01$); *** B > A e C ($p < 0,01$); † B > C ($p=0,05$); ‡ A e B = C ($p=0,08$); ° A > C ($p=0,03$) e B = C ($p=0,09$); † B = C ($p=0,09$).



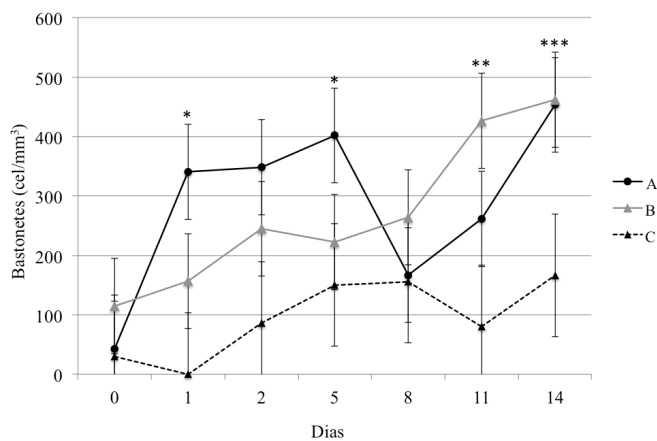
3.A) * A e B > C ($p < 0,01$); ** A > C ($p=0,01$) e B = C ($p=0,09$)



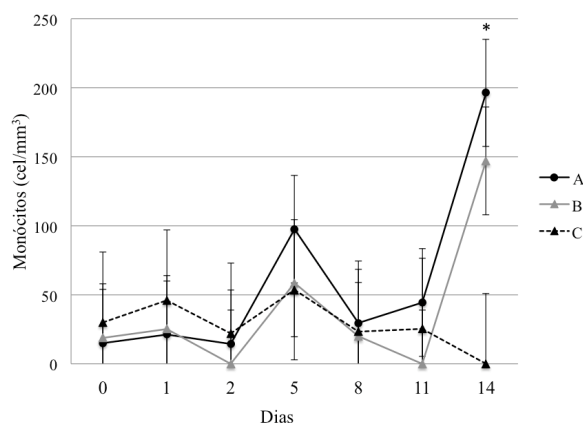
3.B) * B > C ($p < 0,05$)



3.C) * A e B > C ($p < 0,05$; $p < 0,01$); ** A > C ($p < 0,05$)



3.D) *A > C ($p < 0,05$); ** B > C ($p < 0,01$); *** A e B > C ($p < 0,05$)



3.E) *A e B > C ($p < 0,05$)

Gráfico 3. Apresentação da dinâmica da resposta leucométrica (cel/mm^3) durante o período experimental. (A) - Leucócitos totais; (B) - Linfócitos; (C) - Neutrófilos; (D) Bastonetes e (E) - Monócitos.

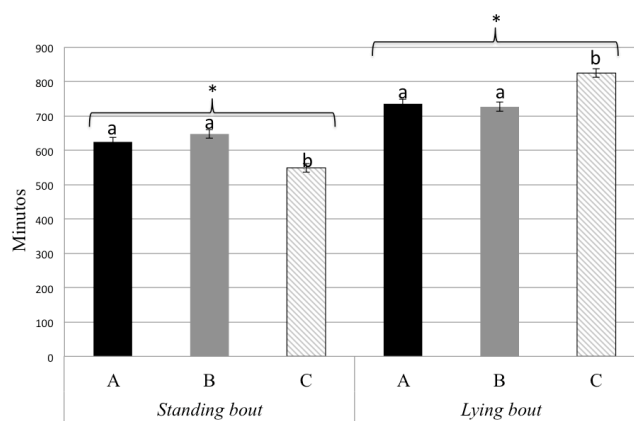


Gráfico 4. Avaliação do comportamento das novilhas com base no tempo médio diário (min) que os animais permaneceram em estação (*standing bout*) ou deitados (*lying bouts*), durante o período do experimento (* $p < 0,05$).

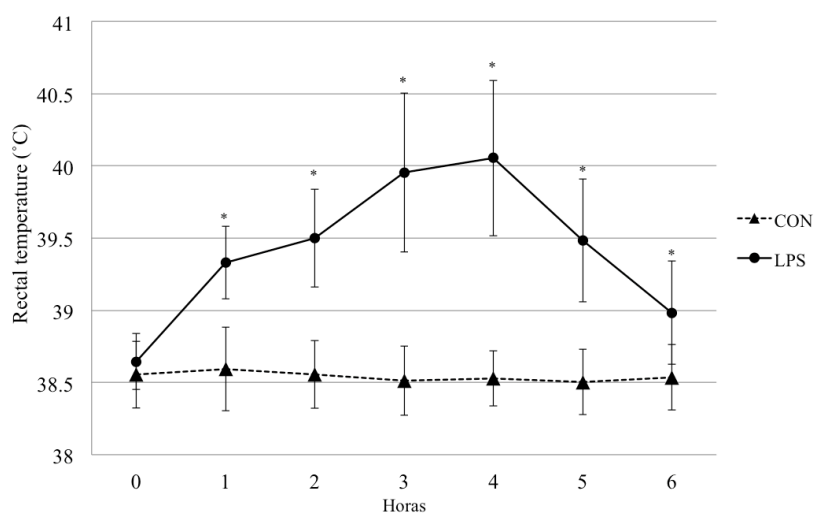


Gráfico 5. Temperatura retal média no período de seis horas após a infusão de LPS intravenosa (* $p < 0,01$).

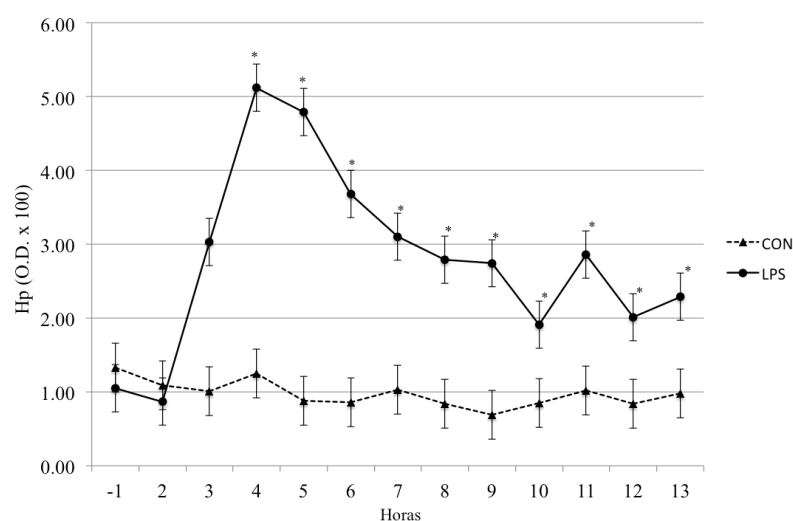


Gráfico 6. Níveis médios plasmáticos de haptoglobina durante o período do experimento, considerando o início da infusão de LPS no dia 2 (* $p < 0,01$).

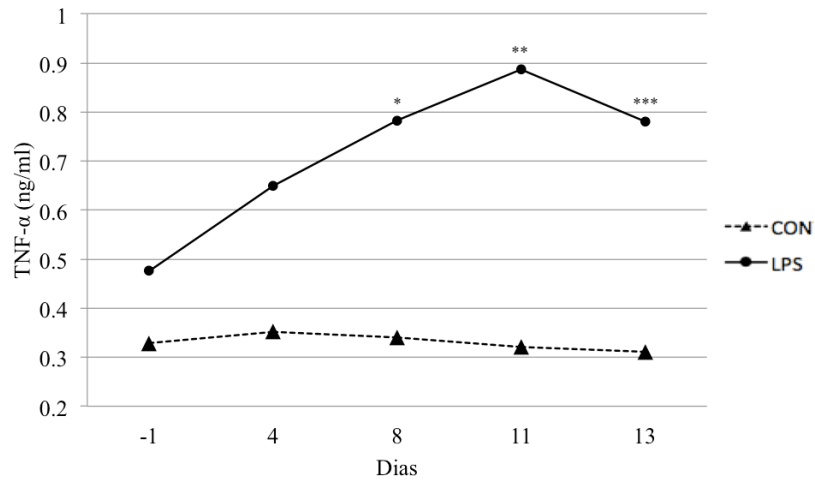
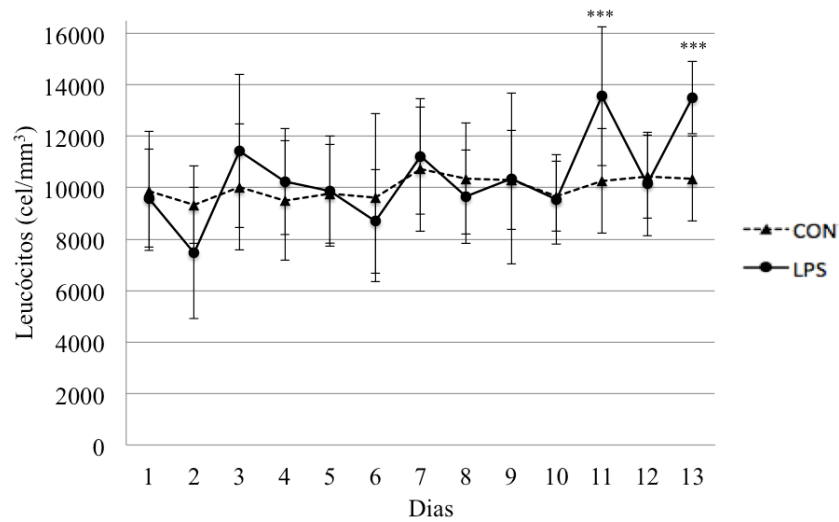
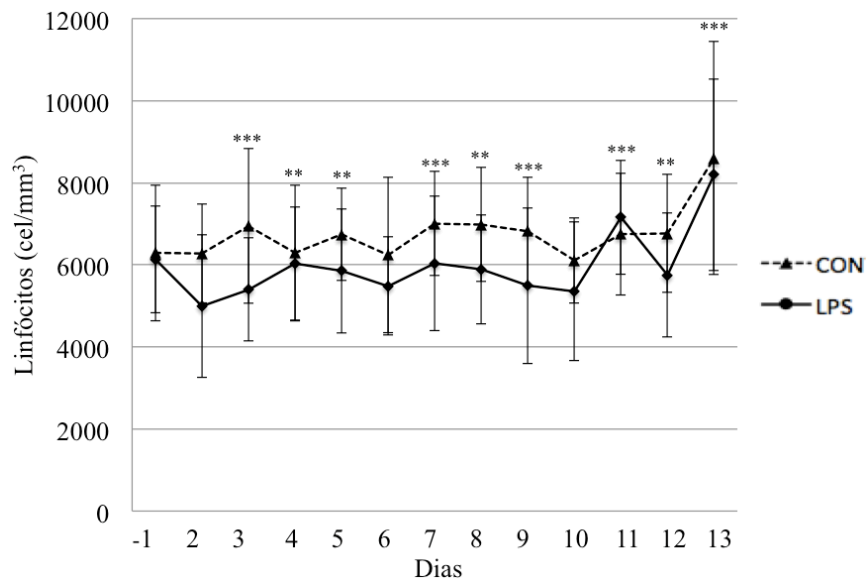


