

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**



Tese

**Efeito do Lipopolissacarídeo (LPS) sobre o metabolismo, a reserva ovariana,
modulação da expressão de genes do útero, ovário e oviduto em novilhas**

Andressa Stein Maffi

Pelotas, 2020

Andressa Stein Maffi

**Efeito do Lipopolissacarídeo (LPS) sobre o metabolismo, a reserva ovariana,
modulação da expressão de genes do útero, ovário e oviduto em novilhas**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas como requisito final à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Nunes Corrêa

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M187e Maffi, Andressa Stein

Efeito do Lipopolissacarídeo (LPS) sobre o metabolismo, a reserva ovariana, modulação da expressão de genes do útero, ovário e oviduto em novilhas / Andressa Stein Maffi ; Cassio Cassal Brauner, orientador. — Pelotas, 2020.

104 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Endotoxinas. 2. Inflamação. 3. Metabolismo. 4. Reprodução. I. Brauner, Cassio Cassal, orient. II. Título.

CDD : 636.208982

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Andressa Stein Maffi

Efeito do Lipopolissacarídeo (LPS) sobre o metabolismo, a reserva ovariana,
modulação da expressão de genes do útero, ovário e oviduto em novilhas

Tese aprovada, como requisito final, para obtenção do grau de Doutor em Ciência,
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel,
Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 13/02/2020

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner (Orientador)
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Diego Acosta Velasco
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Joabel Tonellotto dos Santos
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Lucas Hax
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

À Deus pela vida, pelo dom de cuidar dos animais, por ser caminho e amparo;

Aos meus pais Euzébio e Lucilda, minhas irmãs Éverla e Amanda e minha avó Helga, pelo amor, carinho e amparo incondicional. Por serem meu porto seguro e minha maior motivação para buscar meus objetivos.

Ao meu namorado, Cláudio, pelo carinho, amparo, por caminhar ao meu lado e ser um incentivador dos meus sonhos.

As minhas amigas, Bruna, Camila, Gabriela, Julia, Laura e Paula, pelo companheirismo e amizade ao longo desses anos.

Ao meu orientador Dr. Cassio Cassal Brauner e meu coorientador Dr. Marcio Nunes Côrrea, pelo incentivo, ensinamentos, confiança e oportunidades a mim oferecidas, vocês são profissionais exemplares.

Aos professores, Eduardo Schmitt, Rafael Gianella Mondadori, Augusto Schneider e Bernardo Gasperin e aos técnicos laboratoriais do setor de histologia, Augusto, Eliane e Otávio pelo auxílio técnico e pela disponibilização de equipamentos e materiais para realização das análises.

Aos meus colegas, Joao e Antônio, pelo companheirismo e empenho na realização desse projeto.

As minhas colaboradoras ao longo do doutorado, Mariane, Jéssica e Rutiele por toda a ajuda e dedicação na realização das atividades.

A toda família NUPEEC, pelo apoio para realização desse trabalho, pela convivência e o crescimento pessoal e profissional que me proporcionaram ao longo desses anos.

Ao Frigorífico espinilho pela disponibilidade dos animais e pela acessibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela possibilidade de realização do doutorado e a Universidade Federal de Pelotas.

Resumo

MAFFI, Andressa Stein. **Efeito do Lipopolissacarídeo (LPS) sobre o metabolismo, a reserva ovariana, modulação da expressão de genes do útero, ovário e oviduto em novilhas.** 2020. 104f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A fim de avaliar os efeitos de exposições agudas ao LPS, sobre o metabolismo, útero, oviduto e ovário de bovinos, foram acompanhadas 16 novilhas de corte, europeias, distribuídas uniformemente em dois grupos, a partir do peso corporal: O grupo LPS (n=8) recebeu 2 aplicações contendo 0,5 µg/kg de peso corporal de LPS diluídas em 2 mL de solução salina via intravenosa, com intervalo de 24 horas e o grupo controle (n=8) que recebeu 2 aplicações contendo 2 mL de solução salina via intravenosa, com o mesmo intervalo. Os resultados encontrados são apresentados através de 3 artigos. No artigo 1, o objetivo do estudo foi avaliar os parâmetros hematológicos, bem como alguns marcadores energéticos e inflamatórios e níveis de minerais e enzimas hepáticas. No artigo 2, o objetivo do estudo foi identificar os possíveis mecanismos moleculares no oviduto e útero pelos quais as endotoxinas podem influenciar a fertilidade em bovinos. No artigo 3 o objetivo foi verificar o efeito de duas aplicações de LPS sobre a reserva, ativação e apoptose de folículos primordiais. Como resultados, no artigo 1 os animais desafiados apresentaram aumento de temperatura acima dos valores fisiológicos (38,5-39,5°C) da 1 às 4,5 horas com pico na hora 1, no primeiro desafio. Em relação ao segundo desafio, foi observado uma elevação aguda na temperatura 2 horas após o segundo desafio com retorno as 3 horas. Ocorreu uma leucopenia por neutropenia no grupo LPS, sem alteração da série vermelha e das plaquetas. Em relação aos parâmetros bioquímicos ocorreu uma redução nos níveis de colesterol 8 horas após o primeiro desafio no grupo LPS. Os níveis de parâmetros energéticos, inflamatórios, de minerais e enzimas hepáticas não sofreram efeito do desafio. No artigo 2, ocorreu uma redução significativa na expressão dos genes *PTGS2* e *NANOG* no útero, enquanto que os demais genes avaliados não apresentaram alteração. No estudo 3, não houve diferença na população folicular total, bem como nas diferentes categorias foliculares avaliadas. Além disso, o desafio com LPS não modulou a expressão de genes relacionados a reserva ovariana, sobrevivência oocitária, taxa de ativação e atresia folicular. Com isso concluímos que a exposição de animais ao LPS com intervalo de 24 horas, desencadeou uma resposta sistêmica com alteração na temperatura corporal, no leucograma e com um efeito a curto prazo no metabolismo lipídico. Além disso, promoveu a alteração na expressão de genes relacionados a produção de prostaglandinas e a renovação endometrial, sem alterar a população folicular total, taxa de atresia e ativação e a expressão de genes relacionados a reserva ovariana, a sobrevivência oocitária, e a ativação e atresia de folículos primordiais e antiapoptóticos.

Palavras-chave: endotoxinas; inflamação; metabolismo; reprodução.

Abstract

MAFFI, Andressa Stein. 2020. **Acting of Lipopolysaccharide (LPS) on metabolism, ovarian reserve, modulation of uterus, ovary and oviduct gene expression and in heifers.** 104f. Thesis (Doctoral degree em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

In order to evaluate the effects of acute exposure to LPS, on the metabolism, uterus, oviduct and ovary of cattle, sixteen European heifers were uniformly distributed in two groups, based on body weight: The LPS group (n = 8) received 2 applications containing 0.5 µg / kg of body weight of LPS diluted in 2 mL of saline intravenously, with an interval of 24 hours and the control group (n = 8) that received 2 applications containing 2 mL of solution saline via intravenously, with the same interval. The results found are presented through 3 articles. In article 1, the aim of the study was to assess hematological parameters, as well as some energy and inflammatory markers and levels of minerals and liver enzymes. In article 2, the objective of the study was to identify the possible molecular mechanisms in the oviduct and uterus by which endotoxemias can influence fertility in cattle. In article 3, the objective was to verify the effect of two applications of LPS on the reserve, activation and apoptosis of primordial follicles. The results of article 1 indicated that the challenged animals showed an increase in temperature above the physiological values (38.5-39.5 °C) from 1 to 4.5 hours with a peak at hour 1, in the first challenge. In relation to the second challenge, a sharp rise in temperature was observed 2 hours after the second challenge with a return at 3 hours. Leukopenia due to neutropenia occurred in the LPS group, with no change in the red series and platelets. Regarding the biochemical parameters, there was a reduction in cholesterol levels 8 hours after the first challenge in the LPS group. Levels of energy, inflammatory parameters, liver enzyme minerals were not affected by the challenge. In article 2, there was a significant reduction in the expression of the *PTGS2* and *NANOG* genes in the uterus, while the other evaluated genes showed no change. In study 3, there was no difference in the total follicular population, as well as in the different follicular categories evaluated. Furthermore, the challenge with LPS did not modulate the expression of genes related to ovarian reserve, oocyte survival, activation rate and follicle atresia. Thus, we conclude that the exposure of animals to LPS with an interval of 24 hours, triggers a systemic response with changes in body temperature, leukogram and with a short-term effect on lipid metabolism. In addition, it promoted the alteration in the expression of genes related to the production of prostaglandins and endometrial renewal, without altering the total follicular population, rate of atresia and activation and the expression of genes related to ovarian reserve, oocyte survival, and primordial follicle activation and atresia and anti-apoptotics.

Keywords: endotoxins; inflammation; metabolism; reproduction.

Lista de abreviaturas

AGNES	Ácidos Graxos Não Esterificados
ALT	Alanina aminotransferase
AMH	Anti-Mullerian hormone
AST	Aspartato Amino transferase
BSG	Basigin
CASP3	Caspase 3
CD14	Grupamento de diferenciação 14
Cox2	Cicloxigenase 2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMMPRIN	Indutor de Metaloproteinasas de Matriz Extracelular
EU	Unidades de endotoxinas
FSHr	Receptor de hormônio folículo estimulante
GAPDH	Gliceraldeido 3- fosfato desidrogenase
GGT	Gama Glutamil transferase
GPX4	Glutaciona Peroxidase 4
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HSPA1A	Proteína do choque térmico 1A
IGF2	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina tipo 2
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL 6	Interleucina-6
IL 8	Interleucina 8
IL	Interleucina
IL1 β	Interleucina 1 β
IL10	Interleucina 10
IMS	Ingestão de Matéria Seca
KIT	Receptor tyrosine kinase
KITL2	KIT ligand 2
KITLG	KIT ligand

LBP	Proteína ligante de LPS
LHr	Receptor de hormônio luteinizante
LPS	Lipopolissacarídeo
MMP19	Metalopeptidase da Matriz-19
MTOR	Mechanistic target of rapamycin kinase
NaCl	Cloreto de sódio
NANOG	Nanog homeobox
OCT4	Fator de transcrição de ligação ao octamero-4
OVGP 1	Glicoproteína oviductal 1
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PFA	Proteínas de fase aguda
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PGH2	Prostaglandina H sintase 2
PIK3R1	Subunidade 1 reguladora de fosfoinosítídeo 3-quinase
PON1	Paraoxonase 1
PTEN	Fosfatase Homóloga a Tensina
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
RFA	Resposta de fase aguda
RN18S1	18S ribossomal RNA
SARA	Acidose Ruminal Subaguda
SELL	Selectin L
SIRT1	Sirtin 1
SOD	Superoxido dismutase
SURVIVIN	Survivin
TLR4	Toll Like Receptor 4
TNF	Fator de necrose tumoral
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

Sumário

1.Introdução.....	11
2.Revisão de literatura	13
2.1. Sistema reprodutivo de bovinos	13
2.2 Lipopolissacarídeo e sua atuação no sistema imune, metabolismo, e sistema reprodutivo de bovinos	20
3. Hipótese, objetivo geral e objetivos específicos.....	26
3.1 Hipótese	26
3.2 Objetivo geral	26
3.3 Objetivos específicos	26
Capítulo I.....	27
Capítulo II	53
Capítulo III	71
Considerações finais.....	93
Referências	94

1 Introdução

O Brasil é o maior produtor e exportador de carne do mundo (ABIEC, 2019), e o 3º maior produtor de leite (RESENDE, J.C.; LEITE, J.L.B.; STOCK, L.A.; NARDY, 2019). Demonstrando com isso, a importância da pecuária na economia do país, visto que o setor da carne contribui com 8,7% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional e o leite representa cerca de 2,0% (CARVALHO, G.R.; ROCHA, 2019). Contudo a ocorrência de enfermidades de origem infecciosa ou nutricional, ocasionam um grande impacto econômico dentro das propriedades de bovinos de leite e corte, devido ao custo com tratamento, a redução da produção, bem como pelo descarte involuntário de animais. Em bovinos de corte, o confinamento dos animais levou a maior predisposição a quadros de doença respiratória assim como quadros de acidose (PANCIERA; CONFER, 2010). Já para bovinos leiteiros, a intensificação do sistema predispõem a ocorrência de mastite, metrite, endometrite e acidose (SEEGERS; FOURICHON; BEAUDEAU, 2003; GILBERT et al., 2005; HAIMERL; HEUWIESER, 2014; PEDERZOLLI et al., 2018).

Além dos efeitos locais, essas doenças exercem efeitos sistêmicos, alterando o metabolismo e também prejudicando o sistema reprodutivo. Esses efeitos decorrem da presença de bactérias gram-negativas na etiologia dessas enfermidades. Essas bactérias possuem em sua camada externa um constituinte de membrana denominado lipopolissacarídeo (LPS), o qual é uma endotoxina com potente efeito endotóxico, sendo capaz de provocar uma forte resposta por parte do sistema imune, promovendo uma inflamação com consequente produção de interleucinas (IL) e fator de necrose tumoral (TNF) (WALDRON et al., 2003; MORESCO; LAVINE; BEUTLER, 2011). O LPS também ocasiona a redução da ingestão de matéria seca (IMS) e alterações metabólicas, alterando os níveis de glicose, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I), cálcio e fósforo (WALDRON et al., 2003).

Além disso, já foi evidenciado que o LPS pode atuar no hipotálamo ou na hipófise, inibindo a liberação dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), importantes mediadores da dinâmica folicular. No oviduto, é capaz de modular a expressão gênica promovendo o aumento da expressão de mediadores inflamatórios, como a Interleucina 1 beta ($IL-1 \beta$) e Fator de Necrose Tumoral alfa

34 (*TNF α*) (IBRAHIM et al., 2015; MENCHETTI et al., 2018), bem como provocar a
35 redução da expressão de genes associados com a capacitação espermática, com a
36 qualidade do ambiente para desenvolvimento embrionário como a Glicoproteína
37 Específica do Oviduto (*OVGP1*) e Fator de Crescimento Semelhante a Insulina tipo 2
38 (*IGF2*), assim como também está associado com o aumento de genes que
39 desencadeiam apoptose e estresse oxidativo como a Caspase 3 (*CASP3*) e
40 Superóxido Dismutase (*SOD*) (IBRAHIM et al., 2015). No útero, o LPS aumenta a
41 expressão dos mediadores inflamatórios *TNF α* , interleucina-6 (*IL-6*), interleucina-8
42 (*IL-8*) e interleucina-1 β (*IL-1 β*) (HERATH et al., 2006; CRONIN et al., 2012) assim
43 como altera a expressão de genes relacionados ao processo de implantação
44 embrionária como a Metaloproteínase da Matriz-19 (*MMP19*), Indutor de
45 Metaloproteínases de Matriz Extracelular (*EMMPRIN*) e L-Selectina (*SELL*). No
46 ovário, a presença do LPS e os produtos gerados a partir do processo inflamatório
47 alteram o crescimento e a qualidade de folículos nas suas diversas fases de
48 desenvolvimento e também atuam sobre o corpo lúteo (HERATH et al., 2007;
49 LÜTTGENAU et al., 2016). Além dos efeitos relatados em folículos antrais e no
50 corpo lúteo, trabalhos realizados principalmente em camundongos demonstram que
51 o LPS é capaz de afetar a reserva folicular, devido a maior ocorrência de atresia e
52 também a maior ativação de folículos primordiais (WU et al., 2011, SOMINSKY et al.,
53 2012, BROMFIELD; SHELDON, 2013), podendo esgotar a reserva ovariana de
54 forma precoce e com isso prejudicar a vida reprodutiva a longo prazo.

55 Já está bem estabelecido que quadros infecciosos próximo ao momento da
56 inseminação causam prejuízos reprodutivos (SANTOS et al., 2004; AHMADZADEH
57 et al., 2009), no entanto, mesmo após a resolução clínica desses quadros os animais
58 apresentam um menor desempenho reprodutivo. Com isso, a hipótese desse estudo
59 é que novilhas de corte expostas ao LPS apresentarão uma resposta inflamatória,
60 com conseqüente alterações em seu metabolismo, modificações na expressão de
61 genes do útero, ovário e oviduto, além de modificar a taxa de ativação e de atresia
62 de folículos primordiais.

63

64

65 **2 Revisão de literatura**

66

67 **2.1 Sistema reprodutivo de bovinos**

68 O trato reprodutivo das fêmeas bovinas é composto por: ovários, ovidutos,
69 útero, cérvix, vagina, vestíbulo da vagina e vulva (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

70 A vagina, possui uma superfície epitelial, uma camada muscular e uma
71 camada serosa, sendo o órgão copulatório das fêmeas bovinas. O lúmen da vagina
72 diminui na porção cranial pela projeção do colo uterino, formando o fórnice vaginal
73 (HAFEZ; HAFEZ, 2004; KÖNIG; LIEBICH, 2011). A cérvix é uma estrutura fibrosa
74 que possui uma espessa parede, possui formato transverso sendo dividida
75 geralmente, por quatro pregas, denominados anéis (KÖNIG; LIEBICH, 2011). Essa
76 estrutura funciona como uma barreira entre a vagina e o útero, sendo que seu lúmen
77 abre-se somente no estro ou no parto.

78 O útero é sustentado pelo mesométrio e irrigado pela artéria uterina média.
79 Este órgão é constituído por três camadas, o endométrio que é a camada mais
80 interna mucosa, seguida de uma camada muscular chamada miométrio e a camada
81 externa serosa, perimétrio. A superfície interna do endométrio dos ruminantes
82 apresenta projeções não glandulares chamadas carúnculas, que tem por função
83 fixar a placenta durante a gestação e as quais possuem um tecido conectivo rico em
84 vasos sanguíneos. O endométrio é a primeira barreira de defesa contra patógenos e
85 deve, portanto, ter capacidade de reconhecer patógenos (BEUTLER, 2004). A
86 capacidade do endométrio de realizar esta função depende dos receptores imunes
87 inatos, os Toll Like Receptores (TLRs) que reconhecem os Padrões moleculares
88 associados a patógenos (PAMPS) presentes nos microorganismos (HERATH et al.,
89 2006).

90 O miométrio possui dois estratos musculares lisos, um circular interno mais
91 espesso e outro longitudinal externo mais fino. Essa camada muscular auxilia no
92 transporte de espermatozoides para o oviduto após inseminação e no nascimento do
93 bezerro no momento do parto. O tamanho do útero varia conforme a idade da fêmea,
94 a fase do ciclo estral e a quantidade de partos. No entanto estima-se, que um útero
95 não gravídico, tem aproximadamente 20 a 40 cm de comprimento nos cornos e 1,2 a

96 4 cm de diâmetro (ARTHUR; SANTOS, 1979; BALL; PETERS, 2006; KÖNIG;
97 LIEBICH, 2011). A sua espessura e vascularização variam com o ciclo estral e a
98 gestação, sob influência hormonal, sendo que na vaca existem anastomoses entre
99 os sistemas arteriais útero-ováricos, e a artéria uterina contribui ao suprimento
100 ovárico ipsi-lateral.

101 Os ovidutos, são em número de dois, e encontram-se suspensos pela
102 mesosalpinge, eles são os responsáveis pela conexão do ovário ao útero,
103 possuindo a função de transporte dos gametas. O oviduto é dividido em três
104 estruturas funcionais sendo a primeira delas chamada de infundíbulo, no qual se
105 localiza as fímbrias (com forma de franjas), que têm por função captar os oócitos
106 liberados pelo ovário. No segmento médio do oviduto, se encontra a ampola, na qual
107 ocorre o processo de fertilização e onde o zigoto sofre os primeiros estágios de
108 clivagem. Conectado a ampola, está o istmo, estrutura que se liga ao corno uterino e
109 capta os espermatozoides, realizando contrações para levá-los até a ampola. Cada
110 oviduto possui 20 a 30 cm de comprimento e 2 a 3 mm de diâmetro (BALL; PETERS,
111 2006; HAFEZ; HAFEZ, 2004). A mucosa do epitélio tubárico possui células ciliadas,
112 cujos movimentos são afetados hormonalmente, sendo maior a atividade logo após
113 a ovulação. Os cílios batem em direção ao útero e sua atividade, junto com as
114 contrações tubáricas, mantém os óvulos no oviduto em permanente rotação, efeito
115 necessário para a aproximação espermatozóide-óvulo e para impedir a implantação
116 tubárica. O número de cílios, que é maior no infundíbulo, diminui no segmento entre
117 a ampola e o istmo. Nesse último segmento as células chamadas de secretoras são
118 mais abundantes.

119 A superfície do oviduto é revestida com mucosa, e atua como uma barreira
120 física contra o ambiente externo e participa da defesa imune inata e adquirida
121 (YILMAZ et al., 2012). Os TLRs têm papéis importantes na detecção de patógenos e
122 no início de respostas inflamatórias que subsequentemente iniciam respostas
123 imunes adaptativas específicas durante a infecção (O'NEILL, 2006). As fibras
124 musculares lisas longitudinais e circulares presentes na parede do oviduto possuem
125 receptores para os esteróides ováricos e algumas prostaglandinas. A frequência e a
126 amplitude das contrações variam com a fase do ciclo estral, de forma que antes da
127 ovulação são suaves e com a ovulação tornam-se mais vigorosas. As

128 prostaglandinas E1 e E2 causam aumento do tono muscular das fibras longitudinais,
129 enquanto que a prostaglandina F2 α tem efeito relaxante.

130 Os ovários são órgãos pares, que se localizam até o terço ventral da cavidade
131 abdominal, cranialmente ao púbis e são sustentados pelo mesovário, e irrigados
132 pela artéria ovariana. Possuem formato elíptico (forma de amêndoa), tendo como
133 tamanho cerca de 1,5 a 5 cm de comprimento e 1 a 3 cm de diâmetro, sendo esta
134 dimensão variável conforme a fase do ciclo estral, ao qual a fêmea se encontra. Os
135 ovários desempenham tanto função endócrina (devido à esteroidogênese), quanto
136 função exócrina (devido à produção de gametas). Os ovários possuem uma zona
137 medular (estroma), na qual se localiza nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, e uma
138 zona cortical (região parenquimatosa) na qual se desenvolvem os folículos ovarianos
139 (ARTHUR; SANTOS, 1979; MOLINA, 2001; BALL; PETERS, 2006; KÖNIG;
140 LIEBICH, 2011; JUNQUEIRA, 2013).

141 No córtex está localizado o epitélio que recobre o ovário e contém uma
142 camada única de células cubóides ou colunares baixas, chamada incorretamente de
143 epitélio germinativo. Abaixo do epitélio, está a túnica albugínea, tecido conectivo
144 fibroso sendo que o epitélio superficial do ovário penetra na túnica albugínea
145 formando cordões no córtex ovárico. Esses cordões não contribuem à formação dos
146 ovócitos, ideia que originou o nome de epitélio germinativo, embora contribuam com
147 células da granulosa para os folículos em crescimento (GONZALES, 2002). O
148 estroma cortical, sofre alterações durante a vida reprodutiva, sendo capaz de
149 originar células da teca interna e células intersticiais. Neste estroma também estão
150 inseridas células musculares lisas que auxiliam contração do folículo durante a
151 ovulação.

152 A atividade ovariana é caracterizada pela alternância de fases de
153 crescimento, as quais necessitam de contínua angiogênese (FRASER; LUNN,
154 2001). A vascularização ovariana ocorre a partir da região medular, sendo que os
155 folículos primordiais quiescentes e os folículos pré-antrais em crescimento não têm
156 vascularização própria, por isso, são dependentes de vasos sanguíneos presentes
157 no estroma (BRUNO et al., 2009). Nos folículos antrais a teca interna é a
158 responsável pela irrigação folicular (MACCHIARELLI et al., 2006). A formação do
159 antro ovariano requer um aumento da demanda nutritiva e metabólica, assim, há

160 maior necessidade de suprimentos sanguíneos, devido a isso, ocorre
161 neovascularização (ROBINSON et al., 2009; ARAÚJO et al., 2013).

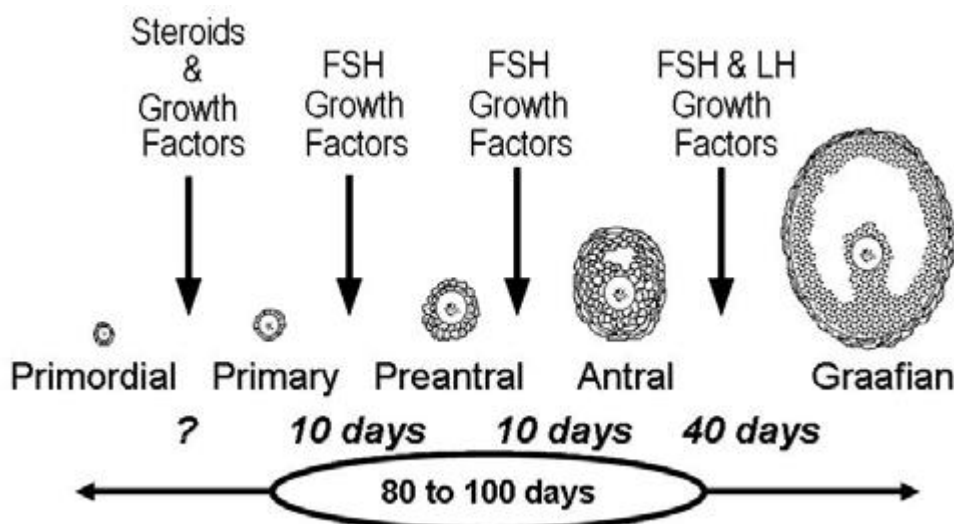
162

163 **2.1.1 Foliculogênese**

164 O ovário de mamíferos contém folículos em vários estádios de
 165 desenvolvimento e sua função inclui o recrutamento cíclico, desenvolvimento e
 166 regressão dos folículos (KIM, 2012). Esse processo de formação, crescimento e
 167 maturação folicular, começando com a formação do folículo primordial e culminando
 168 com o estágio de folículo pré-ovulatório é denominado foliculogênese (VAN DEN
 169 HURK; ZHAO, 2005).

170 A foliculogênese pode ser dividida nas fases pré-antral e antral (Fig. 1), tendo
 171 um período de 100 dias (BRITT, 2008) onde a regulação de cada fase é complexa e
 172 envolve fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, que controlam diversos
 173 processos (MANUEL SILVA; PRICE, 2000; FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004;
 174 WEBB et al., 2004).

175



176

177 Figura 1- Hormônios e fatores de crescimento relacionados com a foliculogênese de
 178 bovinos.

179

Fonte: (BRITT, 2008)

180 As fêmeas bovinas nascem com uma reserva de folículos conhecidos como
 181 primordiais, os quais são considerados o *pool* de reserva dos folículos ovarianos.
 182 Esse *pool* de folículos primordiais é mantido em dormência e serve como reserva
 183 para o recrutamento cíclico de folículos e oócitos (KIM, 2012). A manutenção da
 184 quiescência e sobrevivência dos folículos primordiais é importante como reserva

185 para fornecer oócitos durante toda a vida reprodutiva (KIM, 2012).
186 Morfologicamente, os folículos primordiais possuem uma única camada de células
187 da granulosa com a forma pavimentosa (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005) e durante a
188 vida reprodutiva, apenas um pequeno número desses folículos são estimulados a
189 crescer, sendo a transição de folículo primordial até o diâmetro aproximado de 4 mm
190 coordenado por fatores intrafoliculares e metabólitos sanguíneos e na ausência de
191 gonadotrofinas (GONG et al., 1996).

192 O *pool* de folículos primordiais está sob controle inibitório, portanto, quando
193 esses fatores diminuem ou os fatores estimuladores aumentam, os folículos são
194 ativados (WANDJI; EPPIG; FORTUNE, 1996). Dentre os fatores relatados como
195 estimuladores do desenvolvimento de folículos primordiais temos a fosfatidilinositol-
196 3-quinase (*PI3K*), o fator de crescimento beta (*TGF-β*), o fator de diferenciação do
197 crescimento 9 (*GDF9*) e a proteína morfogenética óssea 15 (*BMP-15*). Dentre os
198 fatores inibidores, temos o *Forkhead box L2 (FOXL2)*, o hormônio antimulheriano
199 (*HAM*), a fosfatase homóloga a tensina (*PTEN*) e a *Forkhead box class O 3a*
200 *Foxo3a*. Algumas citocinas também participam desse processo (DINARELLO, 1994;
201 QIAO; FENG, 2011) promovendo a ativação e também a apoptose dessas células
202 primordiais. Além dos fatores relatados, as citocinas, pequenas proteínas
203 sinalizadoras solúveis que possuem propriedades imunorreguladoras, são cada vez
204 mais reconhecidas como fatores de crescimento que governam a função,
205 proliferação e diferenciação celular (KOHEN et al., 1999). A interleucina IL1β parece
206 exercer um papel regulador no ovário de ratos e bovinos, modulando a proliferação
207 de células da granulosa *in vitro*, estimulando o número de folículos em
208 desenvolvimento PASSOS et al., (2016) e inibindo a esteroidogênese em folículos
209 indiferenciados bovinos.

210 Os folículos ativados, passam da fase de folículo primordial para a fase de
211 folículo primário, esse processo caracteriza-se por alteração da morfologia celular,
212 desenvolvimento do oócito, multiplicação e diferenciação celular (BRISTOL-GOULD
213 et al., 2006). Os folículos primários, caracterizam-se morfologicamente por ter o
214 oócito circundado por uma camada completa de células da granulosa de morfologia
215 cúbica. Com o decorrer do crescimento as células da granulosa se multiplicam
216 formando várias camadas ao redor do oócito, passando a serem chamados de
217 folículos secundários, nessa fase também começam a ser sintetizadas as proteínas

218 que formarão a zona pelúcida (LEE et al., 2000). Posteriormente inicia-se a
219 formação das células da teca externa e os folículos passam a ser sensíveis ao
220 hormônio folículo estimulante (FSH), principal hormônio para o crescimento, que
221 ocorre em ondas sincronizadas (ADAMS et al., 1992; FORTUNE et al., 2001; VAN
222 DEN HURK; ZHAO, 2005) passando para fase antral. Em bovinos, os intervalos
223 interovulatórios apresentam 2 ou 3 ondas foliculares sempre precedidas pelo
224 aumento dos níveis de FSH (SIROIS; FORTUNE, 1988; ADAMS et al., 1992). A
225 partir do diâmetro de 6 e 9 mm ocorre o processo de divergência em *Bos indicus* e
226 *Bos taurus* respectivamente, que é associado com um aumento na concentração
227 folicular de estradiol (GONG et al., 1996; ROCHE, 1996; MIHM et al., 2000;
228 FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004), redução na dependência de FSH (MIHM et al.,
229 2006) e a um aumento na expressão do gene para o receptor de LH nas células da
230 granulosa (BEG et al., 2001). O aumento do nível de estradiol gerado pelo folículo
231 dominante diminui a expressão e a estabilidade do gene que codifica a subunidade
232 beta do FSH (ROCHE, 1996) com isso gerando uma diminuição dos níveis
233 plasmáticos desse hormônio (EVANS; FORTUNE, 1997; AUSTIN et al., 2001) e
234 inibindo a capacidade esteroidogênica dos folículos subordinados, com conseqüente
235 início do processo de atresia via apoptose (GINTHER et al., 1996). Já o folículo
236 dominante, com o aumento do diâmetro folicular passa a adquirir receptores
237 funcionais de hormônio luteinizante (LHr) e conseqüentemente maior capacidade
238 ovulatória (SARTORI et al., 2001) sendo que a expressão do RNA mensageiro
239 (mRNA) do LHr mostrou-se correlacionada com o diâmetro folicular em células da
240 granulosa (SARTORELLI et al., 2005).

