



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

PRISCILA ANGELICA VICENTE DE OLIVEIRA

**Análise do perfil glicídico, lipídico e histopatológico do lavado
uterino e tecido endometrial de vacas repetidoras e não
repetidoras de cio**

RIO DE JANEIRO
2019

PRISCILA ANGELICA VICENTE DE OLIVEIRA

Análise do perfil glicídico, lipídico e histopatológico do lavado uterino e tecido endometrial de vacas repetidoras e não repetidoras de cio

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientadores: José Osvaldo Previato
Leonardo Freire de Lima

Trabalho realizado no Laboratório de Glicobiologia
(Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ)

RIO DE JANEIRO
2019

CIP - Catalogação na Publicação

O48a Oliveira, Priscila Angelica Vicente de
 Análise do perfil glicídico, lipídico e
 histopatológico do lavado uterino e tecido
 endometrial de vacas repetidoras e não repetidoras
 de cio / Priscila Angelica Vicente de Oliveira. --
 Rio de Janeiro, 2019.
 91 f.

 Orientador: José Osvaldo Previato.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
 Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas
 Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências
 Biológicas, 2019.

 1. Sub-fertilidade. 2. Gado leiteiro. 3.
 Endométrio. 4. Mucinas. 5. Lipídios . I. Previato,
 José Osvaldo, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

PRISCILA ANGELICA VICENTE DE OLIVEIRA

Análise do perfil, glicídico, lipídico e histopatológico do lavado uterino e tecido endometrial de vacas repetidoras e não repetidoras de cio

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Aprovada em:

Dr. José Osvaldo Previato (Orientador, Doutor, UFRJ)

Dr. Leonardo Freire de Lima (Orientador, Doutor, UFRJ)

Dr^a. Maria Auxiliadora Coelho Kaplan (Membro interno, Doutora, UFRJ)

Dr. Paulo Antonio de Souza Mourão (Membro externo, Doutor, UFRJ)

Dr. Bruno Campos de Carvalho (Membro externo, Doutor, EMBRAPA)

Dr. Marcel Frajblat (Suplente interno, Revisor, Doutor, UFRJ)

Dr. Luiz Claudio Francisco da Silva (Suplente externo, Doutor, UFRJ)

“Portanto Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória perpetuamente! Amém.”

(Romanos 11:36)

Aos professores Lucia Mendonça Previato e José Osvaldo Previato, por todo conhecimento compartilhado e pelo incentivo que transformou a minha história.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar toda honra e toda glória a Deus.

Gostaria de agradecer ao meu esposo Bruno pelo companheirismo e apoio em todas as decisões importantes da minha vida.

Gostaria de agradecer a minha mãe Suely e minhas irmãs Marina e Brenda pelo amor incondicional.

Aos professores Jose Osvaldo Previato e Lucia Mendonça Previato pelos ensinamentos e exemplo de dedicação à ciência.

Gostaria de agradecer aos colegas de laboratório, Leonardo Freire, Eduardo Salustiano, Kelly Monteiro e em especial Maria Alice e Leonardo Fonseca por me ajudarem com paciência na dissertação.

A Lana Cristina e Vilma Frazão pela amizade e carinho.

A minha chefia imediata Dr. Marcel Frajblat e aos colegas de trabalho pela compreensão.

Ao Dr. Bruno Campos da Embrapa Gado de Leite por ceder amostras.

Ao Dr. Rodrigo Catharino e Mohamed Dabaja pelo apoio na execução da espectrometria de massas e análise estatística dos lipídios.

À Dra. Christina Maeda Takiya pelo ensino e apoio nas análises histopatológicas.

RESUMO

A bovinocultura leiteira é de grande importância no agronegócio mundial e movimentada bilhões de dólares por ano. Alterações reprodutivas como a repetição de cio geram perdas econômicas significativas. A repetição de cio é caracterizada por pelo menos três inseminações artificiais consecutivas sem que haja gestação, sendo o principal causador desta alteração a infecção do endométrio. A endometrite muitas vezes ocorre de maneira subclínica, pois, há ausência de sintomas, tornando o diagnóstico difícil. Nesta dissertação, a análise histopatológica do endométrio demonstrou a presença de infiltrado inflamatório, caracterizado por células polimorfonucleadas e mononucleadas, tanto em fêmeas férteis como em fêmeas repetidoras de cio; no entanto, as fêmeas classificadas como repetidoras de cio apresentaram células mononucleadas significativamente maiores, quando comparadas às fêmeas férteis. O endométrio de fêmeas bovinas é recoberto por glicoproteínas do tipo Mucina (MUC), sendo a mucina tipo1 (MUC1) considerada crucial para a implantação do embrião. Visando identificar as diferenças na distribuição e expressão de glico-epítomos característicos da MUC1, foi realizada a histoquímica do endométrio de vacas repetidoras e não repetidoras de cio, utilizando as lectinas Jacalina e UEAI que reconhecem, respectivamente, Gal β 1-3GalNAc e α -Fucose, sacarídeos típicos de mucinas. Nossos resultados positivos com as lectinas demonstram a presença de MUC1, no tecido endometrial bovino, com terminais de Gal β 1-3GalNAc e α -Fucose. Estes glico-epítomos estão presentes em ambas as fases do ciclo estral, nas fêmeas analisadas. A intensidade de marcação pelas duas lectinas demonstrou que não ocorre variação na abundância dos glico-epítomos durante o ciclo estral, entre os grupos estudados. Na análise das mucinas isoladas e purificadas do lavado uterino, de ambos os grupos (controle e experimental) a composição sacarídica identificou fucose, galactose, N-acetilgalactosamina e N-acetilglucosamina. Por outro lado, os dados obtidos da relação molar entre estes monossacarídeos mostram diferenças marcantes entre os grupos (controle e

experimental), sugerindo que o padrão da relação molar entre os monossacarídeos constituintes das mucinas possa ser um biomarcador em potencial para discriminar vacas repetidoras e não repetidoras de cio. Em adição, a comparação do conteúdo lipídico do endométrio, nos dois grupos de fêmeas estudados, foi avaliada. Os lipídios são componentes estruturais de membrana das células que compõem o endométrio, funcionando, ainda, como moléculas de sinalização, modulando os processos envolvidos no desenvolvimento embrionário. Nesta dissertação, foram identificados fosfolipídios poli-insaturados, diacilgliceróis, esfingomiéline, PIP2, PIP3 e gangliosídeos, nas fases estro e diestro, como lipídios endometriais que discriminam as vacas repetidoras e não repetidoras de cio, sendo mais um produto caracterizado em nosso trabalho que poderá ser utilizado como biomarcador.

ABSTRACT

In global agribusiness, raising cattle for milk is of great importance, moving billions of dollars per year. Reproductive changes, such as repetition of estrus, generate significant economic losses. The repeat breeding is characterized by at least three consecutive artificial inseminations without gestation, is mainly due to infection of the uterine mucosa, the endometrium. Endometritis often occurs subclinically, as there are no symptoms, making the diagnosis difficult. In this dissertation, the histopathological analysis of the endometrium demonstrated the presence of inflammatory infiltrate, characterized by polymorphonucleated and mononucleated cells, in both fertile females and repeat breeding females; however, females classified as breeding repeater had significantly higher mononuclear cells when compared of fertile females. The endometrium of bovine females is covered by glycoproteins, named mucins (MUC), with mucin type1 (MUC1) being considered crucial for the implantation of the embryo. Aiming to identify the differences in the distribution and expression of glycoprotein epitopes characteristic of MUC1, endometrial histochemistry of both fertile females and repeat breeding females was performed using the Jacalin and UEAI lectins that recognizes Gal β 1-3GalNAc and α -Fucose terminals, respectively, saccharides typical of mucins. Our positive results with lectins demonstrate the presence of MUC1 in bovine endometrial tissue, with Gal β 1-3GalNAc and α -Fucose terminals. These glycoprotein epitopes are present in both phases of the estrous cycle in the analyzed females. The intensity of labeling, by the two lectins, demonstrated that there is no variation in the abundance of glycoprotein epitopes during the estrous cycle between the groups studied. In the analysis of the isolated and purified mucins of the uterine lavage, from both groups (control and experimental), the saccharide analyses identified fucose, galactose, N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine. However, the data obtained from the molar ratio between these monosaccharides show marked differences between the groups, suggesting that the pattern of

the molar ratio, between the constituent monosaccharides of the mucins, maybe a potential biomarker for discriminating the repeat breeding from non-repeating breeding cows. In addition, the comparison of the lipid content of the endometrium in the two groups of females studied was evaluated. Lipids are structural components of the membrane of the cells that make up the endometrium, functioning as signaling molecules, modulating the processes involved in embryonic development. In this dissertation, polyunsaturated phospholipids, diacylglycerols, sphingomyelin, PIP2, PIP3, and gangliosides were Identified, in the estrus and diestrus phases, as endometrial lipids that discriminate the repeat breeding and non-repeating cows of estrus, being another product characterized in our work that could be used as a biomarker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico da receita dos cinco principais produtos do Brasil	18
Figura 2: População bovina em 2016	19
Figura 3: Ranking de produção leiteira	20
Figura 4: Aparelho genital da fêmea bovina	21
Figura 5: Esquema do controle endócrino do ciclo estral	24
Figura 6: Esquema de inflamação endometrial ocasionada por bactérias patogênicas	26
Figura 7: Estrutura de glicoproteínas <i>O</i> -ligadas	27
Figura 8: Biossíntese de glicerofosfolipídios	30
Figura 9: Biossíntese de esfingolipídios	32
Figura 10: Gráfico de distribuição de idade	43
Figura 11: Número de inseminações artificiais necessárias para o nascimento de um bezerro	44
Figura 12: Volume do ovário em cm ³	44
Figura 13: Fotomicrografias representativas do endométrio do animal do grupo controle, na fase do estro	46
Figura 14: Fotomicrografias representativas do endométrio de animais do grupo controle, na fase do estro	47
Figura 15: Fotomicrografias representativas do endométrio de animais do grupo controle, na fase do diestro	48
Figura 16: Fotomicrografias representativas do endométrio de animal do grupo experimental, na fase do estro	49
Figura 17: Fotomicrografias representativas do endométrio de animal do grupo experimental, na fase do diestro	50
Figura 18: Gráficos de edema do endométrio bovino	52
Figura 19: Gráficos de vasos do endométrio bovino	52