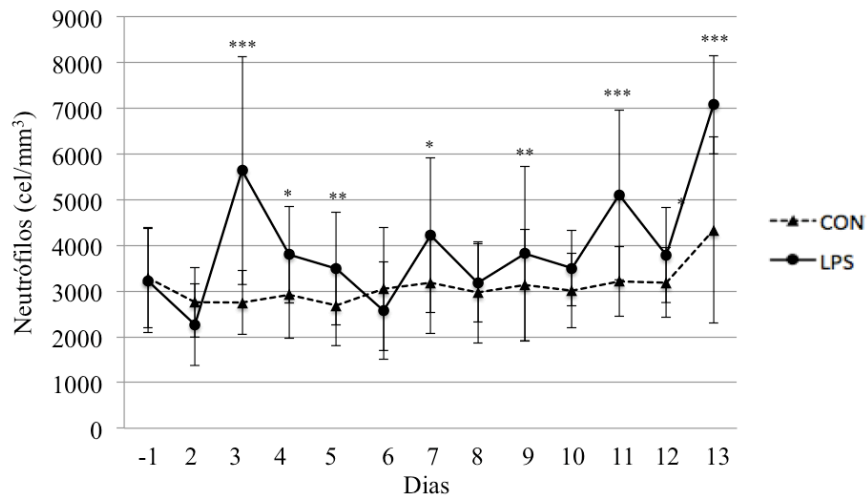
Gráfico 7. Níveis plasmáticos médios de TNF- α nos dias -1, 4, 8, 11 e 13 do experimento, considerando o início da infusão de LPS no dia 2 (*P = 0.05; **P = 0.01; ***P = 0.04).



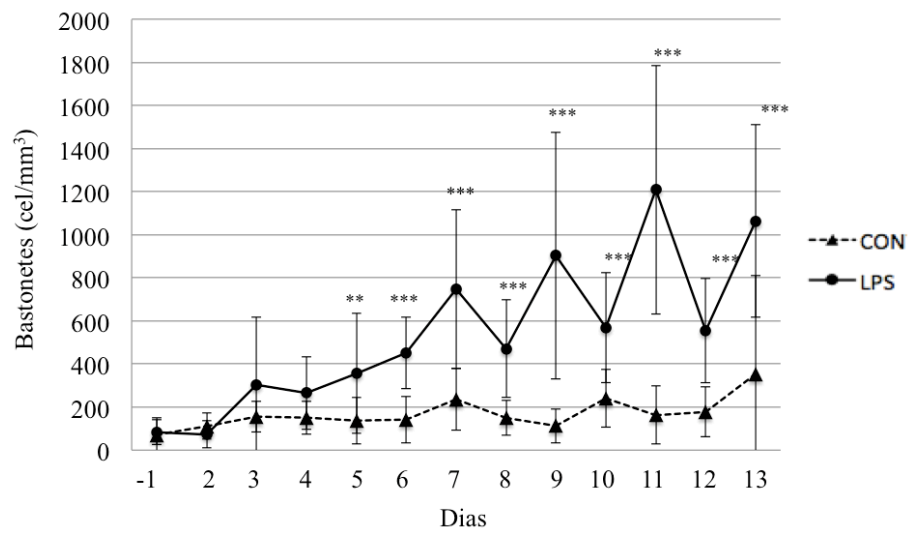
8.A



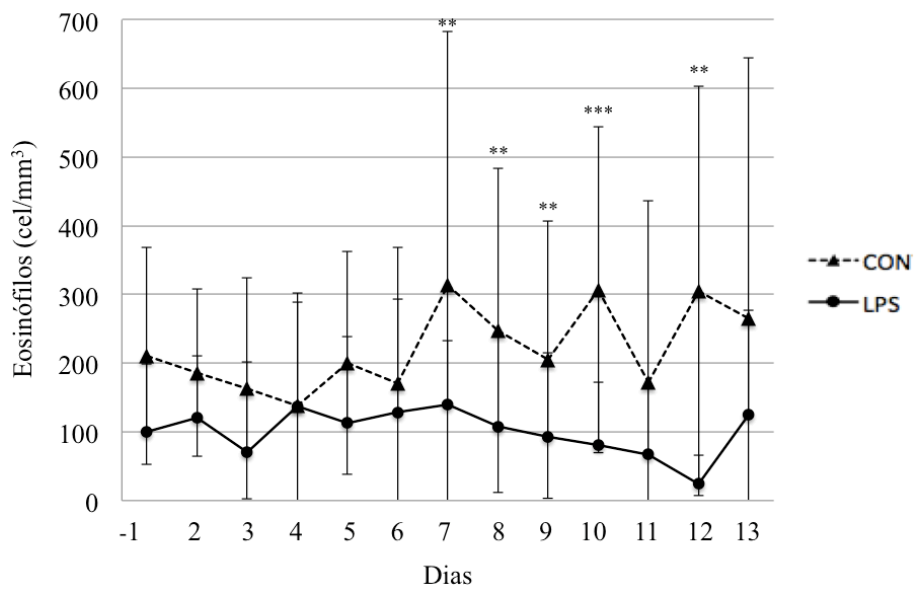
8.B



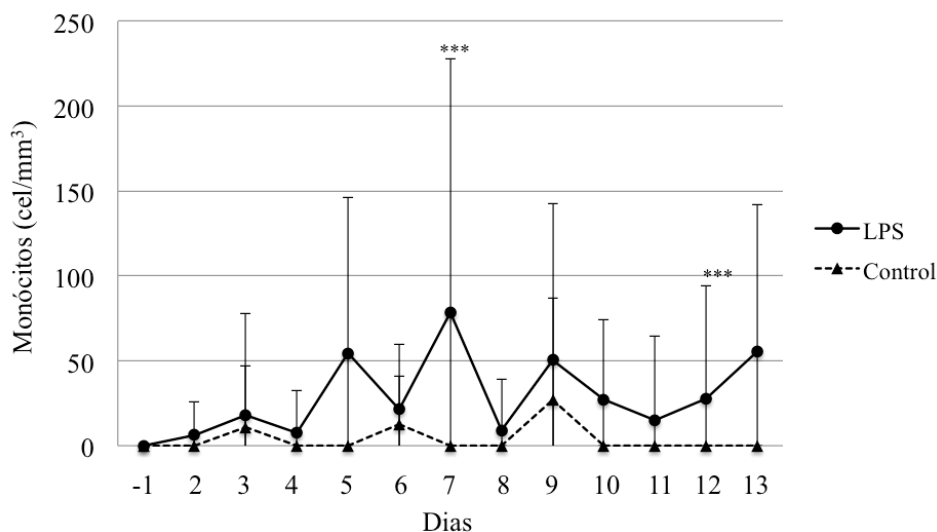
8.C



8.D



8.E



8.F

Gráfico 8. Apresentação da dinâmica da resposta leucométrica (cel/mm^3) nos grupos CON e LPS, durante o período experimental . (A) - Leucócitos totais; (B) - Linfócitos; (C) - Neutrófilos; (D) - Bastonetes; (E) - Eosinófilos; (F) - Monócitos (* $p=0,01$; ** $p<0,05$; *** $p<0,01$).