241 O último estágio do desenvolvimento do folículo é denominado de pré-
242 ovulatório. Nesta fase o oócito é circundado pelas células do *cumulus*. As células da
243 granulosa param de se multiplicar em resposta ao LH e se inicia o processo de
244 luteinização. Ao atingir 10 mm o folículo dominante adquire capacidade ovulatória,
245 porém é necessária uma dose maior de LH para induzir a ovulação em comparação
246 com folículos maiores (MARTINEZ et al., 1999). A ovulação do complexo *cumulus*-
247 oócito é induzida por um aumento da secreção de LH que culmina então no pico de
248 LH necessário à ovulação (KANITZ, 2003) e requer condições endócrinas
249 favoráveis, tais como baixos níveis de progesterona e aumentos significativos de
250 estradiol circulante.

251 **2.1.2 Atresia folicular**

252 A atresia folicular é o processo de degeneração que os oócitos podem sofrer
253 durante seu desenvolvimento. A apoptose é um processo de morte celular
254 programada governada por reguladores pró e anti-apoptóticos, como Proteína X
255 associada a bcl-2 (BAX), Linfoma de células B 2 (BCL-2), TNF- α e o sistema ligando
256 Fas / Fas (Fas / FasL). Esse processo pode ser mediado por fatores intrínsecos e
257 extrínsecos, como o estresse oxidativo, a irradiação e a ativação de genes
258 promotores de apoptose, os quais promovem dano no DNA e a ocorrência de
259 apoptose (BUTTKE; SANDSTROM, 1994). As citocinas inflamatórias também
260 participam desses eventos, sendo que a maior produção de TNF em células da
261 granulosa pode ser um indutor fisiológico de apoptose e atresia folicular (MANABE
262 et al., 2008), assim como a interleucina 6 (IL6) (KAIPIA; HSUEH, 1997; MATSUDA
263 et al., 2012). Ainda um estudo de URI-BELAPOLSKY et al, (2014) demonstrou que a
264 reserva ovariana melhorou na ausência de expressão de IL-1 α .

265 Morfologicamente, a apoptose é encontrada nos folículos ovarianos na vida
266 fetal e adulta. Durante a vida fetal, a apoptose é localizada nos ovócitos, enquanto
267 na vida adulta é detectada nas células da granulosa dos folículos secundários e
268 antrais (HUSSEIN, 2005) . Segundo estudo de HSUEH *et al.*, (1994) e BLONDIN *et*
269 *al.*, (1996) 85% dos folículos ovarianos são atrésicos.

270 **2.2 Lipopolissacarídeo e sua atuação no sistema imune, metabolismo, e** 271 **sistema reprodutivo de bovinos**

272 O sistema imunológico é o sistema de defesa do animal contra patógenos,
273 sendo responsável por proteger o organismo da ocorrência de enfermidades. Dentre
274 os diversos mecanismos que o sistema utiliza para realizar essa proteção, podemos
275 classificar de forma geral três deles: as barreiras físicas, o sistema imune inato e o
276 sistema imune adquirido (TIZARD, 2009).As barreiras físicas são as defesas mais
277 eficazes do organismo e sua principal forma de atuação é evitando a penetração de
278 microrganismos. Podemos citar como exemplos a pele intacta, mecanismos de
279 “autolimpeza” como a presença de muco, a tosse e o espiro no trato respiratório, o
280 vômito e a diarreia no trato gastrointestinal, e fluxo de urina no trato urinário. No
281 entanto, algumas vezes os microrganismos conseguem romper essas barreiras
282 fazendo com que o sistema imune inato seja ativado (TIZARD, 2009).

283 O sistema imune inato é composto por enzimas capazes de digerir a parede
284 bacteriana, por proteínas que se ligam aos carboidratos revestindo a bactéria e
285 levando a destruição e também por células capazes de reconhecer os patógenos,
286 conhecidas também como sentinelas (TIZARD, 2009). As células sentinelas são os
287 neutrófilos e macrófagos e possuem em sua estrutura os receptores tipo Toll, Toll
288 Like Receptores (TLRs) (MORESCO; LAVINE; BEUTLER, 2011), enquanto os
289 microrganismos, possuem estruturas conservadas que são conhecidas com padrões
290 moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os PAMPs são encontrados em
291 células procariotas, mas não em eucariotas (BEUTLER, 2009; TAKEUCHI; AKIRA,
292 2010). Esse sistema caracteriza-se por não apresentar memória, sendo que em
293 todas as infecções, é montada uma resposta da mesma forma, com intensidade e
294 duração semelhantes, independente da frequência da infecção por patógenos
295 (TIZARD, 2009).

296 Os TLRs mais importantes para o reconhecimento de bactérias são o TLR1,
297 TLR2 e TLR6, que se ligam a lipopeptídeos de bactérias gram-positivas e o TLR4,
298 que se liga ao LPS de bactérias gram-negativas (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). A
299 ligação dos PAMPs ou LPS aos TLRs estimula a produção de mediadores
300 inflamatórios, como as citocinas que recrutam neutrófilos e monócitos para local da
301 infecção (BEUTLER, 2009; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Os mediadores inflamatórios
302 tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , e prostaglandina E2, direcionam a resposta
303 inflamatória atraindo e ativando células imunes, particularmente neutrófilos e
304 macrófagos para remover micróbios e células mortas. Posteriormente, mediadores
305 inflamatórios como a interleucina-10 (IL-10) promovem o reparo do tecido e
306 coordenam a resolução da inflamação (WANNEMACHER et al., 1980; DINARELLO,
307 1994). A maioria destes mediadores inflamatórios são fatores solúveis os quais são
308 produzidos por uma célula e tem atuação em outra, sendo que alguns autores
309 consideram esses mediadores como "hormônios" das respostas imunes e
310 inflamatórias (DINARELLO, 2007). De forma mais tardia ocorre a ativação do sistema
311 imune adquirido, o qual caracteriza-se pela presença de memória. Diferente do
312 sistema imune inato que responde de forma imediata, este sistema leva alguns dias
313 para que sua atuação seja efetiva, porém a partir da sua ativação ocorre a formação
314 de memória, tornando a resposta cada vez mais eficiente a medida que entra em
315 contato novamente com o patógeno (TIZARD, 2009).

316 Eventos como o parto em vacas leiteiras ou o confinamento de animais de
317 corte, desencadeiam alterações no sistema imune, predispondo os animais a maior
318 ocorrência de enfermidades, como a metrite, endometrite, mastite e pneumonia.
319 Próximo ao parto alterações nos níveis hormonais, minerais e no consumo de
320 alimentos predispõem os animais a um quadro de imunocpetência (BURTON et al.,
321 1995)(WEBER et al., 2001). (LEBLANC, 2010), (HAMMON et al., 2006) (HUZZEY et
322 al., 2007) (KIMURA; GOFF; KEHRLI, 1999). Em vacas de corte o confinamento
323 apresenta-se como um desafio aos animais devido a aglomeração, disputa por
324 alimento, dominância, fatores climáticos e maior pressão infectiva, levando a
325 liberação de níveis elevados de cortisol (Randall, 2011; Ralph et al, 2015). (Burton et
326 al., 2005; Buckham et al, 2008) (Kanitz et al., 2009, Burton et al., 2005, Gupta et al.,
327 2016). Além disso a busca do maior desempenho dos animais através da oferta de
328 dietas com uma alta porcentagem de concentrado para vacas leiteiras e de corte,
329 predispõem a um quadro de acidose, com morte de bactérias gram-negativas e
330 proliferação de bactérias gram-positivas.

331 Tanto as doenças infecciosas citadas acima quanto os casos de acidose,
332 possuem em sua etiologia o envolvimento de bactérias gram-negativas. Essas
333 bactérias apresentam em sua parede celular o LPS que é liberado após a lise ou a
334 multiplicação das mesmas (PIA; ANDERSEN; ANDERSEN, 2003). O LPS possui
335 uma porção hidrofílica, chamada de polissacarídeo O, e uma porção hidrofóbica, o
336 lipídeo A, sendo esta última porção a responsável pela toxicidade da molécula e o
337 desencadeamento da resposta inflamatória (QUINN, P.J.; MARKEY, B.K; CARTER,
338 M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, 2005).

339 Ao ser liberada da membrana das bactérias, essa molécula tem capacidade
340 de migrar do seu local de origem para a corrente circulatória onde será distribuída
341 para os tecidos periféricos do organismo. Conforme comprovado no estudo de
342 MAGATA et al., (2015), quando foram comparados os níveis de LPS em tecidos
343 distintos (fluido uterino, soro e fluido folicular) de bovinos com metrite clínica, foi
344 encontrado 6,34 unidades de endotoxina (UE) de LPS no fluido uterino, 0,94 UE no
345 soro, e 0,62 até 0,97 UE/ mL nos folículos ovarianos antrais. Ao ser absorvido e
346 migrar para a corrente circulatória, essas endotoxinas são reconhecidas pelos
347 receptores TLRs das células de defesa, principalmente o TLR4, que em conjunto
348 com as proteínas MD-2 (fator de diferenciação mieloide 2), proteína ligante de LPS

349 (LBP) e Grupamento de diferenciação 14 (CD14), são responsáveis pela sinalização
350 e produção de citocinas e quimosinas que conseqüentemente vão ativar e recrutar
351 células imunes como os macrófagos, estimulando a resposta inflamatória (TIZARD,
352 2014).

353 Alguns estudos tem demonstrado as diversas alterações desencadeadas por
354 essa endotoxina no organismo, onde a infusão de LPS via endovenosa promove:
355 elevação da temperatura corporal logo após o início da infusão podendo permanecer
356 elevada até 12 horas após (JACOBSEN et al., 2005; OH et al., 2017), aumento da
357 frequência cardíaca 1,5 até 4 horas após o desafio (WALDRON et al., 2003),
358 aumento dos níveis de cortisol a partir da aplicação permanecendo elevado até 72
359 horas pós indução (OHTSUKA et al., 1997; FILIPOV et al., 1999; SOLIMAN et al.,
360 2002; ROBINSON et al., 2009;), elevação de haptoglobina de 1 até 4 horas após
361 indução e de interleucina-1 a partir de 2 até 4 horas após indução (OHTSUKA et al.,
362 1997), aumento dos níveis de hormônio do crescimento de 1 até 2 horas (FILIPOV et
363 al., 1999), aumento de glucagon de 2 até 8 horas (WALDRON et al., 2003), redução
364 da IMS em até cerca de 10 horas após a infusão, redução da produção de leite em
365 vacas leiteiras (WALDRON et al., 2003; OH et al., 2017) redução do IGF-I em 24
366 horas (FILIPOV et al., 1999), redução dos níveis de glicose logo após a indução
367 podendo chegar até 24 horas (FILIPOV et al., 1999; WALDRON et al., 2003), e a
368 redução dos níveis de cálcio e fósforo a partir das 2 até 8 horas após o desafio
369 (WALDRON et al., 2003).

370 Além disso, o LPS tem capacidade de migrar para o ovário, útero e para o
371 oviduto causando prejuízos a reprodução. No ovário, essa endotoxina causa danos
372 para as estruturas foliculares e luteiais. No estudo realizado por (HERATH et al.,
373 2007), o cultivo *in vitro* de células da granulosa com LPS, ocasionou redução na
374 produção de estradiol e progesterona em folículos médios e grandes, 48 horas após
375 o cultivo. Além disso, (MAGATA et al., 2014) ao cultivar células da teca e da
376 granulosa *in vitro*, observou que folículos grandes que apresentavam altos níveis de
377 LPS (>0.5 EU/mL) tiveram uma menor expressão de LHr, receptor de hormônio
378 folículo estimulante (*FSHr*), e *P450 aromatase*, além de um incremento na
379 expressão de *caspase-3*, quando comparado a animais com baixos níveis de LPS
380 (<0.5 EU/mL). Trabalhos *in vivo*, desafiando vacas antes da ovulação com LPS
381 observaram um aumento do intervalo estro/ovulação (LAVON et al., 2008; GINDRI et

382 al., 2019) com redução nos níveis de LH (LAVON et al., 2008), além de um menor
383 crescimento folicular (LAVON et al., 2008; GINDRI et al., 2019) e a redução nos
384 níveis de Paraoxonase 1 (PON1) intrafolicular (CAMPOS et al., 2017). Já o cultivo
385 de oócitos *in vitro* provenientes de animais expostos ao LPS, apresentaram uma
386 menor taxa de blastocistos (RINCÓN et al., 2019). Da mesma forma, oócitos
387 maturados *in vitro* com fluido folicular ou plasma de vacas desafiadas com LPS *in*
388 *vivo*, tiveram uma menor taxa de blastocisto (ROTH et al., 2020). Em relação à
389 atuação do LPS sobre o corpo lúteo, LÜTTGENAU et al., (2016) ao desafiar vacas
390 10 dias após a ovulação observou uma maior expressão de IL-1 α , IL-1 β , TNF- α ,
391 sendo relatados também casos de luteólise precoce. Os efeitos sobre o sistema
392 reprodutivo são decorrentes da ação do LPS, mas também das citocinas
393 inflamatórias (WILLIAMS et al., 2008, BROMFIELD; SHELDON, 2013) .

394 Grande parte dos estudos realizados até então focaram entender o efeito a
395 curto prazo do LPS, porém sabe-se que mesmo após a resolução clínica das
396 enfermidades mencionadas nos tópicos acima, os animais ainda apresentam um
397 déficit reprodutivo em relação a animais saudáveis, elevando com isso os dias em
398 aberto, o número de inseminações por concepção e reduzindo a eficiência dos
399 sistemas produtivos. Nesse sentido estudos principalmente em camundongos (WU
400 et al., 2011; SOMINSKY et al., 2012) vêm demonstrando que o LPS atua
401 negativamente sobre a reserva folicular. No estudo de BROMFIELD; SHELDON,
402 (2013), o desafio com LPS em camundongos *in vivo*, promoveu o aumento em 3,3
403 vezes da ocorrência de atresia de folículos primordiais, e além disso, reduziu em 1,2
404 vezes o pool de folículos totais. Ainda nesse estudo, observaram uma maior
405 ativação da proteína PTEN, indicando uma aceleração da passagem de folículos da
406 fase primordial para primária, podendo levar a uma redução na população folicular
407 (BROMFIELD; SHELDON, 2013), indicando com isso que os efeitos do LPS podem
408 ocasionar malefícios a logo prazo no sistema reprodutivo de bovinos. Além disso,
409 estudos *in vitro* mostram que em coelhos, o LPS pode induzir uma resposta imune
410 no oviduto, através do aumento da expressão de mediadores inflamatórios, como IL-
411 1 β e TNF α (MENCHETTI et al., 2018), e em bovinos ocasiona a redução da
412 expressão de genes associados com a capacitação espermática, com a qualidade
413 do ambiente para desenvolvimento embrionário (*OVGP1* e *IGF2*), e também com o
414 aumento de genes que desencadeiam apoptose e estresse oxidativo (*CASP3* e
415 *SOD*) (IBRAHIM et al., 2015). No útero o LPS pode também aumentar a expressão

416 dos mediadores inflamatórios $TNF\alpha$, $IL-6$, $IL-8$ e $IL-1\beta$, e tem sido relacionado com a
417 alteração da expressão de genes relacionados a implantação embrionária em vacas
418 ($MMP19$, $EMMPRIN$ e $SELL$) e em camundongos ($NANOG$, $OCT4$ e $SOX2$)
419 (CAMPOS et al., 2017; XIAO et al., 2017) (XIAO et al., 2017).

420 Contudo, os mecanismos pelos quais as endotoxemias diminuem a fertilidade
421 em bovinos ainda não estão totalmente elucidados, existindo poucos estudos e
422 sendo na grande maioria em animais modelo ou *in vitro* com células bovinas,
423 demonstrando a necessidade de mais estudos em bovinos *in vivo*.

424

425
426
427
428

429 **3 Hipótese, objetivo geral e objetivos específicos**

430
431 **3.1 Hipótese**

432 Animais expostos ao LPS desencadeiam uma resposta inflamatória, com
433 consequente alterações em seu metabolismo, modulação na expressão de genes do
434 útero, ovário e oviduto, além de modificarem a taxa de ativação e de atresia de
435 folículos primordiais.

436 **3.2 Objetivo geral**

437 Avaliar os efeitos da exposição ao LPS, sobre o metabolismo, alterações de
438 expressão gênica no útero, ovário e oviduto, e na taxa de ativação e de atresia de
439 folículos primordiais.

440

441 **3.3 Objetivos específicos**

442 Avaliar se animais expostos ao LPS apresentam:

- 443 • alteração nos parâmetros hematológicos, inflamatórios, energéticos, minerais
444 e hepáticos.
- 445 • alteração na expressão de genes relacionados a inflamação, ao
446 reconhecimento do LPS, ao estresse térmico e estresse oxidativo, a
447 qualidade do ambiente do oviduto e do útero
- 448 • alteração na expressão de genes relacionados a reserva ovariana, a ativação
449 folicular e antiapoptótico no ovário
- 450 • maior taxa de ativação e atresia de folículos primordiais.

451

452
453
454
455

456 **Capítulo I**

457

458 **Efeito do Lipopolissacarídeo (LPS) sob parâmetros inflamatórios,** 459 **hematológicos e bioquímicos de bovinos de corte confinados**

460 Andressa Stein Maffi¹, Joao Alveiro Alvarado Rincón¹, Antônio Amaral Barbosa¹,
461 Jenifer Vahl¹, Jéssica Lazzari¹, Rutiele Silveira¹, Wagner Machado dos Santos¹,
462 Marcio Nunes Corrêa¹, Eduardo Schimitt¹, Cassio Cassal Brauner¹

463 ¹Núcleo de Pesquisa Ensino e Extensão em Pecuária, Universidade Federal de Pelotas- Campus
464 Capão do Leão

465

466 **Resumo**

467 O objetivo do estudo foi avaliar os parâmetros hematológicos bem como alguns
468 marcadores inflamatórios e bioquímicos de novilhas de corte submetidas a duas
469 exposições agudas ao LPS em um intervalo de 24 horas. Foram acompanhadas 16
470 novilhas de corte, europeias, distribuídas uniformemente em dois grupos, a partir do
471 peso corporal: O grupo LPS (n=8) recebeu 2 aplicações contendo 0,5 µg/kg de peso
472 corporal de LPS (Sigma Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA) diluídas em 2 mL de
473 solução salina (0,9% de NaCl) via intravenosa (i.v), com intervalo de 24 horas e o
474 grupo controle (n=8) que recebeu 2 aplicações contendo 2 mL de solução salina
475 (0,9% de NaCl) via i.v, com o mesmo intervalo. Dados de temperatura foram
476 mensurados a partir de termômetros intravaginais até 24 horas após o primeiro
477 desafio. Foram realizadas coletas de sangue anterior ao desafio (0) e 4, 8, 24, 28, 32
478 e 48 horas após o primeiro desafio, para avaliação hematológica e mensuração de
479 proteína plasmática total, uréia, albumina, colesterol, lipoproteína de alta densidade,
480 lactato, glicose, aspartato aminotransferase, gama glutamil transferase, fósforo,
481 fosfatase alcalina e paraoxonase 1. Os animais desafiados apresentaram aumento
482 de temperatura acima dos valores fisiológicos (38,5-39,5°C) da 1ª às 4,5 horas, com
483 pico na hora 1, no primeiro desafio. Em relação ao segundo desafio, foi observado
484 uma elevação aguda na temperatura nas 2 horas após o segundo desafio com
485 retorno às 3 horas. A série vermelha e plaquetas não foram alteradas pelo desafio,
486 no entanto ocorreu uma leucopenia por neutropenia no grupo LPS. Em relação aos
487 parâmetros bioquímicos ocorreu uma redução nos níveis de colesterol 8 horas após
488 o primeiro desafio no grupo. Os níveis de parâmetros energéticos, inflamatórios, de
489 minerais e enzimas hepáticas não sofreram efeito do desafio. Com isso concluímos
490 que a exposição de animais ao LPS com intervalo de 24 horas, desencadeia uma

491 resposta sistêmica com alteração na temperatura corporal, e no leucograma, com
492 um efeito a curto prazo no metabolismo lipídico, no entanto sem alterações no
493 metabolismo proteico, mineral e hepático.

494 Palavras chave: confinamento, endotoxinas, inflamação, produção

495

496 **Introdução**

497 A adoção de sistemas baseados no confinamento de animais vem se
498 tornando uma alternativa para o alcance de maior produção e eficiência do sistema
499 pecuário. No entanto, o aumento na produção de carne e leite em tais sistemas
500 intensivos é baseado em dietas contendo grandes quantidades de concentrado,
501 aumentando com isso, o risco da ocorrência de transtornos ocasionados pela
502 nutrição, como a acidose (RODRÍGUEZ-LECOMPTE et al., 2014; ZHAO et al.,
503 2018). A elevação no teor de carboidratos na alimentação desencadeia a queda no
504 pH ruminal, morte de bactérias gram-negativas e rumenite (GOZHO; KRAUSE;
505 PLAIZIER, 2007), com consequente aumento de lipopolissacarídeos (LPS) no trato
506 gastrointestinal, provindos da morte dessas bactérias (PIA; ANDERSEN;
507 ANDERSEN, 2003; PLAIZIER et al., 2012).

508 O LPS intestinal parece ser a fonte mais natural e a de maior frequência de
509 absorção dessa endotoxina para a corrente sanguínea (MUNFORD, 2016). Essa
510 absorção ocorre devido ao comprometimento das junções celulares e também
511 auxiliado por transportadores de mucosa, através de transcitose mediado por
512 transportadores de lipídios (ECKEL; AMETAJ, 2016). Além disso o LPS pode ser
513 absorvido via parede ruminal, quando esta é lesada (Gómez et al., 2014; (YÁÑEZ-
514 RUIZ; ABECIA; NEWBOLD, 2015) como nos casos de acidose. Além da exposição
515 ao LPS pelos quadros de acidose, doenças infecciosas como mastite, metrite e
516 endometrite em bovinos leiteiros e pneumonias em bovinos de corte (OWENS et al.,
517 1998; SANTOS et al., 2004; HUZZEY et al., 2007; SHELDON; OWENS, 2017),
518 também promovem a exposição a essa endotoxina, visto que na etiologia dessas
519 enfermidades, destaca-se a presença de bactérias gram- negativas.

520 Independente da origem, uma vez presente na corrente circulatória, os LPS
521 são drenados para o sangue portal a fim de serem depurados no fígado. No entanto,
522 quando os níveis de LPS no sangue portal ultrapassam a capacidade do fígado

523 realizar a detoxicação, essa endotoxina pode ser encontrada no sangue periférico.
524 Na corrente circulatória, células imunes tais como leucócitos, reconhecem a
525 molécula de LPS através do receptor Toll Like Receptor 4 (TLR4) e iniciam a
526 resposta inflamatória, produzindo citocinas inflamatórias como a Interleucina 6 (IL6),
527 Interleucina 8 (IL8) e o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF α) (WALDRON et al.,
528 2003; LECCHI et al., 2009; HOEBEN et al., 2000). E essas citocinas, de forma
529 distinta promovem a produção de proteínas de fase aguda (RICHARDS; GAULDIE;
530 BAUMANN, 1991) desencadeando a febre e alterando os processos metabólicos
531 como a hiperglicemia e/ou hipoglicemia (WALDRON et al., 2003; KVIDERA et al.,
532 2017a; HORST et al., 2019), resistência periférica a insulina (BRADFORD et al.,
533 2009; HORST et al., 2019), elevação nos níveis de glucagon (WALDRON et al.,
534 2003), catabolismo do músculo esquelético e adiposo (WANNEMACHER et al.,
535 1980; LOHUIS et al., 1988; BRADFORD et al., 2009; HORST et al., 2019) e
536 hipertrigliceridemia (WANNEMACHER et al., 1980; MCGUINNESS, 2005).

537 Além disso, durante a resposta imunológica as células de defesa alteram sua
538 forma de produção de energia, produzindo Adenosina trifosfato (ATP) através da
539 glicólise aeróbica e não através da fosforilação oxidativa, um processo conhecido
540 como “efeito Warburg” (PALSSON-MCDERMOTT, 2013), ocasionando um
541 incremento da necessidade de glicose. Com isso, toda vez que a resposta imune é
542 ativada, seja na circulação ou nos órgãos e tecidos, os nutrientes e a energia são
543 redirecionados para o sistema imunológico (ZEBELI et al., 2011; JOHNSON et al.,
544 2012; KVIDERA et al., 2017b), reduzindo a disponibilidade de energia para a
545 produção de carne e leite e conseqüentemente o desempenho animal.

546 Grande parte dos estudos realizados até então, utilizam camundongos como
547 modelo experimental, contudo acreditamos que as alterações desencadeadas
548 ocorrem de forma distintas em ruminantes. Portanto, o objetivo de nosso estudo foi
549 avaliar o comportamento hematológico, bioquímico e inflamatório de novilhas de
550 corte submetidas a duas exposições agudas ao LPS em um intervalo de 24 horas.

551 **Materiais e Métodos**

552 O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética e Experimentação animal da
553 Universidade Federal de Pelotas, sob o número 9364. O experimento foi realizado
554 em uma fazenda comercial, no município de São Lourenço do Sul, RS. Foram

555 acompanhadas 16 novilhas de corte, de origem européia, saudáveis, com idade
 556 média de 14 meses, manejadas em um sistema de confinamento. Os animais foram
 557 selecionados 14 dias antes do início do período experimental, para formação dos
 558 grupos e adaptação dos mesmos a dieta e ao manejo. A alimentação consistiu em
 559 uma dieta *total mixed* a base de silagem de milho, milho moído e suplemento
 560 mineral em uma proporção de 60% de volumoso e 40% de concentrado, sendo
 561 ofertada duas vezes ao dia (7:00hs e 17:00hs) e água à vontade. Na tabela 1,
 562 encontra-se descrita a composição química da dieta.

563 **Tabela 1.** Composição química da dieta de novilhas de corte, submetidas ou não ao desafio com
 564 LPS.

Composição química	Matéria Seca (%)
FDA ¹	25,74
FDN ²	44,70
Lignina	4,40
Proteína Bruta	10,26
Proteína degradável	9,57
Extrato etéreo	5,35
Cinzas	3,82
Cálcio	0,22
Fósforo	0,27

565 ¹Fibra em detergente ácido

566 ²Fibra em detergente Neutro

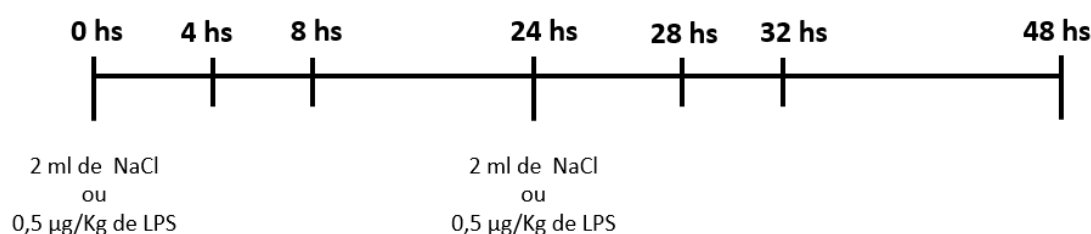
567

568 Os animais foram distribuídos uniformemente em dois grupos, a partir do peso
 569 corporal: o grupo LPS (n=8) recebeu 2 aplicações contendo 0,5 µg/kg de peso
 570 corporal de LPS (Sigma Aldrich®, Saint Louis, Missouri, EUA) diluídas em 2 mL de
 571 solução salina (0,9% de NaCl) via intravenosa (i.v), com intervalo de 24 horas; o
 572 grupo controle (n=8) recebeu 2 aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl)
 573 via i.v, com o mesmo intervalo. A escolha da utilização de 0,5 ug/Kg de peso vivo
 574 baseou-se em um estudo piloto e na metodologia utilizada por Waldron et al 2003, o

575 qual demonstrou que essa concentração foi capaz de desencadear uma resposta
576 inflamatória nos animais expostos.

577 *Coleta de sangue, análises bioquímicas e hematológicas*

578 A coleta de sangue foi realizada através do complexo arteriovenoso da
579 coccígea em um tubo contendo fluoreto de sódio para avaliação dos níveis de
580 glicose, tubo sem anticoagulante para avaliação de marcadores energéticos,
581 inflamatórios, minerais e enzimáticos e em tubos contendo ácido etilenodiamino
582 tetra-acético (EDTA) para realização do hemograma completo. As coletas foram
583 realizadas nas seguintes horas: 0 (anterior ao desafio), 4, 8, 24, 28, 32 e 48 em
584 relação ao primeiro desafio, conforme a figura 1.



585

586 **Figura 1.** Delineamento experimental demonstrando os momentos em que foram realizados os
587 desafios com LPS e as coletas de sangue em novilhas de corte.