Figura 20: Gráficos de inflamação do endométrio bovino	53
Figura 21: Dimensão das glândulas uterinas endometriais	54
Figura 22: Fotomicrografias representativas de endométrio de animal controle, na fase do estro coradas pela técnica histoquímica	57
Figura 23: Fotomicrografias representativas de endométrio de animal controle, na fase do diestro coradas pela técnica histoquímica	58
Figura 24: Fotomicrografias representativas de endométrio de animal do grupo experimental, na fase do estro coradas pela técnica histoquímica	59
Figura 25: Fotomicrografias representativas de endométrio de animal do grupo experimental, na fase do diestro corado pela técnica histoquímica	60
Figura 26: Cromatografia do lavado uterino, em coluna TSK G4000 SW	62
Figura 27: Perfil cromatográfico dos metil-glicosídeos trimetilsililados	64
Figura 28: Perfil cromatográfico obtido pela análise por CG-MS dos metil-glicosídeos trimetilsililados	65
Figura 29: Esquema de fragmentação de metil-6-deoxi-hexopiranosídeos trimetilsililados	66
Figura 30: Esquema de fragmentação de metil-hexopiranosídeos trimetilsililados	67
Figura 31: Esquema de fragmentação de N-acetil metil-hexopiranosídeos trimetilsililados	68
Figura 32: Espectro de massas referente aos sinais de Fucose	69
Figura 33: Espectro de massas referentes aos sinais de Galactofuranose	69
Figura 34: Espectro de massas referentes aos sinais de Galactopiranosose	70
Figura 35: Espectros de massas referentes aos sinais GalNAc e GlcNAc	70
Figura 36: Gráfico OPLS-DA das fêmeas selecionadas na fase do estro	73
Figura 37: Gráfico OPLS-DA das fêmeas selecionadas na fase do diestro	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de cabeças de gado no ano de 2016	18
Tabela 2: Reatividade de lectinas biotiniladas no endométrio bovino, fase do estro.	56
Tabela 3: Reatividade de lectinas biotiniladas no endométrio bovino, fase do diestro	56
Tabela 4: Composição química das mucinas do lavado uterino das fêmeas do grupo controle	71
Tabela 5: Composição química das mucinas do lavado uterino das fêmeas do grupo experimental	71
Tabela 6: Fosfolipídios endometriais responsáveis pela discriminação entre vacas não repetidoras e repetidoras de cio no estro	74
Tabela 7: Fosfolipídios endometriais responsáveis pela discriminação entre vacas não repetidoras e repetidoras de cio no diestro	74
Tabela 8: Esfingolipídios endometriais responsáveis pela discriminação entre vacas não repetidoras e repetidoras de cio no estro	75
Tabela 9: Esfingolipídios endometriais responsáveis pela discriminação entre vacas não repetidoras e repetidoras de cio no diestro	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Importância da bovinocultura	18
1.2	Sistema reprodutor feminino	20
1.2.1	Anatomia e histologia do útero	20
1.2.2	Controle endócrino do ciclo estral	22
1.3	Repetição de cio em vacas leiteiras	24
1.4	Importância das mucinas	27
1.5	Importância dos lipídios	28
1.5.1	Glicerolipídios	29
1.5.2	Glicerofosfolipídios	29
1.5.3	Esfingolipídios	31
2	OBJETIVO	34
2.1	Objetivo geral	34
2.2	Objetivos específicos	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Delineamento	35
3.2	Animais	35
3.3	Manejo reprodutivo	35
3.4	Coleta de material uterino	36
3.5	Lavado uterino	36
3.5.1	Biópsia uterina	36
3.5.2	Análise estatística do histórico reprodutivo	37
3.6	Histologia	37
3.6.1	Processamento	37
3.6.2	Histoquímica	37
3.6.3	Avaliação Histopatológica	38
3.6.4	Histomorfometria glandular	39
3.7	Purificação e obtenção das mucinas	40
3.7.1	Reação por PAS	40
3.7.2	Análise da composição de monossacarídica das mucinas purificadas.	40
3.8	Análise dos lipídios por espectrometria de massas de alta resolução	41
3.8.1	Obtenção dos lipídios	41
3.8.2	Espectrometria de Massas de Alta Resolução	41
3.8.3	Análise Estatística e Identificação de Biomarcadores	42

4	RESULTADOS	43
4.1	Histórico reprodutivo	43
4.2	Histologia	45
4.2.1	Avaliação Histopatológica	45
4.2.2	Histomorfometria glandular	53
4.2.3	Histoquímica	54
4.3	Purificação de mucinas do lavado uterino	61
4.3.1	Determinação da composição da mucina uterina	63
4.4	Análise dos lipídios endometriais por espectrometria de massas	72
4.4.1	Biomarcadores lipídicos de fertilidade e ou repetição de cio	76
5	DISCUSSÃO	77
6	CONCLUSÃO	83
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância da bovinocultura

A bovinocultura brasileira tem grande impacto no agronegócio mundial, movimentando bilhões de dólares por ano. Sendo responsável por gerar diferentes matérias primas, com destaque para as produções de carne e leite que estão entre os cinco principais produtos que movem a economia do país, as quais, no ano de 2016, juntas renderam cerca de 36 bilhões de dólares (Figura 1).

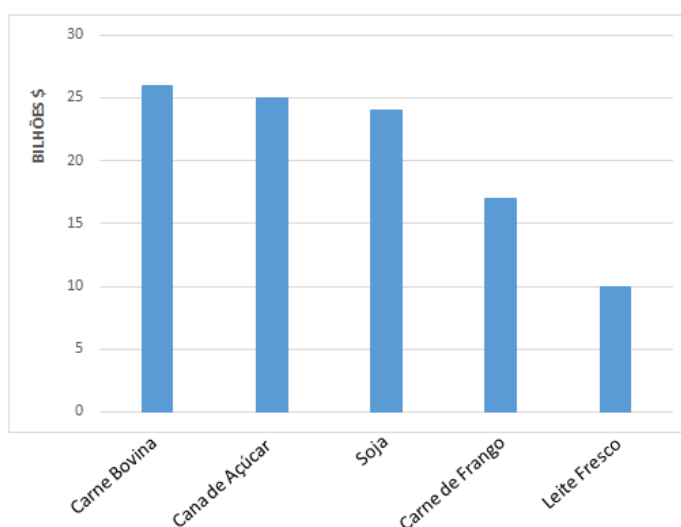


Figura 1: Gráfico demonstrando a receita (valor líquido) dos cinco principais produtos do Brasil em 2016, com destaque para produção de carne bovina e produção de leite fresco, adaptado da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura.

De acordo com os dados mais recentes da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) o Brasil, no ano de 2016, tornou-se o país com o maior rebanho do mundo, com aproximadamente 218 milhões de cabeças de gado, superando países como Índia, Estados Unidos e China (Tabela 1).

Tabela 1: Número de cabeças de gado no ano de 2016, adaptado da FAO

CLASSIFICAÇÃO	PAÍS	QUANTIDADE
1º	Brasil	218.225.177
2º	Índia	185.987.136
3º	Estados Unidos da América	91.918.000
4º	China	84.523.418
5º	Rússia	19.325.515

Em relação aos animais de produção leiteira, estes representam 9% do rebanho do Brasil, possuindo, aproximadamente, 20 milhões de cabeças de gado, atrás apenas da Índia com cerca de 49 milhões como demonstrado na Figura 2.

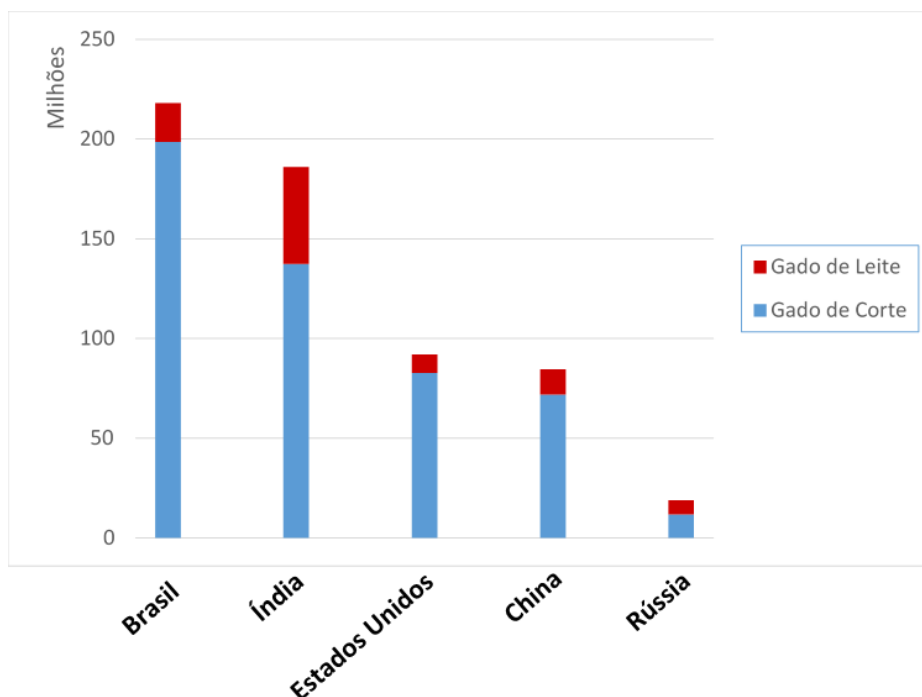


Figura 2: População bovina em 2016, gado de corte (azul) e gado leiteiro (vermelho), adaptado da FAO.

Ainda de acordo com a FAO, o Brasil em 2016 produziu cerca de 34 milhões de toneladas de leite, o que quando comparado aos dois anos anteriores é possível notar que houve uma queda de 2%. Além disso, os dados indicam que apesar do país ser destaque no número de cabeças de gado, ele perde em produção leiteira para os Estados Unidos, Índia e China (Figura 3). Este dado é justificado pela média de produção de leite por animal, onde dos países destacados o Brasil possui a segunda menor média, sendo 1.708 litros/vaca/ano, superando apenas a Índia com 1.592 litros/vaca/ano. A média de produção dos Estados Unidos é o destaque com 10.330 litros/vaca/ano, seguido pela Rússia com 4.238 litros/vaca/ano e China com 2.2941 litros/vaca/ano.

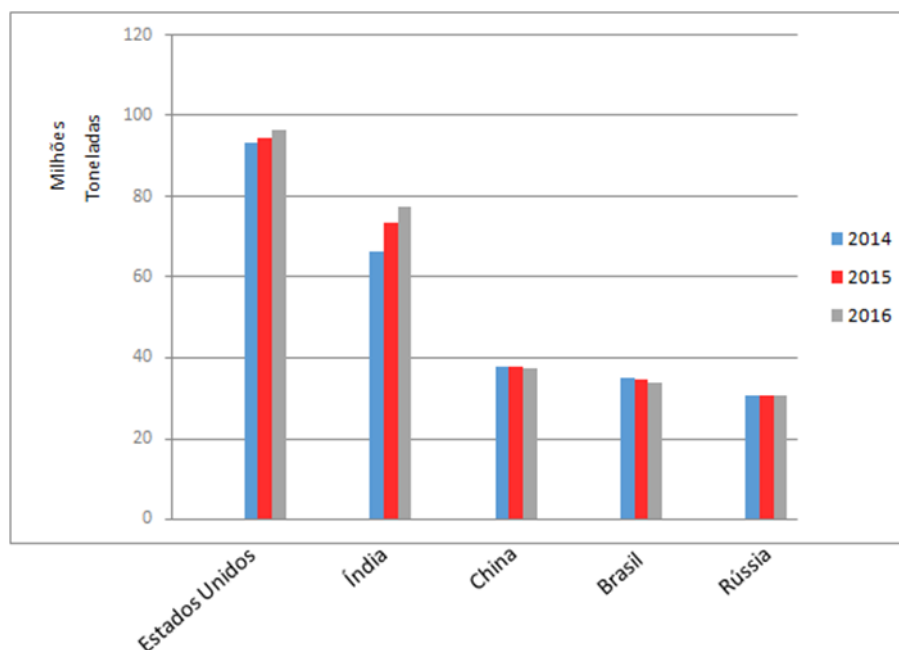


Figura 3: Ranking de produção leiteira dos maiores produtores de leite do mundo nos anos de 2014 – 2016, adaptado da FAO.

1.2 Sistema reprodutor feminino bovino

1.2.1 Anatomia e histologia do útero bovino

O útero é um órgão muscular oco, responsável por desempenhar muitas funções reprodutivas, desde reconhecer e nutrir o conceito até o parto (Spencer *et al.*, 2006). Em bovinos o útero é constituído por dois cornos, um corpo e a cérvix que também é chamada de colo do útero. Nos bovinos, o útero está situado dentro da cavidade abdominal e é do tipo bipartido, pois, possui um septo que separa os dois cornos. Este segmento do útero constitui a maior parte, possuindo em torno de trinta e cinco centímetros cada (Hafez e Hafez, 2013), já o corpo é o menor segmento do órgão, com apenas três centímetros de comprimento, esta é a região de escolha para a deposição do sêmen na inseminação artificial, pois aumentam as chances de concepção (López-Gatius, 2012). Uma característica marcante dos bovinos é a presença de carúnculas, que são as regiões onde ocorre a adesão das membranas fetais na gestação (Bridger *et al.*, 2007) (Figura 4). A cérvix possui a parede bem espessa, medindo em torno oito centímetros de comprimento e de formato transversal, consiste na estrutura localizada entre o corpo do útero e a vagina sendo de extrema importância para limitar o acesso ao útero. Além disso, é

possível encontrar projeções interdigitantes provenientes das paredes que auxiliam na oclusão do útero (Hafez e Hafez, 2013).