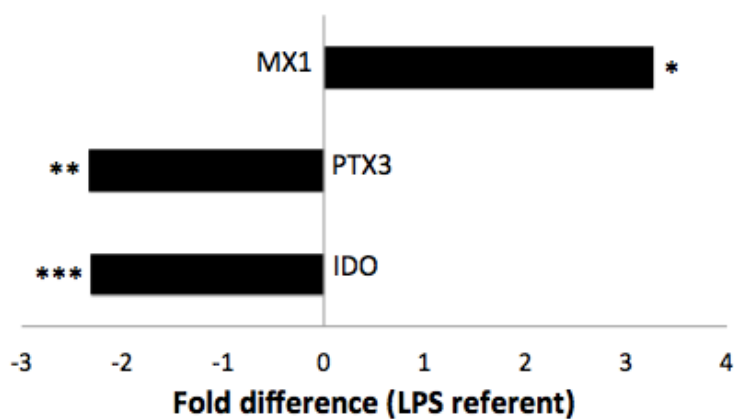


Gráfico 9. Transcrições de genes endometriais expressos diferentemente após repetidas infusões de LPS (* $P = 0,02$, ** $P = 0,01$, *** $P \leq 0,03$).

Tabela 1: Sequência dos primers para análise da transcrição realizada em amostras do endométrio

Sequência de primers utilizados para análise da qPCR do tecido endometrial				
Símbolo do gene	Número de identificação	Primer	Sequência do Primer	Comprimento do produto (pb)
GAPDH	NM_001034034.2	F R	GAG ATC CTG CCA ACA TCA A CTT CTC CAT GGT AGT GAA GAC	83
LGALSBP3	NM_001046316.2	F R	CTC TGT CTC CTG GTC TTT GGG ATT GGA CTT GGA GTA	127
SERPINA14	NM_174821.2	F R	GAC AGA GTC ACC TCA GAT A CAT CGA GAA TAC CTC CTT TC	91
CLD4	NM_001014391.2	F R	CCC TCA TCG TCA TCT GTA T CCT TGG AGC TCT CAT CAT	99
IDO	NM_001101866.2	F R	AGC TAT GGT CTC CTT GAG GCC TCC AGT TCC TCT ATT	121
MSX1	NM_174798.2	F R	AAG CAG TAC CTG TCC ATC GGT TCT GAA ACC AGA TCT TC	88
SPP1	NM_174178.2	F R	GGA CTT CAC ATC ACA CAT AG CTC GCT ACT GTT GGT TTC	97
IL-10	NM_174088.1	F R	GCT CAG CAC TAC TCT GTT GTT GGC AAG TGG ATA CAG	97
AXIN1	NM_001191398.1	F R	GCC ATC TAC CGC AAA TAC CGA GAT GCA GTC CTT TAT G	93
IGLL1	NM_001083800.1	F R	GGA AGC AGC ACG AAT ATC GGG TCG ATA CTT ATC TTC ATA G	99
TIMP2	NM_174472.4	F R	GGT CAC GGA GAA GAA CAT TCC TCG ATG TCC AGA AAC	126
MX2	NM_173941.2	F R	CCA ATC AGA TCC CGT TCA TGA AGC AGC CAG GAA TAG	115
TRD	XM_603355.3	F R	GTC GCT TGT TTG GTG AAG CCA GGT GAG ATG GCA ATA	104
CDH1	NM_001002763.1	F R	CTG AGA ACG AGG CTA ATG T GGT CTG TGA CGA CGA TAA A	132
RELN	NM_001206458.1	F R	GGG TGT GCC AAT CAA TTC CTG GGT AAC AGC CTT CTT	100
EMMPRIN	NM_001075371.2	F R	GGT CAC CAT CAT CTT CAT CTA AGA GCC TAT GTC TTC ATC ATC	73
LIFR	NM_001192263.1	F R	GCT CTT GGA ATG GGA AAT AG CCA GAC TGA GAT GAG TTA CA	98
SLPI	NM_001098865.2	F R	GCC TTG GAG ATG AGA AAC GGT CCA GAC ATT CAG TTC	96
MYL12A	NM_001015640.2	F R	CAC CAT TCA GGA GGA TTA C GTC AAT AGG TGC TTC TCT G	100
MYH10	NM_174834.1	F R	GAC TAC CAG CGT GAA TTA G CCT GCA ACT GAA GGA TTT	115

MYH9	NM_001192762.1	F R	GAC AAG AGT GGC TTT GAG GTT CAC CTT CAC CTT CTT C	96
IGHG1	DQ452014.1	F R	GAC CCT CTG TCT TCA TCT GTT TAC CTC CAC GTT GTC	146
FDZ4	NM_001206269.1	F R	GTT CCA TCT GGT GGG TTA TTC GCT GCG ATG TGG AAA TAA GA	106
FZD8	XM_005214320.1	F R	CCT ATA TGC CCA ACC AGT TC CAT GCT GCA CAG GAA GAA	122
WNT3	NM_001206024.1	F R	AGA AGC GGA AGG AGA AGT CAC GTC ATA GAT GCG GAT AC	83
AXIN2	NM_001192299.1	F R	GGA GAA ATG CGT GGA TAC TT GTA GAT CGC TTT GGC TAC TC	103
GSK3B	NM_001101310.1	F R	GGG TCA TTT GGT GTC GTG TAT C GAT CTG GAG CTC TCG GTT CTT A	97
GLYCAM1	NM_174828.2	F R	CCT CTG CTC AGT TCA TCA GG TCT GAT CAC AAT TTG CTC TTT GG	97
SELL	NM_001076141.1	F R	GGT GGG AAC CAA CAA ATC CAC AGT CCT CCT TAC TCT TC	86
WNT2	NM_001013001.1	F R	TCC TGT GAC CCA AAG AAG GCA AAC TTG ATC CCA TAG TC	98
CXCL10	NM_001046551.2	F R	GTG TAC CTC TCT CTA GGA ATA C GGA TTG ACT TGC AGG AAT G	107
PTX3	NM_001076259.2	F R	CGC TGA TGC TGT GAT TTC CCA CCG AGT CAC CAT TTA	101
DKK1	NM_001205544.1	F R	CCA TGG GCT GGA GAT ATT GTG AAG CCT GGA AGA ATT AC	100
MMP19	NM_001075983.1	F R	ATC TTG AAC CTA CCG TCT AC GCC ACA TTG CTC CAA TAC	83
APC	NM_001075986.2	F R	GAG CCC TTC ACA GAA TGA CTC AGG ATA CAC GGG ATA AG	118
FZD7	NM_001144091.1	F R	GGG TGT GCC AAT CAA TTC CTG GGT AAC AGC CTT CTT	138
CTNNB1	NM_001076141.1	F R	CCC TTT GTC CAG CAA ATC CTG TGT TCC ACC CAT AGA	119
MX1	NM_1733940.2	F R	AGT CCA TCC GAC TAC ATT TC CTT CTT CTG CCT CCT TCT C	102

Tabela 2: Os genes analisado foram agrupados de acordo com sua função no endométrio durante o início da gestação

Adesão celular	Sistema imunológico	Desenvolvimento do concepto
SPP1	IDO	APC
CLD4	SELL	RELN
CDH1	SLPI	DKK1
TIMP2	LIFR	FZD4
MYH10	TRD	MSX1
MMP19	MX2	AXIN2
MYL12A	MX1	WNT2
SERPINN	IL10	GSK3 β
EMMPRIN	PTX3	CTNNB1
LGALSBP3	IGHG1	-
-	CXCL10	-

Tabela 3. Níveis plasmáticos médios de progesterona (ng/mL) nos dias -1, 3, 6, 9 e 11, bem como de IFN-tau (intensidade de banda) no D15 após a IA, que não apresentaram diferenças entre os grupos LPS e CON.

	LPS	CON	<i>P</i> -value
	Média (\pm)	Média (\pm)	
P4 / D-1	0,54 (\pm 0,63)	0,49 (\pm 0,66)	0,95
P4 / D 3	0,99 (\pm 0,63)	0,91 (\pm 0,66)	0,93
P4 / D 6	3,67 (\pm 0,63)	2,93 (\pm 0,66)	0,41
P4 / D 9	5,29 (\pm 0,64)	5,24 (\pm 0,66)	0,95
P4 / D 11	7,07 (\pm 0,65)	8,30 (\pm 0,66)	0,19
IFN-t	6,27 (\pm 2,89)	10,71 (\pm 3,08)	0,31

5. Capítulo II

Avaliação de aspectos inflamatórios e metabólicos após infusão intramamária de LPS em vacas em lactação

“RESUMO INTERPRETATIVO”

Avaliação de aspectos inflamatórios e metabólicos após infusão intramamária de LPS em vacas em lactação. *Por Fernandes et al.* As alterações metabólicas são responsáveis por grandes perdas na bovinocultura de leite, e ocorrem por falhas no manejo nutricional e sanitário. Neste sentido, o presente estudo objetivou avaliar a resposta inflamatória induzida por infusões intramamárias de LPS, e sua interação com o metabolismo energético de vacas em lactação. Com isso, foi possível observar evidências da alteração no perfil do metabolismo energético em vacas de leite associadas à resposta inflamatória, o que reforça a participação de mediadores inflamatórios na patogênese de alterações metabólicas comumente observadas no período de transição.

Avaliação de aspectos inflamatórios e metabólicos após infusão intramamária de LPS em vacas em lactação

CABEÇALHO: EFEITOS DA INFLAMAÇÃO NO METABOLISMO ENERGÉTICO

A.C.C. Fernandes,^{*,†} C.C. Campos,^{*} D. Veira,^{*} N. Audrey,^{*} L.E.H. Melo,[†] R.L.A.