588 Os níveis de proteína plasmática total, uréia, albumina, colesterol, lipoproteína
589 de alta densidade (HDL), lactato, glicose, aspartato transaminase (AST), gama
590 glutamil transpeptidase (GGT), fósforo e fosfatase alcalina, foram analisados através
591 de kits comerciais (Labtest Diagnóstica®, Minas Gerais, Brazil) com auxílio do
592 equipamento Labmax Plenno (Labtest Diagnóstica®). Para determinação da
593 atividade de Paraoxonase 1 (PON1) foi utilizado um protocolo previamente descrito
594 por Campos et al 2017. O hemograma foi realizado através do equipamento
595 automático BC2800 VET (Mindray, Schenzhen, China), sendo realizado
596 posteriormente o diferencial leucocitário através de esfregaço sanguíneo corado com
597 corante de panótipo rápido, e realizado a leitura em microscopia óptica (THRALL,
598 2007). O teor plasmático de fibrinogênio foi obtido pelo método de precipitação pelo
599 calor e leitura em refratômetro (MILLAR et al., 1971).

600 *Avaliação da temperatura corporal*

601 O acompanhamento da temperatura corporal foi realizado através de
602 termômetros digitais, data logger (Ibutton®, Thermochron, Whitewater, USA),
603 implantados via intravaginal, desde a hora 0 até 12 horas após o segundo desafio
604 com LPS. A mensuração da temperatura foi realizada com intervalos de 30 minutos.
605 No dia 1 são apresentadas as temperaturas até 8 horas após o desafio e no dia 2,
606 até 12 horas, momentos esses onde ocorreu a estabilização da temperatura.

607 *Análise estatística*

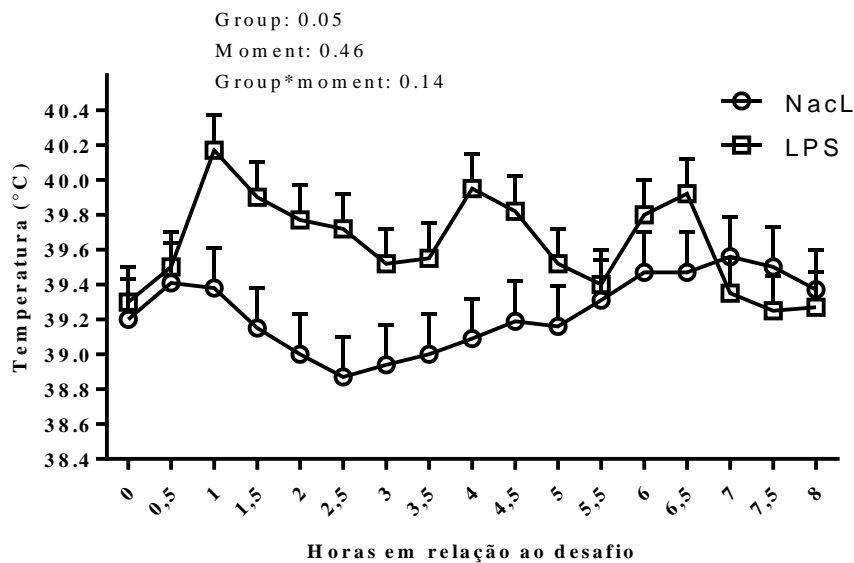
608 Todos os dados foram analisados através de ANOVA de medidas repetidas,
609 em um desenho randomizado, considerando o efeito do grupo (Controle e LPS) do
610 período (0, 4, 8, 24, 28 e 32 e 48 horas) e o efeito aleatório (do animal). Tais
611 análises foram realizadas no programa NCSS 2005 (NCSS. Number Cruncher
612 Statistical Systems. Kaysville, Utah) utilizando o seguinte modelo:

$$613 Y_{ijkl} = \mu + M_j + T_k + MT_{jk} + cl(b_i) + e_{ijkl},$$

614 Onde: Y_{ijkl} é a variável continua dependente, μ é a média total, M_j é o efeito
615 fixo do grupo ($j = \text{LPS vs. Controle}$), T_k é o efeito fixo do tempo ($k = 4, 8, 24, 28, 32, 48$),
616 MT_{jk} é a interação entre grupo e tempo, $cl(b_i)$ é o efeito aleatório da vaca, e e_{ijkl} é o
617 efeito residual do erro. Os dados de neutrófilos, basófilos, monócitos não
618 apresentaram distribuição normal e foram transformados para LOG10. Foram
619 considerados significativos valores de $P \leq 0,05$.

620 **Resultados**

621 O desafio com LPS foi capaz de induzir a elevação de temperatura nos
622 animais expostos ao LPS (Figura 2 e 3). No primeiro desafio, os animais do grupo
623 LPS apresentaram temperatura mais elevada que o grupo controle ($P=0,05$). O
624 grupo desafiado apresentou aumento de temperatura acima dos valores fisiológicos
625 ($38,5-39,5^\circ\text{C}$) da 1ª às 4,5 horas com pico na hora 1, no entanto não ocorrendo
626 diferença entre os momentos avaliados.

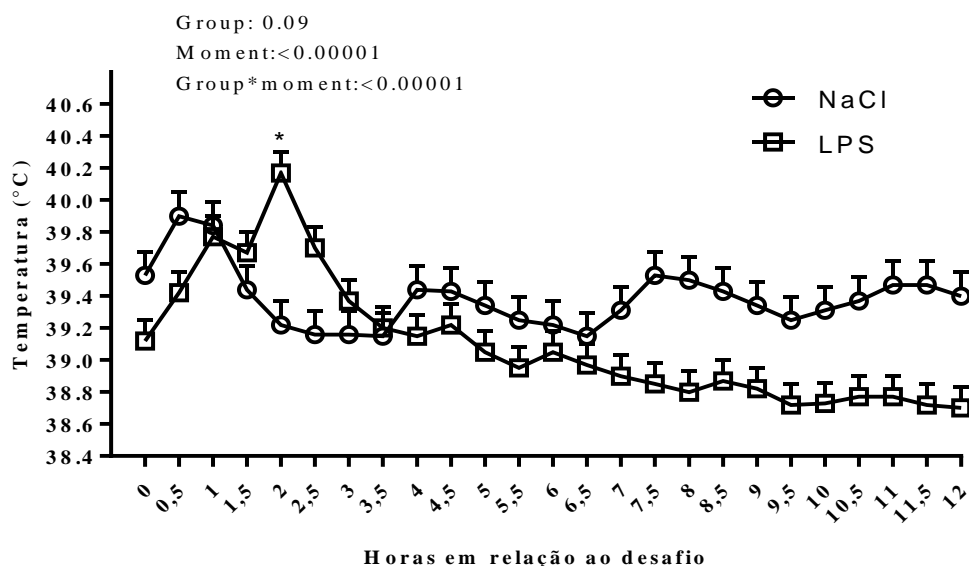


627

628 **Figura 2.** Temperatura corporal de novilhas de corte após o primeiro desafio com lipopolissacarídeos
629 (LPS) (0,5 µg de LPS/ kg de peso corporal) ou solução salina (Controle).

630 No segundo desafio com LPS (figura 3) foi observada uma elevação aguda
631 na temperatura duas horas após o desafio, com retorno 60 minutos após (P<0,05).

632



633

634 **Figura 3.** Temperatura corporal de novilhas de corte após o segundo desafio com lipopolissacarídeos
635 (LPS) (0,5 µg de LPS/ kg de peso corporal) ou solução salina (Controle).

636 Em relação aos parâmetros hematológicos, não houve diferença nas células
637 vermelhas e plaquetas (P>0,05), no entanto referente ao leucograma os animais do

638 grupo LPS apresentaram menores concentrações de leucócitos totais
639 (12.396,35±1.537,77 / μ L) comparado aos animais do grupo controle
640 (16.930,91±1.472,30 / μ L) (P=0,05) não havendo interação momento grupo (p= 0,17).
641 Da mesma forma os níveis de neutrófilos foram menores no grupo LPS
642 (4.774,16±853,76 / μ L) comparado ao grupo controle (7.427,64±804,93 / μ L) (P=0,04),
643 não havendo interação momento grupo (P=0,28). Os demais tipos celulares não
644 apresentaram diferença (P>0,05, Tabela 2).

645 **Tabela 2.** Hemograma completo de novilhas de corte desafiadas com lipopolissacarídeos (LPS) (0,5 µg de LPS/ kg de peso corporal) ou solução salina (Controle) às 0 e 24
646 horas.

Parâmetro		Hora 0	Hora 4	Hora 8	Hora 24	Hora 28	Hora 32
Hematócrito (%)	LPS	39,47±1,73	35,35±1,73	34,70±1,87	35,15±1,73	34,93±1,53	33,90±1,73
	CONT	42,45±1,87	37,42±2,29	38,27±1,73	36,07±1,73	35,65±1,62	34,95±1,87
Hemoglobina (g/dL)	LPS	12,72±0,93	11,61±0,93	11,40±0,93	12,47±0,93	12,45±0,93	12,12±0,93
	CONT	13,70±0,98	12,15±0,98	12,55±0,98	13,12±0,98	12,68±0,98	12,80±0,98
Fibrinogênio (mg/dL)	LPS	742,85±181,57	788,88±160,13	725,00±169,84	711,11±160,13	725,00±169,84	933,33±160,13
	CONT	542,85±181,57	828,57±181,57	750,00±192,12	814,28±181,57	1066,66±196,14	742,85±181,57
Plaquetas (/µL)	LPS	252,85±60,20	300,00±60,20	254,00±65,03	299,87±56,31	174,66±53,09	193,88±53,09
	CONT	217,05±65,03	354,00±79,64	303,42±79,64	403,57±60,20	200,12±56,31	172,16±65,03
Leucócitos totais (/µL)	LPS	15420,00±1221,85	8550,00±1366,08	10800±1366,08	14185,71±1032,66	12076,67±115,4	13345,71±1032,66
	CONT	1585,00±1115,4	14625,00±1366,08	16662,86±1032,66	18336,67±1115,4	15420,00±1221,85	18556,67±1115,4
Linfócitos (/µL)	LPS	8499,32±928,86	4687,75±1038,50	5313,32±1038,50	7302,95±785,03	4886,93±847,93	6445,73±847,93
	CONT	8700,00±847,93	6882,53±1038,50	7557,12±785,03	9627,47±475,00	6469,59±785,03	6791,33±847,93
Neutrófilos (/µL)	LPS	5110,60±944,04	3000,63±1055,47	4086,92±155,47	5112,87±797,86	6187,66±861,79	5146,30±861,79
	CONT	5978,30±861,79	6463,51±1055,47	7870,68±797,86	6279,03±861,79	8543,42±797,86	9430,92±861,79
Bastonetes	LPS	359,68±186,02	250,08±207,98	266,91±207,98	500,77±157,21	115,70±169,81	330,48±169,81

(/μL)	CONT	230,06±169,81	593,83±207,98	336,23±157,21	571,34±169,81	242,26±157,21	931,60±169,81
Monócitos (/μL)	LPS	1046,51±454,51	490,52±508,16	958,26±508,16	889,16±384,13	695,54±414,91	1083,96±414,91
	CONT	894,97±414,91	379,62±508,16	673,82±384,13	1599,85±414,91	2065,42±384,13	1168,42±414,91

647

648 Os parâmetros energéticos (Tabela 3), proteína plasmática total, glicose,
649 uréia, e HDL, não foram afetados pelo desafio com LPS durante o período estudado.
650 No entanto, uma interação foi observada em relação aos níveis de colesterol 8 horas
651 após o primeiro desafio, onde os animais desafiados apresentaram uma redução
652 nos níveis de colesterol comparado aos animais controle. Os níveis de fósforo e
653 cálcio (Tabela 3) também não sofreram efeito do desafio, não havendo alteração no
654 período total, assim como em períodos específicos.

655 Os parâmetros inflamatórios, albumina e PON1 (Tabela 3) não foram
656 alteradas pelo desafio. As enzimas hepáticas AST, Alanina aminotransferase (ALT)
657 e fosfatase alcalina (Tabela 3) não foram alteradas pelo desafio

658 **Tabela 3.** Parâmetros energéticos inflamatórios e hepáticos de novilhas desafiadas com lipopolissacarídeos (LPS) (0,5 µg de LPS/ Kg de peso corporal) ou
 659 solução salina (Controle) às 0 e 24 horas.

		Hora 0	Hora 4	Hora 8	Hora 24	Hora 28	Hora 32	Hora 48
Proteína plasmática total (g/dL)	LPS	7,05±0,31	6,73±0,19	7,00±0,18	6,88±0,17	7,04±0,19	7,08±0,17	6,94±0,27
	CONT	6,36±0,28	6,88±0,17	6,93±0,22	7,13±0,15	6,99±0,23	7,15±0,18	7,17±0,21
Colesterol (mg/dL)	LPS	74,28±7,42	97,42±9,61	69,00±9,02	55,00±8,88	65,14±7,14	63,25±5,96	68,37±6,13
	CONT	70,6±8,78	83,42±9,61	93,14±9,64	58,66±9,60	62,50±7,72	72,57±6,37	44,5±7,08
Fósforo (mg/dL)	LPS	9,56±1,04	7,78±0,66	8,41±0,77	6,08±0,56	5,83±0,29	5,94±0,34	7,12±0,33
	CONT	7,96±0,95	8,44±0,66	7,34±0,83	7,42±0,60	6,51±0,33	6,38±0,37	6,38±0,38
Albumina (g/dL)	LPS	2,51±0,10	2,79±0,15	1,87±0,15	2,37±0,12	2,43±0,10	2,70±0,12	2,43±0,08
	CONT	2,53±0,12	2,80±0,15	1,83±0,14	2,63±0,14	2,70±0,12	2,57±0,13	2,53±0,10
Calcio (mg/dL)	LPS	8,10±0,15	8,75±0,27	8,81±0,28	9,46±0,20	9,47±0,25	9,43±0,30	9,61±0,24
	CONT	7,95±0,17	9,18±0,27	9,19±0,28	9,47±0,22	9,79±0,29	9,92±0,35	9,92±0,28
ALT (U/L)	LPS	37,40±4,55	24,85±2,20	26,12±2,38	22,57±3,60	26,75±2,28	24,42±2,73	27,62±1,86
	CONT	28,40±4,55	30,57±2,20	24,71±2,54	24,33±3,89	23,83±2,62	28,42±2,73	25,5±2,15

AST (U/L)	LPS	77,00±9,90	85,66±2,88	87,5±6,77	79,14±6,85	82,37±6,18	69,37±6,87	79,00±4,89
	CONT	61,42±8,36	70,42±2,66	69±7,82	65,33±7,40	64,33±7,14	66,75±7,34	70,16±5,65
FA (U/L)	LPS	72,00±8,17	108,85±14,39	94,85±11,33	97,50±12,91	120,5±15,63	104,14±14,90	124,42±10,25
	CONT	79,71±6,91	112,00±14,39	117,28±11,23	102,50±12,91	112,5±15,63	103,83±16,10	135,5±11,08
Ureia (mg/dL)	LPS	22,60±2,09	24,42±1,83	24,75±2,14	17,28±1,67	19,12±1,40	22,50±1,72	14,62±1,46
	CONT	22,85±1,77	22,42±1,83	25,85±2,28	20,66±1,81	20±1,61	23,28±1,84	19,5±1,69
Glicose (mg/dL)	LPS	93,28±7,58	74,85±5,42	88,37±4,97	91,42±4,92	77,00±3,18	77,14±2,92	88,5±7,09
	CONT	117,33±8,15	86,6±6,42	88,57±5,31	80,00±5,31	85,60±4,03	91,2±3,52	67,40±8,97
HDL mg/dL	LPS	42,40±4,66	50,57±4,41	43,14±5,77	48,42±5,92	44,12±4,06	49,28±5,49	43,06±5,63
	CONT	35,85±3,84	51,28±4,41	51,16±6,24	43,33±6,39	42,5±4,69	51,5±5,09	47,25±6,50

660 **Discussão**

661 Ao avaliar a temperatura corporal e o leucograma dos animais, é possível
662 afirmar que o LPS foi efetivo na indução de uma resposta inflamatória, visto que a
663 elevação na temperatura corporal é desencadeada por citocinas inflamatórias como
664 o TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, produzidos pelas células de defesa a partir do
665 reconhecimento de um agente invasor (GIUSTI-PAIVA et al., 2003), sendo a IL-6 um
666 dos principais mediadores da resposta febril (ROTH et al., 2009; PEÑAILILLO et al.,
667 2016). O grupo desafiado, desenvolveu uma resposta febril prolongada frente a
668 primeira exposição ao LPS, ocorrendo um quadro febril curto e agudo após o
669 segundo desafio. Esse efeito se dá em virtude de dois mecanismos, sendo o
670 primeiro inflamatório, com participação de citocinas que estimulam a febre, e o
671 segundo compensatório, envolvendo o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal com
672 liberação de vasopressinas e outras moléculas que limitam a febre (GIUSTI-PAIVA
673 et al., 2003).

674 Além disso, a resposta febril parece ser diretamente influenciada pela dose e
675 forma de exposição ao LPS (forma aguda ou crônica), visto que STEIGER et al.,
676 (1999), ao desafiar novilhos com 2 μ g/kg de peso vivo de LPS ao longo de 100
677 minutos, observou um aumento na temperatura em torno de 60 minutos após o início
678 da infusão, com valores permanecendo elevados até em torno de 6 horas. No
679 entanto, a temperatura apresentada pelos animais ficou abaixo dos 39,5°C. A
680 elevação de temperatura observada em nosso estudo está presente em grande
681 parte das doenças infecciosas e é extremamente importante pois visa combater o
682 agente infeccioso, no entanto, é uma das respostas mais onerosas energeticamente
683 para ser mantida, sendo que o aumento de 1°C aumenta de 10 a 13% o gasto
684 energético com o metabolismo basal do animal (CARROLL; FORSBERG, 2007),
685 desviando a energia que seria utilizada para a produção de leite e carne para
686 manutenção da homeostase do organismo.

687 O desafio com LPS, levou a redução nos níveis de leucócitos totais
688 ocasionado pelos menores níveis de neutrófilos. Semelhante ao nosso estudo,
689 (GERROS; SEMRAD; PROCTOR, 1995), ao desafiar bezerros com doses
690 crescentes de LPS também observaram redução nos níveis de leucócitos totais,
691 sendo esse efeito dose dependente. Além disso KOOT et al (1989) observaram

692 neutropenia em cabras tratadas com uma dose de 0,1 µg de LPS/kg iv. E em
693 bovinos leiteiros já é bem evidenciado que animais que passam por um estado pró-
694 inflamatório mais intenso em torno do parto, devido a fatores ambientais
695 estressantes ou agentes patogênicos, apresentam uma maior ineficiência da
696 resposta imune inata (TREVISI; MINUTI, 2018). O LPS pode desencadeando a
697 apoptose de neutrófilos, através da disfunção mitocondrial (PERIASAMY;
698 PRAVEENA; SINGH, 2018) e além disso, DIEZ-FRAILE et al., (2003) relataram que
699 há uma diminuição sérica das células polimorfonucleadas em vacas leiteiras em
700 decorrência de alterações nas moléculas de adesão (Lselectina e $\beta 2$ – integrinas).
701 Outra possível via para a ocorrência de neutropenia é pela ocorrência de um
702 sequestro dessas células pela microcirculação pulmonar, demonstradas em casos
703 de endotoxemia em equinos e camundongos (DUNCAN et al 1985, WARD et al.
704 1987, PARK et al 2019).

705 A resposta febril nos animais desafiados, teve como consequência a redução
706 de colesterol durante o primeiro desafio, posteriormente ao período que os animais
707 apresentaram elevação da temperatura. Essa redução pode ter ocorrido em função
708 da quebra dessa molécula para a formação de fosfolipase A2 (TIETGE et al., 2000)
709 a qual encontra-se elevada durante o processo inflamatório (NEVALAINEN, 1993).
710 No estudo de (KUSHIBIKI et al., 2002) a administração de rbTNF- α mostrou induzir
711 rapidamente aumentos contínuos nos níveis circulantes de triglicerídeos, Ácidos
712 Graxos Não Esterificados (AGNES), retinol e Lipoproteína de muito baixa densidade
713 (VLDL) em novilhas leiteiras. Um efeito semelhante ao de nosso estudo foi
714 observado por AMETAJ et al., (2009) onde a elevação na oferta de alimento
715 concentrado durante 10 dias, promoveu uma redução nos níveis de colesterol. O
716 colesterol é produzido em quase todas as células do corpo, e principalmente nos
717 hepatócitos, córtex da adrenal, ovários e epitélio intestinal, sendo o fígado o local
718 primário de síntese na maioria dos animais (HENDRIX, 2002). Alterações de forma
719 intensa e prolongada em seus níveis são prejudiciais visto que podem reduzir o
720 desempenho dos animais, e afetar negativamente o desempenho reprodutivo pois
721 esta é a molécula primordial para a esteroidogênese (RIGO et al., 2015).

722 Esta redução dos níveis de colesterol não foi acompanhada por alterações
723 nos níveis de glicose em nosso estudo. Esse mesmo comportamento da glicose já
724 foi relatado em outros trabalhos de forma semelhante, (HORST et al., 2019) ao

725 realizarem a exposição constante e exponencial de animais ao LPS ao longo de 8
726 dias, não observaram alterações nos níveis de glicose. No entanto, o desafio
727 desencadeou uma elevação de 140% nos níveis de insulina, indicando uma
728 resistência periférica a insulina. Os autores defendem que a ocorrência desse
729 quadro de hiperinsulinemia é uma via para aumentar a captação da glicose por
730 leucócitos e melhorar a função dessas células durante a imunoativação, visto que as
731 células imunológicas são sensíveis à insulina e requerem grandes quantidades de
732 glicose (HELDERMAN, 1984; CALDER; DIMITRIADIS; NEWSHOLME, 2007;
733 MARATOU et al., 2007). Com essa finalidade tecidos periféricos como tecido
734 adiposo e músculo esquelético, tornam-se resistentes a insulina durante a
735 imunoativação, buscando de forma sincronizada, dispor de mais glicose ao sistema
736 imune (LANG; DOBRESU; MÉSZÁROS, 1990). No estudo de WALDRON et al.,
737 (2003) ao testarem doses crescentes de LPS (0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 ug/Kg de peso
738 vivo) também não encontraram alteração nos níveis de glicose, porém houve
739 elevação nos níveis de insulina. Enquanto (STEIGER et al., 1999), observaram um
740 quadro de hiperinsulinemia com manutenção de níveis normais de glicose,
741 ocorrendo um quadro de hipoglicemia quando os níveis de insulina retornaram à
742 normalidade.

743 Assim como a glicose, os níveis de proteína plasmática total e ureia não
744 foram afetados pelo desafio com LPS. Em quadros de infecção, observa-se um
745 incremento do catabolismo proteico para disponibilizar energia aos leucócitos,
746 fazendo com que os aminoácidos sirvam de substratos para a gliconeogênese
747 (WANNEMACHER et al., 1980) e biossíntese de proteínas de fase aguda (PFA)
748 positivas. Diferente do observado em nosso estudo, (HORST et al., 2019)
749 demonstraram ocorrer um incremento no nitrogênio ureico nos animais expostos ao
750 LPS de forma crônica, devido provavelmente a uma maior demanda metabólica
751 nesses animais que levou a degradação proteica.

752 Juntamente com a elevação da temperatura esperávamos observar uma
753 resposta de fase aguda (RFA) (WERLING et al., 1996), com redução de proteínas
754 de fase aguda negativa como a PON e a albumina, desencadeada pela cascata de
755 citocinas TNF- α , IL-1 α e IL-6, ativadas (BAUMANN; GAULDIE, 1994; GRUYS et al.,
756 2005). A PON1 e a albumina são produzidas principalmente pelos hepatócitos e são
757 reduzidas em casos inflamatórios para que proteínas de fase aguda positivas sejam

758 produzidas e auxiliem na resolução da infecção. Em nosso estudo apesar da
759 redução marcada nos níveis de PON 1 quatro horas após o primeiro e o segundo
760 desafio, essa não foi diferente do grupo controle. A intensidade na alteração nos
761 níveis dessa PFA, parece estar ligada à dose de LPS que o animal é exposto, visto
762 que no estudo de TERRES et al., (2017), vacas leiteiras desafiadas com uma dose
763 2,5 µg/Kg de peso vivo de LPS, apresentaram uma redução da atividade dessa
764 enzima 6 horas após a exposição ao LPS. São poucos ainda os estudos que que
765 utilizam a PON1 como um marcador da resposta inflamatória aguda, em quadros
766 endotoxemicos. No estudo de ZHAO et al., (2018), vacas submetidas a um quadro
767 de Acidose Ruminal Subaguda (SARA), apresentaram alterações no nível de
768 haptoglobina, sendo essa uma proteína de fase aguda positiva. Nesse estudo os
769 animais apresentaram níveis de LPS plasmático de 0,21 UE/ml (1 UE = 0,1 ng) ou
770 seja 0,000002 µg, no entanto as vacas permaneceram em SARA por trinta dias, com
771 pH abaixo de 5,6 e em média 6,15 horas por dia. GOZHO; KRAUSE; PLAIZIER,
772 (2006), também relatou aumento de haptoglobina e proteína amiloide A sérica em
773 vacas que receberam dietas para indução de acidose contendo 61 e 76% de
774 concentrado.

775 A albumina, outro marcador de resposta aguda utilizado em nosso estudo se
776 manteve similar entre os grupos. A redução dessa PFA negativa ocorre inicialmente
777 devido ao aumento da permeabilidade vascular desencadeado pela inflamação que
778 altera a distribuição de proteínas entre o plasma e outros fluidos (FLECK, 1989).
779 Talvez essa seja uma via mais ativa quando a presença de patógenos ou de
780 endotoxinas ocorra em um tecido periférico, não sendo o caso de nosso estudo,
781 onde a endotoxina estava presente na corrente circulatória. Nos casos de redução
782 tardia da albumina plasmática, tem-se como causa principal a menor síntese
783 hepática (Powanda, 1980), ocasionada pela competição para maior síntese de PFA
784 positiva e até mesmo pela lesão hepática. Neste sentido, no estudo de (TREVISI et
785 al., 2012), vacas leiteiras que apresentavam baixa funcionalidade hepática no pré-
786 parto tinham uma redução marcada da concentração de albumina imediatamente
787 após o parto. Sendo que outros trabalhos demonstraram que vacas com inflamação
788 severa, tiveram redução acentuada dessa proteína antes (TREVISI et al., 2010) ou
789 após o parto (BIONAZ et al., 2007; BERTONI et al., 2008). Assim como relatado

790 referente a PON1, estudos utilizando a albumina como proteína de fase aguda em
791 bovinos de corte, são escassos.

792 Acreditamos que a dose de LPS utilizada em nosso estudo e o curto período
793 ao que os animais foram expostos, propiciou que os hepatócitos detoxicassem o
794 sangue sem causar lesão ao tecido hepático, pois os níveis das enzimas ALT e
795 fosfatase alcalina foram semelhantes entre os grupos. No entanto, vale ressaltar que
796 ocorreu uma tendência a maiores níveis de AST 4 horas após o desafio, indicando
797 que exposições mais prolongadas podem causar efeitos negativos sobre a
798 funcionalidade dos hepatócitos. (MARCHESINI et al., 2013), ao induzir a ocorrência
799 de acidose, em bovinos observou, uma elevação nos níveis da proteína ligante de
800 LPS (LBP) e aumento dos níveis de AST, estando possivelmente relacionado a
801 necessidade de detoxicação do LPS no fígado.

802 O metabolismo mineral não foi afetado pelo desafio com LPS. Níveis
803 adequados de Ca, são importantes visto que esse mineral auxilia da destoxicação
804 do LPS no fígado (JIRILLO et al., 2002). Alguns estudos prévios relatam elevação do
805 cálcio, devido a liberação de citocinas e prostaglandinas pró-inflamatórias durante a
806 inflamação que induzem atividade de osteoclastos aumentando a reabsorção óssea
807 (CHIANG et al., 1999). Por outro lado, em bovinos leiteiros, quadros de infecção
808 severa são acompanhados por hipocalcemia, sendo defendido por alguns autores
809 que esse é um mecanismo de defesa, evitando uma resposta inflamatória aguda em
810 humanos (COLLAGE et al., 2013). Nesse sentido, JACOBSEN et al., (2005)
811 utilizando doses de LPS de 0,01, 0,1, e 1 ug/Kg de peso vivo observaram uma
812 redução desse mineral, dependentes da dose, indicando que quanto maior a dose
813 utilizada menores os níveis de cálcio. Em relação ao fósforo, diferente de nosso
814 estudo, (KUSHIBIKI, S., HODATE, K., SHINGU, H., UEDA, Y., WATANABE, A.,
815 MORI, Y., ... & YOKOMIZO, 2000) que ao desafiarem bezerros com rbTNF- α ,
816 observaram um quadro de hipofosfatemia, sendo resultante da redistribuição do
817 fósforo inorgânico do fluido extracelular para as células (BRAUTBAR; LEIBOVICI;
818 MASSRY, 1983). WALDRON et al., (2003), observaram uma redução em relação a
819 esses dois minerais após o desafio.

820 Estudos realizados previamente ao nosso, demonstram ocorrer duas
821 respostas distintas em relação a presença de LPS na corrente circulatória onde em

822 um primeiro momento tem-se uma resposta semelhante ao estresse, com animais
823 apresentando aumento de glicose e cortisol, enquanto em um segundo momento
824 tem-se uma redução dos níveis de glicose e aumento da lipólise indicando um déficit
825 energético (STEIGER et al., 1999). Os resultados encontrados em nosso trabalho
826 demonstram que exposições ao LPS mesmo que por um curto período são capazes
827 de alterar a funcionalidade do sistema imune e o metabolismo energético,
828 representado pela redução dos níveis de colesterol 8 horas pós desafio. Sendo este
829 efeito consecutivo a elevação da temperatura corporal. Exposições a quadros de
830 acidose e conseqüentemente ao LPS ao longo do dia, são comuns em animais
831 confinados, sendo importante a adoção de medidas que reduzam esse problema e
832 evitem essa resposta inflamatória e o gasto energético dos animais.

833 **Conclusão**

834 A exposição de animais a duas doses de LPS em um intervalo de 24 horas
835 desencadeou uma resposta sistêmica com alteração na temperatura corporal, nos
836 níveis de leucócitos totais e de neutrófilos, com conseqüente repercussão nos níveis
837 de colesterol, sem alteração nos demais componentes avaliados.

838

839 **Referências**

840 AMETAJ, B. N. et al. Backgrounding and finishing diets are associated with
841 inflammatory responses in feedlot steers. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 4, p.
842 1314–1320, 2009.

843 BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v. 15,
844 n. 2, p. 74–80, fev. 1994. Disponível em:
845 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167569994901376>>.