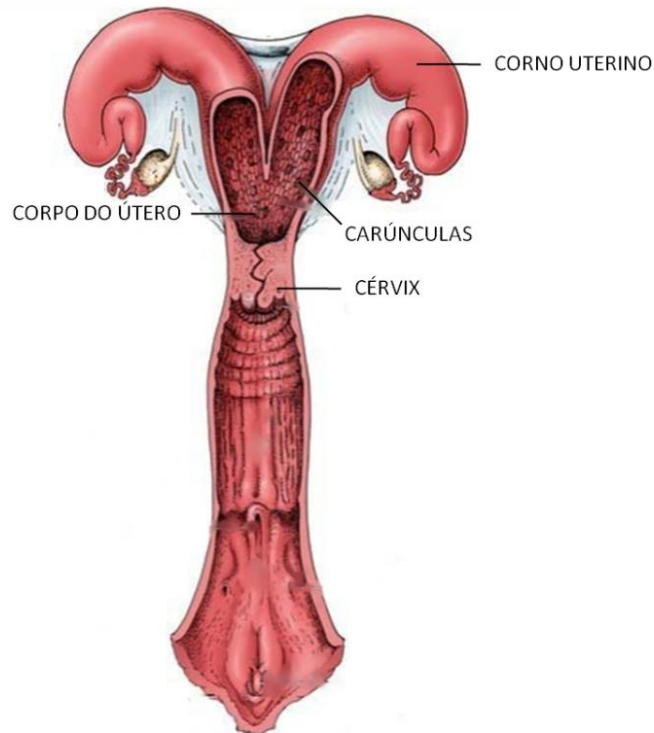


Figura 4: Aparelho genital da fêmea bovina. Vista dorsal dos órgãos reprodutivos, destacando os diferentes seguimentos do útero, adaptado de Dyce *et al.* (2004)

Histologicamente, o útero é dividido em três regiões distintas: a serosa ou perimétrio, a muscular ou miométrio, e a mucosa também conhecida como endométrio. A serosa é composta de tecido conjuntivo frouxo coberto por mesotélio peritoneal, possui muitos vasos sanguíneos, linfáticos e fibras nervosas. A camada muscular do útero, também conhecida como miométrio, é formada por fibras musculares lisas arranjadas em uma camada interna, circular e espessa, e uma camada externa, longitudinal e menos densa, ambos separados por uma camada vascular, o estrato vascular (Liebich, 2010).

A mucosa do útero, o endométrio, está sujeito à ação de diversos hormônios, o que leva a modificações características em cada fase do ciclo estral (Bauersachs *et al.*, 2005). Em bovinos o epitélio que reveste o endométrio é pseudo-estratificado e/ou colunar simples. O polo apical, que está voltado para a cavidade (lúmen) das células colunares, possuem abundantes especializações digitiformes da membrana

plasmática, as microvilosidades, que variam de altura de acordo com a atividade secretora do epitélio, apresentando-se mais longas na fase lútea em relação à fase folicular (Liebich, 2010). Sob o epitélio luminal está localizado o estroma que é formado por tecido conjuntivo contendo as glândulas uterinas (Wang *et al.*, 2007); o estroma inclui duas diferentes regiões: uma área densamente organizada de fibroblastos chamada de estrato compacto, muito vascularizado contendo macrófagos e mastócitos em maior quantidade, porém, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos também podem ser encontrados; estendendo-se para uma área menos densamente organizada localizada no endométrio mais profundo, chamada de estrato esponjoso (Espejel e Medrano, 2017). As glândulas uterinas estão presentes em todo o endométrio, com exceção da região das carúnculas. As glândulas são tubulares, simples e ramificadas e são responsáveis pela produção do histotrófo (Wang *et al.*, 2007) que consiste em um complexo de nutrientes, moléculas de adesão, enzimas, fatores de crescimento, citocinas e outras proteínas (Dunlap *et al.*, 2008). As carúnculas são proeminências da lâmina própria com vasto suprimento sanguíneo e ausência de glândulas, a região profunda possui um hilo no qual os vasos penetram; já o restante tem uma aparência esponjosa, em consequência das numerosas criptas que recebem as vilosidades coriônicas (Bridger *et al.*, 2007).

1.2.2 Controle endócrino do ciclo estral

O ciclo estral pode ser definido como um conjunto de eventos que tem a finalidade de preparar a fêmea para concepção e gestação. Como mostrado na Figura 5, o ciclo reprodutivo é determinado por alterações no perfil hormonal que acarretam em modificações fisiológicas e morfológicas características de cada fase. O ciclo tem duração aproximada de vinte e um dias e o início dá-se a partir da puberdade (Kojima e Patterson, 2003). Didaticamente, o ciclo pode ser dividido em quatro fases: estro (dia 1), metaestro (dia 2-3), diestro (dia 4-18), proestro (dia 19-21). Além disso, alguns autores dividem o ciclo em fase folicular que corresponde aos eventos de crescimento folicular até ovulação (proestro e estro) e fase luteínica, que vai do surgimento do corpo lúteo (CL) até sua regressão (metaestro e diestro) (Piccinno *et al.*, 2017).

O início do ciclo ocorre a partir da secreção do hormônio liberador de Gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo. Através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário o GnRH alcança a hipófise e estimula a liberação dos hormônios gonadotróficos FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e LH (Hormônio Luteinizante) (Hafez e Hafez, 2004). A secreção de GnRH ocorre em duas áreas do hipotálamo: nos centros controladores de secreção tônica, onde, ocorre a liberação de maneira constante; e através dos centros controladores da onda da onda pré-ovulatória que secreta, de uma vez, grande quantidade (Clarke, 2002). Por meio da circulação sanguínea as gonadotrofinas chegam até o ovário, onde o FSH é responsável por estimular o desenvolvimento dos folículos, assim como, produzir estrogênio, que chega ao hipotálamo provocando um *feedback* negativo na secreção tônica e *feedback* positivo na hipófise, gerando aumento na secreção dos hormônios gonadotróficos (Adams *et al.*, 2008).

Ao ocorrer à elevação do estrogênio na corrente sanguínea, até atingir o nível máximo, há alterações comportamentais gerando na fêmea a aceitação do macho (fase chamada de estro) (Galina e Orihuela, 2007), além disso, atua também nos centros controladores da onda pré-ovulatória, estimulando a liberação de grande quantidade de GnRH (Hafez e Hafez, 2004). Na fase final de maturação dos folículos outro hormônio chamado inibina é secretado, atuando de forma seletiva na hipófise fazendo o bloqueio na liberação de FSH. Este bloqueio faz com que haja uma maior liberação de LH, e posterior ovulação dos folículos maduros (Roth *et al.*, 2000).

Após a ovulação ocorre a formação do corpo lúteo, resultando na secreção de progesterona (Hafez e Hafez, 2004). Royal *et al.* (2002) citam que o CL começa a passar por modificações logo após a ovulação, porém, em vacas seu funcionamento é iniciado após um ou dois dias, atingindo seu desempenho máximo após cinco dias. A regressão do CL ocorre pela presença de um fator luteolítico, a prostaglandina F2 α (PGF2 α), que é produzida pelo endométrio. O período de atividade do CL é chamado de fase luteínica, esta fase que também é conhecida como diestro dura aproximadamente 15 dias em vacas (Hafez e Hafez, 2004).

Caso ocorra a fecundação, a secreção de progesterona é mantida através sinalização do embrião. A gestação bovina dura cerca de 290 dias (Hagiwara, 2014)

e vacas são consideradas férteis ao dar origem a um bezerro saudável por ano (López-Gatius *et al.*, 2006).

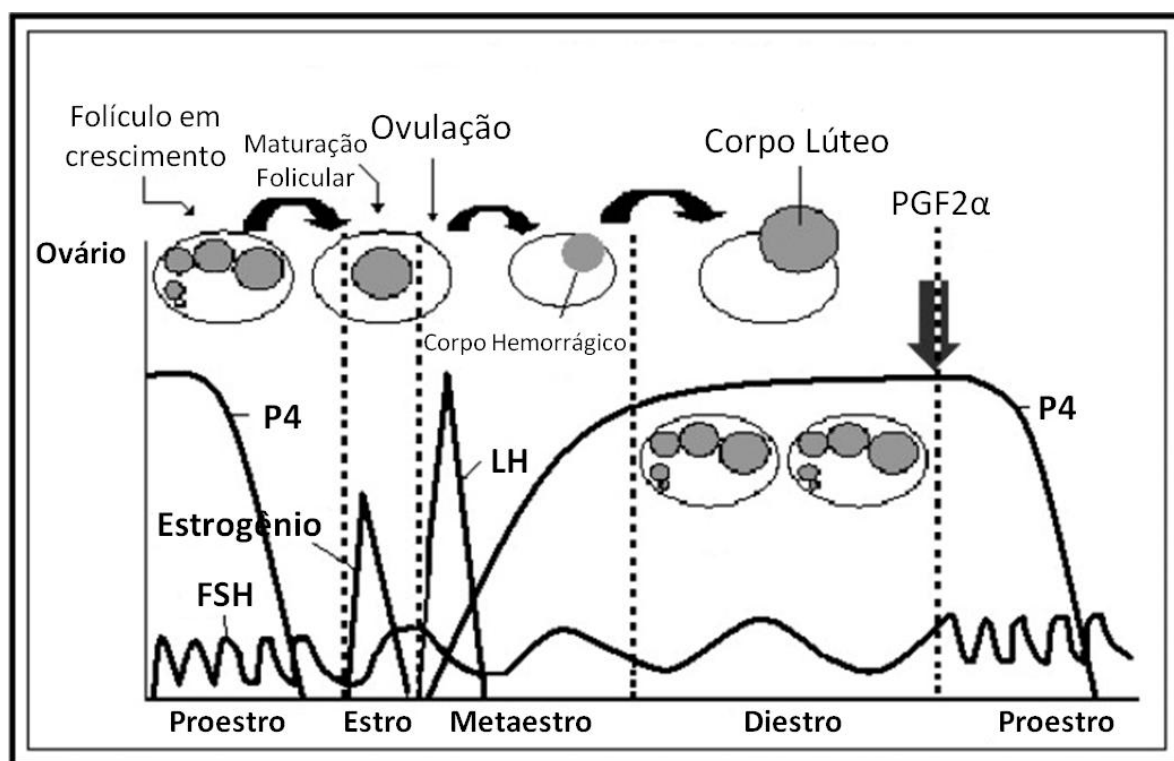


Figura 5: Diagrama do controle endócrino do ciclo estral. A figura expõe alterações no perfil dos hormônios secretados pelos ovários (estrogênio e progesterona) e pela hipófise (LH e FSH). As quatro fases do ciclo estral são: proestro, estro, metaestro e diestro. Adaptado de

1.3 Repetição de cio em vacas leiteiras

Importantes remodelamentos no sistema reprodutor feminino ocorrem para que haja uma gestação bem-sucedida, essas alterações são essenciais para maturação final dos gametas, fertilização, implantação e, posterior desenvolvimento do embrião. Uma adequada interação embrio-materna no período de implantação é crucial para o sucesso da gestação, logo, alterações que levem a uma falha no reconhecimento do embrião podem ser determinantes para perdas embrionárias (Bauersachs *et al.*, 2008).

A repetição de cio em vacas leiteiras é caracterizada por três ou mais inseminações artificiais consecutivas, sem que haja gestação, em fêmeas clinicamente saudáveis. Além disso, alguns autores consideram aceitável o intervalo

entre partos de até quatorze meses, acima deste período já pode ser indicativo de alguma doença no sistema reprodutor (Vercesi Filho *et al.*, 2007).

Doenças que levam a repetição de cio no rebanho são de grande importância, pois, podem afetar a qualidade de vida e o bem-estar do animal, assim como, gerar impacto econômico negativo para o país e prejuízos para o produtor, uma vez que o descarte dos animais afeta a lucratividade (Kasimanickam *et al.*, 2004), assim como, o alto custo com uso de antibiótico e perda na produção de leite (Gilbert *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos vêm demonstrando que a repetição de cio e até mesmo a infertilidade em bovinos, podem ter diferentes causas como, por exemplo, a retenção de placenta, cistos ovarianos e balanço energético negativo (Buso, 2015; Gundling *et al.*, 2015). No entanto grande parte dos casos está relacionada às doenças uterinas decorrentes, principalmente, de infecção pós-parto persistente (Sheldon *et al.*, 2009). Potter *et al.* (2010) demonstraram que, durante a primeira semana pós-parto, mais de 90% de vacas da raça holandesa estão com o útero infectados por bactérias. Porém, a diminuição da carga bacteriana ocorre durante o período de involução uterina, onde, o útero retorna ao seu tamanho original em até oito semanas. No transcorrer da involução ocorre à retração do útero, assim como, atrofia glandular, necrose e descamação permitindo que o endométrio sofra regeneração (Noakes, 2009). Estudos sugerem que a infecção do útero no momento do parto, possa ter um importante papel no processo de involução uterina, pois, a resposta imune inata é ativada, porém, quando a resposta do organismo não ocorre de maneira adequada o quadro de inflamação poderá persistir gerando, então, a endometrite (Chapwanya *et al.*, 2009). Esta infecção da mucosa uterina pode ser aguda, onde, os animais afetados apresentam sinais clínicos como descarga vaginal mucopurulenta, febre e diminuição da produção leiteira, ou, em alguns casos, as vacas podem ter endometrite subclínica, que de acordo com Leblanc (2014) entre 30% a 50% das vacas recém-paridas podem desenvolver este quadro, tornando o diagnóstico e tratamento mais difíceis devido à ausência de sinais clínicos (Salilew-Wondim *et al.*, 2016).