Cerri.^{*2}

^{*} Faculty of Land and Food Systems, The University of British Columbia, Vancouver,
BC V6T 1Z4

[†] Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária,
Recife, Brazil 52171-900

Avaliação de aspectos inflamatórios e metabólicos após infusão intramamária de LPS em vacas em lactação

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da resposta inflamatória, induzida pela infusão intramamária de LPS, nos parâmetros metabólicos a partir da análise dos ácidos graxos livres (AGNE) e do β -hidroxibutirato (BHB). Para tanto, 20 vacas em lactação foram divididas aleatoriamente em grupos CON (n=10), submetido a duas infusões de solução salinas estéreis, e LPS (n=10), o qual recebeu 25 μ g LPS diluídos 10 mL de solução salina. Nos dias de infusão, a temperatura reticular foi avaliada durante 14 horas a partir do momento da infusão. Foram colhidas amostras de leite para avaliação da produção diária e análise da CCS entre os dias 4 e 14. Além disso, para a análise da haptoglobina, TNF- α , AGNE e BHB foram obtidas amostras sorológicas nos dias 1, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 14 e 15. Com isso, foi possível observar sinais da resposta local já nas primeiras dez horas após a infusão, a partir do aumento da CCS no grupo LPS ($P < 0,0001$). Foi observada ainda queda acentuada na produção leiteira após o desafio com LPS ($P < 0,05$). A resposta sistêmica foi evidenciada inicialmente pelo aumento da temperatura reticular média do grupo LPS nas duas infusões em relação ao CON

²Corresponding author: R.L.A Cerri, Faculty of Land and Food Systems, University of British Columbia, Vancouver V6T 1Z4, Canada. Tel.: +1-604-822-5056; Fax: +1-604-822-6394, E-mail address: ronaldo.cerri@ubc.ca

($P < 0,005$), atingindo índices máximos entre 8 e 7 horas após as infusões. Adicionalmente, apesar de não observada alteração nos níveis sorológicos de TNF- α ($P > 0,05$), o aumento da concentração de haptoglobina no grupo LPS ($P < 0,0001$) demonstra o envolvimento sistêmico na resposta inflamatória induzida, através da participação do metabolismo hepático na produção das PFA. Na avaliação dos parâmetros metabólicos o grupo LPS apresentou valores elevados de AGNE no dia 9 ($P < 0,05$) e de BHB também no dia 9 ($P < 0,05$) e 10 ($P = 0,05$), o que sugere a indução de uma resposta lipolítica, porém, com menor intensidade do que esperado. Desta forma, considerando a resposta inflamatória induzida pelo LPS intramamário, foi possível observar evidências da relação da resposta inflamatória com o metabolismo energético de vacas em lactação, o que reafirma a participação de mediadores inflamatórios na fisiopatogenia de enfermidades metabólicas em vacas de leite e apontam para a necessidade de maiores esclarecimentos acerca da participação de diferentes mediadores inflamatórios e metabólitos nestas enfermidades.

Palavras-chave: Proteínas de fase aguda, inflamação, BHB, AGNE.

INTRODUÇÃO

As bactérias gram-negativas são comumente relacionadas às doenças infecciosas na produção de ruminantes, causando infecções gastrointestinais, pulmonares, septicemias neonatais, e ainda metrite e mastite (Waldron et al., 2003; Radostits et al., 2007), o que compromete o desempenho da produção leiteira. Além disso, estudos sugerem os efeitos negativos da inflamação sobre o metabolismo energético, uma vez observada a estreita relação da mesma com a síndrome do fígado gorduroso e com comprometimento da atividade metabólica do fígado, com consequências ainda sobre a fertilidade, considerando o comprometimento do metabolismo dos hormônios esteróides (Ametaj et al., 2005; Bradford et al., 2009; Zabeli et al., 2015).

Os sinais clínicos oriundos da infecção por bactérias gram-negativas ocorrem principalmente pela interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o lipopolissacarídeo (LPS), um importante constituinte da parede bacteriana considerado uma endotoxina (Steiger et al., 1999). Dentre as primeiras células que mediam a resposta à nível sistêmico, e alteram o perfil imunológico, estão os macrófagos hepáticos, ou células de *kupffer*, que induzem a produção de diversas citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), e IL-6. Desta forma, o metabolismo hepático é um importante mediador da resposta inflamatória, uma vez que o fígado é responsável por filtrar as toxinas produzidas em locais de inflamação, como por exemplo o LPS proveniente do útero ou da glândula mamária, produzindo a resposta de fase aguda (Ametaj et al., 2005), uma resposta inespecífica caracterizada pela produção das proteínas de fase aguda como por exemplo a haptoglobina e a serum amiloide A (Ceciliane et al., 2012).

A resposta inflamatória está relacionada ainda às alterações no metabolismo energético, bem como à diminuição do consumo de matéria seca (CMS), o que pode agravar o balanço energético negativo, observado sobretudo no período de transição (Waldron et al., 2003; Plaizier et al., 2008). Durante uma resposta de fase aguda podem ser observadas alterações no metabolismo dos lipídios e da glicose, como o aumento na taxa de lipólise, seguido do aumento plasmático dos níveis de ácidos graxos não-esterificados (AGNE), e um expressivo aumento da glicemia em um primeiro momento da resposta aguda, seguido por um período de hipoglicemia (Kushibiki et al. 2000; Jiang et al., 2008). Estudos *in vivo* demonstraram que a exposição de vacas a citocinas pró-inflamatórias, como o interferon- α (via oral) e o TNF- α (subcutâneo), resultaram respectivamente em elevados níveis plasmáticos de corpos cetônicos duas semanas antes do parto e no acúmulo de triglicerídeo hepático no final da lactação (Bradford et al., 2009; Trevesi et al., 2009). Adicionalmente, foram observados efeitos negativos na

expressão de importantes genes hepáticos relacionados à produção de glicose, o que pode expor vacas em lactação a um quadro de hipoglicemia, resultando em mobilização da gordura corpórea e inevitavelmente, a elevados níveis de AGNE e aumento na produção de corpos cetônicos pelo fígado, à exemplo do o beta-hidroxibutirato (BHB) (Jiang et al., 2008; Bradford et al., 2009). Desta forma, a literatura sugere a resposta inflamatória como possível agente precursor de alterações metabólicas como a cetose e a lipidose hepática, duas importantes manifestações clínicas de grande impacto na pecuária leiteira.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a resposta inflamatória induzida por infusões intramamárias de LPS, e sua interação com o metabolismo energético de vacas em lactação.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no centro de educação e pesquisa em gado de leite da Universidade da Columbia Britânica, em Agassiz, Canadá (*Dairy Education and Research Centre at the University of British Columbia*), de acordo com as práticas preconizadas pelo *Canadian Animal Care Council* (CACC, 2009), e aprovado pelo comitê local de bem-estar animal.

Animais e delineamento experimental.

Foram utilizadas 20 vacas da raça Holandesa em lactação, primíparas e multíparas, apresentando no início do experimento em média 62 dias em lactação (± 7). As mesmas eram ao submetidas ao sistema de *free stall* com camas de areia, ordenhadas duas vezes ao dia com uma produção média de 35 Kg de leite por vaca por dia. O manejo nutricional da fazenda não foi alterado para a realização do experimento, estando em conformidade com o que é preconizado pelo conselho nacional de pesquisa aplicado no Canadá (National Research Council - NRC, 2001), para atender às

necessidades dos animais com base no período da lactação. Os animais eram alimentados duas vezes ao dia (manhã e tarde), recebendo dieta composta por silagem de milho, silagem de capim e feno, sendo oferecidos ainda grãos como fonte protéica e vitaminas e minerais. Além disso, os animais possuíam livre acesso à água.

De forma a homogeneizar os animais utilizados, e considerando que os mesmos estavam sendo normalmente sincronizados e inseminados, foi considerado o D0 (dia da inseminação) o início do experimento, e a partir daí os animais foram inseridos aleatoriamente nos grupos controle (CON) e LPS, e receberam infusões intramamárias após a ordenha matinal nos dias 5 e 10, por meio de uma cânula intramária estéril (Figura 1). O grupo CON recebeu duas infusões de 10 mL de solução salina estéril, ao tempo que os animais LPS receberam duas infusões de 10 mL da mesma solução salina contendo 25 µg de LPS de *E. coli* cepa 0111:B4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Como critério de inclusão dos animais no experimento foi utilizada a CCS, exigindo-se valores < 200.000 cel/mL nas avaliações que antecederam o início das análises, além da exigência da não apresentação de sinais clínicos de mastite e não terem sido tratados para mastite nos 30 dias que antecederam o início do experimento. Além disso animais com elevados níveis de haptoglobina e AGNE antes do início das infusões não foram inseridos nas análises.

Avaliação da temperatura corpórea.

Após as infusões realizadas nos dias cinco e 10 do experimento a temperatura corpórea foi monitorada durante 14 horas através de um sensor reticular de temperatura (TempTrack®, DVM Systems, LLC, Greeley, CO) inserido no retículo de por via oral. O mesmo apresentava estrutura cilíndrica com 95 mm por 23 mm de dimensão. A leitura do sensor ocorria quando o animal deixava a sala de ordenha, ao passar por um leitor fixo, e as informações eram então enviadas para um computador central para

futuras análises, sendo possível identificar um aumento de 0,8°C na temperatura basal do animal (Adams et al., 2013).