846 BERTONI, G. et al. Effects of Inflammatory Conditions on Liver Activity in Puerperium
847 Period and Consequences for Performance in Dairy Cows. **Journal of Dairy
848 Science**, v. 91, n. 9, p. 3300–3310, set. 2008. Disponível em:
849 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030208710452>>.

850 BIONAZ, M. et al. Plasma Paraoxonase, Health, Inflammatory Conditions, and Liver
851 Function in Transition Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1740–
852 1750, abr. 2007. Disponível em:

853 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030207716600>>.

854 BRADFORD, B. J. et al. Daily Injection of Tumor Necrosis Factor- α Increases
855 Hepatic Triglycerides and Alters Transcript Abundance of Metabolic Genes in
856 Lactating Dairy Cattle. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 8, p. 1451–1456, 2009.

857 BRAUTBAR, N.; LEIBOVICI, H.; MASSRY, S. G. On the mechanism of
858 hypophosphatemia during acute hyperventilation: evidence for increased muscle
859 glycolysis. **Mineral and electrolyte metabolism**, v. 9, n. 1, p. 45–50, 1983.
860 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6843518>>.

861 CALDER, P. C.; DIMITRIADIS, G.; NEWSHOLME, P. Glucose metabolism in
862 lymphoid and inflammatory cells and tissues. **Current Opinion in Clinical Nutrition
863 and Metabolic Care**, v. 10, n. 4, p. 531–540, jul. 2007. Disponível em:
864 <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00075197-200707000-00024>>.

865 CAMPOS, F. T. et al. Theriogenology The acute effect of intravenous
866 lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL components and gene
867 expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle. v. 89, p. 244–249, 2017.

868 CARROLL, J. A.; FORSBERG, N. E. Influence of Stress and Nutrition on Cattle
869 Immunity. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, n. 1,
870 p. 105–149, mar. 2007. Disponível em:
871 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072007000047>>.

872 CHIANG, C. Y. et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor activities partially
873 account for calvarial bone resorption induced by local injection of lipopolysaccharide.
874 **Infection and immunity**, v. 67, n. 8, p. 4231–6, ago. 1999. Disponível em:
875 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10417196>>.

876 COLLAGE, R. D. et al. Calcium Supplementation During Sepsis Exacerbates Organ
877 Failure and Mortality via Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase
878 Signaling. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 11, p. e352–e360, nov. 2013. Disponível
879 em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00003246-201311000-00037>>.

880 DIEZ-FRAILE, A. et al. L-selectin and β 2-integrin expression on circulating bovine
881 polymorphonuclear leukocytes during endotoxin mastitis. **Journal of Dairy Science**,
882 v. 86, n. 7, p. 2334–2342, 2003.

- 883 ECKEL, E. F.; AMETAJ, B. N. Invited review: Role of bacterial endotoxins in the
884 etiopathogenesis of periparturient diseases of transition dairy cows. **Journal of Dairy**
885 **Science**, v. 99, n. 8, p. 5967–5990, ago. 2016. Disponível em:
886 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216302764>>.
- 887 FLECK, A. Clinical and nutritional aspects of changes in acute-phase proteins during
888 inflammation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 48, n. 3, p. 347–354, 28 set.
889 1989. Disponível em:
890 <<https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0029665189000522/type/journal>
891 [_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0029665189000522/type/journal)>.
- 892 GERROS, T. C.; SEMRAD, S. D.; PROCTOR, R. A. Alterations in clinical,
893 hematological and metabolic variables in bovine neonatal endotoxemia. **Canadian**
894 **Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 1, p. 34–39, 1995.
- 895 GIUSTI-PAIVA, A. et al. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock:
896 involvement of vasopressin. **Pflügers Archiv**, v. 447, n. 2, p. 175–180, 3 nov. 2003.
897 Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00424-003-1164-2>>.
- 898 GOZHO, G. N.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Rumen Lipopolysaccharide and
899 Inflammation During Grain Adaptation and Subacute Ruminant Acidosis in Steers.
900 **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 11, p. 4404–4413, nov. 2006. Disponível em:
901 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030206724870>>.
- 902 GOZHO, G. N.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Ruminant Lipopolysaccharide
903 Concentration and Inflammatory Response During Grain-Induced Subacute Ruminant
904 Acidosis in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 856–866, fev.
905 2007. Disponível em:
906 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030207715692>>.
- 907 GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of**
908 **Zhejiang University: Science**, v. 6 B, n. 11, p. 1045–1056, 2005.
- 909 HELDERMAN, J. H. Acute regulation of human lymphocyte insulin receptors.
910 Analysis by the glucose clamp. **Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 4, p.
911 1428–1435, 1 out. 1984. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/111554>>.
- 912 HOEBEN, B. D. et al. Role of endotoxin and TNF- α in the pathogenesis of
913 experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. **J Dairy Res**, v. 67, p.

914 503–514, 2000.

915 HORST, E. A. et al. Effects of continuous and increasing lipopolysaccharide infusion
916 on basal and stimulated metabolism in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy**
917 **Science**, v. 102, n. 4, p. 3584–3597, abr. 2019. Disponível em:
918 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030219300682>>.

919 HUZZEY, J. M. et al. Prepartum Behavior and Dry Matter Intake Identify Dairy Cows
920 at Risk for Metritis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3220–3233, jul. 2007.
921 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203020771771X>>.

922 JACOBSEN, S. et al. Dose dependency and individual variability in selected clinical ,
923 haematological and blood biochemical responses after systemic lipopolysaccharide
924 challenge in cattle To cite this version : HAL Id : hal-00902965 Dose dependency and
925 individual variability . 2005.

926 JIRILLO, E. et al. The role of the liver in the response to LPS: Experimental and
927 clinical findings. **Journal of Endotoxin Research**, v. 8, n. 5, p. 319–327, 2002.

928 JOHNSON, M. D. et al. Cytokine Gene Polymorphisms and the Outcome of Invasive
929 Candidiasis: A Prospective Cohort Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 4,
930 p. 502–510, 15 fev. 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cir827>>.

932 KUSHIBIKI, S., HODATE, K., SHINGU, H., UEDA, Y., WATANABE, A., MORI, Y., ...
933 & YOKOMIZO, Y. Acute phase responses and metabolic and hormonal changes
934 induced by recombinant bovine tumor necrosis factor alpha in calves. **Bulletin of the**
935 **Tohoku National Agricultural Experiment Station**, n. 96, p. 39–50, 2000.

936 KUSHIBIKI, S. et al. Alterations in lipid metabolism induced by recombinant bovine
937 tumor necrosis factor-alpha administration to dairy heifers^{1,2}. **Journal of Animal**
938 **Science**, v. 80, n. 8, p. 2151–2157, 1 ago. 2002. Disponível em:
939 <<https://academic.oup.com/jas/article/80/8/2151/4789682>>.

940 KVIDERA, S. K. et al. Glucose requirements of an activated immune system in
941 lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 2360–2374, mar.
942 2017a. Disponível em:
943 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216309213>>.

- 944 KVIDERA, S. K. et al. Estimating glucose requirements of an activated immune
945 system in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 11, p. 5020–5029, 1
946 nov. 2017b. Disponível em: <[https://academic.oup.com/jas/article/95/11/5020-](https://academic.oup.com/jas/article/95/11/5020-5029/4807460)
947 [5029/4807460](https://academic.oup.com/jas/article/95/11/5020-5029/4807460)>.
- 948 LANG, C. H.; DOBRESU, C.; MÉSZÁROS, K. Insulin-mediated glucose uptake by
949 individual tissues during sepsis. **Metabolism**, v. 39, n. 10, p. 1096–1107, out. 1990.
950 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0026049590901729>>.
- 951 LECCHI, C. et al. Extra hepatic expression of the acute phase protein alpha 1-acid
952 glycoprotein in normal bovine tissues. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 2, p. 256–
953 258, maio 2009. Disponível em:
954 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023308000038>>.
- 955 LOHUIS, J. A. C. M. et al. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants.
956 **Veterinary Quarterly**, v. 10, n. 2, p. 109–116, abr. 1988. Disponível em:
957 <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01652176.1988.9694157>>.
- 958 MARATOU, E. et al. Glucose transporter expression on the plasma membrane of
959 resting and activated white blood cells. **European Journal of Clinical Investigation**,
960 v. 37, n. 4, p. 282–290, abr. 2007. Disponível em:
961 <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2362.2007.01786.x>>.
- 962 MARCHESINI, G. et al. Effect of induced ruminal acidosis on blood variables in
963 heifers. **BMC Veterinary Research**, v. 9, 2013.
- 964 MCGUINNESS, O. P. DEFECTIVE GLUCOSE HOMEOSTASIS DURING
965 INFECTION. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 25, p. 9–35, 2005.
- 966 MUNFORD, R. S. Endotoxemia-menace, marker, or mistake? **Journal of Leukocyte**
967 **Biology**, v. 100, n. 4, p. 687–698, out. 2016. Disponível em:
968 <<http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.3RU0316-151R>>.
- 969 NEVALAINEN, T. J. Serum phospholipases A2 in inflammatory diseases. **Clinical**
970 **chemistry**, v. 39, n. 12, p. 2453–9, dez. 1993. Disponível em:
971 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252715>>.
- 972 OWENS, F. N. et al. Acidosis in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76,
973 n. 1, p. 275, 1998. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jas/article/76/1/275->

- 974 286/4625198>.
- 975 PALSSON-MCDERMOTT, E. M. The Warburg effect then and now: From cancer to
976 inflammatory diseases. **Bioessays**, v. 35, p. 1–9, 2013.
- 977 PEÑAILILLO, A. K. et al. Haematological and blood biochemical changes induced by
978 the administration of low doses of Escherichia coli lipopolysaccharide in rabbits.
979 **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 48, n. 3, p. 315–320, 2016.
- 980 PERIASAMY, S.; PRAVEENA, P. E.; SINGH, N. Effects of Pasteurella multocida
981 lipopolysaccharides on bovine leukocytes. **Microbial Pathogenesis**, v. 119, p. 225–
982 232, jun. 2018. Disponível em:
983 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401018300305>>.
- 984 PIA, B.; ANDERSEN, H.; ANDERSEN, H. Bovine Endotoxemia – Some Aspects of
985 Relevance to Production Diseases . A Review *. p. 141–155, 2003.
- 986 PLAIZIER, J. C. et al. Subacute ruminal acidosis (SARA), endotoxins and health
987 consequences. **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, n. 1–2, p. 9–21, fev.
988 2012. Disponível em:
989 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840111004937>>.
- 990 RICHARDS, C.; GAULDIE, J.; BAUMANN, H. Cytokine control of acute phase protein
991 expression. **European cytokine network**, v. 2, n. 2, p. 89–98, 1991. Disponível em:
992 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1725967>>.
- 993 RIGO, M. L. et al. Steroidogenic enzymes mRNA expression profile and steroids
994 production in bovine theca cells cultured in vitro and stimulated with angiotensin II.
995 **Ciência Rural**, v. 45, n. 4, p. 704–710, abr. 2015. Disponível em:
996 <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-
997 84782015000400704&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782015000400704&lng=en&tlng=en)>.
- 998 RODRÍGUEZ-LECOMPTE, J. C. et al. Evaluation of the systemic innate immune
999 response and metabolic alterations of nonlactating cows with diet-induced subacute
1000 ruminal acidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7777–7787, dez. 2014.
1001 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214007103>>.
- 1002 ROTH, J. et al. Molecular Aspects of Fever and Hyperthermia. **Immunology and
1003 Allergy Clinics of North America**, v. 29, n. 2, p. 229–245, maio 2009. Disponível

- 1004 em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088985610900006X>>.
- 1005 SANTOS, J. E. . et al. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on
1006 lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal**
1007 **Reproduction Science**, v. 80, n. 1–2, p. 31–45, jan. 2004. Disponível em:
1008 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432003001337>>.
- 1009 SHELDON, I. M.; OWENS, S. E. Postpartum uterine infection and endometritis in
1010 dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 622–629, 2017. Disponível em:
1011 <[http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/dow](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p622-629)
1012 [nload/v14/v14n3/p622-629](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p622-629) (AR1006) AETE.pdf>.
- 1013 STEIGER, M. et al. Effect of a prolonged low-dose lipopolysaccharide infusion on
1014 feed intake and metabolism in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 9, p.
1015 2523–2532, 1999.
- 1016 TIETGE, U. J. F. et al. Overexpression of Secretory Phospholipase A 2 Causes
1017 Rapid Catabolism and Altered Tissue Uptake of High Density Lipoprotein Cholesteryl
1018 Ester and Apolipoprotein A-I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 14, p.
1019 10077–10084, 7 abr. 2000. Disponível em:
1020 <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.275.14.10077>>.
- 1021 TREVISI, E. et al. Blood and milk immune and inflammatory profiles in periparturient
1022 dairy cows showing a different liver activity index. **Journal of Dairy Research**, v. 77,
1023 n. 3, p. 310–317, 19 ago. 2010. Disponível em:
1024 <<https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0022029910000178/type/journal>
1025 [_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0022029910000178/type/journal)>.
- 1026 TREVISI, E. et al. Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding,
1027 periparturient dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 2, p. 695–704,
1028 out. 2012. Disponível em:
1029 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528811004619>>.
- 1030 TREVISI, E.; MINUTI, A. Assessment of the innate immune response in the
1031 periparturient cow. **Research in Veterinary Science**, v. 116, p. 47–54, fev. 2018.
1032 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528817301947>>.
- 1033 WALDRON, M. R. et al. Effect of Lipopolysaccharide on Indices of Peripheral and
1034 Hepatic Metabolism in Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 11, p.

- 1035 3447–3459, nov. 2003. Disponível em:
1036 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030203739496>>.
- 1037 WANNEMACHER, R. W. et al. Glucose and alanine metabolism during bacterial
1038 infections in rats and rhesus monkeys. **Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 201–212, mar.
1039 1980. Disponível em:
1040 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002604958090061X>>.
- 1041 WERLING, D. et al. Characterisation of the acute phase response of heifers to a
1042 prolonged low dose infusion of lipopolysaccharide. **Research in Veterinary Science**,
1043 v. 61, n. 3, p. 252–257, nov. 1996. Disponível em:
1044 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528896900739>>.
- 1045 YÁÑEZ-RUIZ, D. R.; ABECIA, L.; NEWBOLD, C. J. Manipulating rumen microbiome
1046 and fermentation through interventions during early life: a review. **Frontiers in**
1047 **Microbiology**, v. 6, 14 out. 2015. Disponível em:
1048 <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.011133/abstract>>.
- 1049 ZEBELI, Q. et al. Intermittent parenteral administration of endotoxin triggers
1050 metabolic and immunological alterations typically associated with displaced
1051 abomasum and retained placenta in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy**
1052 **Science**, v. 94, n. 10, p. 4968–4983, out. 2011. Disponível em:
1053 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030211005182>>.
- 1054 ZHAO, C. et al. Inflammatory mechanism of Rumenitis in dairy cows with subacute
1055 ruminal acidosis. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 135, 19 dez. 2018.
1056 Disponível em: <[https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-](https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-1463-7)
1057 [1463-7](https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-1463-7)>.
- 1058
- 1059

1060
1061
1062
1063

1064 **Capítulo II**

1065

1066 **Expressão de genes associados à fertilidade no útero e oviduto de bovinos desafiados**
1067 **com lipopolissacarídeo (LPS)**

1068 Artigo será submetido a revista *Reproduction*

1069 Andressa Stein Maffi¹, Giuliana de Ávila Ferronato², Joao Alveiro Alvarado Rincón³,
1070 Antônio Amaral Barbosa³, Bernardo Garziera Gasperin³, Augusto Schneider⁴, Marcio Nunes
1071 Corrêa³, Cássio Cassal Brauner¹

1072

1073 ¹*Departamento de Zootecnia, ²Faculdade de Biotecnologia. ³Faculdade de Veterinária, ⁴Faculdade de nutrição,*
1074 *Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil*

1075 Corresponding author. E-mail: cassiocb@gmail.com

1076

1077 **Resumo**

1078 O objetivo do estudo foi identificar os possíveis mecanismos moleculares no oviduto e útero
1079 pelos quais as endotoxemias podem influenciar a fertilidade em bovinos. Para isso, 16
1080 novilhas foram submetidas a um protocolo de sincronização baseado em progesterona (P4) e
1081 estradiol (E2), e divididas uniformemente em dois grupos: LPS que recebeu duas aplicações
1082 de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) contendo 0,5 µg/kg de peso corporal de LPS, com
1083 intervalo de 24 horas; e o controle que recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina
1084 (0,9% de NaCl) com o mesmo intervalo de tempo. Quatro dias após a primeira aplicação de
1085 LPS foram coletadas amostras de oviduto e útero para avaliação da expressão dos genes Toll
1086 Like Receptors 4 (TLR4), fator de necrose tumoral (TNF) , interleucina 1β (IL 1β),
1087 interleucina 10 (IL 10), Glutathione Peroxidase 4 (GPX4) e proteína do choque térmico A1A
1088 (HSPAA1) em ambos tecidos, de caspase 3 (CASP 3), Fator de Crescimento Semelhante a
1089 Insulina (IGF) e glicoproteína oviductal 1 (*OVGP1*) no oviduto e prostaglandin-endoperoxide
1090 synthase 2 (PTGS2) e nanog homeobox (NANOG), selectin (SELL), metalopeptidase da

1091 Matriz 19 (MMP 19), Basigin (BSG) no útero. Como resultados, obtivemos uma redução
1092 significativa na expressão dos genes PTGS2 e NANOG no útero, enquanto que os demais
1093 genes avaliados não apresentaram alteração. Pode-se concluir que o desafio com duas doses
1094 de LPS teve influência na expressão de alguns dos genes relacionados com a qualidade
1095 uterina, porém não influenciou os genes avaliados no oviduto.

1096 Palavras chave: Endotoxemia, Reprodução, Inflamação.

1097

1098 **Introdução**

1099 As endotoxemias são caracterizadas pelo aumento de toxinas na corrente sanguínea.
1100 Essas toxinas são liberadas por bactérias quando ocorre sua multiplicação ou desintegração
1101 celular, como é o caso dos lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular das bactérias
1102 gram-negativas, que possuem a capacidade de desencadear resposta inflamatória no
1103 organismo (Bertani and Ruiz 2018). Em bovinos, existe uma série de doenças relacionadas
1104 com endotoxemia por bactérias gram-negativas (principalmente com LPS), sendo elas tanto
1105 infecciosas, como a metrite, endometrite e a mastite (Sheldon et al. 2002), ou metabólicas,
1106 como a acidose ruminal (Stefanska et al. 2018). Estas doenças estão associadas com redução
1107 da produção e qualidade de leite em bovinos (McDougall et al. 2011; Ning et al. 2018) e,
1108 além disso, já foi evidenciado que o LPS possui ação em todo trato reprodutivo das fêmeas e
1109 por isto, a ocorrência de endotoxemias nos rebanhos tem sido associada com menor
1110 fertilidade em várias espécies, incluindo bovinos (Bidne et al. 2018).

1111 O oviduto é o órgão que conecta o ovário ao útero, possuindo a função de transporte
1112 dos gametas. Neste local ocorre a capacitação do espermatozoide para a penetração no oócito,
1113 a fecundação e também o desenvolvimento inicial do embrião até a fase de 16 células (Li and
1114 Winuthayanon 2017). Estudos *in vitro* mostram que em coelhos, o LPS pode induzir uma
1115 resposta imune no oviduto, através do aumento da expressão de mediadores inflamatórios,
1116 como interleucina 1 β (*IL-1 β*) e fator de necrose tumoral alfa (*TNF- α*) (Ibrahim et al. 2015;
1117 Menchetti et al. 2018). Além disso, estudos *in vitro* utilizando células epiteliais do oviduto
1118 bovino também relacionam o LPS com redução da expressão de genes associados com
1119 capacitação espermática e qualidade do ambiente para desenvolvimento do embrião como a
1120 glicoproteína oviductal (*OVGP1*) e o fator de crescimento tipo 2 (*IGF2*), e também com o
1121 aumento de genes que desencadeiam a apoptose como a caspase 3 (*CASP3*) (Ibrahim et al.
1122 2015).

1123 Após o estágio de 16 células, o oviduto transporta o embrião até o útero (Li and
1124 Winuthayanon 2017), onde ocorre a implantação no endométrio para que ele se desenvolva
1125 até o nascimento, sendo assim, o processo de implantação é essencial para a prenhez.
1126 Entretanto, o LPS tem sido relacionado com a alteração da expressão de genes que participam
1127 desse processo no útero de vacas (Matriz metaloproteinase-19 (*MMP19*), Basigin (*BSG*) e
1128 *Selectin L* (*SELL*) e de camundongos (*NANOG*, fator de transcrição de ligação ao octamero-4
1129 (*OCT4*) e Box Transcription Factor 2 (*SOX2*) (Xiao et al. 2017; Campos et al. 2018). Além
1130 disso, o LPS pode aumentar a expressão dos mediadores inflamatórios TNF α , IL6, IL8 e IL1 β
1131 no útero de bovinos (Herath et al. 2006; Cronin et al. 2012).

1132 Contudo, os mecanismos pelos quais as endotoxemias diminuem a fertilidade em
1133 bovinos ainda não estão totalmente elucidados, existindo poucos estudos em útero e oviduto,
1134 sendo deste último apenas em animais modelos ou *in vitro* com células bovinas, necessitando
1135 mais estudos *in vivo* em bovinos. Tendo isso em vista, o objetivo deste estudo foi identificar
1136 os possíveis mecanismos moleculares no oviduto e útero pelos quais as endotoxemias podem
1137 influenciar a fertilidade em bovinos.

1138 **Materiais e Métodos**

1139 *Animais e instalações*

1140 O experimento foi realizado em uma fazenda comercial localizada no município de
1141 São Lourenço do Sul, no Rio Grande do Sul, Brasil. Foram utilizadas 16 novilhas de corte de
1142 raça europeia (Hereford/Angus), clinicamente saudáveis, com média de 14 meses de idade,
1143 pesando aproximadamente 330 kg, manejadas em sistema de confinamento intensivo. O
1144 fornecimento da dieta ocorria duas vezes ao dia com uma proporção de 60% volumoso e 40%
1145 concentrado, também era disponibilizado água à vontade. Todos os procedimentos realizados
1146 no estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade
1147 Federal de Pelotas, RS, Brasil (Protocolo 9364).

1148 *Sincronização da onda folicular e tratamentos*

1149 O delineamento experimental (Figura 2) ocorreu da seguinte forma, quatorze dias
1150 antes de iniciar o experimento (D -14) os animais iniciaram um protocolo hormonal para
1151 sincronização da onda folicular, onde receberam uma dose intramuscular (i.m) de 25 mg de
1152 PGF2 α (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil). No dia zero do experimento (D0) foi realizada
1153 a colocação do dispositivo intravaginal liberador de progesterona (1,9g de P4, CIDR®,

1154 Zoetis®), associado a aplicação de 2 mg de Benzoato de estradiol (Gonadiol, Zoetis®) e 25
1155 mg de PGF2 α (Lutalyse®, Zoetis) via i.m.

1156 Os animais foram distribuídos uniformemente em dois grupos: o grupo LPS (n=8) que
1157 recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) contendo 0,5 μ g/kg de
1158 peso corporal de LPS (Sigma Aldrich® Missouri, EUA) via intravenosa, com intervalo de 24
1159 horas (D1 e D2) do experimento; e o grupo controle (n=8) que recebeu duas aplicações de 2
1160 mL de solução salina (0,9% de NaCl) com o mesmo intervalo de tempo. A dose definida para
1161 esse experimento foi baseada no estudo de Waldron et al. (2003), onde essa foi a menor dose
1162 utilizada capaz de gerar uma resposta sistêmica.

1163 *Coleta de tecidos*

1164 Os animais foram abatidos no dia 5 do experimento, onde foram feitas as coletas de
1165 tecidos do útero e oviduto. As amostras foram colocadas em criotubos, homogeneizadas com
1166 um mixer em 0,5mL de Trizol (Sigma Aldrich® Missouri, EUA) e armazenadas em
1167 nitrogênio líquido até serem transferidas para o freezer -80°C onde permaneceram até a
1168 extração de RNA para análises de expressão gênica.

1169 *Análise de expressão gênica*

1170 O RNA total das amostras de oviduto e útero foi extraído usando trizol (Sigma
1171 Aldrich® Missouri, EUA) associado a um sistema de purificação por coluna RNeasy Cleanup
1172 (Qiagen®, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações dos fabricantes. A concentração e
1173 pureza do RNA foi medida utilizando o Nanodrop Lite (Thermo Fischer Scientific Inc.®,
1174 Waltham, MA, EUA). O cDNA foi conduzido utilizando o kit iScript Synthesis (BIORAD®,
1175 Hercules, CA, EUA) e conduzido com 1000ng de RNA total em uma reação de 20 μ L. As
1176 amostras foram incubadas à 25°C por 5 minutos, 42°C por 20 minutos e 95°C por 1 minuto.
1177 Após isso o cDNA foi diluído para uma concentração de 5ng/ μ L, e foi realizada a PCR em
1178 tempo real utilizando GoTaq (GoTaq® qPCR Master Mix, Promega, Madison, WI, USA)
1179 com um volume de reação de 15 μ L, sendo esses 5 μ L da GoTaq, 0,75 μ L de cada primer
1180 (5 μ M), 4,5 μ L de água ultra pura e 4 μ L de cDNA (20ng), sendo cada amostra realizada em
1181 duplicata.

1182 As reações ocorreram no termociclador Eco™ Real-Time PCR System (Illumina,
1183 Inc., San Diego, CA, EUA) sendo realizado 1 ciclo de 45°C por 2 minutos e 45 ciclos de 95°C
1184 por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final de cada reação foi realizada a curva de

1185 dissociação (Melting) para checagem da amplificação de um único produto de PCR. Os genes
1186 do 18S ribossomal RNA (*RN18S1*) e glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)
1187 foram utilizados como controle endógeno no útero e no oviduto.

1188 As análises de expressão gênica foram realizadas utilizando genes alvo ligados à
1189 resposta inflamatória, reconhecimento do LPS e estresse térmico e estresse oxidativo no útero
1190 e oviduto: interleukin 1 beta (*IL-1 β*), interleukin 10 (*IL10*), tumor necrosis factor (*TNF*), toll
1191 like receptor 4 (*TLR4*), heat shock protein family A (*Hsp70*) member 1A (*HSPA1A*) e
1192 glutathione peroxidase 4 (*GPX4*), qualidade do ambiente do oviduto: caspase 3 (*CASP3*),
1193 insulin like growth factor 2 (*IGF2*) e oviductal glycoprotein 1 (*OVGP1*), e qualidade do
1194 ambiente uterino: prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*PTGS2*), nanog homeobox
1195 (*NANOG*), matrix metalloproteinase 19 (*MMP19*), selectin L (*SELL*) e basigin (*BSG*). As
1196 sequências dos primers utilizados estão listadas na tabela 1. A expressão relativa foi calculada
1197 a partir da equação $2^{-(A-B)/2C-D}$, utilizando a média geométrica da expressão dos controles
1198 endógenos.

1199 **Análise estatística**

1200 A análise de expressão gênica foi realizada utilizando test t no GraphPad Prism 7 (GraphPad
1201 Software Inc., La Jolla, CA, USA). Foi considerado como diferença estatística valores de
1202 $P < 0,05$.

1203 **Resultados**

1204 *Efeito do LPS no oviduto*

1205 O desafio com duas doses de LPS com intervalo de 24 horas em novilhas não
1206 apresentou efeito na expressão dos genes *TLR4*, *TNF*, *IL1 β* , *IL10*, *HSPA1A*, *GPX4*, *CASP3*,
1207 *IGF2* e *OVGP1* ($P > 0,05$) no oviduto, figura 1.

1208 *Efeito do LPS no útero*

1209 Foi observado um efeito do tratamento nos genes relacionados à qualidade do ambiente
1210 uterino em animais desafiados com o LPS, sendo uma diminuição de 50% na expressão de
1211 *PTGS2* ($P = 0,024$) e de 92% na expressão de *NANOG* ($P = 0,020$). No entanto, não foi
1212 observada influência das doses de LPS ($P > 0,05$) nos genes relacionados ao reconhecimento
1213 do LPS, *TLR4*, inflamação, *TNF*, *IL1 β* e *IL10*, estresse térmico, *HSPA1A*, estresse oxidativo,
1214 *GPX4*, e qualidade do ambiente uterino, *SELL*, *MMP19* e *BSG* (figura 2).

1215 **Discussão**

1216 Neste estudo, a inflamação que é gerada pelo aumento de LPS na corrente sanguínea
1217 em doenças clínicas ou subclínicas, sejam elas infecciosas ou metabólicas, foi mimetizada
1218 através da aplicação de duas doses de LPS, onde buscamos avaliar o seu efeito na expressão
1219 de genes ligados à resposta imune e qualidade do ambiente para gestação, nos tecidos de
1220 oviduto e útero.

1221 A expressão de TLR4 que é o principal receptor de reconhecimento do LPS pelas
1222 células do organismo (Herath et al. 2006; Menchetti et al. 2018) apresentava-se semelhante
1223 entre os grupos, no oviduto e no útero, quatro dias após o primeiro desafio, assim como os
1224 mediadores inflamatórios TNF e IL1 β . Contudo, experimentos *in vitro* com células do oviduto
1225 ou do endométrio reportaram aumento na expressão de TLR4, 24 horas após o desafio com
1226 LPS (Swangchan-Uthai et al. 2012; Ibrahim et al. 2015), como também em um estudo que
1227 avaliou os efeitos do LPS na corrente sanguínea por acidose e evidenciou aumento da
1228 expressão de TLR4 no útero (Bilal et al. 2016). Além disso, Menchetti et al. (2018),
1229 observaram em coelhos desafiados com LPS, um aumento de IL1 β nos tecidos de oviduto e
1230 útero e de TNF somente no oviduto, porém Herath et al. (2006) e Cronin et al. (2012)
1231 reportaram *in vivo*, aumento da expressão dos mediadores inflamatórios IL1 β , IL6, IL8 e TNF
1232 no endométrio. Sendo que, Cronin et al. (2012) mostram que quando é feito knockdown do
1233 gene do TLR4 ocorre ao mesmo tempo uma diminuição de mediadores inflamatórios, como
1234 IL1 β , IL6 e IL8, indicando que os receptores TLR4 estão diretamente relacionados com a
1235 indução da inflamação. Os níveis semelhantes entre os grupos de TLR-4, TNF e IL1 β , podem
1236 ter ocorrido pelo curto tempo de exposição dos animais ao LPS e pelo tempo entre a última
1237 aplicação de LPS e a coleta dos tecidos. Sendo que Swangchan-Uthai et al. (2012),
1238 demonstraram que a exposição de células endometriais ao LPS *in vitro* promove a maior
1239 expressão de TNF na primeira hora e de IL6 seis horas após a indução, sendo que em 24 horas
1240 esses níveis já retornaram ao normal, porém vale ressaltar que *in vitro* existe uma exposição
1241 muito maior das células ao LPS o que torna alguns parâmetros diferentes dos encontrados *in*
1242 *vivo*.