Diferentes microrganismos são capazes de provocar a endometrite, sendo as bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) as mais frequentes (Carneiro *et al.*, 2016). Após a infecção uterina, ocorre o recrutamento de células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, que são atraídos por

citocinas e quimiocinas, com o objetivo de eliminar os microrganismos patogênicos. Apesar da cascata inicial de eventos imunológicos acontecerem através de mediadores inflamatórios, o impacto dos microrganismos no hospedeiro pode ser potencializado por múltiplos fatores de virulência, incluindo toxinas formadoras de poros, sistemas de secreção bacteriana e proteases (Blander e Sander, 2012), pois, além da destruição uterina provocada pelos microrganismos, estes são capazes de invadir o epitélio e gerar a morte celular como demonstrado na Figura 6 (Sheldon *et al.*, 2014). Em relação à infecção viral o Herpesvírus bovino tipo quatro (*BoHV-4*) tem sido amplamente associado a alterações no trato reprodutivo (Yang *et al.*, 2017).

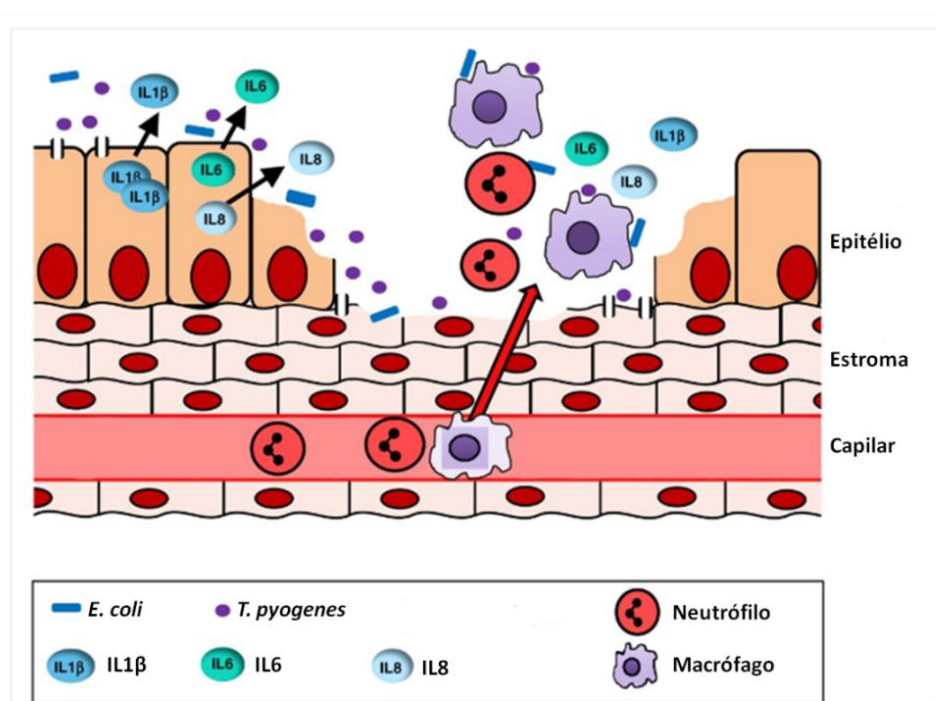


Figura 6: Inflamação endometrial ocasionada por bactérias patogênicas. A infecção uterina ocorre normalmente após o parto, principalmente por *Escherichia coli* e *Trueperella pyogenes*, estas bactérias invadem o endométrio, causando morte celular e outros danos teciduais. Ocorre a liberação de citocinas e quimiocinas como IL-1β, IL-6 e IL-8 (setas pretas). Estes mediadores inflamatórios atraem e ativam as células da corrente sanguínea, particularmente neutrófilos e macrófagos, para o local da infecção (seta vermelha), a fim de eliminar os microrganismos e restaurar o tecido lesado. Adaptado de Sheldon *et al.* (2014).

1.4 Importância das mucinas

As mucinas são glicoproteínas com elevado conteúdo de oligossacarídeos O-ligados, contendo unidades de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) ligadas a unidades de serina ou treonina na sequência peptídica. As unidades de GalNAc podem ser alongadas por galactose (Gal), *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), GalNAc, fucose (Fuc) e ácido siálico (Neu5Ac) (Figura 7), formando até 8 diferentes *cores* (Murray *et al.*, 2014). Além disso, as mucinas também podem ser classificadas como secretadas ou ligadas à membrana, onde, estão ancoradas ao polo apical do epitélio através de um domínio transmembrana (Perez-Vilar e Hill, 2004).

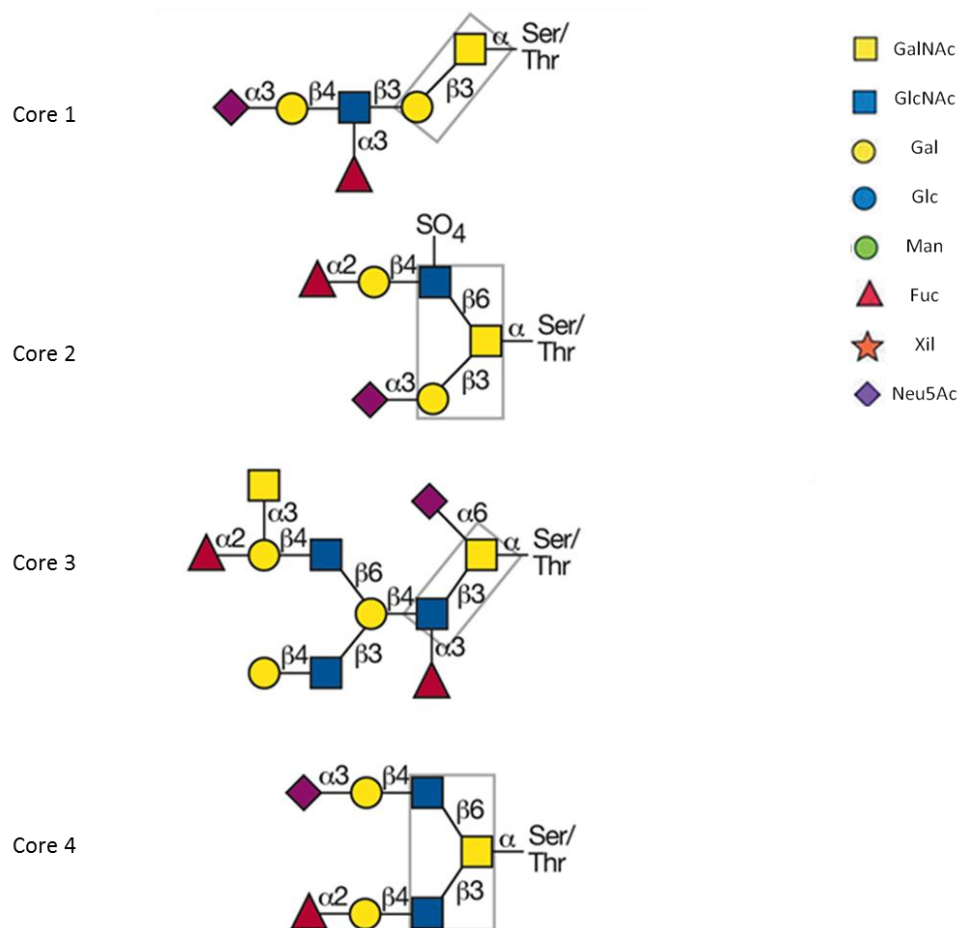


Figura 7: Estrutura de oligossacarídeos O-ligados à proteína, apresentando resíduos de serina ou treonina ligados à unidade de *N*-acetilgalactosamina. As unidades podem ser alongadas por Galactose, *N*-acetilglucosamina, Fucose e Ácido Siálico. Imagem representando os *cores* 1, 2, 3 e 4. Adaptado de Brockhausen *et al.* (2009).

Graças às características físico-químicas, as mucinas têm a capacidade de proteger o epitélio da desidratação, assim como, de ataques proteolíticos (Ramsey *et al.*, 2016). Porém, trabalhos vêm demonstrando que as mucinas podem exercer outras funções no organismo mais complexas, como proteção contra microrganismos (Parker *et al.*, 2010) e modulação da interação célula-célula, função que é realizada por mucinas de membrana, como por exemplo, as mucinas MUC1 e MUC4 (Parker *et al.*, 2010).

Muitos genes responsáveis por codificar diferentes mucinas já foram descritos. Resultados de diferentes grupos demonstram a importância biológica das mucinas, e, é crescente o número de autores que pesquisam sobre o envolvimento de mucinas na reprodução. Trabalhos vêm demonstrando a importância do MUC1 na fertilidade, pois, no útero esta mucina é regulada através dos hormônios gonadotróficos estrogênio e progesterona (Dharmaraj *et al.*, 2010). Em 2014, Kasimanickam *et al.* (2014) realizaram estudos, visando avaliar a expressão de RNA mensageiro (mRNA) dos genes MUC1 e de diversas outras citocinas no endométrio de vacas com condições inflamatórias uterinas pós-parto ou com histórico de repetição de cio, os resultados obtidos revelaram aumento de expressão de MUC1 em fêmeas repetidoras de cio quando comparadas a fêmeas controle, sugerindo então que MUC1 pode ter um importante papel na inflamação. Além disso, é crucial que no momento da implantação ocorra uma regulação negativa de MUC1 no local, permitindo a adequada interação embrio-materna e, conseqüentemente, sucesso na gestação (Aplin, 1997).

Além de MUC1 outros genes responsáveis por codificar mucinas parecem ter importância, como o MUC4 e MUC12 que foram significativamente mais expressos em vacas repetidoras de cio, quando comparadas ao grupo controle (Wagener *et al.*, 2017).

1.5 Importância dos lipídios

Assim, como as mucinas, os lipídios são constituintes celulares que possuem importantes funções biológicas, além de, formar a bicamada lipídica tanto de células como de organelas (Khan *et al.*, 2013). A estrutura química dos lipídios é fundamental para a sua distribuição nas seguintes categorias: ácidos graxos, glicerolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, esteróis, prenois, sacarolipídios e

policetídeos (Fahy *et al.*, 2009). Nessa dissertação destacaremos apenas os lipídios pertencentes à categoria dos glicerolipídios, glicerofosfolipídios e esfingolipídios.

1.5.1 Glicerolipídios

Esta categoria engloba os lipídios que apresentam a molécula de glicerol esterificada somente com ácidos graxos. Dependendo do número de ácidos graxos que esterificam a molécula de glicerol, esses lipídios são denominados mono, di e triacilglicerol (Fahy *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que moléculas de diacilglicerol (DG) são importantes mensageiras na ativação, proliferação, migração de células do sistema imunológico inato e adaptativo (Kobayashi *et al.*, 2007), sendo, sua abundancia regulada pelas diacilglicerolquinases (DGKs) que fazem conversão de DG para ácido fosfatídico (PA). Assim, o PA produzido pelas DGKs pode funcionar como um regulador negativo da resposta inflamatória, pois, o aumento dos níveis de DG pode gerar a hiperativação da resposta imunológica (Joshi *et al.*, 2013).

O envolvimento do DG nos eventos relacionados à resposta imunológica do hospedeiro ocorre graças a sua capacidade de estimular diferentes receptores de célula T, que estão envolvidos na ativação de diferentes tirosinasquinases, além, da formação de um complexo que envolve muitas moléculas, essa cascata de eventos é fundamental para uma adequada resposta imunológica inicial contra agentes infecciosos (Zehn *et al.*, 2009).