Colheita e análise de amostras de leite e de sangue

Durante o período experimental as amostras de leite foram colhidas no D1, D4 e D5 pela manhã (AM) com o objetivo de avaliar a CCS antes do início das infusões, e em seguida para avaliar os efeitos do LPS foram colhidas amostras no D5/PM (10 horas após a 1ª infusão), no D6/AM (24 horas após a 1ª infusão), D6/PM (34 horas após 1ª a infusão), no D9/AM (24 horas antes da segunda infusão), D10/AM (momento antes da 2ª infusão), D10/PM (10 horas após a 2ª infusão), D11/AM (24 horas após a 2ª infusão), D11/PM (34 horas após a 2ª infusão) e D14 (quatro dias após a segunda infusão).

As amostras de sangue foram colhidas através da veia coccigea medial, em tubos vacutainer de 10 mL sem EDTA (Becton & Dickinson Vacutainer systems, Rutherford, NJ). As mesmas foram obtidas após as ordenhas matinais, em seguida centrifugadas à 2.000 g por 15 min para obtenção do soro e posteriormente armazenado a -20°C. As alíquotas sorológicas foram submetidas ao ELISA para a determinação das concentrações de haptoglobina (dias 0, 1, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 14, 15), de TNF- α (dias 0, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 15) e de parâmetros relacionados ao metabolismo energético (dias 4, 5, 6, 9, 10, 11 e 14), .

Os níveis sorológicos de haptoglobina foram determinados através do *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), com base na formação do complexo haptoglobina-hemoglobina, estimando a diferença de atividade de peroxidase no plasma (Makimura e Suzuki, 1982). A reação colorimétrica foi avaliada através do leitor de ELISA (Gemini™ EM; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) configurado para leitura de comprimento de onda de 450 nm. A concentração sorológica do TNF- α foi determinada utilizando o kit de ELISA para TNF- α bovino (RayBio®, Gerorgia, USA),

que se aplica à avaliação quantitativa desta citocina em plasma e soro bovino, com leitura realizada à 450 nm. A avaliação dos parâmetros metabólicos foi realizada com base na análise dos níveis sorológicos, ácidos graxos não-esterificados (AGNE) e β -hidroxibutirato (BHB). Foi realizado ensaio enzimático colorimétrico para a quantificação de AGNE (HR Series AGNE-HR, WAKO Diagnostics, Mountain View, CA), com base na reação de acilação da coenzima A (CoA) que resulta em um produto de cor púrpura mensurado colorimetricamente à 550nm. A quantificação do BHB foi realizada por meio de reações de enzima acoplada (β -Hydroxybutyrate Assay Kit, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) resultando em produtos colorimétricos identificados à 450nm, proporcional à quantidade de BHB presente na amostra.

Análises estatísticas.

O procedimento *Univariate* do software estatístico SAS versão 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) foi utilizado para avaliar os dados quanto a sua normalidade, e quando necessário foi realizada a transformação logarítmica (log). Medidas repetidas foram analisadas utilizando o procedimento *Mixed* também do SAS.

RESULTADOS

Os animais desafiados com infusões intramamárias de LPS, em relação ao grupo controle, apresentaram uma menor produção leiteira após o início das infusões ($p < 0,05$). Durante o período experimental os animais desafiados produziram em média 5L de leite por dia a menos do que os animais controle, sendo observado os menores valores nos dias 6, 7, 11 e 13, com com produção média diária de 27 L. Neste mesmo período, o grupo CON apresentou uma produção média diária de 34 L (Gráfico 1). Na avaliação da CCS, após a transformação logarítmica dos dados, foi observada diferença entre os grupos LPS (1.816×10^3 cel/mL) e o grupo controle (201×10^3 cel/mL). Adicionalmente, a CCS apresentou dinâmica semelhante após ambas as infusões,

demonstrando aumento significativo 10 horas após às infusões ($p < 0,0001$), e manutenção dos valores elevados em relação ao grupo CON por pelo menos 34 horas. A avaliação quatro dias após os desafios demonstrou o reestabelecimento dos valores normais na CCS (Gráfico 2).

O monitoramento da temperatura reticular após as infusões de LPS demonstrou variação significativa ($P < 0,005$) entre os grupos CON e LPS. Esta variação foi observada seis horas após a primeira infusão (CON = $39,5^{\circ}\text{C}$ e LPS = $40,7^{\circ}\text{C}$) (Gráfico 3.A), ao passo que após a segunda infusão o aumento de temperatura foi observado já a partir de três horas (CON = $39,6^{\circ}\text{C}$ e LPS = $40,7^{\circ}\text{C}$) (Gráfico 3.B). Os valores máximos observados ocorreram entre sete e oito horas após as infusões, atingindo em média $40,8^{\circ}\text{C}$. Sobre os níveis sorológicos de haptoglobina foram observados valores elevados no grupo LPS 24 horas após a primeira infusão ($P < 0,0001$), com a manutenção dos valores elevados nos dias 9, 10, 11, 14 e 15 (Gráfico 4). Contudo, na análise dos valores sorológicos de TNF- α não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos CON e LPS (Tabela 1).

Na avaliação dos parâmetros metabólicos não foi observado efeito do tratamento sobre os níveis de AGNE entre os grupos, porém, no dia nove os animais desafiados apresentaram elevada concentração em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Gráfico 5). Os níveis sorológicos de BHB apresentaram-se elevados no grupo LPS ($10,3 \text{ mg/dL}$) em relação ao controle ($8,3 \text{ mg/dL}$) ($P < 0,05$). A exemplo do AGNE, o BHB apresentou valores elevados em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) no dia nove no dia dez ($P = 0,05$) (Gráfico 6). Adicionalmente, o grupo LPS apresentou valores numericamente superiores desses metabólitos após o início do desafio.

DISCUSSÃO

Os resultados referentes à produção leiteira e a contagem de células somáticas evidenciam a ocorrência da resposta inflamatória local após as infusões, caracterizando

o impacto da mastite na produtividade de vacas de leite. Os valores da CCS assemelham-se aos dados apresentados por Rainard e Paape (1997), que ressaltam ainda o marcante aumento após a infusão intramamárias de LPS, apesar da baixa concentração circulante de TNF- α , a exemplo do que foi observado no presente estudo. Também LEEAN SUOJALA et al. (2008) observaram aumento na CCS após desafiarem vacas com *Escherichia coli* por via intramamária, porém com contagem superior à 24×10^6 cel/mL e por um período maior do que observado no presente estudo, o que sugere uma variação na amplitude da resposta a depender do mediador utilizado na infusão. A expressiva migração de leucócitos para a glândula mamária, responsável pelo aumento súbito da CCS, representa uma importante fase da ativação da resposta imune inata diante de bactérias gram-negativas, que se dá pela interação direta entre o LPS e os receptores CD14 das membranas dos neutrófilos (Leean Suojala et al., 2008).

O aumento da temperatura reticular nas vacas do grupo LPS demonstra a interação entre os mediadores inflamatórios e o SNC, interferindo no controle hipotalâmico da termorregulação. Neste sentido, citocinas pirogênicas como a IL-1, IL-6 e o TNF- α apresentam em comum a mesma via de sinalização que resulta na ativação do fator nuclear κ B (FN κ B), conseqüentemente na expressão da cicloxigenase-2 (COX-2) e por fim na produção da PGE₂. Elevados níveis de PGE₂ na região do hipotálamo denominada órgão vascular da lâmina terminal (*organum vasculosum laminae terminalis* - OVLT) eleva a liberação de neurotransmissores e cAMP, ativando neurônios termossensíveis e causando ainda alterações comportamentais (Dinarello, 2004; Ceciliani et al., 2012). Além da atuação direta das citocinas, os receptores de membrana do tipo *toll* (*Toll-like receptors* - TLR), que utilizam a mesma área de sinalização citoplasmática dos receptores de IL-1, também participam de forma ativa no estímulo à produção de PGE₂, e conseqüentemente na termorregulação à nível de hipotálamo (Gay e Keith, 1991).

O comportamento dos níveis sorológicos da haptoglobina (Hp) sinaliza para a atividade dos macrófagos e monócitos na glândula mamária, que ao interagirem com o LPS produzem as citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela atração dos neutrófilos para o local da inflamação, assim como pelo estimulando hepático à resposta de fase aguda (RFA) (Burverick et al., 2003). A resposta inflamatória sistêmica, bem como o estímulo hepático à produção de proteínas de fase aguda (PFA), tem sido associados à absorção de citocinas para a circulação, e não necessariamente ao extravasamento de LPS da glândula mamária (Kushibiki et al., 2003). Neste sentido, Minuti et al. (2015) correlaciona a ativação do sistema imune diante do LPS não apenas à resposta local na glândula mamária, mas também ao metabolismo hepático que resulta na RFA e na alteração do metabolismo de lipídios.