1243 Apesar dos genes relacionados a inflamação não estarem alterados quatro dias após a
1244 primeira exposição ao LPS, no útero, o desafio reduziu pela metade a expressão de PTGS2,
1245 que resulta na enzima cicloxigenase 2 (COX2). A COX2 é capaz de converter o ácido
1246 araquidônico em prostaglandina H sintase 2 (PGH2), que por sua vez é a precursora da

1247 biossíntese de vários prostanóides, incluindo a prostaglandina E2 (PGE2) e a prostaglandina
1248 F2 α (PGF2 α) (Helliwell et al. 2004). É evidenciado em estudos tanto *in vivo* em bovinos e em
1249 outras espécies quanto em *ex vivo* com tecidos bovinos, que o LPS é capaz de desregular a
1250 produção de prostaglandinas via reconhecimento por TLR4, aumentando a secreção de PGE2
1251 e PGF2 α pelas células endometriais (Mateus et al. 2003; Herath et al. 2006; Silva et al. 2008;
1252 Silva et al. 2010). Além disso, a indução por LPS também estimula a expressão de PTGS2 e
1253 alguns estudos indicam uma correlação entre a expressão de PTGS2 com a concentração de
1254 PGE2 e de PGF2 α no sangue ou em explantes de endométrio bovino (Herath et al. 2006; Silva
1255 et al. 2008). Altas concentrações de PGE2 no lúmen uterino estão relacionadas com atraso na
1256 involução uterina e severidade e persistência das doenças infecciosas em bovinos (Slama et al.
1257 1991; Mateus et al. 2003; Silva et al. 2008), corroborando com isso, os estudos *in vitro* que
1258 existe uma dose-dependência entre a concentração de LPS aplicada e a secreção de PGE2
1259 (Herath et al. 2006).

1260 A duração do ciclo ovariano e também a mantença da prenhez, está relacionada
1261 diretamente com a presença do corpo lúteo ativo, contudo ele é regulado pela PGE2 e PGF2 α
1262 (Poyser 1995). A secreção de PGF2 α induz a regressão do corpo lúteo (luteólise) e, com isso,
1263 reinicia uma nova onda folicular no ciclo ovariano, já a PGE2 é responsável por manter o
1264 corpo lúteo ativo, principalmente durante a gestação, evitando a luteólise (Parent and Fortier
1265 2005). Visto isso, esses trabalhos demonstram que as endotoxemias podem levar a uma
1266 luteólise precoce, ocasionando em perdas de gestação, ou por outro lado, estender o tempo de
1267 vida do corpo lúteo, retardando o processo de ovulação (Opsomer et al. 2000). No entanto, no
1268 presente estudo, utilizando duas doses de LPS, ocorreu o contrário do encontrado na literatura
1269 com outras abordagens de delineamento experimental, houve uma diminuição da expressão de
1270 PTGS2, o que poderia reduzir a produção de PGE2 e PGF2 α , visto que a COX2 é essencial
1271 para a produção destas prostaglandinas e que existe uma relação entre o aumento de COX2
1272 com o também aumento de PGE2 e PGF2 α (Marini et al. 2016). Essa diferença entre os
1273 resultados pode ocorrer justamente pelas divergências entre os próprios estudos, sendo que a
1274 maior parte deles foi realizada *in vitro* ou *ex vivo*, e também pode divergir dos estudos *in vivo*
1275 devido ao ciclo estral que os animais se encontravam no momento do período experimental,
1276 visto que no estudo de Mateus et al. (2003), as vacas não haviam passado por sincronização
1277 hormonal.

1278 O desafio com LPS também gerou uma redução de 92% na expressão de NANOG no
1279 útero. Esse gene está associado com a pluripotência celular, sendo importante na regeneração

1280 dos tecidos frente a injúrias (Jaenisch and Young 2008). Além disso, também foi observado
1281 que o NANOG atua na regulação da resposta inflamatória em células microgliciais, através de
1282 um possível mecanismo de inibição de fatores pró-inflamatórios (Zhou et al. 2012). Ao
1283 contrário do nosso resultado, em camundongos desafiados com LPS houve um aumento da
1284 expressão de NANOG com pico às 6 horas após a aplicação e com retorno da sua expressão
1285 basal 24h após o desafio (Xiao et al. 2017), isso foi demonstrado igualmente tanto na
1286 expressão gênica quanto proteica. A função do NANOG em embriões é bem elucidada, um
1287 knockdown de NANOG nos embriões de cabra diminuiu o número de células do trofoblasto
1288 (Habibi et al. 2018), que atua na implantação do embrião no endométrio. Entretanto, no
1289 endométrio a função do gene ainda não é clara, sabe-se que as células-tronco estão presentes
1290 no endométrio na presença ou não de danos no tecido e podem se diferenciar em células
1291 epiteliais ou estromais do endométrio (Taylor 2004), esse gene pode regular a diferenciação
1292 dessas células (Calloni et al. 2013), promovendo o desenvolvimento normal do endométrio,
1293 essencial para a implantação do embrião e para a manutenção da gestação (Spencer et al. 2004;
1294 Gargett and Healy 2011). Tendo isso em vista, no trabalho com camundongos pode ter
1295 ocorrido um aumento da expressão de NANOG por medida compensatória do endométrio, no
1296 entanto, no presente estudo, pelo tempo decorrido entre os desafios e a coleta do endométrio,
1297 pode ser que esse mecanismo compensatório não foi o suficiente pelos danos causados ao
1298 tecido, o que reduziu a expressão do gene. Essa diminuição de NANOG pode trazer prejuízos
1299 à manutenção da prenhez, visto que o bom funcionamento do endométrio é essencial para a
1300 implantação do embrião (Gargett and Healy 2011). Ademais, em bovinos, foi demonstrada
1301 uma relação que quanto mais jovens os animais, maior a expressão de NANOG no
1302 endométrio (Lupicka et al. 2015), e no presente estudo foram utilizadas novilhas,
1303 demonstrando que ainda assim a expressão do gene foi reduzida em 92%.

1304 No oviduto, não houve influência das doses de LPS aplicadas na expressão dos genes
1305 CASP3 e IGF2. A CASP3 é uma das principais enzimas que induzem a apoptose das células
1306 (Crowley and Waterhouse 2016), já o IGF2 pode ser considerado como um marcador da
1307 qualidade do ambiente materno para o desenvolvimento embrionário inicial, visto que está
1308 associado com maior número de células em blastocistos e melhor taxa de nascimento de
1309 bezerros saudáveis (Neira et al. 2010). Diferente do nosso estudo, existiu um aumento na
1310 expressão de CASP3 frente a um estímulo com LPS em células do oviduto bovino *in vitro*
1311 (Ibrahim et al. 2015) e *ex vivo* (O'Doherty et al. 2016), demonstrando a relação do LPS com
1312 morte celular. Da mesma forma, o gene IGF2 foi estudado *in vitro* em células do oviduto

1313 bovino, e foi evidenciada uma redução na sua expressão pelo desafio com LPS (Ibrahim et al.
1314 2015), indicando que as endotoxemias podem reduzir a qualidade do ambiente materno do
1315 oviduto.

1316 Em nosso estudo podemos observar que mesmo em casos onde a exposição ao LPS é
1317 inferior a doses utilizadas em outros trabalhos, já se tem alterações na expressão de genes
1318 relacionados a capacidade de regeneração do útero e envolvidos na produção de
1319 prostaglandinas, indicando que mesmo pequenas exposições a essa endotoxina podem alterar
1320 o ambiente uterino, alterando a capacidade reprodutiva.

1321 **Conclusão**

1322 O desafio com duas doses de LPS com intervalo de 24 horas alterou a expressão de um
1323 gene relacionado a produção de prostaglandina e também de um gene relacionado a qualidade
1324 uterina, porém não influenciou a expressão de genes avaliados no oviduto.

1325 *Conflito de interesses*

1326 Os autores declaram que não há conflito de interesses.

1327 *Agradecimentos*

1328 Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
1329 Tecnológico-(CNPq), bem como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
1330 Superior (CAPES), pela concessão de bolsas. Além disso agradecemos ao Frigorífico
1331 Espinilho pela concessão dos animais para realização do estudo.

1332 **Referencias**

1333 Bai, R., Kusama, K., Sakurai, T., Bai, H., Wang, C., Zhang, J., Kuse, M., Ideta, A., Aoyagi,
1334 Y., Okuda, K., and Imakawa, K. (2015) The Role of Endometrial Selectins and Their Ligands
1335 on Bovine Conceptus Attachment to the Uterine Epithelium During Peri-Implantation Period.
1336 *Biol Reprod* 93(2), 46.

1337 Baithalu, R.K., Singh, S.K., Kumaresan, A., Mohanty, A.K., Mohanty, T.K., Kumar, S.,
1338 Kerketta, S., Maharana, B.R., Patbandha, T.K., Attupuram, N., and Agarwal, S.K. (2017)
1339 Transcriptional abundance of antioxidant enzymes in endometrium and their circulating levels
1340 in Zebu cows with and without uterine infection. *Anim Reprod Sci* 177, 79-87.

- 1341 Bertani, B., and Ruiz, N. (2018) Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal*
1342 Plus 8(1).
- 1343 Bidne, K.L., Dickson, M.J., Ross, J.W., Baumgard, L.H., and Keating, A.F. (2018) Disruption
1344 of female reproductive function by endotoxins. *Reproduction* 155(4), R169-R181.
- 1345 Bilal, M.S., Abaker, J.A., Ul Aabdin, Z., Xu, T., Dai, H., Zhang, K., Liu, X., and Shen, X.
1346 (2016) Lipopolysaccharide derived from the digestive tract triggers an inflammatory response
1347 in the uterus of mid-lactating dairy cows during SARA. *BMC Vet Res* 12(1), 284.
- 1348 Calloni, R., Cordero, E.A., Henriques, J.A., and Bonatto, D. (2013) Reviewing and updating
1349 the major molecular markers for stem cells. *Stem Cells Dev* 22(9), 1455-76.
- 1350 Campos, C.C., Hartling, I., Kaur, M., Fernandes, A.C.C., Santos, R.M., and Cerri, R.L.A.
1351 (2018) Intramammary infusion of lipopolysaccharide promotes inflammation and alters
1352 endometrial gene expression in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 101(11), 10440-10455.
- 1353 Campos, F.T., Rincon, J.A.A., Acosta, D.A.V., Silveira, P.A.S., Pradieé, J., Correa, M.N.,
1354 Gasperin, B.G., Pfeifer, L.F.M., Barros, C.C., Pegoraro, L.M.C., and Schneider, A. (2017)
1355 The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL
1356 components and gene expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle.
1357 *Theriogenology* 89, 244-249.
- 1358 Cronin, J.G., Turner, M.L., Goetze, L., Bryant, C.E., and Sheldon, I.M. (2012) Toll-like
1359 receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are
1360 essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine
1361 endometrium. *Biol Reprod* 86(2), 51.
- 1362 Crowley, L.C., and Waterhouse, N.J. (2016) Detecting Cleaved Caspase-3 in Apoptotic Cells
1363 by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* 2016(11).
- 1364 da Rosa, P., Dau, A., De Cesaro, M.P., Dos Santos, J.T., Gasperin, B.G., Duggavathi, R.,
1365 Bordignon, V., and Goncalves, P. (2016) Mechanistic target of rapamycin is activated in
1366 bovine granulosa cells after LH surge but is not essential for ovulation. *Reprod Domest Anim*
1367 51(5), 766-73.
- 1368 Fernandes, A.C.C., Davoodi, S., Kaur, M., Veira, D., Melo, L.E.H., and Cerri, R.L.A. (2019)
1369 Effect of repeated intravenous lipopolysaccharide infusions on systemic inflammatory

- 1370 response and endometrium gene expression in Holstein heifers. *J Dairy Sci* 102(4), 3531-
1371 3543.
- 1372 Gargett, C.E., and Healy, D.L. (2011) Generating receptive endometrium in Asherman's
1373 syndrome. *J Hum Reprod Sci* 4(1), 49-52.
- 1374 Habibi, R., Hosseini, S.M., Zadegan, F.G., Hajian, M., Ostadhosseini, S., Vash, N.T.,
1375 Naddafpour, A., and Nasr Esfahani, M.H. (2018) Functional characterization of NANOG in
1376 goat pre-implantation embryonic development. *Theriogenology* 120, 33-39.
- 1377 Helliwell, R.J., Adams, L.F., and Mitchell, M.D. (2004) Prostaglandin synthases: recent
1378 developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(2), 101-
1379 13.
- 1380 Herath, S., Fischer, D.P., Werling, D., Williams, E.J., Lilly, S.T., Dobson, H., Bryant, C.E.,
1381 and Sheldon, I.M. (2006) Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial
1382 cells of the uterus. *Endocrinology* 147(1), 562-70.
- 1383 Ibrahim, S., Salilew-Wondim, D., Rings, F., Hoelker, M., Neuhoff, C., Tholen, E., Looft, C.,
1384 Schellander, K., and Tesfaye, D. (2015) Expression pattern of inflammatory response genes
1385 and their regulatory micornas in bovine oviductal cells in response to lipopolysaccharide:
1386 implication for early embryonic development. *PLoS One* 10(3), e0119388.
- 1387 Ilha, G.F., Rovani, M.T., Gasperin, B.G., Antoniazzi, A.Q., Goncalves, P.B., Bordignon, V.,
1388 and Duggavathi, R. (2015) Lack of FSH support enhances LIF-STAT3 signaling in granulosa
1389 cells of atretic follicles in cattle. *Reproduction* 150(4), 395-403.
- 1390 Jaenisch, R., and Young, R. (2008) Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and
1391 nuclear reprogramming. *Cell* 132(4), 567-82.
- 1392 Jordaens, L., Van Hoeck, V., Maillo, V., Gutierrez-Adan, A., Marei, W.F.A., Vlaeminck, B.,
1393 Thys, S., Sturmey, R.G., Bols, P.E.J., and Leroy, J. (2017) Maternal metabolic stress may
1394 affect oviduct gatekeeper function. *Reproduction* 153(6), 759-773.
- 1395 Killeen, A.P., Morris, D.G., Kenny, D.A., Mullen, M.P., Diskin, M.G., and Waters, S.M.
1396 (2014) Global gene expression in endometrium of high and low fertility heifers during the
1397 mid-luteal phase of the estrous cycle. *BMC Genomics* 15, 234.
- 1398 Li, S., and Winuthayanon, W. (2017) Oviduct: roles in fertilization and early embryo
1399 development. *J Endocrinol* 232(1), R1-R26.

- 1400 Lupicka, M., Bodek, G., Shpigel, N., Elnekave, E., and Korzekwa, A.J. (2015) Identification
1401 of pluripotent cells in bovine uterus: in situ and in vitro studies. *Reproduction* 149(4), 317-27.
- 1402 Marini, M.G., Perrini, C., Esposti, P., Corradetti, B., Bizzaro, D., Riccaboni, P., Fantinato, E.,
1403 Urbani, G., Gelati, G., Cremonesi, F., and Lange-Consiglio, A. (2016) Effects of platelet-rich
1404 plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*
1405 14(1), 58.
- 1406 Mateus, L., Lopes da Costa, L., Diniz, P., and Ziecik, A.J. (2003) Relationship between
1407 endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy
1408 cows with puerperal endometritis. *Anim Reprod Sci* 76(3-4), 143-54.
- 1409 McDougall, S., Hussein, H., Aberdein, D., Buckle, K., Roche, J., Burke, C., Mitchell, M., and
1410 Meier, S. (2011) Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores
1411 and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology* 76(2), 229-240.
- 1412 Menchetti, L., Barbato, O., Filipescu, I.E., Traina, G., Leonardi, L., Polisca, A., Troisi, A.,
1413 Guelfi, G., Piro, F., and Brecchia, G. (2018) Effects of local lipopolysaccharide
1414 administration on the expression of Toll-like receptor 4 and pro-inflammatory cytokines in
1415 uterus and oviduct of rabbit does. *Theriogenology* 107, 162-174.
- 1416 Neira, J.A., Tainturier, D., Pena, M.A., and Martal, J. (2010) Effect of the association of IGF-
1417 I, IGF-II, bFGF, TGF-beta1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos
1418 produced in vitro. *Theriogenology* 73(5), 595-604
- 1419 Ning, L.T., Dong, G.Z., Ao, C., Zhang, D.G., Erdene, K., Zhang, F.Q., Wen, J., and Zhang,
1420 T.L. (2018) Effects of continuous low dose infusion of lipopolysaccharide on inflammatory
1421 responses, milk production and milk quality in dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*
1422 102(1), e262-e269
- 1423 O'Doherty, A.M., Di Fenza, M., and Kolle, S. (2016) Lipopolysaccharide (LPS) disrupts
1424 particle transport, cilia function and sperm motility in an ex vivo oviduct model. *Sci Rep* 6,
1425 24583.
- 1426 Opsomer, G., Grohn, Y.T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H., and de Kruif, A. (2000) Risk
1427 factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field
1428 study. *Theriogenology* 53(4), 841-57.

- 1429 Parraguez, V.H., Urquieta, B., Pérez, L., Castellaro, G., De los Reyes, M., Torres-Rovira, L.,
1430 Aguado-Martínez, A., Astiz, S., and González-Bulnes, A. (2013) Fertility in a high-altitude
1431 environment is compromised by luteal dysfunction: the relative roles of hypoxia and oxidative
1432 stress. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 11, 24-24.
- 1433 Parent, J., and Fortier, M.A. (2005) Expression and contribution of three different isoforms of
1434 prostaglandin E synthase in the bovine endometrium. *Biol Reprod* 73(1), 36-44.
- 1435 Poyser, N.L. (1995) The control of prostaglandin production by the endometrium in relation
1436 to luteolysis and menstruation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 53(3), 147-95.
- 1437 Rovani, M.T., Ilha, G.F., Gasperin, B.G., Nobrega, J.E., Jr., Siddappa, D., Glanzner, W.G.,
1438 Antoniazzi, A.Q., Bordignon, V., Duggavathi, R., and Goncalves, P.B.D. (2017)
1439 Prostaglandin F2alpha-induced luteolysis involves activation of Signal transducer and
1440 activator of transcription 3 and inhibition of AKT signaling in cattle. *Mol Reprod Dev* 84(6),
1441 486-494.
- 1442 Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A.N., Pfeiffer, D.U., and Dobson, H. (2002) Influence
1443 of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and
1444 follicle growth and function in cattle. *Reproduction* 123(6), 837-45.
- 1445 Silva, E., Gaivao, M., Leitao, S., Amaro, A., Costa, L.L., and Mateus, L. (2008) Blood COX-
1446 2 and PGES gene transcription during the peripartum period of dairy cows with normal
1447 puerperium or with uterine infection. *Domest Anim Endocrinol* 35(3), 314-23.
- 1448 Silva, E., Leitao, S., Henriques, S., Kowalewski, M.P., Hoffmann, B., Ferreira-Dias, G., da
1449 Costa, L.L., and Mateus, L. (2010) Gene transcription of TLR2, TLR4, LPS ligands and
1450 prostaglandin synthesis enzymes are up-regulated in canine uteri with cystic endometrial
1451 hyperplasia-pyometra complex. *J Reprod Immunol* 84(1), 66-74.
- 1452 Slama, H., Vaillancourt, D., and Goff, A.K. (1991) Pathophysiology of the puerperal period:
1453 Relationship between prostaglandin E2 (PGE2) and uterine involution in the cow.
1454 *Theriogenology* 36(6), 1071-1090.
- 1455 Spencer, T.E., Johnson, G.A., Burghardt, R.C., and Bazer, F.W. (2004) Progesterone and
1456 placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol Reprod* 71(1),
1457 2-10.

1458 Stefanska, B., Czlapa, W., Pruszynska-Oszmalek, E., Szczepankiewicz, D., Fievez, V.,

1459 Komisarek, J., Stajek, K., and Nowak, W. (2018) Subacute ruminal acidosis affects
1460 fermentation and endotoxin concentration in the rumen and relative expression of the
1461 CD14/TLR4/MD2 genes involved in lipopolysaccharide systemic immune response in dairy
1462 cows. *J Dairy Sci* 101(2), 1297-1310.

1463 Swangchan-Uthai, T., Lavender, C.R., Cheng, Z., Fouladi-Nashta, A.A., and Wathes, D.
1464 2012) Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to
1465 lipopolysaccharide. *Biol Reprod* 87(6), 135.

1466 Taylor, H.S. (2004) Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow
1467 transplant recipients. *Jama* 292(1), 81-5.

1468 Wallace, R.M., Hart, M.L., Egen, T.E., Schmelzle, A., Smith, M.F., Pohler, K.G., and Green,
1469 J.A. (2019) Bovine pregnancy associated glycoproteins can alter selected transcripts in bovine
1470 endometrial explants. *Theriogenology* 131, 123-132.

1471 Waldron, M.R., Nishida, T., Nonnecke, B.J., and Overton, T.R. (2003) Effect of
1472 lipopolysaccharide on indices of peripheral and hepatic metabolism in lactating cows. *J Dairy*
1473 *Sci* 86(11), 3447-59.

1474 Xiao, L., Song, Y., Huang, W., Yang, S., Fu, J., Feng, X., and Zhou, M. (2017) Expression of
1475 SOX2, NANOG and OCT4 in a mouse model of lipopolysaccharide-induced acute uterine
1476 injury and intrauterine adhesions. *Reprod Biol Endocrinol* 15(1), 14.

1477 Zebeli, Q., Sivaraman, S., Dunn, S.M., and Ametaj, B.N. (2013) Intermittently-induced
1478 endotoxaemia has no effect on post-challenge plasma metabolites, but increases body
1479 temperature and cortisol concentrations in periparturient dairy cows. *Res Vet Sci* 95(3), 1155-
1480 62.

1481 Zhou, H., Chen, S., Wang, W., Wang, Z., Wu, X., and Zhang, Z. (2012) Nanog inhibits
1482 lipopolysaccharide-induced expression of pro-inflammatory cytokines by blocking NF-
1483 kappaB transcriptional activity in rat primary microglial cells. *Mol Med Rep* 5(3), 842-6.

Gene	Sequence 5' → 3'	Access number	Reference
<i>BSG</i>	F: CGCACCGATCTGGAAGTGAA R: AGGATCACAGTCTCCCCCTC	NM_001075371.2	(Wallace <i>et al.</i> 2019)
<i>CASP3</i>	F:TGCAGAAGTCTGACTGGAAAACCCAA AC R: TCATCCTCAGCACCCTGTCTGTCTC	NM_001077840.1	Ilha <i>et al.</i> 2015
<i>GAPDH</i>	F: GATTGTCAGCAATGCCTCCT R: GGTCCATAAGTCCCTCCACGA	NM_001034034.2	Rovani <i>et al.</i> 2017
<i>GPX4</i>	F: ATACGCCGAGTGTGGTTTAC R: CCAGCGGCGAACTCTTT	NM_001039847.3	Baithalu <i>et al.</i> 2017
<i>HSPA1A</i>	F: GGGGAGGACTTCGACAACAG R: GAAGTCGATGCCCTCGAACA	NM_203322.3	Este estudo
<i>IGF2</i>	F: ACCCTCCAGTTTGTCTGTGG R: ACACATCCCTCTCGGACTTG	NM_001367627.1	(Parraguez <i>et al.</i> 2013)
<i>IL10</i>	F: TGCCAAGCCTTGTCGGAAAT R: CTTGTTTTTCGCAGGGCAGAA	NM_174088.1	Este estudo
<i>IL1β</i>	F: GAGAGGGTTTCCATTCTGAAGT R: CATCAGCACTTCTCAAATCGAAGA	NM_174093.1	(Rovani <i>et al.</i> 2017)
<i>MMP19</i>	F: TGGACGTTATCCCCTCAGTC R: GTCCATGGTTCATGCTTGTG	NM_001075983.1	Killeen <i>et al.</i> 2014
<i>NANOG</i>	F: AGTCCCAAACAAAAGCTCTCAAGT R: AGAACACAGTCCGCATCTTCTG	NM_001025344.1	Este estudo
<i>OVGP1</i>	F: AAGAATGAGGCCAGCTCAC R: TGCCGAAGATTTGGGGTCTC	NM_001080216.1	(Jordaens <i>et al.</i> 2017)(
<i>PTGS2</i>	F: TTTGACCCAGAGCTGCTTTT R: GAAAGACGTCAGGCAGAAGG	NM_174445.2	(da Rosa <i>et al.</i> 2016)
<i>RN18S1</i>	F: CCTCCGCGAGGATCCATTG R: CGCTCCCAAGATCCAACACTAC	NR_036642.1	(Rovani <i>et al.</i> 2017)
<i>SELL</i>	F: ACAGCCCTCTGCTACACAGCTTC R: GGGGCCTCCAAAGGCACACA	NM_174182.1	(Bai <i>et al.</i> 2015)
<i>TLR4</i>	F: CTTGCGTACAGGTTGTTCTTAA	NM_174198.6	(Campos <i>et al.</i>

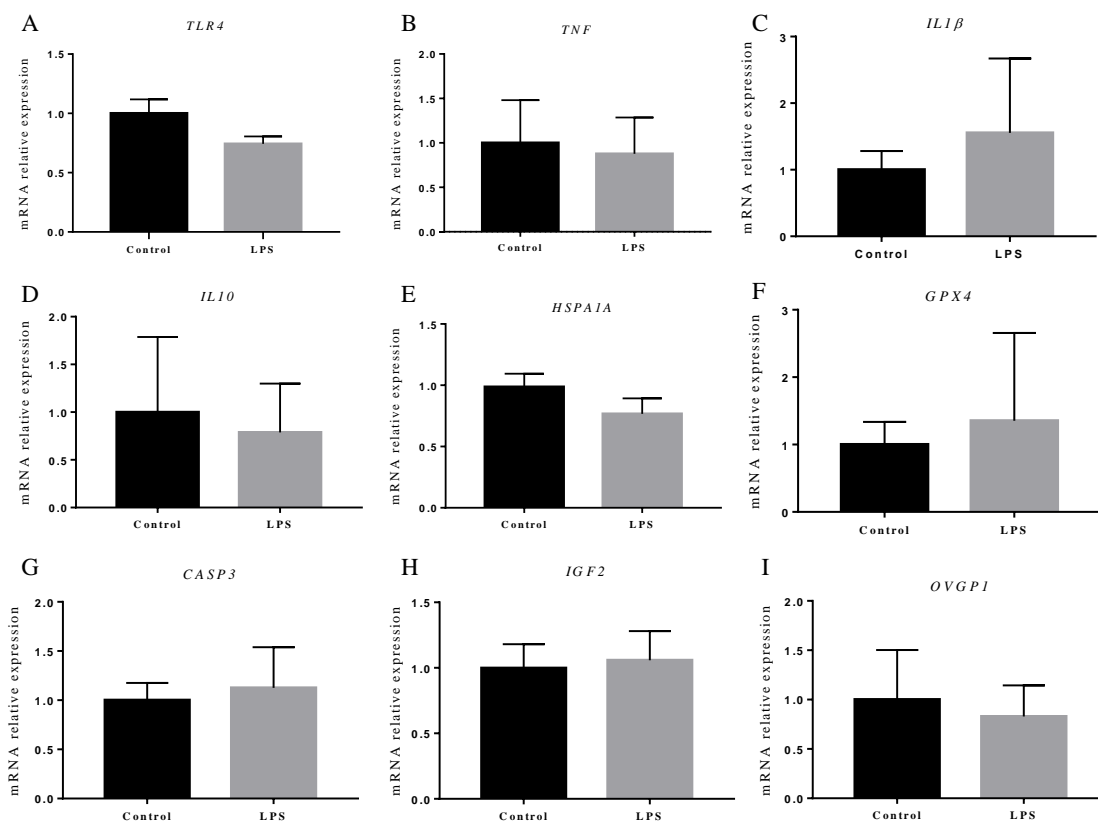
	R: CTGGGAAGCTGGAGAAGTTATG		2017)
<i>TNF</i>	F: AGCACAGAAAGCATGATCCG	NM_173966.3	Campos <i>et al.</i>
	R: CTGATGAGAGGGAGGCCATT		(2017)

1484 **Tabela 1.** Genes e sequências avaliadas nesse estudo.