1.5.2 Glicerofosfolipídios

Os glicerofosfolipídios são os principais lipídios presentes na membrana celular. Estes lipídios são formados pela esterificação do glicerol-3-fosfato (G3P) em uma via que tem como precursores o PA e o DG (Eugene, 1956; Holub e Kuksis, 1978). Assim, a partir do PA e DG são formados glicerolipídios com diferentes cabeças polares esterificando a posição sn-3 do glicerol, denominados de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) e fosfatidilglicerol (PG) (Iupa, 1988) (Figura 8).

A composição de glicerofosfolipídios difere entre os tipos celulares, organelas e membranas, e essas diferenças são conhecidas por desempenharem papéis importantes em várias funções celulares, incluindo transdução de sinal, tráfego de

vesículas e fluidez de membrana. Belaz *et al.* (2016) demonstraram que existe um perfil lipídico, no ambiente uterino, diferente entre dois grupos de bovinos, de alta e baixa receptividade, evidenciando que o remodelamento de lipídios pode ser crucial para a manutenção da gestação. Além disso, outro estudo, porém, em ovinos foi capaz de caracterizar as mudanças no decorrer do ciclo, onde, a PC aumentou com o avanço do ciclo estral e durante o período inicial de gestação, posteriormente, este lipídio diminuiu. Também foi possível observar este aumento na PE, porém, já no final do ciclo. Já em relação a PS e PI estes permaneceram com os níveis constantes (Meier *et al.*, 1997).

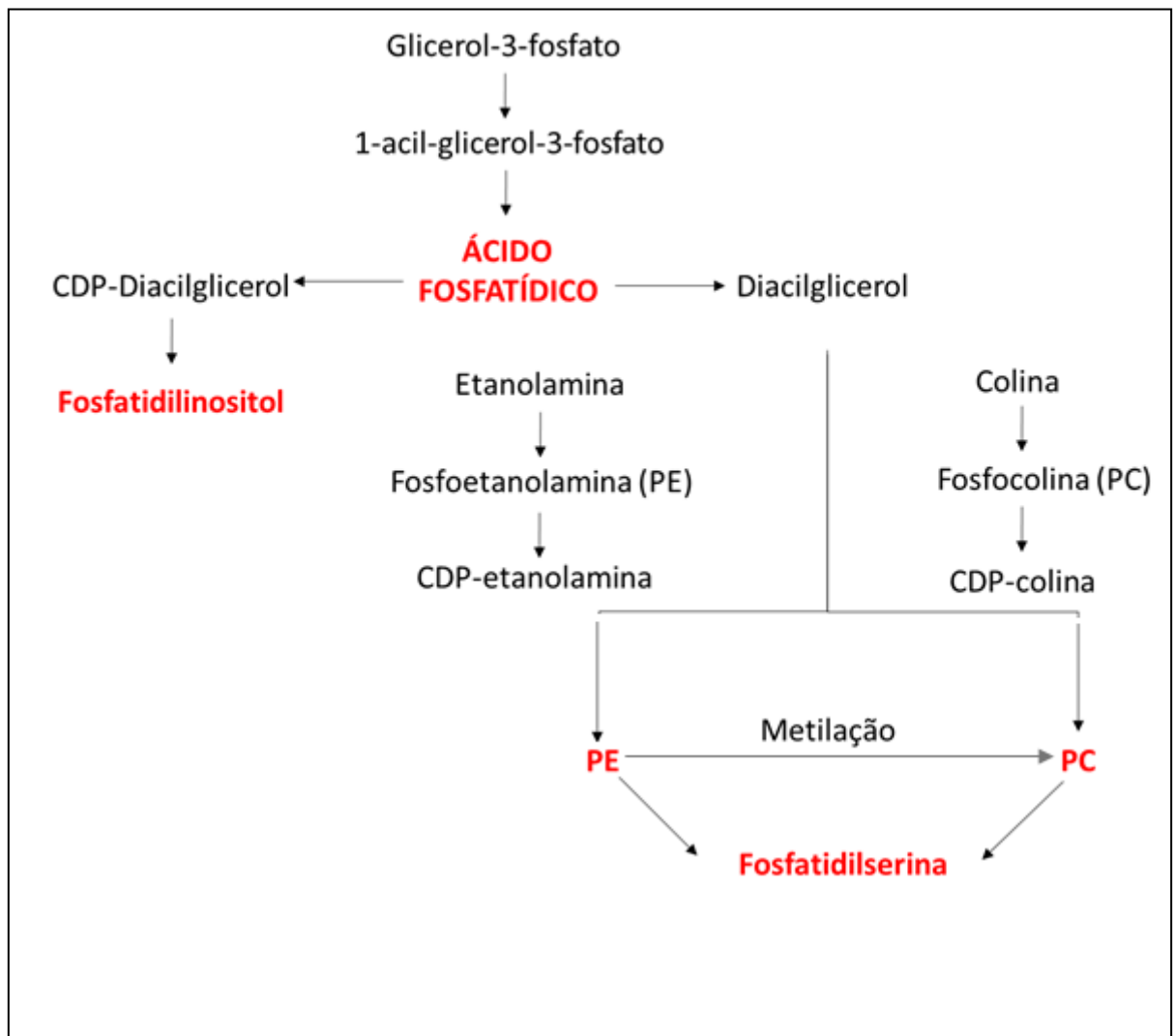


Figura 8: Biossíntese de glicerofosfolípidios. A partir do ácido fosfatídico e diacilglicerol são formados glicerolípídios com diferentes cabeças polares esterificando a posição sn-3 do glicerol, originando diferentes glicerofosfolípidios como a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol. Adaptado (Mendis, 2016).

1.5.3 Esfingolipídios

Os esfingolipídios são componentes de membranas de células eucarióticas, sendo encontrados preferencialmente em membrana plasmática, do retículo endoplasmático, do Golgi e lisossomos. O componente definidor dos esfingolipídios é uma base de cadeia longa (LCB) composta, em geral, por 18 a 20 átomos de carbono, apresentando sempre grupos hidroxila no carbono-1 (C-1) e no carbono-3 (C-3) e um grupo amino no carbono-2 (C-2). As principais LCBs encontradas em células eucarióticas são: esfingosina (SPH), esfinganina ou diidroesfingosina (DHS) e a 4-hidroxi esfinganina ou fitoesfingosina (PHS). As LCBs livres são geralmente, encontradas em baixas concentrações nas células porque durante a síntese *de novo* elas são rapidamente N-aciladas no grupamento amino do C-2 por um ácido graxo, formando a ceramida. Posteriormente, estruturas polares são adicionadas á hidroxila do C-1, formando os diferentes esfingolipídios complexos. Assim, estão incluídos na categoria de esfingolipídios as LCBs livres, LCBs-1-fosfato, ceramidas, ceramidas-1-fosfato, inositolfosfoceramida, esfingomielina e glicoesfingolipídios. A classe dos glicoesfingolipídios é constituída de: monohexosilceramida, lactosilceramida, gangliosídeos e muitos outros oligoglicosilceramidas. Estudos sobre a função biológica dos esfingolipídios demonstraram que esfingosina, esfingosina-1-fosfato, ceramida e ceramida-1-fosfato regulam processos celulares fundamentais e diversos como a organização do citoesqueleto de actina, endocitose, ciclo celular e apoptose (Obeid *et al.*, 1993; Venable *et al.*, 1995).

Assim, as ceramidas estão envolvidas na regulação da apoptose, diferenciação e proliferação celular. Em contraste, a esfingosina-1-fosfato e a ceramida-1-fosfato promovem a divisão celular em oposição a apoptose, de modo que o equilíbrio entre esses esfingolipídios e os níveis de ceramida e/ ou esfingosina nas células é crítico. Da mesma forma, os glicoesfingolipídios estruturais, como os gangliosídeos regulam a atividade do receptor de crescimento epidérmico, do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas, do receptor do fator de crescimento de fibroblastos, do receptor de neurotrofina TrkA e do receptor de insulina (D'angelo *et al.*, 2013; Julien *et al.*, 2013). Além de sua ação como moléculas envolvidas na sinalização celular, os glicoesfingolipídios participam de vários processos de reconhecimento envolvendo interações célula-célula, por

exemplo, a adesão de células neuronais a bainha de mielina por gangliosídeos e glicoproteína associada a mielina, interação do gangliosídeo GM3-Lactosilceramida CG3 mediando a adesão de células do melanoma as células endoteliais, interação esperma-ovo e implantação do embrião a placenta. Mizugishi *et al.* (2015), mostraram que animais com algum tipo de deficiência na síntese de esfingolípídios possuem problemas reprodutivos incluindo aborto.

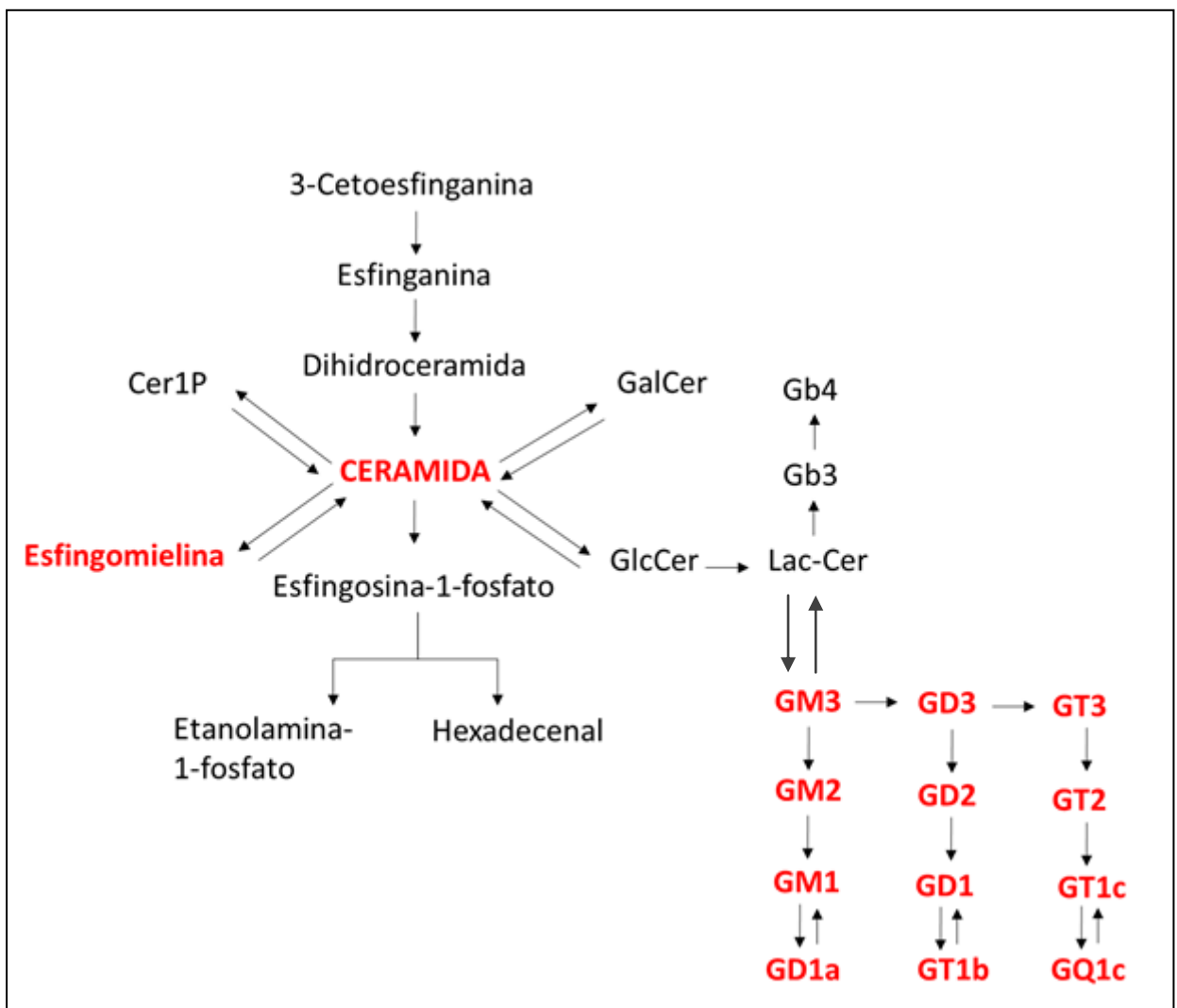


Figura 9: Biossíntese de esfingolípídios. A ceramida é a precursora de muitos esfingolípídios, onde, diversidades no domínio hidrofóbico e nos oligossacarídeos dão origem aos diferentes glicoesfingolípídios. Adaptado de Mendis (2016).