A ação das citocinas pró-inflamatórias no estímulo da produção das proteínas de fase aguda (PFA) no fígado, se dá por diferentes vias. A IL-6 estimula a fosforilação do fator de transcrição de IL-6 que é então transportado ao núcleo celular, onde direciona a transcrição dos genes associados à resposta de fase aguda (RFA). Por outro lado, a IL-1 e o TNF- α atuam degradando o elemento inibidor ($I\kappa B$) do fator nuclear de transcrição (NF κB), resultando na ativação dos genes da RFA no núcleo celular (Jensen e Whitehead, 1998; Eckersall, 2000). Há indícios de que aumento na produção de TNF- α pelos macrófagos da glândula mamária, em resposta ao LPS, são os responsáveis pelo aumento dos níveis séricos do mesmo através do extravasamento para a corrente sanguínea, considerando o aumento da permeabilidade na glândula mamária (Hoeben et al. 2000). Porém, contraditoriamente, Lehtolainen et al. (2004) desafiaram vacas com LPS (100 μ g/5mL) intramamário e não observaram alteração níveis séricos desta citocina, apesar da elevada concentração da mesma no leite e do aumento de proteínas de fase aguda no sangue e no leite, o que sugere a existência do estímulo à produção de PFA mesmo sem alteração nos níveis sistêmicos de TNF- α . De forma complementar e

semelhante aos resultados do presente estudo, Ohtsuka et al. (2001) demonstraram que vacas com mastite, naturalmente infectadas, apresentaram elevados níveis séricos de Hp, sem alteração nos níveis sérico de TNF- α , porém com elevados níveis de IL-1, o que ratifica o importante papel desenvolvido também pela IL-1 na RFA. Neste sentido, considerando a importância do TNF- α na resposta inflamatória inicial do hospedeiro, que induz a produção de IL-1, IL-6 e IL-8 auxiliando no processo de migração das células polimorfonucleares, e ainda a importância da IL-8 que pode ser produzida mesmo na ausência do TNF- α , a interação entre as citocinas pró-inflamatórias e seus reflexos na fisiopatologia da mastite necessitam de mais estudos.

Além da participação na produção de mediadores da RFA, o fígado desenvolve ainda papel fundamental no equilíbrio metabólico de vacas de leite, sobretudo no início da lactação (Minuti et al., 2015), período no qual há uma maior susceptibilidade a alterações metabólicas devido à elevada demanda energética. Nesse contexto, considerando que a homeostase energética depende de processos como a lipólise e a oxidação de ácidos graxos livres (AGNE), os níveis circulantes de metabólitos como AGNE e BHB podem auxiliar na avaliação do *status* energético desses animais. A dinâmica apresentada pelos níveis circulantes de AGNE e BHB no presente estudo possibilita considerar a alteração no metabolismo energético dos animais desafiados, porém, de forma menos expressiva do que imaginado inicialmente, provavelmente minimizada pela queda acentuada na produção leiteira dos animais do grupo LPS, o que diminuiu a demanda energética desses animais, ou ainda pela magnitude da resposta inflamatória induzida. Considerando ainda que o aumento de BHB nestes casos ocorre principalmente em consequência à elevada taxa de oxidação do ácidos graxos livres, os valores de AGNE observados no dia 9 podem ter sido precedidos por valores elevados também nos dias 7 e/ou 8.

Apesar de não observada alteração nos níveis sorológico de TNF- α , considerado um dos primeiros imunomoduladores da RFA e um importante mediador das alterações metabólicas (Bradford et al., 2009), as vacas desafiadas evidenciaram mudanças no metabolismo energético. Contraditoriamente às afirmações que associam elevados níveis de AGNE ao aumento na concentração sistêmica de TNF- α , estudos sinalizam para a ocorrência de alterações metabólicas previamente a mudanças nas concentrações sistêmicas de TNF- α , o que sugere um estímulo a partir da produção local de citocinas pró-inflamatórias (Martinet et al., 1988; Miller et al., 1997). A ação local de citocinas como o TNF- α e a IL-1 estimulam a produção de IL-6, outro importante mediador da resposta sistêmica (Miller et al., 1997), que ativa o sistema nervoso simpático, resultando no aumento da concentração de ACTH, cortisol e catecolaminas, importantes mediadores da resposta lipolítica (Steinger et al., 1999). A princípio o aumento dos níveis de AGNE e BHB sinaliza para uma maior demanda energética que resulta em mobilização de triglicerídeos na tentativa de preservar nutrientes escassos como a glicose e os aminoácidos (Peel e Bauman, 1987; Kushibiki et al., 2003), porém, a longo prazo a manutenção desta resposta pode predispor a enfermidades metabólicas.

Uma vez excedida a capacidade hepática de oxidação do AGNE em CO₂, observa-se uma maior taxa de re-esterificação dos ácidos graxos produzindo triglicerídeos (TGA), assim como um elevada taxa de oxidação dos ácidos graxos e produção de Acetil-CoA. Os triglicerídeos são re-esterificados e transportados como lipoproteínas de baixo peso molecular (VLDLs), porém, os ruminantes possuem uma lenta taxa de remoção de VLDL do fígado, fazendo com que esta via de eliminação do AGNE facilmente se exceda, ocorrendo o acúmulo de triglicerídeo hepático e predispondo a ocorrência da lipidose hepática (Oetzel, 2007; Grummer, 2008). O aumento na produção do Acetil-CoA também reflete a sobrecarga no metabolismo hepático, e neste caso pode resultar em uma produção de acetil-CoA maior do que a capacidade de aproveitamento

do mesmo pelo ciclo de *Krebs*, resultando na sua conversão em corpos cetônicos (acetoacetato, β -hidroxibutirato e acetona), o que evita seu acúmulo na circulação (Sugden et al., 2001). Apesar de ser utilizado como fonte de energia por importantes tecidos, o excesso de corpos cetônicos pode afetar negativamente o comportamento e o desempenho dos animais, e predispor à ocorrência da cetose bovina.

Nesse sentido, os elevados valores de BHB apresentados pelos animais do grupo LPS em relação ao CON, sugerem a saturação do metabolismo hepático e o comprometimento da completa oxidação do AGNE em acetil-CoA (Bell, 1995). Esse resultado confronta os dados apresentados por Steiger et al. (1999) e Waldron et al. (2003), que após infusão de LPS durante 100 min (1mL/min) observaram baixos valores de BHB associados ao aumento de AGNE. Nestes casos, os baixos níveis de BHB foram associados à redução da cetogênese hepática pela ação de citocinas, à diminuição da cetogênese ruminal, e ainda à possibilidade da utilização dos corpos cetônicos como fonte de energia no momento em que considerável parcela da glicose está disponibilizada para o sistema imune (Waldron et al., 2006). Nesse contexto, considerando que as alterações metabólicas frente ao LPS são dose-dependentes pressupõe-se que a dose única utilizada por Steiger et al. (1999) e Waldron et al. (2006), não foi suficiente para transpor esse que parecer ser o primeiro comportamento do BHB após o desafio com LPS, o qual precede a fase de saturação do ciclo de *Krebs* na utilização do acetil-CoA.

Por fim, ao admitir a co-participação de mediadores inflamatórios na ocorrência do BEN, a presença dos mesmos no período de transição pode predispor importantes afecções comumente observadas neste período. Nesse contexto, níveis elevados de AGNE foram recentemente associados à ocorrência de hipocalcemia pós-parto, retenção de placenta e do deslocamento de abomaso, (Adewuyi et al., 2005; Klevenhusen et al., 2015), havendo ainda indícios da participação do BHB na imunossupressão associado

ao BEN, uma vez que o mesmo foi associado à diminuição da atividade neutrofílica (Grinberg et al., 2008). Desta forma, reafirma-se que as consequências de processos inflamatórios, ocorrendo sobre tudo no período de transição, devem ser compreendidos de forma ampla e associados a distúrbios fisiopatológicos, à queda da produção e ao menor desempenho reprodutivo de vacas de leite.

CONCLUSÃO

O protocolo utilizado induziu uma resposta inflamatória local, evidenciada pelo aumento na CCS e pela acentuada queda na produção leiteira, assim como uma resposta inflamatória sistêmica, caracterizada pelo aumento nas concentrações sorológicas de haptoglobina. Foi possível observar a interferência da resposta inflamatória no metabolismo energético, porém, ressalta-se que a queda na produção leiteira pode ter minimizado os efeitos da inflamação sobre este metabolismo. Por fim, os resultados reafirmam a participação de mediadores inflamatórios na fisiopatogenia de enfermidades metabólicas em vacas de leite e apontam para a necessidade de maiores esclarecimentos acerca da participação de diferentes mediadores inflamatórios e metabólitos nestas enfermidades.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio por parte da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - PDSE), ao Conselho Canadense de Pesquisa em Ciências Naturais e Engenharia (NSERC), à UFRPE, ao centro de educação e pesquisa em gado de leite da Universidade da Columbia Britânica (UBC), (*Dairy Education and Research Centre at the University of British Columbia*).

REFERÊNCIAS

Adewuyi, A.A., Gruys, E., Van Eerdenburg, F.J.C.M. 2005. Non Esterified fatty acids (AGNE) in dairy cattle. A review, *Veterinary Quarterly*, 27:3, 117-126.

- Ametaj, B.N., Bradford, B.J., Bobe, G., Nafikov, R.A., Lu, Y., Young, J.W., Beitz, D.C. 2005. Strong relationships between mediators of the acute phase response and fatty liver in dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 58, 165–175.
- Bell, A. W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science.* 73: 2804-2819.
- Bradford, B. J., L. K. Mamedova, J. E. Minton, J. S. Drouillard, and B. J. Johnson. 2009. Daily injection of tumor necrosis factor- α increases hepatic triglycerides and alters transcript abundance of metabolic genes in lactating dairy cattle. *J. Nutr.* 139(8):1451-1456.
- Burvenich C., Van Merris V., Mehrzad J., Diez-Fraile A., Duchateau L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors, *Vet. Res.* 34:521–564.
- Ceciliani, F. Ceronb, J. J., Eckersallc, P. D., Sauerwein, H. 2012. Acute phase proteins in ruminants. *Journal of proteomics.* 75, 4207-4231.
- Dinarello, C. A. 2004. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. *J Endotoxin Res.*10(4):201-22.
- Eckersall, P. D. 2000. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue Méd. Vét.* 151(7):577-584.
- Gay, N. J., Keith, F.J. 1991. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature.* 351:355–356.
- Grinberg, N., Elazar, S., Rosenshine, I., N., Shpige, Y. 2008. Beta-Hydroxybutyrate Abrogates Formation of Bovine Neutrophil Extracellular Traps and Bactericidal Activity against Mammary Pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity,* 76(6), 2802–2807.
- Grummer, R. R. 2008. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet J,* 176, 10–20.