1485

1486

1487



1488

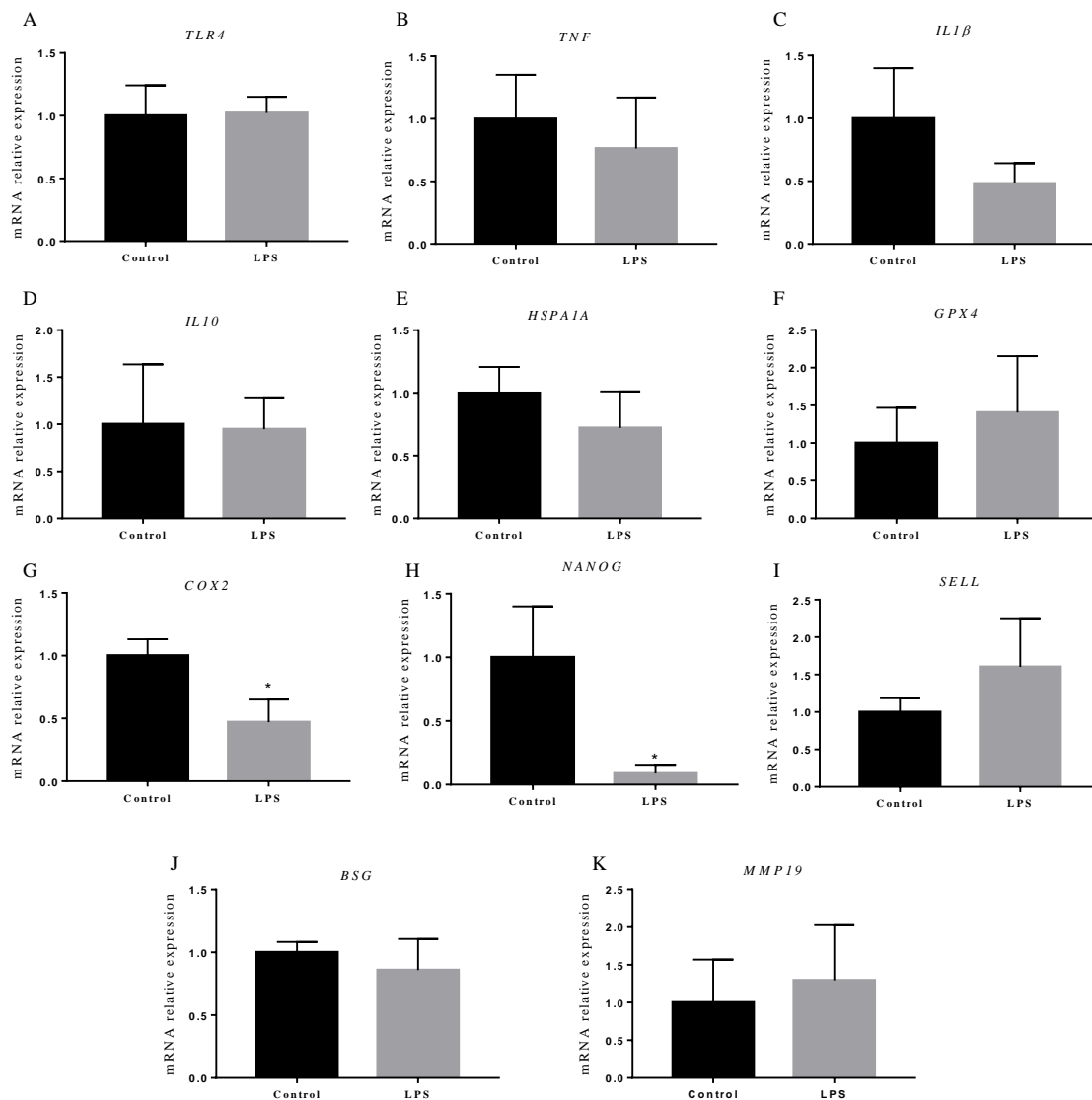
1489

1490

1491

1492

Figure 1. Expressão relativa dos genes TLR4 (A), TNF (B), IL1 β (C), IL10 (D), HSPA1A (E), GPX4 (F), CASP3 (G), IGF2 (H) e OVGPI (I) em o oviduto de novilhas desafiadas (n = 8) ou não (n = 8) com duas doses de LPS (0,5 μ g / kg de peso corporal) com intervalo de 24 horas. A análise da expressão gênica foi realizada usando o teste t. A diferença estatística foi considerada como P <0,05.



1493 **Figura 2.** Expressão relativa de TLR4 (A), TNF (B), IL1 β (C), IL10 (D), HSPA1A (E), GPX4 (F), COX2 (G),
 1494 NANOG (H), SELL (I), BSG (J) e MMP19 (K) no útero de novilhas desafiadas (n = 8) ou não (n = 8) com duas
 1495 doses de LPS (0,5 μ g / kg de peso corporal) com intervalo de 24 horas. A análise da expressão gênica foi
 1496 realizada usando o teste. A diferença estatística foi considerada como P < 0,05.
 1497

1498

1499
1500
1501
1502
1503
1504

Capítulo III

1505 **Efeitos do lipopolissacarídeo sobre a histologia ovariana e expressão de genes associados**
1506 **a reserva folicular**

1507 Artigo será submetido a Revista *Reproduction*

1508 Andressa Stein Maffi¹, Joao Alvarado Rincón², Antônio Amaral², Maria Amélia Weiller³, Rafael Mondadore⁴,
1509 Bernardo Garziera Gasperin², Luis Augusto Xavier Cruz⁴, Augusto Schneider⁵, Marcio Nunes² Correa, Cassio
1510 Cassal Brauner¹

1511 ¹Departamento de Zootecnia, ²Faculdade de Veterinária, ³Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Rio
1512 Grande do Sul, ⁴Instituto de Biologia, ⁵Faculdade de Nutrição

1513

1514 **Resumo**

1515 O objetivo do estudo foi verificar o efeito de duas aplicações de LPS sobre a ativação e
1516 apoptose de folículos primordiais. Foram acompanhadas dez novilhas saudáveis (*Bos taurus*
1517 *taurus*), com aproximadamente 14 meses de idade, manejadas em um sistema confinado e
1518 recebendo uma dieta *total mixed*. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos,
1519 o grupo LPS (n = 5), que recebeu duas aplicações intravenosas de 0,5 µg/kg de peso corporal
1520 de LPS (Sigma Aldrich®) diluído em 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) com intervalo
1521 de 24 h e o grupo controle (n = 5), que recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina
1522 (0,9% de NaCl) no mesmo intervalo. A primeira aplicação de LPS foi realizada no dia 1, e no
1523 dia 5 realizou-se o abate dos animais, pesagem dos ovários e coleta de um fragmento de
1524 ovário destinado a avaliação histológica e um fragmento para a avaliação molecular. Em
1525 relação a avaliação histológica, não houve diferença na população folicular total, bem como
1526 nas diferentes categorias foliculares. Além disso, o desafio com LPS não modulou a
1527 expressão de genes relacionados a reserva ovariana, sobrevivência oocitária, e taxa de
1528 ativação e anormalidade folicular. Concluindo com isso que a exposição de bovinos ao LPS
1529 em intervalos de 24 horas não altera a taxa de ativação e de anormalidade de folículos
1530 primordiais, bem como não afeta a expressão de genes relacionados a reserva ovariana, a
1531 sobrevivência oocitária, e a ativação e anormalidade de folículos primordiais e
1532 antiapoptóticos.

1533 Palavras-chave: Endotoxinas, Inflamação, Reprodução.

1534

1535

1536 **Introdução**

1537 O crescimento rítmico de folículos ovarianos é necessário para o desenvolvimento
1538 contínuo e a ocorrência de ovulação de forma sincronizada em seres humanos e bovinos
1539 (Ginther *et al.*, 1996; Ireland *et al.*, 2000; Baerwald, Adams and Pierson, 2003). A vida útil do
1540 ovário é determinada pelo tamanho do estoque de oócitos presentes no nascimento, bem como
1541 pela taxa na qual essa reserva é esgotada (Morita *et al.*, 2000). Nesse sentido, a morte celular
1542 programada (apoptose), foi identificada como um mecanismo central responsável pela
1543 exaustão de oócitos relacionada à idade, sendo que o equilíbrio entre as moléculas pró-
1544 sobrevivência e pró-apoptótica determina o destino final do folículo (Tilly, 1996; Morita *et*
1545 *al.*, 2000).

1546 Em mulheres a reserva ovariana pode determinar o tempo da menopausa (Hansen *et*
1547 *al.*, 2011), já em bovinos, a senescência não é tão importante, visto que os animais são
1548 vendidos para o abate antes do alcance da mesma. Porém, diversos estudos vêm
1549 demonstrando a relação entre a reserva ovariana e a fertilidade das fêmeas (Evans *et al.*, 2010,
1550 2012; Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Mossa F,
1551 Lonergan P, 2011). Recentemente, pesquisadores forneceram evidências de que a reserva
1552 folicular baixa está associada à fertilidade prejudicada, com taxas de concepção reduzidas
1553 para o primeiro serviço e com maior intervalo entre o parto e a concepção (Evans *et al.*, 2010;
1554 Mossa, S. W. Walsh, S. T. Butler, D. P. Berry, F. Carter, P. Lonergan, G. W. Smith, J. J.
1555 Ireland, 2012).

1556 Estudos recentes vêm demonstrando que a qualidade e vida útil dessa reserva folicular
1557 é grandemente influenciada por processos infecciosos e inflamatórios (Bromfield and
1558 Sheldon, 2013). Neste sentido, na bovinocultura leiteira, desde a fase neonatal os animais são
1559 expostos a quadros de diarreia e broncopneumonia, apresentando posteriormente, na vida
1560 adulta, quadros de mastite, mérito, endometrite e acidoses (Seegers *et al.*, 2003, Gilbert *et al.*,
1561 2005; Haimerl and Heuwieser, 2014; Pederzolli *et al.*, 2018). Já na bovinocultura de corte, os
1562 principais desafios da vida adulta referem-se a broncopneumonias e acidoses (Härtel *et al.*,
1563 2004; Nagaraja and Lechtenberg, 2007). Essas enfermidades tem o envolvimento de bactérias,

1564 destacando-se as bactérias gram-negativas, sendo que a multiplicação ou morte dessas
1565 bactérias ocasiona a liberação de um constituinte de sua membrana, o lipopolissacarídeo
1566 (LPS). O LPS tem capacidade de migrar para a corrente circulatória, onde é reconhecido pelos
1567 receptores de membrana tipo Toll 4 (TLR4) e desencadeia uma resposta inflamatória, marcada
1568 pela produção de citocinas (Eckel and Ametaj, 2016). Além disso, o LPS pode ser
1569 transportado a tecidos periféricos depositando-se no ovário, onde produz uma resposta
1570 inflamatória local, e altera o crescimento e a função endócrina dos folículos antrais (Sheldon
1571 *et al.*, 2002; Herath *et al.*, 2007; Williams, Sibley, Miller, Lane, Fishwick, Nash, Herath, Gary
1572 C. W. England, *et al.*, 2008; Bromfield and Sheldon, 2011; Lavon *et al.*, 2011).

1573 No entanto, acredita-se que os efeitos desencadeados por essas endotoxinas e pelo
1574 processo inflamatório, tem efeitos crônicos visto que 60-80 dias após a ocorrência da
1575 enfermidade os animais ainda apresentam decréscimo no desempenho reprodutivo (Sheldon *et*
1576 *al.*, 2009; Hertl *et al.*, 2010; Hudson *et al.*, 2012). Nesse sentido, o estudo de Bromfield and
1577 Sheldon, (2013) demonstrou que animais expostos ao LPS tem um aumento na taxa de
1578 apoptose e na taxa de ativação folicular, podendo levar a um esgotamento da reserva folicular
1579 de forma precoce. Além disso, o cultivo *in vitro* de tecido ovariano em meio contendo fator de
1580 necrose tumoral alfa (TNF- α), promove a maior vacuolização do núcleo do oócito,
1581 demonstrando a atuação dessa citocina na apoptose (Silva *et al.*, 2017).

1582 No entanto, ainda são poucos os estudos em bovinos *in vivo* que avaliam os efeitos do
1583 lipopolissacarídeo sobre a reserva ovariana. Com isso, o objetivo do presente estudo foi
1584 verificar a atuação do LPS sobre a ativação e apoptose de folículos primordiais, bem como
1585 sobre as demais classes foliculares.

1586 **Materiais e Métodos**

1587 Foram acompanhadas quatorze novilhas saudáveis (*Bos taurus taurus*), com
1588 aproximadamente 14 meses de idade, manejadas em um sistema confinado e recebendo uma
1589 dieta *total mixed*. Todos os animais foram submetidos a um protocolo de sincronização da
1590 onda folicular, onde quatorze dias antes do início do protocolo de sincronização foi aplicado
1591 25 mg de prostaglandina (PGF2 α) (i.m., Lutalyse®; Zoetis, São Paulo, Brasil) em todas as
1592 novilhas. No dia zero do protocolo (D0), as novilhas receberam um dispositivo intravaginal
1593 de liberação lenta de progesterona (1,9 g, CIDR®, Zoetis®), 2 mg de benzoato de estradiol
1594 (Gonadiol, Zoetis®) i.m. e 25 mg de PGF2 α (Lutalyse®, Zoetis) i.m. O dispositivo
1595 intravaginal foi removido no D5 (Cavaliere *et al.*, 2018). As novilhas foram divididas

1596 aleatoriamente em dois grupos, o grupo LPS (n = 8), que recebeu duas aplicações
1597 intravenosas de 0,5 µg / kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich®) diluído em 2 mL de
1598 solução salina (0,9% de NaCl) com intervalo de 24 h e o grupo controle (n = 6), que recebeu
1599 duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) no mesmo intervalo. A dose e o
1600 intervalo de LPS foram escolhidos de acordo com a menor dose de LPS que demonstrou gerar
1601 uma resposta inflamatória em bovinos anteriormente (Waldron *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*,
1602 2019). A primeira aplicação de LPS foi realizada no dia 1, e no dia 5 realizou-se o abate dos
1603 animais, pesagem dos ovários e coleta de um fragmento destinado a avaliação histológica, o
1604 qual foi armazenado em solução de formaldeído e um fragmento para a avaliação molecular
1605 que foi coletado em criotubos, homogeneizado em um mixer com 0,5 ml de trizol
1606 (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) e armazenado em nitrogênio líquido até as análises de
1607 expressão gênica.

1608 *Avaliação histológica e classificação folicular*

1609 Para análise histológica, os ovários foram removidos do formaldeído, desidratados em
1610 álcool, limpos em xilol e incorporados em Paraplast Plus® (Sigma Chemical Company®, St.
1611 Louis, MO, EUA). Os ovários incorporados no Paraplast Plus® foram cortados
1612 sequencialmente a 5 µm em um micrótomo (RM2245, Leica Biosystems, San Diego, CA,
1613 USA) e foram coletadas amostras a cada 120 seções histológicas. As lâminas, foram secadas
1614 em estufa a 56 °C por 24 h e coradas com hematoxilina-eosina. Posteriormente, imagens do
1615 ovário foram capturadas com aumentos de 10 x por uma câmera acoplada a um microscópio
1616 (Nikon Eclipse E200, Nikon Corporation, Japan) usando o software Motic Image Plus 2.0
1617 (Motic®, Hong Kong, China).

1618 Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com o estágio de
1619 desenvolvimento como primordial (uma camada única de células da granulosa achatadas ao
1620 redor do oócito), primordial em transição (células de granulosa achatadas e cuboidais ao redor
1621 do oócito) primário (uma camada única de células da granulosa cuboidais ao redor do oócito)
1622 ou secundário (mais de uma camada de células da granulosa cuboidais circundando o oócito)
1623 (Hulshof *et al.*, 1994). Os folículos foram considerados degenerados se apresentassem um ou
1624 mais dos seguintes aspectos: núcleo do oócito condensado, oócito encolhido, corpos
1625 picnóticos nas células da granulosa ou desintegração de membrana basal (Silva-Santos *et al.*,
1626 2011). Foram contados apenas os folículos que apresentavam o núcleo no corte a fim de evitar
1627 a repetição da contagem do mesmo folículo, sendo realizada uma medição horizontal e

1628 vertical do folículo e também do núcleo do oócito, para obtenção da média aritmética
1629 posterior. O núcleo do oócito foi utilizado como marcador, de acordo com o fator de correção
1630 descrito por (Gougeon and Chainy, 1987) e a seguinte fórmula $Nt = No \times St \times Ts / So \times Do$.
1631 Sendo o Nt: Número total estimado de folículos de cada categoria; No: Número de folículos
1632 observados no ovário; St: Número total de cortes realizados no ovário; Ts: Espessura do corte;
1633 So: Número total de cortes observados e Do: Diâmetro médio do núcleo.

1634 *Avaliação molecular*

1635 O RNA total do tecido ovariano foi extraído utilizando reagente Trizol (Invitrogen®)
1636 conforme as recomendações do fabricante. A concentração de RNA foi mensurada em
1637 espectrofotômetro (Nanodrop Lite, Thermo Fischer Scientific Inc., USA) e a pureza foi
1638 verificada através da relação de absorbância 260/280 nm. A transcrição reversa foi conduzida
1639 com 1 µg de RNA total no volume de reação de 20 µL, utilizando kit comercial (iScript
1640 Synthesis kit, BIORAD®, Hercules, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante.
1641 Para a reação foi utilizado termociclador empregando os seguintes parâmetros de ciclagem:
1642 25 °C por 5 min, 42 °C por 20 min e 95 °C por 1 min.

1643 A PCR em tempo real foi conduzida utilizando o reagente GoTaq (GoTaq® qPCR
1644 Master Mix, Promega, Madison, WI, USA) no volume de 15 µL em termociclador
1645 *StepOnePlus* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cada reação foi realizada em
1646 duplicata, usando 4 µL do cDNA (20 ng), 5 µL de GoTaq, 0,75 µL de cada *primer* (5 µM) e
1647 4,5 µL de água ultrapura. Para cada ensaio foram realizados 45 ciclos (95 °C por 15 seg e 60
1648 °C por 1 min) e no final de cada reação foi realizada uma curva de dissociação (*Melting*) para
1649 conferir a amplificação de um único produto de PCR.

1650 Os genes H2A clustered histone 6 (H2AC6), 18S ribosomal RNA (RN18S1),
1651 ubiquitously expressed prefoldin like chaperone (UXT) e glyceraldehyde-3-phosphate
1652 dehydrogenase (GAPDH) foram usados como controle endógeno e os genes alvo foram
1653 associados à ativação de folículos primordiais phosphatase and tensin homolog (PTEN),
1654 phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1), proto-oncogene, receptor tyrosine
1655 kinase (*KIT*), KIT ligand (*KITLG*), KIT ligand 2 (*KITL2*), sirtuin 1 (*SIRT1*) AKT
1656 serine/threonine kinase 1 (*AKT1*) anti-Mullerian hormone (*AMH*) e mechanistic target of
1657 rapamycin kinase (*MTOR*), e survivin (*SURVIVIN*). As sequências dos *primers* estão descritas
1658 na tabela 1.

1659 O coeficiente de variação foi inferior a 5% para todos os pares de iniciadores
1660 utilizados. A expressão relativa foi calculada a partir da equação $2^{A-B}/2^{C-D}$, em que A é o valor
1661 limiar do ciclo (Ct) para o gene de interesse na primeira amostra do controle; B, o valor de Ct
1662 para o gene de interesse na amostra analisada; C, o valor de Ct para o gene endógeno (média
1663 geométrica dos genes *H2AC6*, *RN18S1*, *UXT* e *GAPDH*) na primeira amostra do controle e
1664 D, o número Ct para o gene endógeno na amostra analisada. A primeira amostra do controle
1665 foi expressa como 1,00 por esta equação, e todas as outras amostras foram calculadas em
1666 relação a este valor. Depois disso, os resultados do grupo controle foram ponderadas, e todos
1667 os outros resultados foram divididos pelo valor médio da expressão relativa no grupo
1668 controle, para se obter a mudança na expressão dos genes de interesse em comparação com o
1669 grupo de controle (*fold change*) (Masternak *et al.*, 2005).

1670 *Análise estatística*

1671 Os dados referentes a análise histológica e de expressão foram analisados através do
1672 test t no programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Foi
1673 considerado como diferença estatística valores de $P < 0,05$. Animais que apresentaram uma
1674 população folicular total acima de 300.000, foram excluídos das análises, sendo 3 animais do
1675 grupo LPS e 1 do grupo controle

1676 **Resultados**

1677 *Avaliação histológica*

1678 Em relação a avaliação histológica, não houve diferença na população folicular total
1679 (Controle: $110.072,5 \pm 15.997,67$; LPS: $98.485,73 \pm 17.885,94$; $p = 0,64$), bem como nas diferentes
1680 categorias foliculares conforme descrito na tabela 2.

1681 Da mesma forma, a porcentagem de folículos em cada categoria foi semelhante entre os
1682 grupos avaliados (tabela 3). Além disso, podemos observar que a frequência de folículos saudáveis
1683 foi semelhante entre os grupos controle e LPS, sendo de 66,49% nos animais do grupo controle e
1684 66,35 % nos animais do grupo LPS.

1685 *Avaliação molecular*

1686 Os genes avaliados relacionados à ativação folicular a sobrevivência oocitária a
1687 reserva ovariana e antiapoptótico não apresentaram diferença (figura 1).

1688 **Discussão**

1689 O número de gametas do ovário é finito, sendo que o tamanho da reserva ovariana, e a
1690 taxa de atresia e de ativação dos folículos primordiais são determinantes para vida reprodutiva
1691 da fêmea. Com base nos resultados demonstrados por Bromfield and Sheldon, (2013)
1692 acreditávamos que a exposição ao LPS, fosse capaz de desencadear uma maior taxa de
1693 anormalidade folicular e também de passagem de folículos primordiais para primordiais em
1694 transição, sendo ambos efeitos ocasionados diretamente pelo LPS e pelos mediadores
1695 inflamatórios.

1696 A ligação dos Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou do LPS aos
1697 Toll Like Receptores (TLRs) estimula a produção de citocinas como a interleucina-1 α e β
1698 (IL1- α e β), interleucina- 6 (IL6), interleucina- 8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa
1699 (TNF- α) na corrente circulatória (Beutler, 2009; Takeuchi and Akira, 2010) e também
1700 localmente no ovário, as quais parecem atuar elevando a taxa de atresia e de ativação folicular
1701 (Bromfield and Sheldon, 2013; Passos *et al.*, 2016). A partir dessa hipótese, buscamos
1702 investigar alguns genes envolvidos no processo de ativação de folículos primordiais (KIT,
1703 KITL1, KITL2, AKT1, SIRT1) e de inibição da ativação (PTEN) (Liu *et al.*, 2006; Reddy *et*
1704 *al.*, 2008), bem como um gene indicador da reserva ovariana (HAM) e também um gene
1705 antiapoptótico (Survivin).

1706 Em nosso estudo apesar do desencadeamento da resposta sistêmica, caracterizada por
1707 febre e leucopenia (Maffi 2020, dados não publicados), o desafio com LPS não alterou a
1708 expressão dos genes relacionados a anormalidade e a ativação folicular, assim como não
1709 modificou a porcentagem de folículos atrésicos e a taxa de ativação folicular avaliados
1710 histologicamente. Os resultados da expressão de HAM corroboram os resultados encontrados
1711 na histologia, visto que esse hormônio é secretado a partir das células da granulosa dos
1712 folículos ovarianos e vem sendo estudado como um marcador endócrino capaz de estimar a
1713 reserva ovariana (Ireland and Mossa, 2018).

1714 A ativação de folículos primordiais é caracterizada morfológicamente, pela transição
1715 da camada epitelial plana para células da granulosa cuboidais, sendo esse processo
1716 independente das gonadotrofinas e estando algumas vias envolvidas, como a PI3K-AKT-
1717 mTORC (Adhikari *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). Esse processo, requer acúmulo de
1718 fosfatidilinositol-isofosfato (PIP3), que causa o estímulo de PI3K e promove a fosforilação de
1719 Akt, resultando na indução de crescimento e maturação meiótica de oócitos (Hoshino *et al.*,
1720 2004; Kalous *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2016). O estímulo do mTORC promove por sua vez a

1721 síntese de proteínas, biogênese de lipídios e nucleotídeos (revisado em Guo and Yu, 2019)
1722 sendo que a superativação da via de sinalização PI3K / Akt / mTOR, tem sido implicada na
1723 ativação prematura de folículos primordiais, levando a atresia folicular precoce (McLaughlin
1724 and Sobinoff, 2010; Sobinoff *et al.*, 2010, 2011). Participam ainda da via de ativação os
1725 fatores de crescimento KIT, KITL1 e KTL2, que estimulam a via AKT/PI3K (Reddy *et al.*,
1726 2005; Jones and Pepling, 2013; Cavalcante *et al.*, 2016). Por outro lado, a proteína PTEN, que
1727 é uma fosfatase lipídica, atua inibindo a ativação dessa via (Reddy *et al.*, 2008), através da
1728 transformação de PIP3 em PIP2, mantendo os folículos em repouso e reduzindo a proliferação
1729 celular (Wang *et al.*, 2016). Nesse sentido a deleção específica de PTEN de oócitos no estágio
1730 primordial em camundongos, permite que ocorra acúmulo de PIP3 o que desencadeia à
1731 ativação global de todos esses folículos (Reddy *et al.*, 2008).

1732 Diferente de nossos resultados, Bromfield and Sheldon, (2013) observaram que o
1733 cultivo *in vitro* de córtex ovariano de bovinos com 10 µg/mL de LPS durante 6 dias,
1734 promoveu a expressão reduzida da PTEN, associada a uma maior ativação folicular. Nesse
1735 estudo ocorreu uma maior porcentagem de folículos que passaram da fase folicular para a fase
1736 primária, sendo 56% superior no grupo exposto ao LPS quando comparado ao grupo controle,
1737 também houve um maior número de folículos no grupo desafiado com LPS que passaram da
1738 fase primária para a fase secundária, sendo 17% superior. Além disso, em um estudo anterior
1739 (Bromfield and Sheldon, 2011) constataram uma diminuição da competência meiótica
1740 oocitária em folículos desafiados por LPS *in vitro*. Da mesma forma em camundongos o
1741 tratamento com LPS ocasionou a redução da reserva folicular (Wu *et al.*, 2011; Sominsky *et*
1742 *al.*, 2012). No estudo de Fuller *et al.*, (2017), a exposição de camundongos ao LPS 3 ou 5 dias
1743 após o nascimento, gerou uma redução no número de folículos primordiais nos animais
1744 expostos ao LPS no dia 5 pós nascimento, e uma maior proporção de folículos primordiais
1745 ativados tanto nos animais expostos no dia 3 quanto no dia 5. Ainda nesse estudo os autores
1746 observaram a alteração na expressão de 29 proteínas nos animais desafiados no dia 5 em
1747 relação aos animais controle, as quais relacionavam-se a resposta de fase aguda, respostas
1748 imunes inatas, metabolismo de aminoácidos e lipídios, transporte molecular. movimento
1749 celular, sinalização e sobrevivência.

1750 Além da ativação folicular, estudos prévios demonstram a maior ocorrência de
1751 apoptose em animais expostos ao LPS. Nesse sentido, Bromfield and Sheldon,
1752 (2013)(Bromfield and Sheldon, 2013) ao desafiarem camundongos *in vivo* com LPS,
1753 encontraram uma elevação na atresia folicular, passando de 3% para 9,8%, sendo este evento

1754 mediado pela resposta inflamatória, visto que camundongos nocaute para TLR4 não
1755 apresentaram essa elevação. A atresia folicular é mediada pelo envolvimento de ligantes como
1756 por exemplo, o TNF- α e o interferon ou pela via mitocondrial na qual os membros da família
1757 Bcl-2 desempenham um papel importante (Hussein, Haemel and Wood, 2003; Hussein,
1758 2005). Sendo demonstrado *in vitro*, que o TNF- α pode diminuir o número de oócitos e
1759 folículos primordiais, por indução de apoptose (Morrison and Marcinkiewicz, 2002). URI-
1760 BELAPOLSKY et al., (2014) demonstrou que camundongos sem receptores para IL1- α
1761 apresentam uma maior expressão da proteína Bcl-2 antiapoptótica e menores níveis das
1762 proteínas proapoptóticas, Bax e PARP no ovário, indicando que essa citocina participa do
1763 processo de apoptose. A ligação dessas citocinas aos receptores inicia a sinalização e
1764 transmissão dos sinais apoptóticos recrutando caspases.

1765 O desafio com LPS também não influenciou a proporção de folículos nas demais
1766 populações foliculares e o número de folículos atrésicos. Em estudos *in vivo* tem sido
1767 demonstrado que o LPS, tem uma forte atuação sobre folículos antrais, alterando a produção
1768 de hormônios (Sheldon *et al.*, 2002; Herath *et al.*, 2007; Williams, Sibley, Miller, Lane,
1769 Fishwick, Nash, Herath, Gary C.W. England, *et al.*, 2008; Bromfield and Sheldon, 2011;
1770 Lavon *et al.*, 2011) no entanto parece haver uma maior resistência a apoptose de folículos
1771 antrais a apoptose quando comparado a folículos pré-antrais (Bromfield and Sheldon, 2013).

1772 A discrepância de nossos resultados quanto aos estudos já realizados *in vitro* com
1773 ovários de bovinos e de camundongos e com camundongos *in vivo*, devem-se provavelmente
1774 a forma de exposição dessas estruturas ao LPS e a dose utilizada. Nos estudos *in vitro* tem-se
1775 a exposição constante dos folículos ao LPS e também as citocinas inflamatórias, e além disso,
1776 as doses utilizadas são superiores as que ocorrem de forma natural, visto que *in vivo* o
1777 organismo lança mão de mecanismos para eliminar essas endotoxinas, como a destoxicação
1778 que ocorre no fígado (Jirillo *et al.*, 2002). A dose preconizada em nosso estudo, baseou-se em
1779 pesquisas prévias (Waldron *et al.*, 2003) que demonstravam que 0,5 ug/Kg já promoviam a
1780 ativação das células de defesa e uma resposta sistêmica, sendo que os resultados de
1781 temperatura comprovam que a dose utilizada foi eficiente (Maffi 2020, dados não
1782 publicados).

1783 Além disso, a grande variação individual na população folicular total que ocorre em
1784 bovinos (Erickson, 1966; Silva-Santos *et al.*, 2011) e que também foi observada em nosso
1785 estudo, é outro fator que dificulta a obtenção de resultados mais claros. Nesse sentido,

1786 (Erickson, 1966) em seu estudo demonstrou que animais de 0 a 24 meses apresentaram uma
1787 variação de 0 à 700.000 células germinativas. Além disso, o número total de folículos
1788 permanece semelhante até em torno de 4-6 meses, reduzindo progressivamente após esse
1789 período (Erickson, 1966). Essa variação já é amplamente relatada e relacionada ao menor ou
1790 maior desempenho dos animais em protocolos de biotécnicas reprodutivas (Ireland and
1791 Mossa, 2018), sendo que diversos estudos buscam encontrar marcadores que indiquem de
1792 forma indireta a população de células germinativas.

1793 Em nosso estudo podemos observar que a porcentagem de folículos saudáveis foi
1794 semelhante entre os grupos, ficando acima de 60% em ambos. Segundo o estudo de Erickson,
1795 (1966) até os 180 dias de vida os folículos primordiais apresentam uma alta qualidade,
1796 reduzindo progressivamente a partir disso e chegando ao ponto de quase todos estarem
1797 degenerados aos 4 anos de idade, indicando com isso, que em nosso estudo o LPS não
1798 intensificou a taxa de atresia. Erickson, (1966) relatou ainda que a partir dos 240 dias de
1799 idade, 70% dos folículos primordiais apresentavam-se em atresia, e aos 12 meses a atresia
1800 chegava a 73%.