A repetição de cio em vacas leiteiras pode ser ocasionada por diferentes fatores, porém, a maioria dos casos é desencadeada por infecção uterina que ativa a resposta imune imediata, levando a inflamação através de uma cascata de eventos bem conservados em diferentes tecidos. Os casos de endometrite, frequentemente, são do tipo subclínicos, porém, devido à ausência de sintomas, a inflamação pode persistir sem tratamento adequado, caso o diagnóstico não seja realizado (Potter *et al.*, 2010).

Entender como determinadas moléculas se comportam durante a repetição de cio é fundamental para desenvolver métodos de diagnósticos precisos e tratamento adequado, com o objetivo de melhorar o desempenho reprodutivo e consequentemente a produção do rebanho.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Isolar, purificar e identificar moléculas do lavado uterino e tecido endometrial, associadas à repetição de cio em vacas leiteiras.

2.2 Objetivos específicos

Analisar o perfil histológico do endométrio de ambos os grupos em dois momentos do ciclo estral: estro e diestro.

Avaliar a distribuição e expressão de glico-epítomos característicos de MUC1, do endométrio de vacas repetidoras e não repetidoras, por histoquímica.

Purificar e caracterizar as mucinas presentes no lavado uterino com o objetivo de avaliar diferenças entre o grupo experimental e controle.

Identificar possíveis biomarcadores lipídicos para repetição de cio, utilizando espectrometria de massas de alta resolução.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento

O delineamento experimental foi realizado em blocos, em um arranjo fatorial 2x2, sendo dois grupos: (i) vacas de alta e baixa fertilidade; e (ii) em dois momentos de avaliação do ciclo estral: estro e diestro.

3.2 Animais

Foram utilizadas vinte vacas da raça Holandesa:

(i) dez vacas de baixa fertilidade, também chamadas de repetidoras de Cio (**Grupo Experimental**). Estes animais são caracterizados por terem, pelo menos, três inseminações artificiais consecutivas sem concepção.

(ii) dez vacas com histórico de alta fertilidade (**Grupo Controle**). Estas vacas foram selecionadas a partir de 45 dias pós-parto, com puerpério normal, sem ocorrência de retenção de placenta ou infecção uterina. O intervalo de partos para estes animais é inferior a quatorze meses, tendo havido até duas inseminações por concepção.

3.3 Manejo reprodutivo

Foi realizado um protocolo hormonal para padronização da fase do ciclo estral. As vacas com atividade ovariana luteal cíclica e híginas foram submetidas a protocolo de tratamento hormonal, com a aplicação de uma dose de hormônio GnRH sintético (acetato de buserelina, Sincroforte, Ouro Fino Saúde Animal, Brasil). Este momento foi considerado o início do manejo (**d0**).

Sete dias após a administração de GnRH (**d7**), as vacas receberam uma dose do análogo de prostaglandina (cloprostenol sódico, Croniben, Biogenesis-Bagó, Brasil).

No oitavo dia (**d8**), as vacas receberam uma segunda dose de GnRH, e passaram por uma observação quanto a manifestação do cio. No **d8**, as vacas foram submetidas à ultrassonografia para avaliação do diâmetro dos ovários.

No décimo dia após a ocorrência do cio (diestro, **d18** do protocolo), as vacas foram novamente avaliadas por ultrassonografia para confirmar a presença de corpo

lúteo. Confirmada a presença de corpo lúteo, uma nova avaliação para a determinação do diâmetro dos cornos uterinos foi realizada, sendo feita uma segunda coleta de material uterino. Após a segunda coleta, as vacas receberam uma dose de prostaglandina e retornaram ao manejo reprodutivo normal do rebanho.

3.4 Coleta de material uterino

As vacas selecionadas foram submetidas à lavagem do lúmen uterino no **d8** (estro), enquanto as biópsias uterinas foram realizadas nos dias **d8** (estro) e **d18** (diestro) do protocolo. Todos os procedimentos de coleta de material uterino foram realizados com anestesia peridural com lidocaína a 2 %.

3.5 Lavado uterino

Para a realização do lavado uterino nos animais, 15 ml de solução fisiológica foram infundidos com auxílio de sonda de *Foley* e seringa. O fluido recolhido foi acondicionado em gelo e centrifugado a 433 g (BeckmanCoulter, Allegra X-30, USA) por 5 min. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -18°C para posterior análise da presença de glicoproteínas com características de mucinas.

3.5.1 Biópsia uterina

Após a lavagem do útero, as vacas foram submetidas à biópsia uterina com auxílio de pinça de biópsia uterina longa (Botupharma, Brasil). Na primeira coleta, a biópsia foi realizada no corno esquerdo. Na segunda coleta, o procedimento foi realizado no corno direito. Em cada coleta, foram recuperados dois fragmentos de tecido uterino. O primeiro foi acondicionado em criotubo e, imediatamente, congelado para a realização de espectrometria de massas (ver detalhe no item específico). O segundo fragmento foi armazenado em solução formol tamponado para análise histológica/histoquímica.

3.5.2 Análise estatística do histórico reprodutivo

Com o objetivo de avaliar se houve a separação efetiva dos grupos, como proposto neste trabalho, após a verificação do histórico reprodutivo dos animais foi realizada análise estatística da razão entre o número de inseminações artificiais (IA) /número de partos por animal. O teste t foi empregado para avaliar a separação dos grupos.

No momento da coleta do material a ser analisado, as fêmeas foram submetidas à ultrassonografia para avaliação do diâmetro do ovário. Para que a análise estatística pudesse ser realizada com eficácia, foi aplicada a fórmula descrita por (Penitente-Filho *et al.*, 2015).

$$\text{Volume do ovário} = \frac{3}{4} \times \pi \times \frac{D1}{2} \times \frac{D2}{2}.$$

Em adição, os grupos foram comparados utilizando o teste t.

3.6 Histologia

3.6.1 Processamento

As biopsias foram fixadas em uma solução de tampão fosfato contendo 10% de formaldeído. Seguindo-se o processo de desidratação em série alcoólica (etanol) crescente (1x 70%, 2x 100%). Posteriormente as amostras foram diafanizadas em xileno por 45 min. As biópsias foram então mantidas imersas em parafina líquida (56° C) durante 20 min (2x). Finalmente, cada fragmento de tecido foi emblocado em parafina (parafina histológica, Cat. No: 755, Isofar, Brasil) e mantido à temperatura ambiente por aproximadamente 24h. Foram obtidos cortes histológicos de 5,0 µm de espessura, no micrótomo (Leica RM2125RT, Alemanha), recolhidos em lâminas histológicas. Após secagem por 12 h, os cortes histológicos foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) (Mcmanus, 1948).

3.6.2 Histoquímica

Com o objetivo de avaliar a distribuição de moléculas glicosiladas presente no endométrio de vacas selecionadas e, verificar as possíveis diferenças entre os grupos propostos (GE e GC), a análise histoquímica foi realizada utilizando duas lectinas. A lectina *Jacalin* (Cat. No: B-1155, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) possui afinidade para unidade de galactose β 1-3 ligada a unidade de N-

acetilgalactosamina (Gal β 1-3GalNAc) (diluição de 1:50); a *Ulex Europaeus Agglutinin I* (UEA I) (Cat. No: B-1065, Vector Labs.) que reconhece unidade terminal de α -L-Fucose, (diluição 1:30).

Após desparafinizar e hidratar os cortes histológicos, foi realizada a inibição da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio 3 % em metanol (15 min), seguido de lavagem em água destilada (2x 5 min) e PBS (2x 5 min). Realizou-se a recuperação antigênica para a exposição de epítomos ou unidades de carboidratos através de aquecimento em Banho-Maria no microondas (2x 5 min) em tampão citrato (10 mM – pH 6,0). Após o resfriamento da solução, os cortes histológicos foram lavados com solução tampão fosfato-salina (PBS), sendo então realizada a inibição da biotina endógena através do kit *Avidin/BiotinBlocking* (Cat. No: SP-2001, Vector Labs.) segundo as instruções do fabricante. O bloqueio inespecífico da ligação das lectinas com o tecido foi realizado utilizando-se o *Carbo-Free™ BlockingSolution* (Cat. No: SP-5040, Vector Labs.) nas condições indicadas pelo fabricante. As seções foram então, incubadas com as lectinas de interesse por 18 h a 4° C, seguido de lavagem em PBS-Tween 0,25 %, pH 7,2. Para visualização da ligação das lectinas foi utilizado o reagente avidina-peroxidase do kit VECTASTAIN® Elite ABC (Cat. No: PK-6100 Vector Labs) seguido de 3,3'-*Diaminobenzidine (DAB) EnhancedLiquidSubstrate System tetrahydrochloride* (Cat. No: D3939, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). As seções foram contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas, diafanizadas e as lâminas foram montadas utilizando Entellan® (Merck).

Os cortes histológicos foram analisados usando microscopia de luz (Nikon Eclipse E800, Japan).

3.6.3 Avaliação Histopatológica

A análise descritiva das biopsias de endométrio foi realizada segundo os parâmetros descritos por Bonnett *et al.* (1991). Foram considerados, o tipo histológico do epitélio superficial do endométrio; das glândulas endometriais; do estroma (estrato compacto e esponjoso); e infiltrado inflamatório presente.

Foi realizada a quantificação do edema, vasos capilares e da inflamação através de score histológico, dos parâmetros: 1. Edema intersticial, 2. Vasos, 3. Inflamação (células polinucleares ou mononucleares), considerando nove escalas:

0	Ausência
0,5	presença do parâmetro, em até 10% da área endometrial presente
1,0	presença do parâmetro em 11 – 24% da área endometrial presente
1,5	presença do parâmetro em 25 – 38% da área endometrial presente
2,0	presença do parâmetro em 39 – 50% da área endometrial presente
2,5	presença do parâmetro em 51% - 64% da área endometrial presente
3,0	presença do parâmetro em 65 – 77% da área endometrial presente
3,5	presença do parâmetro em 78 – 90% da área endometrial presente
4,0	presença do parâmetro em 91 – 100% da área endometrial presente

3.6.4 Histomorfometria glandular

As glândulas presentes no endométrio foram analisadas quantitativamente. Utilizou-se um sistema de captura e análise de imagens, constituído por um microscópio de luz Eclipse E800 (Nikon, Japan) acoplado a uma câmara digital Evolution VR Cooled Color 13 bits (Media Cybernetics, Bethesda, USA). A interface de captura utilizada foi o programa Q-Capture 2.95.0, versão 2.0.5 (SiliconGraphicsInc, EUA), sendo as imagens transmitidas para um monitor colorido LCD, congeladas e digitalizadas. As imagens foram capturadas após calibração dos parâmetros de cor e contraste adequados e mantidos constantes para cada tipo de coloração ou histoquímica. Foram realizadas imagens de alta resolução (2048 X 1536 pixels buffer) em formato TIFF (10 imagens com a lente objetiva 20x) e levadas para leitura no programa ImageJ versão 1.52e (Research Services Branch, U.S. NationalInstitutesof Health, Bethesda, MD, USA), com auxílio de computador de alto desempenho. Usou-se a ferramenta per área (Objeto/área total), ajustada a sensibilidade em 4.0 e calibração do aumento utilizado.

3.7 Purificação e obtenção das mucinas

Para a purificação das mucinas os lavados uterinos coletados foram diluídos 1:3 em água destilada e centrifugados a 15.000 x g durante 30 minutos. Os sobrenadantes obtidos após centrifugação foram dialisados a 4 °C contra água destilada, durante 24 h e liofilizados. Os liofilizados foram solubilizados em tampão Tris-HCL 10 mM pH 7.0, contendo 170 mM de cloreto de sódio (NaCl) e fracionados por cromatografia de filtração em gel, em coluna TSK gel G4000 SW Ultrapac (7,5mm idi x600mm LKB) conectada a um sistema de HPLC (AKTApurifier GE HealthcareSweedem), e calibrada com padrões de: Azul de Dextrana (2,000,000 Da), Imunoglobulina G (156,000 Da), Soro albumina bovina (67.000 Da) e Inibidor de Tripsina (20,100 Da). A coluna foi equilibrada e eluída com o mesmo tampão utilizado para solubilizar a amostra, em um fluxo de 0,7 mL/min. A absorbância do eluato foi monitorada, continuamente, a 280 nm. Frações de 0,6 mL foram coletadas e analisadas com o reagente ácido periódico-Schiff (PAS) para a detecção de carboidratos. As frações contendo mucinas foram reunidas, concentradas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas.