- Hoeben JW, Burvenich C, Trevisi E, Bertoni G, Hamann J, Bruckmaier RM, Blum JW. 2000. Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *Journal of Dairy Research*. 67, 503–514.
- Jiang, L., P. Sorensen, C. Rontved, L. Vels, and K. Ingvarsten. 2008. Gene expression profiling of liver from dairy cows treated intra-mammary with lipopolysaccharide. *BMC Genomics*. 9(1):443.
- Jensen L.E. e Whitehead A.S. 1998. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute phase response. *Biochem. J*. 334:489-503.
- Klevenhusen, F., Humer, E., Metzler-Zebeli, B., Podstatzky-Lichtenstein, L., Wittek, T., Zebeli, Q. 2015. Metabolic profile and inflammatory responses in dairy cows with left displaced abomasum kept under small-scaled farm conditions. *Animals*, 5:1021-1033.
- Kushibiki, S., Hodate, K., Ueda, Y., Shingu, H., Mori, Y., Itoh, T. and Yokomizo, Y. 2000. Administration of recombinant bovine tumor necrosis factor- α affects intermediary metabolism and insulin and growth hormone secretion in dairy heifers. *J. Anim. Sci*. 78: 2164–2171.
- Kushibiki, S., K. Hodate, H. Shingu, Y. Obara, E. Touno, M. Shinoda, and Y. Yokomizo. 2003. Metabolic and lactational responses during recombinant bovine tumor necrosis factor- α treatment in lactating cows. *J. Dairy Sci*. 86:819–827.
- Lehtolainen, T., C. Røntved, e S. Pyörälä. 2004. Serum amyloid A and TNF α in serum and milk during experimental endotoxin mastitis. *Vet. Res*. 35:651–659.

- Martinet, Y., K. Yamauchi, and R. G. Crystal. 1988. Differential expression of the tumor necrosis factor/cachectin gene by blood and lung mononuclear phagocytes. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138: 659–665.
- Miller, A. J., G. N. Luheshi, N. J. Rothwell, and S. J. Hopkins. 1997. Local cytokine induction by LPS in the rat air pouch and its relationship to the febrile response. *Am. J. Physiol.* 272, 857-861.
- Minuti, A., Zhou, Z., Graugnard, D. E., Rodriguez-Zas, S. L., Palladino, A. R., Cardoso, F. C., Trevisi, E., Loor, J.J. 2015. Acute mammary and liver transcriptome responses after an intramammary *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge in postpartal dairy cows. *Physiol Rep.* 3 (4).
- Oetzel, G. R. 2007. Herd-level ketosis: diagnosis and risk factors. In: *Am Assoc Bov Pract Proc.* Vancouver, BC, Canada. 67–91.
- Ohtsuka, H., Kudo, K., Mori, K., Nagai, F., Hatsugaya, A., Tajima, M., Tamura, K., Hoshi, F., Koiwa, M. e Kawamura S. 2001. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. *J Vet Med Sci.* 63(6):675-8.
- Plaizier, J.C., Krause, D.O., Gozho, G.N., McBride, B.W. 2008. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176, 21–31.
- Peel, C. J., and D. E. Bauman. 1987. Somatotropin and lactation. *J. Dairy Sci.* 70:474-486.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. et al. 2007. *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.* 10.ed. Philadelphia: Saunders, 673-762.

- Rainard, P., Paape, M.J. 1997. Sensitization of the bovine mammary gland to *Escherichia coli* endotoxin. *Vet Res.* 28:231-238.
- Steiger, M., Senn, M., Altreuther, G., Werling, D., Sutter, F., Kreuzer, M., Langhans, W. 1999. Effect of a Prolonged Low-Dose Lipopolysaccharide Infusion on Feed Intake and Metabolism in Heifers. *J. Anim. Sci.* 77, 2523-2532.
- Sugden, M.C., Bulmer, K. and Holness, M.J. 2001. Fuel-sensing mechanisms integrating lipid and carbohydrate utilization. *Biochemical Society Transactions.* 29, part 2.
- Suojala, L., Orro, T., Järvinen, H., Saatsi, J. e Pyörälä, S. 2008. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 50:18.
- Trevisi, E., M. Amadori, A. M. Bakudila, and G. Bertoni. 2009. Metabolic changes in dairy cows induced by oral, low-dose interferon-alpha treatment. *J. Anim Sci.* 87(9):3020- 3029.
- Zebeli, Q., Ghareeb, K., Humer, E. Metzler-Zebeli, B.U., and Besenfelder, U. 2015. Nutrition, rumen health and inflammation in the transition period and their role on overall health and fertility in dairy cows. *Research in Veterinary Science* 103, 126–136.

Gráficos, figuras e tabelas

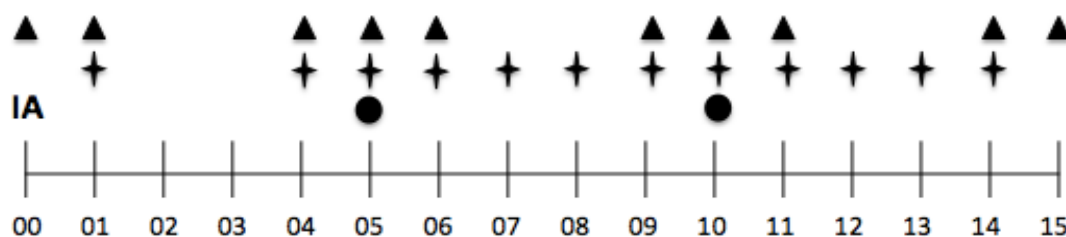


Figura 1. Organograma experimental (IA - Inseminação artificial; ● - Infusões intramamária de LPS (25 µg em 10mL) e solução salina estéril (10 mL); † - Colheita de leite para avaliação da produção diária e CCS; ▲ - Colheita de amostras sorológicas).

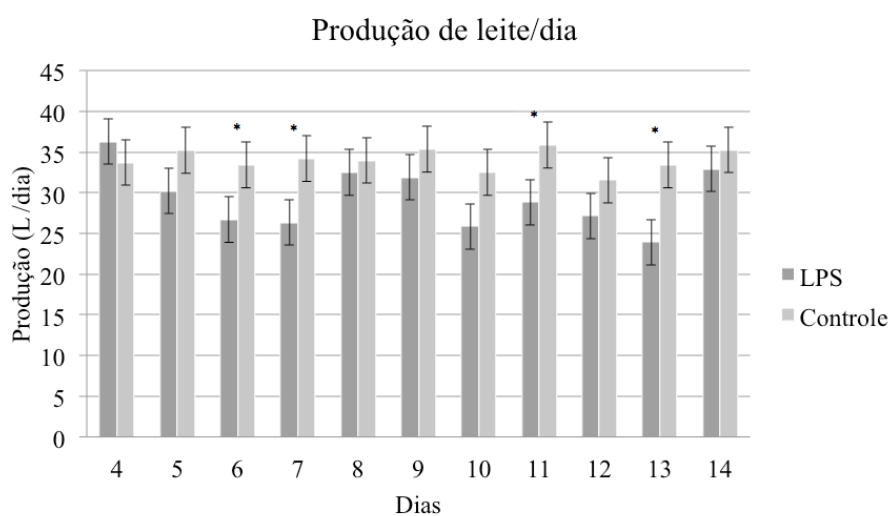


Gráfico 1. Produção leiteira durante o período experimental após infusões intramamárias de LPS realizadas nos dias 5 e 10 (* $P < 0,05$).

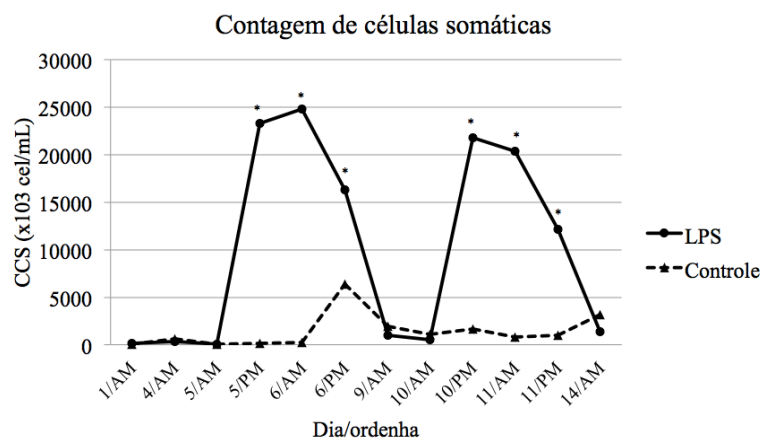


Gráfico 2. Contagem de células somáticas (CCS) nos grupos LPS e controle durante o período experimental (* $P < 0,001$).