1801 Na bovinocultura leiteira e de corte, exposições à bactérias são comuns ao longo da
1802 vida dos animais, e a partir de nosso estudo podemos observar que exposições agudas com
1803 curta duração não parecem exercer efeito sobre a taxa de ativação e a anormalidade folicular.
1804 No entanto, vale ressaltar que em quadros infecciosos e metabólicos a exposição a essas
1805 endotoxinas se dá por um período mais prolongado, variando conforme o início do tratamento
1806 dos animais. Com isso faz-se necessário maiores estudos para compreender os prejuízos do
1807 LPS e das citocinas inflamatórias na reserva ovariana de bovinos.

1808 **Conclusão**

1809 A exposição de novilhas de corte ao LPS em intervalos de 24 horas não foi capaz de
1810 alterar a taxa de ativação e de anormalidade de folículos primordiais, bem como não afeta a
1811 expressão de genes antiapoptótico e relacionados a ativação e inibição de folículos
1812 primordiais.

1813 *Conflito de interesses*

1814 Os autores declaram que não há conflito de interesses.

1815 *Agradecimentos*

1816 Os autores agradecem o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-
1817 (CNPq), bem como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
1818 (CAPES), pela concessão de bolsas. Além disso agradecemos ao Frigorífico Espinilho pela
1819 concessão dos animais para realização do estudo.

1820 **Referências**

1821 Adhikari, D. *et al.* (2010) ‘Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and
1822 activation of primordial follicles’, *Human Molecular Genetics*, 19(3), pp. 397–410. doi:
1823 10.1093/hmg/ddp483.

1824 Andrade, G. M. *et al.* (2017) ‘The role of the PI3K-Akt signaling pathway in the
1825 developmental competence of bovine oocytes’, *PLOS ONE*. Edited by M. Zhang, 12(9), p.
1826 e0185045. doi: 10.1371/journal.pone.0185045.

1827 Baerwald, A. R., Adams, G. P. and Pierson, R. A. (2003) ‘Characterization of Ovarian
1828 Follicular Wave Dynamics in Women¹’, *Biology of Reproduction*, 69(3), pp. 1023–1031. doi:
1829 10.1095/biolreprod.103.017772.

1830 Beutler, B. A. (2009) ‘TLRs and innate immunity’, *Blood*, 113(7), pp. 1399–1407. doi:
1831 10.1182/blood-2008-07-019307.

1832 Bionaz, M. and Loor, J. J. (2007) ‘Identification of reference genes for quantitative real-time
1833 PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle’, *Physiological Genomics*,
1834 29(3), pp. 312–319. doi: 10.1152/physiolgenomics.00223.2006.

1835 Bromfield, J. J. and Sheldon, I. M. (2011) ‘Lipopolysaccharide Initiates Inflammation in
1836 Bovine Granulosa Cells via the TLR4 Pathway and Perturbs Oocyte Meiotic Progression in
1837 Vitro’, *Endocrinology*, 152(12), pp. 5029–5040. doi: 10.1210/en.2011-1124.

1838 Bromfield, J. J. and Sheldon, I. M. (2013) ‘Lipopolysaccharide Reduces the Primordial
1839 Follicle Pool in the Bovine Ovarian Cortex Ex Vivo and in the Murine Ovary In Vivo¹’,
1840 *Biology of Reproduction*, 88(4). doi: 10.1095/biolreprod.112.106914.

1841 Carámbula, S. F. *et al.* (1999) ‘Effect of fetal age and method of recovery on isolation of
1842 preantral follicles from bovine ovaries’, *Theriogenology*, 52(4), pp. 563–571. doi:
1843 10.1016/S0093-691X(99)00152-1.

1844 Cavalcante, A. Y. P. *et al.* (2016) ‘Kit ligand promotes the transition from primordial to
1845 primary follicles after in vitro culture of ovine ovarian tissue’, *Zygote*, 24(4), pp. 578–582.
1846 doi: 10.1017/S0967199415000556.

1847 Cavalieri, F. L. B. *et al.* (2018) ‘Improvement of bovine in vitro embryo production by
1848 ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up’, *Theriogenology*. Elsevier

- 1849 Ltd, 117, pp. 57–60. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.026.
- 1850 Eckel, E. F. and Ametaj, B. N. (2016) ‘Invited review: Role of bacterial endotoxins in the
1851 etiopathogenesis of periparturient diseases of transition dairy cows’, *Journal of Dairy*
1852 *Science*, 99(8), pp. 5967–5990. doi: 10.3168/jds.2015-10727.
- 1853 Erickson, B. H. (1966) ‘Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary’,
1854 *Journal of Animal Science*, 25(3), pp. 800–805. doi: 10.2527/jas1966.253800x.
- 1855 Evans, A. *et al.* (2010) ‘Causes and consequences of the variation in the number of ovarian
1856 follicles in cattle’, *Reproduction in Domestic Ruminants*, 7(1), pp. 419–427. doi:
1857 10.5661/RDR-VII-42.
- 1858 Evans, A. C. O. *et al.* (2012) ‘Effects of Maternal Environment During Gestation on Ovarian
1859 Folliculogenesis and Consequences for Fertility in Bovine Offspring’, 47, pp. 31–37. doi:
1860 10.1111/j.1439-0531.2012.02052.x.
- 1861 Fernandes, A. C. C. *et al.* (2019) ‘Effect of repeated intravenous lipopolysaccharide infusions
1862 on systemic inflammatory response and endometrium gene expression in Holstein heifers’,
1863 *Journal of Dairy Science*, 102(4), pp. 3531–3543. doi: 10.3168/jds.2018-14616.
- 1864 Fuller, E. A. *et al.* (2017) ‘Neonatal immune activation depletes the ovarian follicle reserve
1865 and alters ovarian acute inflammatory mediators in neonatal rats†’, *Biology of Reproduction*,
1866 97(5), pp. 719–730. doi: 10.1093/biolre/iox123.
- 1867 Gilbert, R. O. *et al.* (2005) ‘Prevalence of endometritis and its effects on reproductive
1868 performance of dairy cows’, *Theriogenology*, 64(9), pp. 1879–1888. doi:
1869 10.1016/j.theriogenology.2005.04.022.
- 1870 Ginther, O. J. *et al.* (1996) ‘Selection of the Dominant Follicle in Cattle1’, *Biology of*
1871 *Reproduction*, 55(6), pp. 1187–1194. doi: 10.1095/biolreprod55.6.1187.
- 1872 Gougeon, A. and Chainy, G. B. N. (1987) ‘Morphometric studies of small follicles in ovaries
1873 of’, *Journal of Reproduction and Fertility*, 81(i), pp. 433–442.
- 1874 Guo, Z. and Yu, Q. (2019) ‘Role of mTOR Signaling in Female Reproduction’, *Frontiers in*
1875 *Endocrinology*, 10. doi: 10.3389/fendo.2019.00692.
- 1876 Haas, C. S. *et al.* (2019) ‘Transforming growth factor-beta family members are regulated
1877 during induced luteolysis in cattle’, *Animal Reproduction*, 16(4), pp. 829–837. doi:
1878 10.21451/1984-3143-AR2018-0146.
- 1879 Haimerl, P. and Heuwieser, W. (2014) ‘Invited review: Antibiotic treatment of metritis in
1880 dairy cows: A systematic approach’, *Journal of Dairy Science*, 97(11), pp. 6649–6661. doi:
1881 10.3168/jds.2014-8462.
- 1882 Hansen, K. R. *et al.* (2011) ‘Correlation of ovarian reserve tests with histologically

- 1883 determined primordial follicle number’, *Fertility and Sterility*, 95(1), pp. 170–175. doi:
1884 10.1016/j.fertnstert.2010.04.006.
- 1885 Härtel, H. *et al.* (2004) ‘Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in
1886 Finland’, *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45(4), pp. 193–200. doi: 10.1186/1751-0147-45-
1887 193.
- 1888 Herath, S. *et al.* (2007) ‘Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that
1889 modulate their endocrine function’, *Reproduction*, 134(5), pp. 683–693. doi: 10.1530/REP-
1890 07-0229.
- 1891 Hertl, J. A. *et al.* (2010) ‘Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-
1892 negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State
1893 Holstein dairy cows’, *Journal of Dairy Science*, 93(4), pp. 1551–1560. doi: 10.3168/jds.2009-
1894 2599.
- 1895 Hoshino, Y. *et al.* (2004) ‘Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt participate in the FSH-
1896 induced meiotic maturation of mouse oocytes’, *Molecular Reproduction and Development*,
1897 69(1), pp. 77–86. doi: 10.1002/mrd.20150.
- 1898 Hudson, C. D. *et al.* (2012) ‘Associations between udder health and reproductive performance
1899 in United Kingdom dairy cows’, *Journal of Dairy Science*, 95(7), pp. 3683–3697. doi:
1900 10.3168/jds.2011-4629.
- 1901 Hulshof, S. C. J. *et al.* (1994) ‘Isolation and characterization of preantral follicles from foetal
1902 bovine ovaries’, *Veterinary Quarterly*, 16(2), pp. 78–80. doi:
1903 10.1080/01652176.1994.9694423.
- 1904 Hussein, M. R. (2005) ‘Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms’, *Human*
1905 *Reproduction Update*, 11(2), pp. 162–178. doi: 10.1093/humupd/dmi001.
- 1906 Hussein, M. R., Haemel, A. K. and Wood, G. S. (2003) ‘Apoptosis and melanoma: molecular
1907 mechanisms’, *The Journal of Pathology*, 199(3), pp. 275–288. doi: 10.1002/path.1300.
- 1908 Ilha, G. F. *et al.* (2015) ‘Lack of FSH support enhances LIF–STAT3 signaling in granulosa
1909 cells of atretic follicles in cattle’, *REPRODUCTION*, 150(4), pp. 395–403. doi: 10.1530/REP-
1910 15-0026.
- 1911 Ireland, J. J. *et al.* (2000) ‘Historical Perspective of Turnover of Dominant Follicles During
1912 the Bovine Estrous Cycle: Key Concepts, Studies, Advancements, and Terms’, *Journal of*
1913 *Dairy Science*, 83(7), pp. 1648–1658. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75033-8.
- 1914 Ireland, J. and Mossa, F. (2018) ‘125 Anti-Müllerian Hormone (AMH): a biomarker for the
1915 ovarian reserve, ovarian function and fertility in dairy cows.’, *Journal of Animal Science*,
1916 96(suppl_3), pp. 343–343. doi: 10.1093/jas/sky404.756.

- 1917 Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Mossa F,
1918 Lonergan P, E. A. (2011) ‘Does size matter in females? An overview of the impact of the high
1919 variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian
1920 hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in’,
1921 *Reprod Fertil Dev.*, 23, pp. 1–14. doi: 10.1071/RD10226.
- 1922 Jirillo, E. *et al.* (2002) ‘The role of the liver in the response to LPS: Experimental and clinical
1923 findings’, *Journal of Endotoxin Research*, 8(5), pp. 319–327. doi:
1924 10.1179/096805102125000641.
- 1925 Jones, R. L. and Pepling, M. E. (2013) ‘KIT signaling regulates primordial follicle formation
1926 in the neonatal mouse ovary’, *Developmental Biology*, 382(1), pp. 186–197. doi:
1927 10.1016/j.ydbio.2013.06.030.
- 1928 Kalous, J. *et al.* (2006) ‘PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes’,
1929 *Biology of the Cell*, 98(2), pp. 111–123. doi: 10.1042/BC20050020.
- 1930 Lavon, Y. *et al.* (2011) ‘Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid
1931 concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles’, *Domestic Animal*
1932 *Endocrinology*, 40(2), pp. 98–109. doi: 10.1016/j.domaniend.2010.09.004.
- 1933 Li, J. *et al.* (2010) ‘Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs’,
1934 *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(22), pp. 10280–10284. doi:
1935 10.1073/pnas.1001198107.
- 1936 Lima, P. F. *et al.* (2016) ‘Effect of kit ligand on natriuretic peptide precursor C and oocyte
1937 maturation in cattle’, *Reproduction*, 152(5), pp. 481–489. doi: 10.1530/REP-16-0155.
- 1938 Liu, K. *et al.* (2006) ‘Control of mammalian oocyte growth and early follicular development
1939 by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer’, *Developmental Biology*,
1940 299(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.07.038.
- 1941 Masternak, M. M. *et al.* (2005) ‘Caloric Restriction Results in Decreased Expression of
1942 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Superfamily in Muscle of Normal and Long-
1943 Lived Growth Hormone Receptor/Binding Protein Knockout Mice’, *The Journals of*
1944 *Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(10), pp. 1238–1245. doi:
1945 10.1093/gerona/60.10.1238.
- 1946 McLaughlin, E. A. and Sobinoff, A. P. (2010) ‘Contraception Targets in Mammalian Ovarian
1947 Development’, in, pp. 45–66. doi: 10.1007/978-3-642-02062-9_4.
- 1948 Morita, Y. *et al.* (2000) ‘Oocyte apoptosis is suppressed by disruption of the acid
1949 sphingomyelinase gene or by sphingosine -1-phosphate therapy’, *Nature Medicine*, 6(10), pp.
1950 1109–1114. doi: 10.1038/80442.

- 1951 Morrison, L. J. and Marcinkiewicz, J. L. (2002) ‘Tumor Necrosis Factor α Enhances
1952 Oocyte/Follicle Apoptosis in the Neonatal Rat Ovary¹’, *Biology of Reproduction*, 66(2), pp.
1953 450–457. doi: 10.1095/biolreprod66.2.450.
- 1954 Mossa, S. W. Walsh, S. T. Butler, D. P. Berry, F. Carter, P. Lonergan, G. W. Smith, J. J.
1955 Ireland, and A. C. O. E. (2012) ‘Low numbers of ovarian follicles >3mm in diameter are
1956 associated with low fertility in dairy cows’, *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 95(5), pp.
1957 2355–2361. doi: 10.3168/jds.2011-4325.
- 1958 Nagaraja, T. G. and Lechtenberg, K. F. (2007) ‘Acidosis in Feedlot Cattle’, *Veterinary Clinics
1959 of North America: Food Animal Practice*, 23(2), pp. 333–350. doi:
1960 10.1016/j.cvfa.2007.04.002.
- 1961 Passos, J. R. S. *et al.* (2016) ‘Protein and messenger RNA expression of interleukin 1 system
1962 members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin 1 β on primordial follicle
1963 activation and survival in vitro’, *Domestic Animal Endocrinology*, 54, pp. 48–59. doi:
1964 10.1016/j.domaniend.2015.09.002.
- 1965 Pederzoli, R.-L. A. *et al.* (2018) ‘Effect of ruminal acidosis and short-term low feed intake on
1966 indicators of gastrointestinal barrier function in Holstein steers’, *Journal of Animal Science*,
1967 96(1), pp. 108–125. doi: 10.1093/jas/skx049.
- 1968 Reddy, P. *et al.* (2005) ‘Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and
1969 rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development’, *Developmental
1970 Biology*, 281(2), pp. 160–170. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.02.013.
- 1971 Reddy, P. *et al.* (2008) ‘Oocyte-Specific Deletion of Pten Causes Premature Activation of the
1972 Primordial Follicle Pool’, *Science*, 319(5863), pp. 611–613. doi: 10.1126/science.1152257.
- 1973 Rovani, M. T. *et al.* (2017) ‘Prostaglandin F₂ α -induced luteolysis involves activation of
1974 Signal transducer and activator of transcription 3 and inhibition of AKT signaling in cattle’,
1975 *Molecular Reproduction and Development*, 84(6), pp. 486–494. doi: 10.1002/mrd.22798.
- 1976 Seegers, H., Fourichon, C. and Beaudeau, F. (2003) ‘Production effects related to mastitis and
1977 mastitis economics in dairy cattle herds’, *Veterinary Research*, 34(5), pp. 475–491. doi:
1978 10.1051/vetres:2003027.
- 1979 Sheldon, I. M. *et al.* (2002) ‘Influence of uterine bacterial contamination after parturition on
1980 ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle.’, *Reproduction
1981 (Cambridge, England)*, 123(6), pp. 837–45. Available at:
1982 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12052238>.
- 1983 Sheldon, I. M. *et al.* (2009) ‘Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of
1984 Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle¹’, *Biology of*

- 1985 *Reproduction*, 81(6), pp. 1025–1032. doi: 10.1095/biolreprod.109.077370.
- 1986 Silva-Santos, K. C. *et al.* (2011) ‘Estimate of the population of preantral follicles in the
1987 ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle’, *Theriogenology*, 76(6), pp. 1051–
1988 1057. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.05.008.
- 1989 Silva, A. W. B. *et al.* (2017) ‘mRNA expression profile of the TNF- α system in LH-induced
1990 bovine preovulatory follicles and effects of TNF- α on gene expression, ultrastructure and
1991 expansion of cumulus-oocyte complexes cultured in vitro’, *Theriogenology*, 90, pp. 1–10. doi:
1992 10.1016/j.theriogenology.2016.11.015.
- 1993 Sobinoff, A. P. *et al.* (2010) ‘Adding Insult to Injury: Effects of Xenobiotic-Induced Preantral
1994 Ovotoxicity on Ovarian Development and Oocyte Fusibility’, *Toxicological Sciences*, 118(2),
1995 pp. 653–666. doi: 10.1093/toxsci/kfq272.
- 1996 Sobinoff, A. P. *et al.* (2011) ‘Understanding the Villain: DMBA-Induced Preantral
1997 Ovotoxicity Involves Selective Follicular Destruction and Primordial Follicle Activation
1998 through PI3K/Akt and mTOR Signaling’, *Toxicological Sciences*, 123(2), pp. 563–575. doi:
1999 10.1093/toxsci/kfr195.
- 2000 Sominsky, L. *et al.* (2012) ‘Neonatal immune challenge alters reproductive development in
2001 the female rat’, *Hormones and Behavior*, 62(3), pp. 345–355. doi:
2002 10.1016/j.yhbeh.2012.02.005.
- 2003 Takeuchi, O. and Akira, S. (2010) ‘Pattern Recognition Receptors and Inflammation’, *Cell*,
2004 140(6), pp. 805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- 2005 Tilly, J. (1996) ‘Apoptosis and ovarian function’, *Reviews of Reproduction*, 1(3), pp. 162–
2006 172. doi: 10.1530/ror.0.0010162.
- 2007 Uri-Belapolsky, S. *et al.* (2014) ‘Interleukin-1 deficiency prolongs ovarian lifespan in mice’,
2008 *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(34), pp. 12492–12497. doi:
2009 10.1073/pnas.1323955111.
- 2010 Waldron, M. R. *et al.* (2003) ‘Effect of Lipopolysaccharide on Indices of Peripheral and
2011 Hepatic Metabolism in Lactating Cows’, *Journal of Dairy Science*, 86(11), pp. 3447–3459.
2012 doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73949-6.
- 2013 Wang, L.-Q. *et al.* (2016) ‘Regulation of primordial follicle recruitment by cross-talk between
2014 the Notch and phosphatase and tensin homologue (PTEN)/AKT pathways’, *Reproduction*,
2015 *Fertility and Development*, 28(6), p. 700. doi: 10.1071/RD14212.
- 2016 Williams, E. J., Sibley, K., Miller, A. N., Lane, E. A., Fishwick, J., Nash, D. M., Herath, S.,
2017 England, Gary C. W., *et al.* (2008) ‘ORIGINAL ARTICLE: The Effect of *Escherichia coli*
2018 Lipopolysaccharide and Tumour Necrosis Factor Alpha on Ovarian Function’, *American*

- 2019 *Journal of Reproductive Immunology*, 60(5), pp. 462–473. doi: 10.1111/j.1600-
2020 0897.2008.00645.x.
- 2021 Williams, E. J., Sibley, K., Miller, A. N., Lane, E. A., Fishwick, J., Nash, D. M., Herath, S.,
2022 England, Gary C.W., *et al.* (2008) ‘The effect of escherichia coli lipopolysaccharide and
2023 tumour necrosis factor alpha on ovarian function’, *American Journal of Reproductive*
2024 *Immunology*, 60(5), pp. 462–473. doi: 10.1111/j.1600-0897.2008.00645.x.
- 2025 Wu, X.-Q. *et al.* (2011) ‘Neonatal programming by immunological challenge: effects on
2026 ovarian function in the adult rat’, *REPRODUCTION*, 141(2), pp. 241–248. doi: 10.1530/REP-
2027 10-0252.
- 2028
- 2029

2030 **Tabela 1.** Genes avaliados em amostras de ovários de novilhas desafiadas ou não com LPS.

Gene	Sequencia primers 5' → 3'	Código NCBI	Referência
<i>H2AC6</i>	F: GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG R: TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC	NM_001205596.1	(Rincón et al., 2018)
<i>RN18S1</i>	F: CCTTCCGCGAGGATCCATTG R: CGCTCCCAAGATCCAACACTAC	NR_036642.1	(Rovani et al., 2017)
<i>UXT</i>	F: TGTGGCCCTTGGATGGATGGTT R: GGTTGTCGCTGAGCTGAGCTG	NM_001037471.2	(Bionaz and Loor, 2007)
<i>GAPDH</i>	F: GATTGTCAGCAATGCCTCCT R: GGTCATAAGTCCCTCCACGA	NM_001034034.2	(Rovani et al., 2017)
<i>KIT</i>	F: ATCATGAAGACCTGCTGGGATGCT R: GGGCTGCAGTTTGCTAAGTTGGAA	NM_001166484.1	(Lima et al., 2016)
<i>KITL1</i>	F: GTGTGATTTCTCAACATCAAGTCC R: TGCTACTGCTGTCATTCCCTAAGGG	NM_174375.2	(Lima et al., 2016)
<i>KITL2</i>	F: AAGGGAAGGCCTCAAATTCCATTGAAGA R: AGCAAACCCGATCACAAGAGA	NM_174375.2	(Lima et al., 2016)
<i>AMH</i>	F: ACACCGGCAAGCTCCTCAT R: CACCATGTTTGGGACGTGG	NM_173890.1	(Haas et al., 2019)
<i>MTOR</i>	F: TCCTTGTCACGAGGCAACAA R: GCGTATCAATTCTTGCAATGA	XM_002694043.6	Este estudo
<i>AKT1</i>	F: GATTCTTCGCCAGCATCGTG R: GGCCGTGAACTCCTCATCAA	NM_173986.2	(Ilha et al., 2015)
<i>PTEN</i>	F: GCCACAAAGTGCCCTCGTTTACC R: AGAAGGCAACTCTGCCAAACAC	NM_001319898.1	(Andrade et al., 2017)
<i>SIRT1</i>	F: CAACGGTTTCCATTTCGTGTG R: GTTCGAGGATCTGTGCCAAT	NM_001192980.3	(Khan et al 2017)

PIK3R1 F: ACACAGCTGACGGGACCTTT NM_174575.1 (Andrade *et al.*, 2017)
R: CCATATTTCCCATCTCGGTGA

2031

2032

2033 **Tabela 2.** Total de folículos conforme a sua categoria de novilhas de corte desafiadas com LPS ou não.

Grupo/ classificação	Controle	LPS	Valor de P
Primordial	25.645,96 ± 5.966,35	18.449,72 ± 6.670,58	0,44
Primordial transição	38.811,75 ± 7.986,62	35.919,41 ± 8.929,31	0,81
Primário	6.847,35 ± 2.263,20	8.570,36 ± 2.530,36	0,62
Secundário	1.797,655 ± 6.85,36	2.055,34 ± 7.66,26	0,80
Terciário	95,48 ± 99,58	358,52 ± 111,34	0,12
Primordial anormal	10.456,94 ± 3.303,90	11.799,49 ± 3.693,87	0,79
Primordial trans anormal	20.172,89 ± 3.790,71	11.515,3 ± 4.238,14	0,17
Primário anormal	4.783,35 ± 2.031,18	7.797,62 ± 2.270,93	0,35
Secundário anormal	1.449,52 ± 312,75	1.953,23 ± 349,67	0,31
Terciário anormal	14,49 ± 29,60	66,72 ± 29,60	0,25

2034

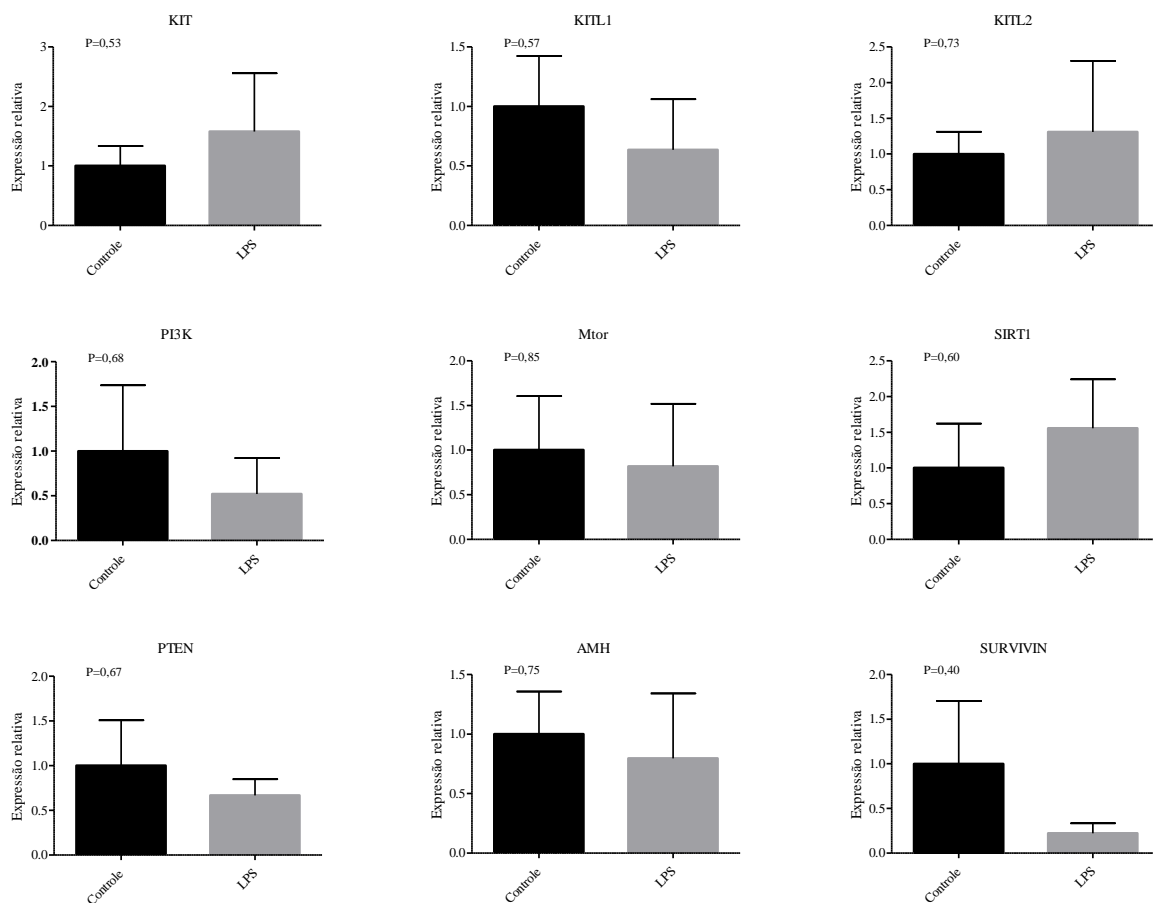
2035

2036 **Tabela 3.** Porcentagem de folículos de cada categoria em relação a população folicular total

Grupo/ classificação	Controle (%)	LPS (%)	Valor de P
Primordial	22,49	17,90	0,55
Primordial trans	35,37	35,20	0,98
Primário	5,99	9,10	0,33
Secundário	1,81	1,97	0,88
Terciário	0,08	0,34	0,11
Primordial anormal	10,05	11,76	0,70
Primordial trans anormal	18,38	13,61	0,49
Primário anormal	4,36	7,87	0,22
Secundário anormal	1,40	2,12	0,20
Terciário anormal	0,01	0,08	0,16

2037

2038



2039

2040 **Figura 1.** Expressão de genes relacionados à ativação folicular, reserva ovariana e antiapoptótico em novilhas de
 2041 corte desafiadas ou não com LPS.

2042

2043 Considerações finais

2044 A exposição de animais ao LPS com intervalo de 24 horas mostrou
2045 desencadear uma resposta sistêmica com alteração na temperatura corporal de
2046 forma prolongada no primeiro desafio e de forma aguda frente ao segundo desafio,
2047 juntamente com alterações nos leucócitos totais em detrimento da redução dos
2048 neutrófilos. Além disso foi possível observar um efeito a curto prazo no metabolismo
2049 lipídico, indicando que mesmo exposições curtas ao LPS, já desencadeiam
2050 alterações no metabolismo, não sendo benéfico ao mesmo. No âmbito reprodutivo, o
2051 desafio com LPS foi capaz de alterar a expressão de genes relacionados a
2052 renovação endometrial e a produção de prostaglandinas.

2053 Acreditamos que mais estudos devem ser realizados, buscando compreender
2054 mais amplamente o impacto do LPS e do processo inflamatório no sistema
2055 reprodutivo. Além disso, há uma necessidade de entender a proporção de LPS que
2056 chega ao ovário e atua sobre as reservas foliculares, principalmente na categoria de
2057 folículos primordiais.