3.7.1 Reação por PAS

Para a detecção das mucinas, foi realizado o ensaio com PAS em microplacas de 96 poços (K12-96, Kasvi, Brasil) onde 50 µL da amostra foram incubados com 120 µL de ácido periódico a 0,06 % (v/v) em 7 % (v/v) de ácido acético durante 90 min à temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados 100 µL de reagente de Schiff (Wcor corantes, Brasil), seguindo-se por 60 min à temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 570 nm em leitor de placas (AD340 platereader, BeckmanCoulter, Califónia, EUA).

3.7.2 Análise da composição de monossacarídica das mucinas purificadas

A determinação da composição monossacarídica foi realizada por metanólise das mucinas purificadas e liofilizadas. O procedimento foi iniciado com a adição de 500 µL de metanol-HCL 0,5 M, a 80 °C, por 18 h. Após extração do metanolizado com hexano, a fase metanólica foi neutralizada com carbonato de prata e submetida à re-N-acetilacção com anidrido acético à temperatura ambiente. Após 18 h, o

carbonato de prata foi removido por centrifugação e os metil-glicosídeos, presentes no sobrenadante metanólico, foram trimetilsililados com N,O-bis (trimetilsilil) trifluoracetanamida (BSTFA) e piridina (1:1 v/v) por 1 h, à temperatura ambiente e analisados por cromatografia gás-liquida (CG) e cromatografia gás-liquida acoplada a espectrometria de massa (CG-MS). A CG dos metil-glicosídeos trimetilsililados foi realizada em cromatógrafo Shimadzu 2012 Plus equipado com uma coluna capilar DB-1 com 30 m de comprimento e 25 mm de diâmetro interno, sendo o hidrogênio utilizado como gás de arraste. A análise de CG-MS foi realizada em um espectrômetro de massa Shimadzu GCMS-QP5050 (impacto de elétrons 70 eV), acoplado a um cromatógrafo Shimadzu 17 A, equipado com uma coluna capilar DB-5 com 30 m de comprimento e 25 mm de diâmetro usando o hélio como arraste. A temperatura da coluna de ambos cromatógrafos foi programada para variar de 120 a 240°C, 2°C/min. Os metil-glicosídeos foram identificados por comparação com os tempos de retenção de padrões conhecidos, e pelo padrão de fragmentação observado nos espectros de massas.

3.8 Análise dos lipídios por espectrometria de massas de alta resolução

3.8.1 Obtenção dos lipídios

Para análise dos lipídios presentes no endométrio das vacas selecionadas 1,5mL de metanol foi adicionado às biopsias, seguindo-se sonicação por 5 min e agitação, em vortex, por 20 seg (2x). Após centrifugação, 1800 x g durante 15 min a 4° C, foi realizada diluição 1:1000, em metanol. A solução diluída foi dividida em dois frascos (500 µL cada), seguindo-se adição de ácido fórmico ou hidróxido de amônio (2%v/v) e posterior análise, respectivamente, nos modos positivo e negativo. Todas as amostras foram preparadas em triplicata. Metanol, ácido fórmico e hidróxido de amônio foram adquiridos junto a J. T. Baker (Xalostoc, México) e utilizados sem purificação adicional.

3.8.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Após a preparação, todas as amostras foram analisadas em um instrumento Orbitrap Discovery ESI-LTQ-XL (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) com uma resolução nominal de 30.000 (FWHM). As análises foram realizadas na faixa de massa de 60 a 600 (baixa massa) e 600 a 1600 (alta massa) m/z. Para a obtenção

dos espectros o instrumento foi configurado de acordo com os seguintes parâmetros: taxa de fluxo de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, temperatura capilar de 280 °C, 5 kV de tensão de pulverização e gás de bainha em 10 unidades arbitrárias. As aquisições foram realizadas em quintuplicatas e, nos modos positivo e negativo.

3.8.3 Análise Estatística e Identificação de Biomarcadores

O método de escolha para analisar a variação entre os grupos foi o de análise de discriminação de mínimos quadrados parciais ortogonais (OPLS-DA). Trata-se de um método que utiliza técnicas de regressão multivariada para extrair características de cada grupo e mostrar a existência de diferenças ou semelhanças entre as amostras analisadas. A significância estatística do modelo obtido pelo OPLS-DA foi avaliada pela aplicação do teste de permutação (100 permutações para cada teste).

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando a plataforma online MetaboAnalyst 4.0. Para a elucidação estrutural dos marcadores, a precisão da massa foi o parâmetro principal, comparando-se os valores de massa obtidos experimentalmente e aqueles disponíveis em bancos de dados online, como o METLIN (Scripps Center for Metabolomics, La Jolla, CA, EUA). Uma molécula foi caracterizada quando apresentou um valor de erro de identificação menor que 5 ppm.

A escolha de biomarcadores potenciais, para repetição de cio e ou fertilidade, foi feita através da análise estatística das massas obtidas por espectrometria de massas.

4 RESULTADOS

4.1 Histórico reprodutivo

Após a separação dos animais para a formação dos grupos propostos, as análises do histórico reprodutivo dos animais foram realizadas com o objetivo de avaliar, estatisticamente, diferenças significativas entre os grupos.

A idade das fêmeas selecionadas foi calculada em meses e expressa em mediana. Como apresentado na (Figura 10), a mediana das fêmeas GC foi, aproximadamente, 83 meses; enquanto das fêmeas GE ficou em torno de 101 meses.

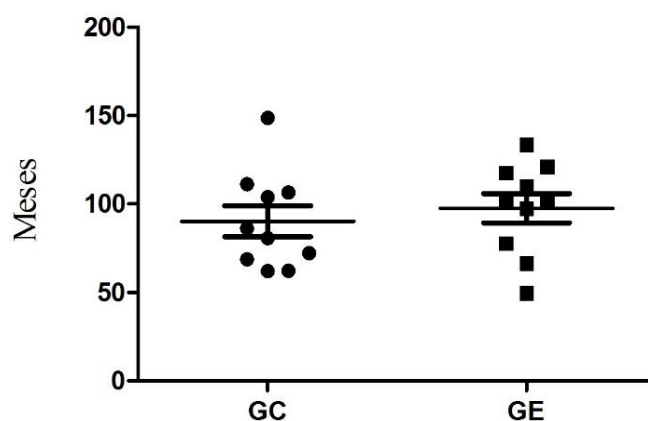
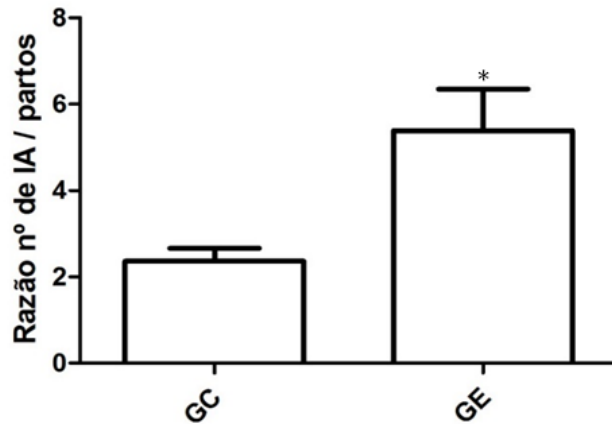


Figura 10: Gráfico de distribuição de idade. A idade das fêmeas bovinas foi calculada em meses, os resultados foram expressos em mediana.

Como descrito em material e métodos, o critério utilizado para separação dos grupos foi o número de inseminações artificiais necessárias para gerar um bezerro, havendo, portanto, diferença significativa entre os grupos e, demonstrando que a separação ocorreu de forma eficiente (Figura 11). Esta afirmação é deduzida pelo fato de que para que ocorra o nascimento de um bezerro são necessárias,

aproximadamente, cinco inseminações artificiais para as fêmeas do GE e apenas



duas inseminações para o GC.

Figura 11: Número de inseminações artificiais necessárias para o nascimento de um bezerro. Para a análise deste resultado foi calculada a razão entre o nº de IA / partos, demonstrando diferença significativa entre os grupos; $p < 0,01$.

No momento de realizar a biópsia uterina, os ovários foram avaliados quanto a sua dimensão, através de ultrassonografia. Os resultados demonstraram que no período do estro, em ambos os grupos (GC e GE) a dimensão do ovário foi em média $3,0 \text{ cm}^3$; na fase do diestro a média para a GC foi mantida, enquanto houve aumento para $3,6 \text{ cm}^3$ na dimensão do ovário no grupo GE, diferença considerada não sendo significante (Figura 12 A e B).

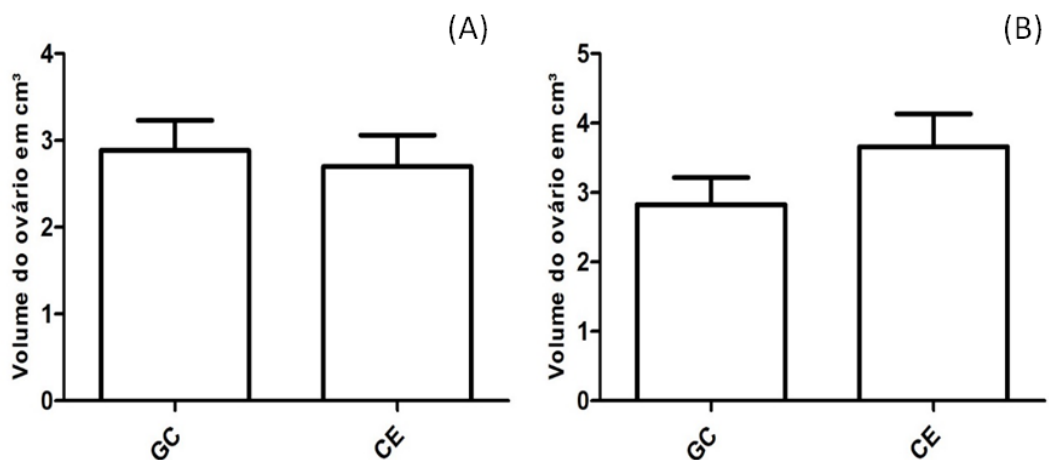


Figura 12: Volume do ovário em cm³. As medidas do ovário foram obtidas por ultrassonografia aplicando-se a fórmula do volume da esfera (volume do ovário = $\frac{3}{4}x\pi x\frac{D1}{2}x\frac{D2}{2}$). A. Comparação do volume do ovário em cm³ entre os grupos GC e GE na fase do estro; B. Comparação na fase do diestro. Não houve diferença significativa; p < 0,01.

4.2 Histologia

4.2.1 Avaliação Histopatológica

A principal causa que leva a repetição de cio em vacas leiteiras é a endometrite subclínica, logo, avaliar histologicamente o endométrio é importante para entender as alterações celulares, principalmente as relacionadas à inflamação.

O endométrio exibiu epitélio de revestimento, na fase do estro, pseudo-estratificado, raras vezes do tipo cuboidal ou cilíndrico (Figura 13A). Na fase do diestro, o epitélio de revestimento foi predominantemente pseudo-estratificado (Figura 15C). Em alguns casos o epitélio estava ausente (Figura 16A).

O infiltrado inflamatório se mostrou presente em ambos os grupos, nas duas fases estudadas. O infiltrado foi constituído principalmente por células linfócitos (mononucleadas) e ou leucócitos polimorfonucleares (PMN) (Figura 13B), além disso, eventos inflamatórios como permeação do epitélio de revestimento por células mononucleadas (MON) e focos linfocitários na região sub-epitelial foram visualizados (Figuras 15A, 15B).

O estroma compacto, constituído por células conjuntivas, exibiu padrão denso ou edemaciado. O estroma esponjoso, com padrão de organização do tipo frouxo, se apresentou edemaciado em alguns casos (Figura 13C).