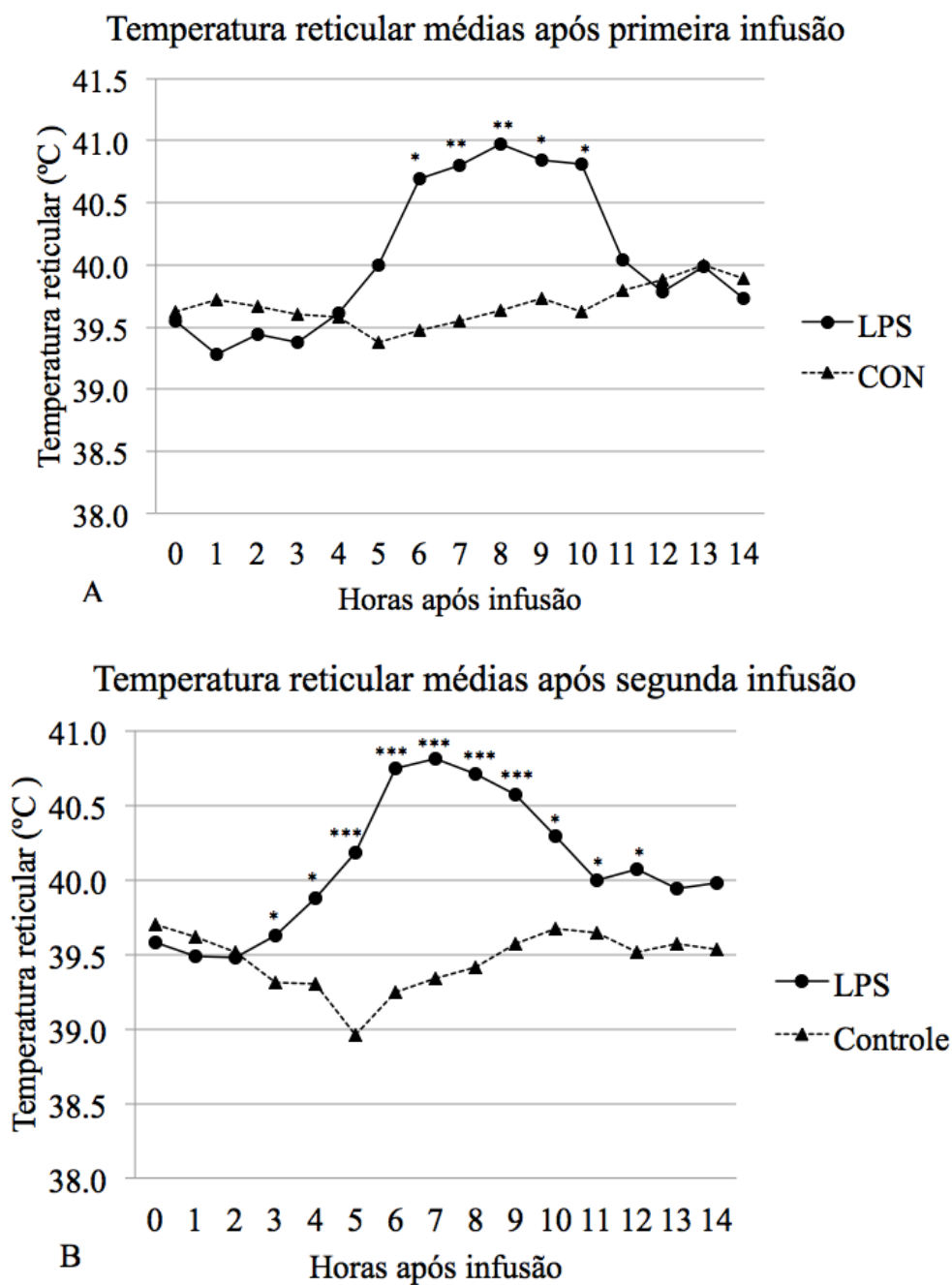


Gráfico 3. Avaliação das infuses intramamárias de LPS (25 μ g de LPS de *E. coli* cepa 0111:B4) realizadas no dia 5 (A) e no dia 10 (B) (* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$; *** $P < 0,005$).

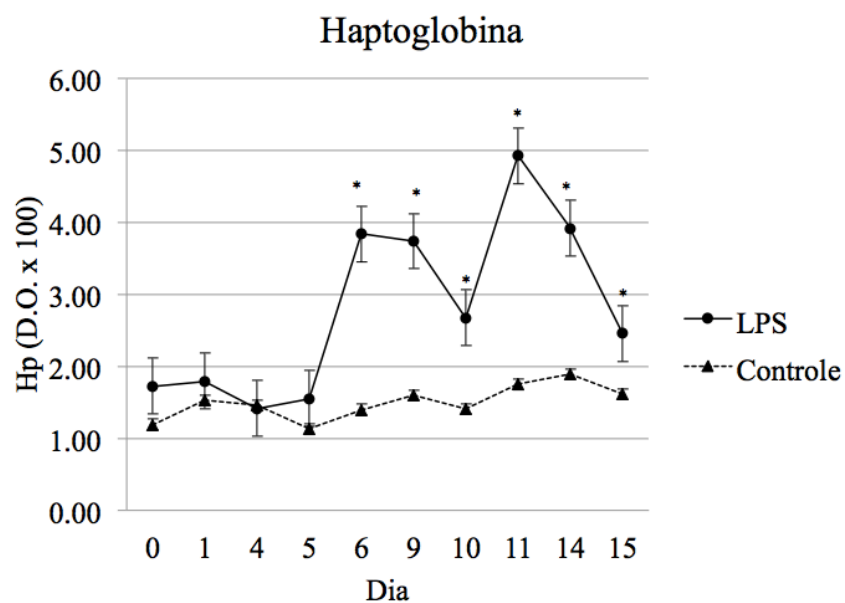


Gráfico 4. Concentração sorológica de haptoglobina durante o período experimental (* $P < 0,005$).

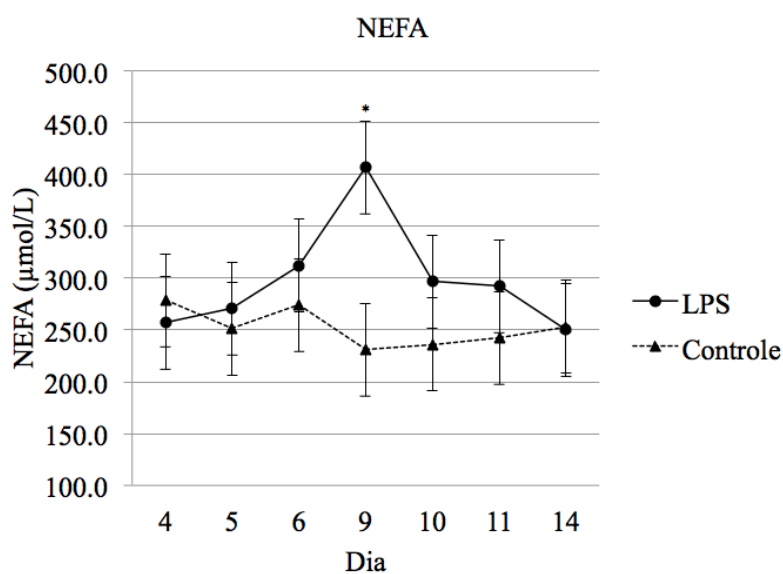


Gráfico 5. Concentração sorológica de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) nos grupos LPS e controle (* $P < 0,05$).

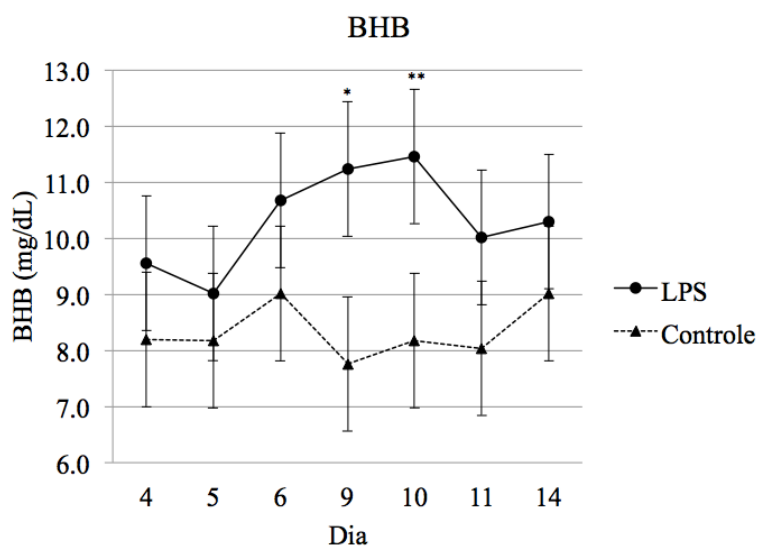


Gráfico 6. Concentração sorológica de β -hidroxibutirato (BHB) nos grupos LPS e controle (* $P < 0,05$; ** $P = 0,053$).

Tabela 1. Concentração sorológica de fator de necrose tumoral (TNF- α) nos grupos LPS e controle.

Dias	Controle		LPS		P-value
	Média (ng/mL)	S	Média (ng/mL)	S	
0	0.534	0.158	0.513	0.230	0,76
4	0.745	0.704	0.520	0.234	0,36
5	0.716	0.631	0.456	0.160	0,17
6	0.730	0.640	0.443	0.139	0,15
9	0.657	0.548	0.453	0.139	0,35
10	0.652	0.479	0.450	0.140	0,28
11	0.640	0.443	0.404	0.118	0,12
15	0.668	0.431	0.447	0.131	0,17