2058

2059 **Referências**

- 2060 ABEBE, R. et al. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of
2061 *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. **BMC**
2062 **Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 270, 3 dez. 2016. Disponível em:
2063 <<http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-016-0905-3>>.
- 2064 ABIEC. **Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil**, 2019.
- 2065 ADAMS, G. P. et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and
2066 the emergence of follicular waves in heifers. **Reproduction**, v. 94, n. 1, p. 177–188,
2067 1 jan. 1992. Disponível em:
2068 <<https://rep.bioscientifica.com/doi/10.1530/jrf.0.0940177>>.
- 2069 AHMADZADEH, A. et al. Effect of clinical mastitis and other diseases on reproductive
2070 performance of Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 112, n. 3–4, p.
2071 273–282, jun. 2009. Disponível em:
2072 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432008001541>>.
- 2073 ARAÚJO, V. R. et al. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in
2074 ovarian physiology of mammals. **Zygote**, v. 21, n. 3, p. 295–304, 13 ago. 2013.
2075 Disponível em:
2076 <[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0967199411000578/type/journal](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0967199411000578/type/journal_article)
2077 [_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0967199411000578/type/journal_article)>.
- 2078 ARTHUR, G. H; SANTOS, O. R. F. **Reprodução e Obstertricia em Veterinária**. 4
2079 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1979.
- 2080 AUSTIN, E. J. et al. Alterations in Intrafollicular Regulatory Factors and Apoptosis
2081 During Selection of Follicles in the First Follicular Wave of the Bovine Estrous Cycle.
2082 **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 839–848, 1 mar. 2001. Disponível em:
2083 <<https://academic.oup.com/biolreprod/articlelookup/doi/10.1095/biolreprod64.3.839>>.
- 2084 BEG, M. A. et al. Follicular-Fluid Factors and Granulosa-Cell Gene Expression
2085 Associated with Follicle Deviation in Cattle1. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 2,
2086 p. 432–441, 1 fev. 2001. Disponível em:
2087 <<https://academic.oup.com/biolreprod/articlelookup/doi/10.1095/biolreprod64.2.432>>.
- 2088 BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. [s.l.]
2089 Jaboticabal: Funep, 2006.
- 2090 BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 12, p.
2091 845–859, fev. 2004. Disponível em:
2092 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016158900300316X>>.
- 2093 BEUTLER, B. A. TLRs and innate immunity. **Blood**, v. 113, n. 7, p. 1399–1407, 12
2094 fev. 2009. Disponível em:
2095 <[https://ashpublications.org/blood/article/113/7/1399/25973/TLRs-and-innate-](https://ashpublications.org/blood/article/113/7/1399/25973/TLRs-and-innate-immunity)
2096 [immunity](https://ashpublications.org/blood/article/113/7/1399/25973/TLRs-and-innate-immunity)>.
- 2097 BLONDIN, P.; DUFOUR, M.; SIRARD, M. Analysis of Atresia in Bovine Follicles
2098 Using Different Methods : Flow Cytometry , Enzyme-Linked Immunosorbent Assay,
2099 and Classic Histology. **Biology of Reproduction**, v. 637, p. 631–637, 1996.
- 2100 BRISTOL-GOULD, S. K. et al. Postnatal regulation of germ cells by activin: The

- 2101 establishment of the initial follicle pool. **Developmental Biology**, v. 298, n. 1, p. 132–
2102 148, out. 2006. Disponível em:
2103 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160606009286>>.
- 2104 BRITT, J. H. Oocyte development in cattle: physiological and genetic aspects.
2105 **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. spe, p. 110–115, jul. 2008. Disponível
2106 em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982008001300013&lng=en&tlng=en>.
2107
- 2108 BROMFIELD, J. J.; SHELDON, I. M. Lipopolysaccharide Reduces the Primordial
2109 Follicle Pool in the Bovine Ovarian Cortex Ex Vivo and in the Murine Ovary In Vivo.
2110 **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 4, 1 abr. 2013. Disponível em:
2111 <[https://academic.oup.com/biolreprod/articlelookup/doi/10.1095/biolreprod.112.1069](https://academic.oup.com/biolreprod/articlelookup/doi/10.1095/biolreprod.112.106914)
2112 14>.
- 2113 BRUNO, J. B. et al. Angiogenic factors and ovarian follicle development. **Animal**
2114 **Reproduction**, v. 55, n. 85, p. 371–379, 2009.
- 2115 BURTON, J. L. et al. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by
2116 glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. **Journal of Leukocyte**
2117 **Biology**, v. 57, n. 2, p. 317–325, fev. 1995. Disponível em:
2118 <<http://doi.wiley.com/10.1002/jlb.57.2.317>>.
- 2119 BUTTKE, T. M.; SANDSTROM, P. A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis.
2120 **Immunology Today**, v. 15, n. 1, p. 7–10, jan. 1994. Disponível em:
2121 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167569994900183>>.
- 2122 CAMPOS, F. T. et al. The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on
2123 serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of
2124 the bovine dominant follicle. **Theriogenology**, v. 89, p. 244–249, 2017.
- 2125 CARNEIRO, L. C. et al. Incidence of subclinical endometritis and its effects on
2126 reproductive performance of crossbred dairy cows. **Tropical Animal Health and**
2127 **Production**, v. 46, n. 8, p. 1435–1439, 4 dez. 2014. Disponível em:
2128 <<http://link.springer.com/10.1007/s11250-014-0661-y>>.
- 2129 CARVALHO, G.R.; ROCHA, D. **O leite em 2018 e perspectivas para 2019.**
2130 Anuário Leite - Embrapa, 2019.
- 2131 CONTRERAS, G. A.; SORDILLO, L. M. Lipid mobilization and inflammatory
2132 responses during the transition period of dairy cows. **Comparative Immunology,**
2133 **Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. 281–289, maio 2011.
2134 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147957111000178>>.
- 2135 CRONIN, J. G. et al. Toll-Like Receptor 4 and MYD88-Dependent Signaling
2136 Mechanisms of the Innate Immune System Are Essential for the Response to
2137 Lipopolysaccharide by Epithelial and Stromal Cells of the Bovine Endometrium.
2138 **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 2, 1 fev. 2012. Disponível em:
2139 <[https://academic.oup.com/biolreprod/articlelookup/doi/10.1095/biolreprod.111.0927](https://academic.oup.com/biolreprod/articlelookup/doi/10.1095/biolreprod.111.092718)
2140 18>.
- 2141 DINARELLO, C. A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. **FASEB journal :**
2142 **official publication of the Federation of American Societies for Experimental**
2143 **Biology**, v. 8, n. 15, p. 1314–25, dez. 1994. Disponível em:
2144 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8001745>>.

- 2145 DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. **European Journal of**
2146 **Immunology**, v. 37, n. S1, p. S34–S45, nov. 2007. Disponível em:
2147 <<http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200737772>>.
- 2148 ECKEL, E. F.; AMETAJ, B. N. Invited review: Role of bacterial endotoxins in the
2149 etiopathogenesis of periparturient diseases of transition dairy cows. **Journal of Dairy**
2150 **Science**, v. 99, n. 8, p. 5967–5990, ago. 2016. Disponível em:
2151 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030216302764>>.
- 2152 ERICKSON, B. H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary.
2153 **Journal of Animal Science**, v. 25, n. 3, p. 800–805, 1 ago. 1966. Disponível em:
2154 <<https://academic.oup.com/jas/article/25/3/800-805/4700168>>.
- 2155 EVANS, A. C. O.; FORTUNE, J. E. Selection of the Dominant Follicle in Cattle
2156 Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic
2157 Acid for Gonadotropin Receptors. **Endocrinology**, v. 138, n. 7, p. 2963–2971, 1 jul.
2158 1997. Disponível em: <<https://academic.oup.com/endo/article/138/7/2963/2988418>>.
- 2159 FILIPOV, N. M. et al. Increased responsiveness to intravenous lipopolysaccharide
2160 challenge in steers grazing endophyte-infected tall fescue compared with steers
2161 grazing endophyte-free tall fescue. **Journal of endocrinology**, p. 213–220, 1999.
- 2162 FORTUNE, J. .; RIVERA, G. .; YANG, M. Follicular development: the role of the
2163 follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal**
2164 **Reproduction Science**, v. 82–83, p. 109–126, jul. 2004. Disponível em:
2165 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432004000867>>.
- 2166 FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in
2167 Cattle1. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 648–654, 1 set. 2001. Disponível
2168 em: <[https://academic.oup.com/biolreprod/article-
2169 lookup/doi/10.1095/biolreprod65.3.648](https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod65.3.648)>.
- 2170 FRASER, H.; LUNN, S. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate
2171 corpus luteum. **Reproduction**, p. 355–362, 1 mar. 2001. Disponível em:
2172 <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/121/3/355.xml>>.
- 2173 GILBERT, R. O. et al. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive
2174 performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p. 1879–1888, dez. 2005.
2175 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X05001482>>.
- 2176 GINDRI, P. et al. Intrafollicular lipopolysaccharide injection delays ovulation in cows.
2177 **Animal Reproduction Science**, v. 211, n. October, p. 1–8, 2019. Disponível em:
2178 <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106226>>.
- 2179 GINTHER, O. J. et al. Selection of the Dominant Follicle in Cattle. **Biology of**
2180 **Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187–1194, 1 dez. 1996. Disponível em:
2181 <<https://academic.oup.com/biolreprod/articlelookup/doi/10.1095/biolreprod55.6.1187>
2182 >.
- 2183 GONG, J. G. et al. Suppression in the Secretion of Follicle-Stimulating Hormone and
2184 Luteinizing Hormone, and Ovarian Follicle Development in Heifers Continuously
2185 Infused with a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist. **Biology of Reproduction**,
2186 v. 55, n. 1, p. 68–74, 1 jul. 1996. Disponível em:
2187 <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod55.1.68>>.

- 2188 GOZHO, G. N.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Ruminal Lipopolysaccharide
2189 Concentration and Inflammatory Response During Grain-Induced Subacute Ruminal
2190 Acidosis in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 856–866, fev.
2191 2007. Disponível em:
2192 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030207715692>>.
- 2193 GROPP, A.; OHNO, S. The presence of a common embryonic blastema for ovarian
2194 and testicular parenchymal (follicular, interstitial and tubular) cells in cattle, *Bos*
2195 *taurus*. **Z Zellforsch Mikrosk Anat.**, v. 74, n. 4, p. 505–528, 1966. Disponível em:
2196 <<http://link.springer.com/10.1007/BF00496841>>.
- 2197 HAFEZ, B. & HAFEZ, E. **Reprodução Animal**. 1 ed. São Paulo, Manole, 2004.
2198
- 2199 KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos**. Porto Alegre,
2200 Artmed, 2011.
- 2201 HAIMERL, P.; HEUWIESER, W. Invited review: Antibiotic treatment of metritis in
2202 dairy cows: A systematic approach. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 6649–
2203 6661, nov. 2014. Disponível em:
2204 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214006237>>.
- 2205 HAMMON, D. S. et al. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with
2206 uterine health disorders. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n.
2207 1–2, p. 21–29, set. 2006. Disponível em:
2208 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242706001206>>.
- 2209 HAZZARD, T. M.; STOUFFER, R. L. Angiogenesis in ovarian follicular and luteal
2210 development. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.
2211 14, n. 6, p. 883–900, dez. 2000. Disponível em:
2212 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521693400901330>>.
- 2213 HERATH, S. et al. Expression and Function of Toll-Like Receptor 4 in the
2214 Endometrial Cells of the Uterus. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 562–570, jan. 2006.
2215 Disponível em: <[https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2005-](https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2005-1113)
2216 1113>.
- 2217 HERATH, S. et al. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that
2218 modulate their endocrine function. **Reproduction**, v. 134, n. 5, p. 683–693, nov.
2219 2007. Disponível em:
2220 <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/134/5/1340683.xml>>.
- 2221 HSUEH, A. J. W.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally
2222 Controlled Apoptotic Process. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 6, p. 707–724, dez.
2223 1994. Disponível em: <[https://academic.oup.com/edrv/article-](https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv-15-6-707)
2224 lookup/doi/10.1210/edrv-15-6-707>.
- 2225 HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human**
2226 **Reproduction Update**, v. 11, n. 2, p. 162–178, 1 mar. 2005. Disponível em:
2227 <[http://academic.oup.com/humupd/article/11/2/162/763692/Apoptosis-in-the-ovary-](http://academic.oup.com/humupd/article/11/2/162/763692/Apoptosis-in-the-ovary-molecular-mechanisms)
2228 molecular-mechanisms>.
- 2229 HUZZEY, J. M. et al. Prepartum Behavior and Dry Matter Intake Identify Dairy Cows
2230 at Risk for Metritis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3220–3233, jul. 2007.
2231 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203020771771X>>.

- 2232 IBRAHIM, S. et al. Expression pattern of inflammatory response genes and their
2233 regulatory MicroRNAs in bovine oviductal cells in response to lipopolysaccharide:
2234 Implication for early embryonic development. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–21, 2015.
- 2235 JACOBSEN, S. et al. Dose dependency and individual variability in selected clinical ,
2236 haematological and blood biochemical responses after systemic lipopolysaccharide
2237 challenge in cattle To cite this version : **Veterinary Research**, v. 36, n. 2, p.1 67-178,
2238 2005.
- 2239 JACOMINI, J. O. et al. Morfogênese do testículo de embriões e fetos de vacas da
2240 raça nelore (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and
2241 Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 33, 1 fev. 2007. Disponível em:
2242 <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26658>>.
- 2243 JUNQUEIRA, L. C. U. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro:
2244 Guanabara Koogan, 2013.
- 2245 KAIPIA, A.; HSUEH, A. J. W. REGULATION OF OVARIAN FOLLICLE ATRESIA.
2246 **Annual Review of Physiology**, v. 59, n. 1, p. 349–363, out. 1997. Disponível em:
2247 <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.59.1.349>>.
- 2248 KANITZ, W. Follicular dynamic and ovulation in cattle- A review. **Archives Animal
2249 Breeding**, v. 46, n. 2, p. 187–198, 2003.
- 2250 KIM, J. Y. Control of ovarian primordial follicle activation. **Clinical and Experimental
2251 Reproductive Medicine**, v. 39, n. 1, p. 10, 2012. Disponível em:
2252 <<http://ecerm.org/journal/view.php?doi=10.5653/cerm.2012.39.1.10>>.
- 2253 KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI, M. E. Effects of the Presence of the Mammary
2254 Gland on Expression of Neutrophil Adhesion Molecules and Myeloperoxidase Activity
2255 in Periparturient Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2385–2392,
2256 nov. 1999. Disponível em:
2257 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030299754895>>.
- 2258 KOHEN, P. et al. Interleukin-1 β (IL-1 β) Is a Modulator of Human Luteal Cell
2259 Steroidogenesis: Localization of the IL Type I System in the Corpus Luteum 1. **The
2260 Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 11, p. 4239–4245, nov.
2261 1999. Disponível em: <[https://academic.oup.com/jcem/article-
2262 lookup/doi/10.1210/jcem.84.11.6130](https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.84.11.6130)>.
- 2263 LAVON, Y. et al. Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation
2264 and hormonal concentrations in cows. v. 70, p. 956–967, 2008.
- 2265 LEBLANC, S. Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in the Transition Period.
2266 **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. S, p. S29–S35, 2010.
2267 Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jrd/1056S29?from=CrossRef>>.
- 2268 LEBLANC, S. J. et al. Major Advances in Disease Prevention in Dairy Cattle. **Journal
2269 of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1267–1279, abr. 2006. Disponível em:
2270 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030206721956>>.
- 2271 LEE, C. J. et al. Natural and radiation-induced degeneration of primordial and
2272 primary follicles in mouse ovary. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 1–2, p.
2273 109–117, abr. 2000. Disponível em:
2274 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432000000725>>.

- 2275 LI, S.; WINUTHAYANON, W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo
2276 development. **Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 1, p. R1–R26, jan. 2017.
2277 Disponível em: <<https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/232/1/R1.xml>>.
- 2278 LÜTTGENAU, J. et al. LPS-mediated effects and spatio-temporal expression of TLR2
2279 and TLR4 in the bovine corpus luteum. **REPRODUCTION**, v. 151, n. 4, p. 391–399,
2280 abr. 2016. Disponível em:
2281 <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/151/4/391.xml>>.
- 2282 MACCHIARELLI, G. The Microvasculature of the Ovary. A Review by SEM of
2283 Vascular Corrosion Casts. **Journal of Reproduction and Development**, v. 46, n. 4,
2284 p. 207–225, 2000. Disponível em:
2285 <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jrd/46.207?from=CrossRef>>.
- 2286 MACCHIARELLI, G. et al. Morphological patterns of angiogenesis in ovarian follicle
2287 capillary networks. A scanning electron microscopy study of corrosion cast.
2288 **Microscopy Research and Technique**, v. 69, n. 6, p. 459–468, jun. 2006.
2289 Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.20305>>.
- 2290 MAGATA, F. et al. Lipopolysaccharide in ovarian follicular fluid influences the steroid
2291 production in large follicles of dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 144, n.
2292 1–2, p. 6–13, 2014. Disponível em:
2293 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.005>>.
- 2294 MAGATA, F. et al. Comparison of bacterial endotoxin lipopolysaccharide
2295 concentrations in the blood , ovarian follicular fluid and uterine fluid : a clinical case of
2296 bovine metritis. p. 2–5, 2015.
- 2297 MANABE, N. et al. Role of Cell Death Ligand and Receptor System on Regulation of
2298 Follicular Atresia in Pig Ovaries. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 268–
2299 272, jul. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2008.01172.x>>.
- 2301 MANUEL SILVA, J.; PRICE, C. A. Effect of Follicle-Stimulating Hormone on Steroid
2302 Secretion and Messenger Ribonucleic Acids Encoding Cytochromes P450
2303 Aromatase and Cholesterol Side-Chain Cleavage in Bovine Granulosa Cells In
2304 Vitro1. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 186–191, 1 jan. 2000. Disponível
2305 em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod62.1.186>>.
- 2307 MARTINEZ, M. . et al. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first
2308 follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 1–2, p. 23–
2309 33, out. 1999. Disponível em:
2310 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432099000573>>.
- 2311 MENCHETTI, L. et al. Effects of local lipopolysaccharide administration on the
2312 expression of Toll-like receptor 4 and pro-inflammatory cytokines in uterus and
2313 oviduct of rabbit does. **Theriogenology**, v. 107, p. 162–174, fev. 2018. Disponível
2314 em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X17305320>>.
- 2315 MIHM, M. et al. Identification of Potential Intrafollicular Factors Involved in Selection
2316 of Dominant Follicles in Heifers. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 3, p. 811–819, 1
2317 set. 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod63.3.811>>.
- 2318

- 2319 MIHM, M. et al. Molecular Evidence That Growth of Dominant Follicles Involves a
2320 Reduction in Follicle-Stimulating Hormone Dependence and an Increase in
2321 Luteinizing Hormone Dependence in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 6, p.
2322 1051–1059, 1 jun. 2006. Disponível em:
2323 <[https://academic.oup.com/biolreprod/articlelookup/doi/10.1095/biolreprod.105.0457](https://academic.oup.com/biolreprod/articlelookup/doi/10.1095/biolreprod.105.045799)
2324 99>.
- 2325 MOLINA, P. E. **Fisiologia endócrina**. São Paulo: AMGH, 2014.
- 2326 MORESCO, E. M. Y.; LAVINE, D.; BEUTLER, B. Toll-like receptors. **Current**
2327 **Biology**, v. 21, n. 13, p. R488–R493, jul. 2011. Disponível em:
2328 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982211005975>>.
- 2329 NAGARAJA, T. G.; LECHTENBERG, K. F. Acidosis in Feedlot Cattle. **Veterinary**
2330 **Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 23, n. 2, p. 333–350, jul. 2007.
2331 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072007000230>>.
- 2332 NASCIMENTO, A. A. do et al. Correlação morfométrica do ovário de fêmeas bovinas
2333 em diferentes estádios reprodutivos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and**
2334 **Animal Science**, v. 40, n. 2, p. 126–132, 2003. Disponível em:
2335 <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/issue/view/11373>>.
- 2336 O'NEILL, L. A. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't
2337 know. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, n. 1, p. 3–9, fev. 2006. Disponível
2338 em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791505002050>>.
- 2339 OH, J. et al. Effects of rumen-protected Capsicum oleoresin on immune responses in
2340 dairy cows intravenously challenged with lipopolysaccharide. p. 1–12, 2017.
- 2341 OHTSUKA, H. et al. Circulating Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 after
2342 administration of LPS in Adult Cows. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59,
2343 n. 10, p. 927–929, 1997. Disponível em:
2344 <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jvms/59.927?from=CrossRef>>.
- 2345 PANCIERA, R. J.; CONFER, A. W. Pathogenesis and Pathology of Bovine
2346 Pneumonia. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n.
2347 2, p. 191–214, jul. 2010. Disponível em:
2348 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0749072010000071>>.
- 2349 PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Kit-Ligand/Stem Cell Factor Induces Primordial
2350 Follicle Development and Initiates Folliculogenesis. **Endocrinology**, v. 140, n. 9, p.
2351 4262–4271, 1 set. 1999. Disponível em:
2352 <<https://academic.oup.com/endo/article/140/9/4262/2990966>>.
- 2353 PASSOS, J. R. S. et al. Protein and messenger RNA expression of interleukin 1
2354 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin 1 β on primordial
2355 follicle activation and survival in vitro. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 54, p.
2356 48–59, jan. 2016. Disponível em:
2357 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0739724015001009>>.
- 2358 PEDERZOLLI, R.-L. A. et al. Effect of ruminal acidosis and short-term low feed intake
2359 on indicators of gastrointestinal barrier function in Holstein steers. **Journal of Animal**
2360 **Science**, v. 96, n. 1, p. 108–125, 15 fev. 2018. Disponível em:
2361 <<https://academic.oup.com/jas/article/96/1/108/4827805>>.

- 2362 PETERS, H. Migration of Gonocytes Into the Mammalian Gonad and Their
2363 Differentiation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological**
2364 **Sciences**, v. 259, n. 828, p. 91–101, 6 ago. 1970. Disponível em:
2365 <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.1970.0048>>.
- 2366 PIA, B.; ANDERSEN, H.; ANDERSEN, H. Bovine Endotoxemia – Some Aspects of
2367 Relevance to Production Diseases . A Review. p. 141–155, 2003.
- 2368 QIAO, J.; FENG, H. L. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome:
2369 impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. **Human**
2370 **Reproduction Update**, v. 17, n. 1, p. 17–33, 1 jan. 2011. Disponível em:
2371 <<https://academic.oup.com/humupd/article-lookup/doi/10.1093/humupd/dmq032>>.
- 2372 QUINN, P.J.; MARKEY, B.K; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F. C.
2373 **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- 2374 RADOSTITIS, O. M. e et al. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos**
2375 **Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Eqüinos**. 9. ed. [s.l.] Guanabara Koogan,
2376 2002.
- 2377 REDMER, D. Angiogenesis in the ovary. **Reviews of Reproduction**, v. 1, n. 3, p.
2378 182–192, 1 set. 1996. Disponível em: <[http://www.reproduction-](http://www.reproduction-online.org/lookup/doi/10.1530/ror.0.0010182)
2379 [online.org/lookup/doi/10.1530/ror.0.0010182](http://www.reproduction-online.org/lookup/doi/10.1530/ror.0.0010182)>.
- 2380 REDMER, D. A. et al. Evidence for a Role of Capillary Pericytes in Vascular Growth
2381 of the Developing Ovine Corpus Luteum. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p.
2382 879–889, 1 set. 2001. Disponível em: <[https://academic.oup.com/biolreprod/article-](https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod65.3.879)
2383 [lookup/doi/10.1095/biolreprod65.3.879](https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod65.3.879)>.
- 2384 RESENDE, J.C.; LEITE, J.L.B.; STOCK, L.A.; NARDY, V. P. D. **Produção e**
2385 **produtividade de leite no mundo**Anuário Leite - Embrapa, , 2019. .
- 2386 RIET-CORREA, F. .; SCHILD, A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. [s.l.] Varela,
2387 2002.
- 2388 RINCÓN, J. A. A. et al. Effect of high-density lipoprotein on oocyte maturation and
2389 bovine embryo development in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n.
2390 3, p. 445–455, 13 mar. 2019. Disponível em:
2391 <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/rda.13373>>.
- 2392 ROBINSON, R. S. et al. Angiogenesis and vascular function in the ovary.
2393 **REPRODUCTION**, v. 138, n. 6, p. 869–881, dez. 2009. Disponível em:
2394 <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/138/6/869.xml>>.
- 2395 ROCHE, J. Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective.
2396 **Reviews of Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 19–27, 1 jan. 1996. Disponível em:
2397 <<http://www.reproduction-online.org/lookup/doi/10.1530/ror.0.0010019>>.
- 2398 ROTH, Z. et al. Oocyte maturation in plasma or follicular fluid obtained from
2399 lipopolysaccharide-treated cows disrupts its developmental competence.
2400 **Theriogenology**, v. 141, p. 120–127, jan. 2020. Disponível em:
2401 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X1930411X>>.
- 2402 SANTOS, J. E. . et al. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on
2403 lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal**
2404 **Reproduction Science**, v. 80, n. 1–2, p. 31–45, jan. 2004. Disponível em:

- 2405 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432003001337>>.
- 2406 SARTORELLI, E. S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in
2407 Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2382–2394,
2408 jun. 2005. Disponível em:
2409 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X04003759>>.
- 2410 SARTORI, R. et al. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in
2411 Bovine Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403–1409, 1 nov. 2001.
2412 Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod65.5.1403>>.
2413
- 2414 SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to
2415 mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, v. 34, n.
2416 5, p. 475–491, set. 2003. Disponível em:
2417 <<http://www.edpsciences.org/10.1051/vetres:2003027>>.
- 2418 SHELDON, I. .; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal**
2419 **Reproduction Science**, v. 82–83, p. 295–306, jul. 2004. Disponível em:
2420 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432004000582>>.
- 2421 SHELDON, I. M. et al. The effect of intrauterine administration of estradiol on
2422 postpartum uterine involution in cattle. **Theriogenology**, v. 59, n. 5–6, p. 1357–1371,
2423 mar. 2003. Disponível em:
2424 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X0201169X>>.
- 2425 SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease in cattle.
2426 **Theriogenology**, v. 65, p. 1516–1530, 2006.
- 2427 SHELDON, I. M. et al. Uterine diseases in cattle after parturition. **The Veterinary**
2428 **Journal**, v. 176, n. 1, p. 115–121, abr. 2008. Disponível em:
2429 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023307004327>>.
- 2430 SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in
2431 Heifers Monitored by Real-Time Ultrasonograph. **Biology of Reproduction**, v. 39, n.
2432 2, p. 308–317, 1 set. 1988. Disponível em:
2433 <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod39.2.308>>.
2434
- 2435 SOLIMAN, M. et al. Plasma leptin responses to lipopolysaccharide and tumor
2436 necrosis factor a in cows. **Jpn J Vet Res**, v. 50, p. 107–114, 2002.
- 2437 SOMINSKY, L. et al. Neonatal immune challenge alters reproductive development in
2438 the female rat. **Hormones and Behavior**, v. 62, n. 3, p. 345–355, ago. 2012.
2439 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0018506X12000360>>.
- 2440 SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the
2441 Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 1851–1865, 1997.
2442 Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76121-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76121-6)>.
- 2443 STER, C.; LOISELLE, M.-C.; LACASSE, P. Effect of postcalving serum nonesterified
2444 fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. **Journal of**
2445 **Dairy Science**, v. 95, n. 2, p. 708–717, fev. 2012. Disponível em:
2446 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030212000239>>.
- 2447 TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v.

- 2448 140, n. 6, p. 805–820, mar. 2010. Disponível em:
2449 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867410000231>>.
- 2450 TAMANINI, C.; DE AMBROGI, M. Angiogenesis in Developing Follicle and Corpus
2451 Luteum. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 4, p. 206–216, ago. 2004.
2452 Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0531.2004.00505.x>>.
- 2453 TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- 2454 TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- 2455 URI-BELAPOLSKY, S.; et al. Interleukin-1 deficiency prolongs ovarian lifespan in
2456 mice. **Proc Natl Acad Sci**. v.111, n.34, p. 12492–12497 2014. Disponível em:
2457 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4151745/>
- 2458 VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth,
2459 differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p.
2460 1717–1751, abr. 2005. Disponível em:
2461 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X04002687>>.
- 2462 WALDRON, M. R. et al. Effect of Lipopolysaccharide on Indices of Peripheral and
2463 Hepatic Metabolism in Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 11, p.
2464 3447–3459, nov. 2003. Disponível em:
2465 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030203739496>>.
- 2466 WANDJI, S.-A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and growth factors affect the
2467 growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles.
2468 **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 817–832, mar. 1996. Disponível em:
2469 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0093691X96000118>>.
- 2470 WANNEMACHER, R. W. et al. Glucose and alanine metabolism during bacterial
2471 infections in rats and rhesus monkeys. **Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 201–212, mar.
2472 1980. Disponível em:
2473 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002604958090061X>>.
- 2474 WEBB, R. et al. Control of follicular growth: local interactions and nutritional
2475 influences. **Journal of animal science**, v. 82 E-Suppl, 2004.
- 2476 WEBER, P. S. D. et al. Pre-translational regulation of neutrophil I-selectin in
2477 glucocorticoid-challenged cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**,
2478 v. 83, n. 3–4, p. 213–240, dez. 2001. Disponível em:
2479 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242701003816>>.
- 2480 WILLIAMS, E. J. et al. ORIGINAL ARTICLE: The Effect of Escherichia coli
2481 Lipopolysaccharide and Tumour Necrosis Factor Alpha on Ovarian Function.
2482 **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 60, n. 5, p. 462–473, 13 out.
2483 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0897.2008.00645.x>>.
- 2484 WIRA, C. R.; GRANT-TSCHUDY, K. S.; CRANE-GODREAU, M. A. Epithelial Cells in
2485 the Female Reproductive Tract: a Central Role as Sentinels of Immune Protection.
2486 **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, n. 2, p. 65–76, fev. 2005.
2487 Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0897.2004.00248.x>>.
- 2488 WOOD, L. et al. Innate immune mechanisms linking non-esterified fatty acids and
2489 respiratory disease. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 1, p. 27–43, jan. 2009.
2490 Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782708000581>>.

- 2491 WU, X.-Q. et al. Neonatal programming by immunological challenge: effects on
2492 ovarian function in the adult rat. **REPRODUCTION**, v. 141, n. 2, p. 241–248, fev.
2493 2011. Disponível em:
2494 <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/141/2/241.xml>>.
- 2495 XIAO, L. et al. Expression of SOX2, NANOG and OCT4 in a mouse model of
2496 lipopolysaccharide-induced acute uterine injury and intrauterine adhesions.
2497 **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 14, 3 dez. 2017.
2498 Disponível em: <<http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12958-017-0234-9>>.
- 2499 YANG, W. et al. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from
2500 *Staphylococcus aureus* and *E. coli*, but *S. aureus* fails to both activate NF- κ B in
2501 mammary epithelial cells and to quickly induce TNF α and interleukin-8 (CXCL8)
2502 expression in the udder. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 5, p. 1385–1397, mar.
2503 2008. Disponível em:
2504 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589007007353>>.
- 2505 YILMAZ, O. et al. Nitric oxide in the bovine oviduct: Influence on contractile activity
2506 and nitric oxide synthase isoforms localization. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, p. 1312–
2507 1327, abr. 2012. Disponível em:
2508 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X11005516>>.
- 2509