As glândulas endometriais são do tipo cuboidal ou cilíndrica e em algumas ocasiões pseudoestratificadas, na fase do estro. No diestro, as glândulas são do tipo cilíndrica/pseudo-estratificada, sendo o padrão de secreção glandular supranuclear ou supranuclear e infranuclear nas duas fases (Figura 13D). Como citado acima, o tipo de célula e secreção glandular não apresentaram diferenças, porém, a porcentagem da área glandular ocupada no endométrio foi avaliada separadamente (item 4.2.2).

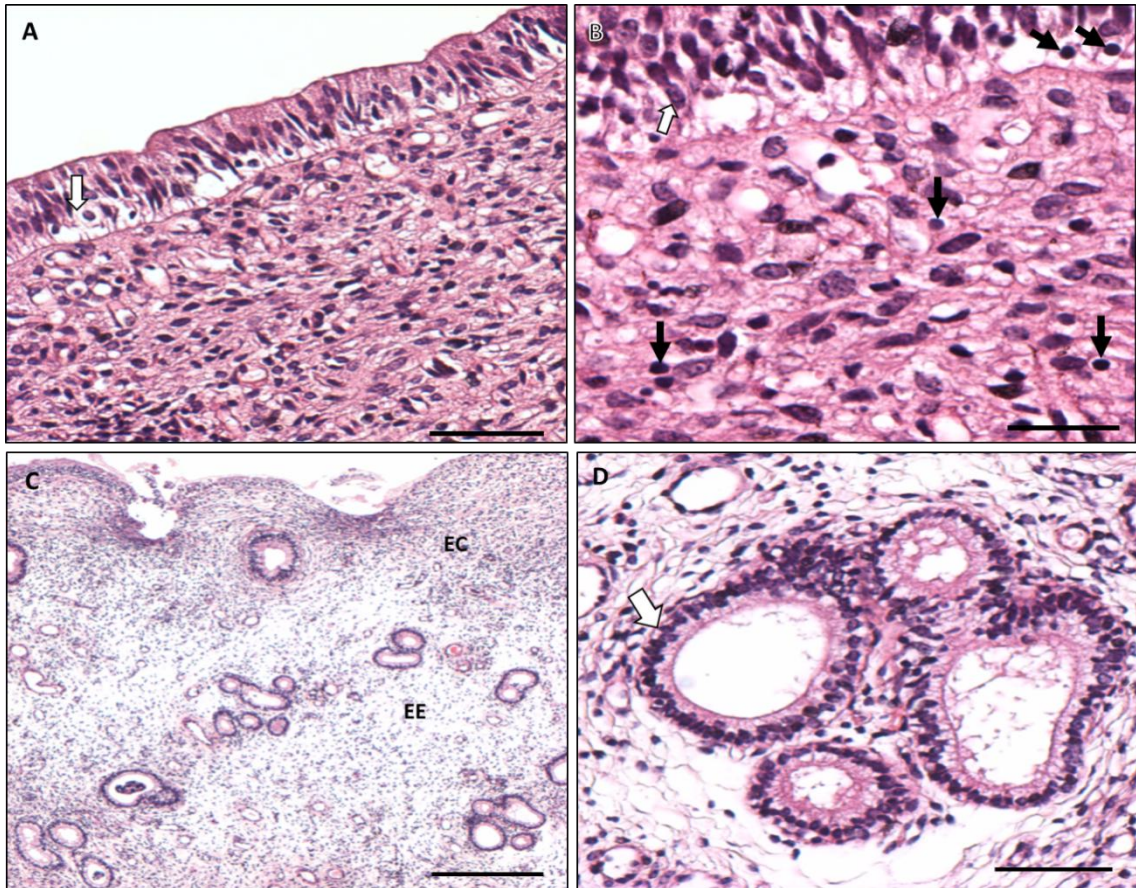


Figura 13: Fotomicrografias representativas do endométrio do animal do grupo controle, na fase do estro, corados pela Hematoxilina-Eosina (HE). A. Epitélio de revestimento do tipo pseudoestratificado (seta branca). Barra de calibração: 100 µm; B. Detalhe da Inflamação presente no epitélio de revestimento e no estroma compacto (setas pretas: linfócitos; seta branca: polimorfonuclear). Barra de calibração: 50 µm; C. Edema no estroma compacto (Bauersachs *et al.*) e no estroma esponjoso (EE). Barra de calibração: 500 µm; D. Glândulas endometriais do EE revestidas por epitélio cuboidal contendo grânulos de secreção supra e infranucleares (seta branca). Barra de calibração: 100 µm.

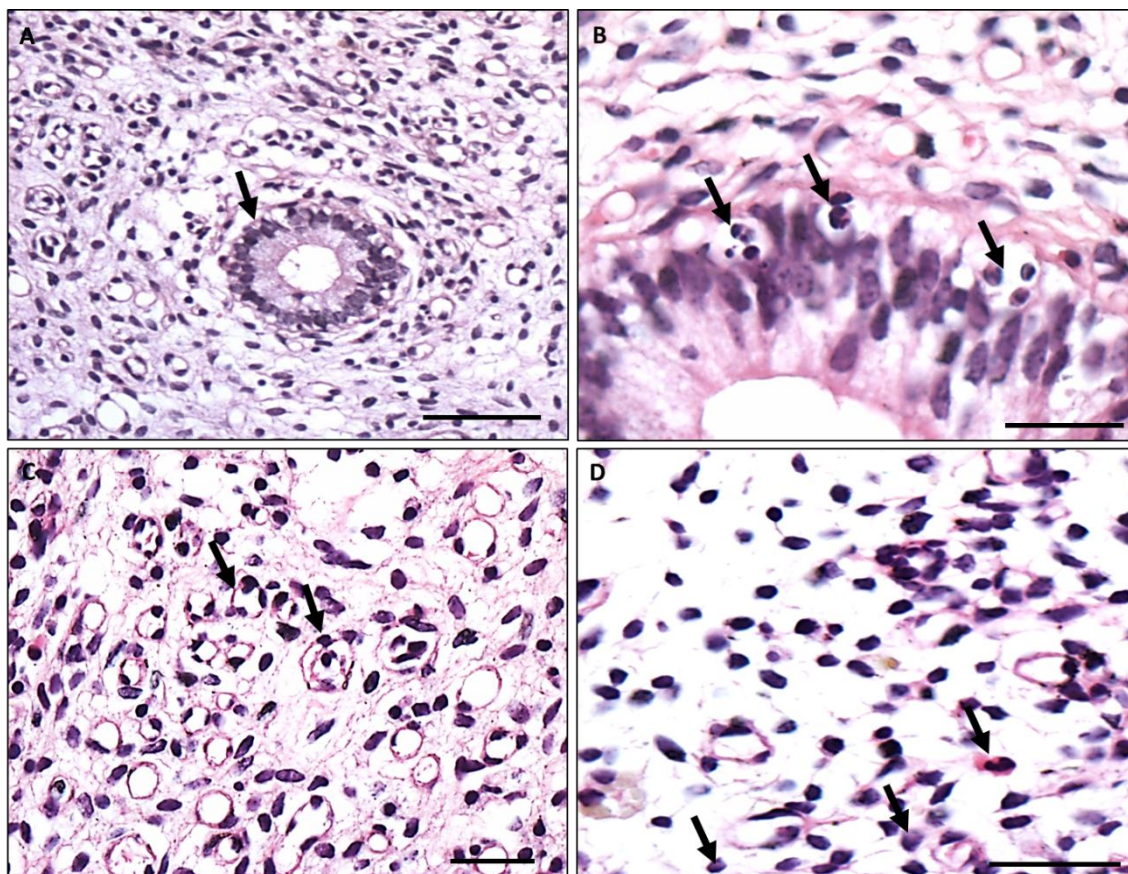


Figura 14: Fotomicrografias representativas do endométrio de animais do grupo controle, na fase do estro, corados pela Hematoxilina-Eosina. A. Glândulas endometriais do estrato esponjoso exibindo secreção supra e infranuclear (seta). Barra de calibração: 200 μ m; B. Células inflamatórias entre as células epiteliais da glândula (setas). Barra de calibração: 50 μ m; C. Estroma esponjoso exibindo edema intersticial e grande número de capilares sanguíneos (setas). Barra de calibração: 100 μ m; D. Inúmeros cortes transversais de capilares sanguíneos (seta) em meio ao estroma esponjoso. Barra de calibração: 50 μ m.

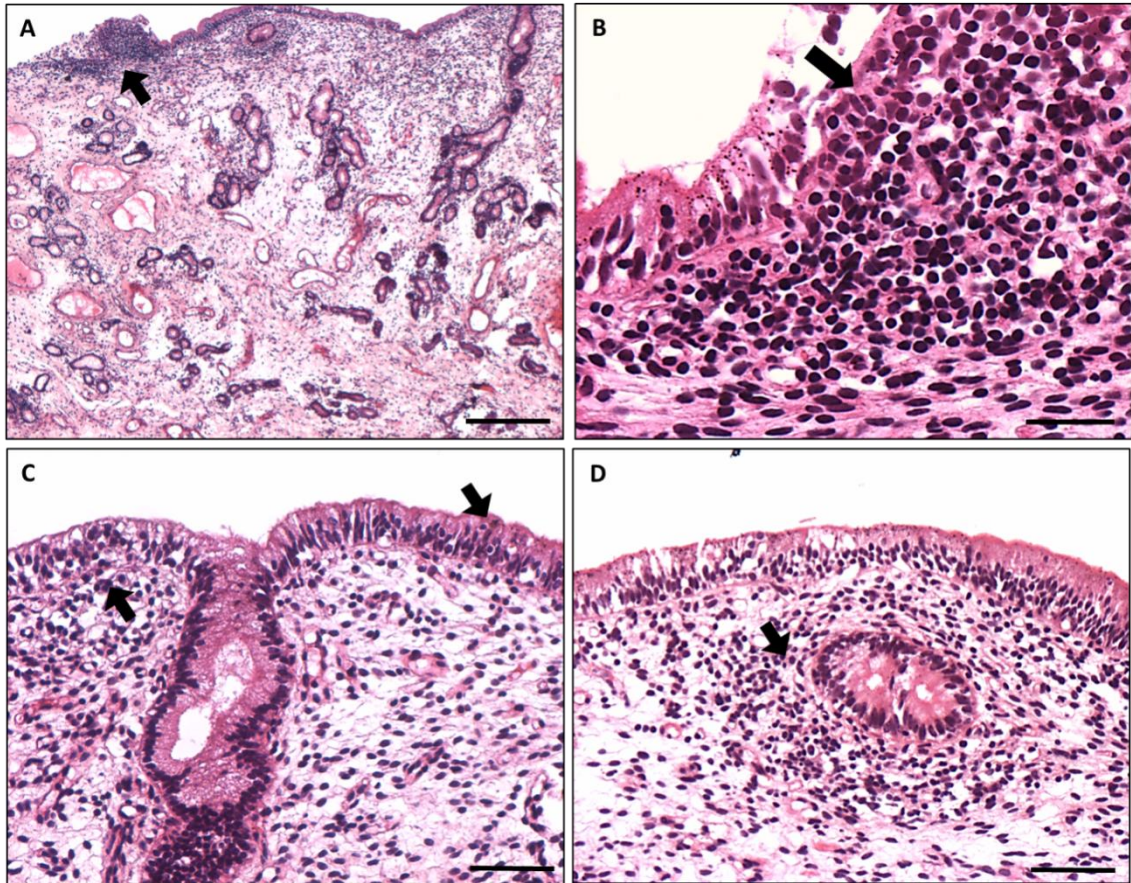


Figura 15: Fotomicrografias representativas do endométrio de animais do grupo controle, na fase do diestro, corados pela Hematoxilina-Eosina. A. Epitélio de revestimento exibindo foco inflamatório intra e subepitelial (seta). Barra de calibração: 500 µm; B. Foco inflamatório intra e subepitelial (seta). Barra de calibração: 50 µm; C. Epitélio de revestimento pseudo-estratificado mostrando inflamação intra-epitelial e sub-epitelial (setas). Barra de calibração: 100 µm; D. Em meio ao estroma compacto edemaciado, infamação periglandular (seta). Barra de calibração: 100 µm.

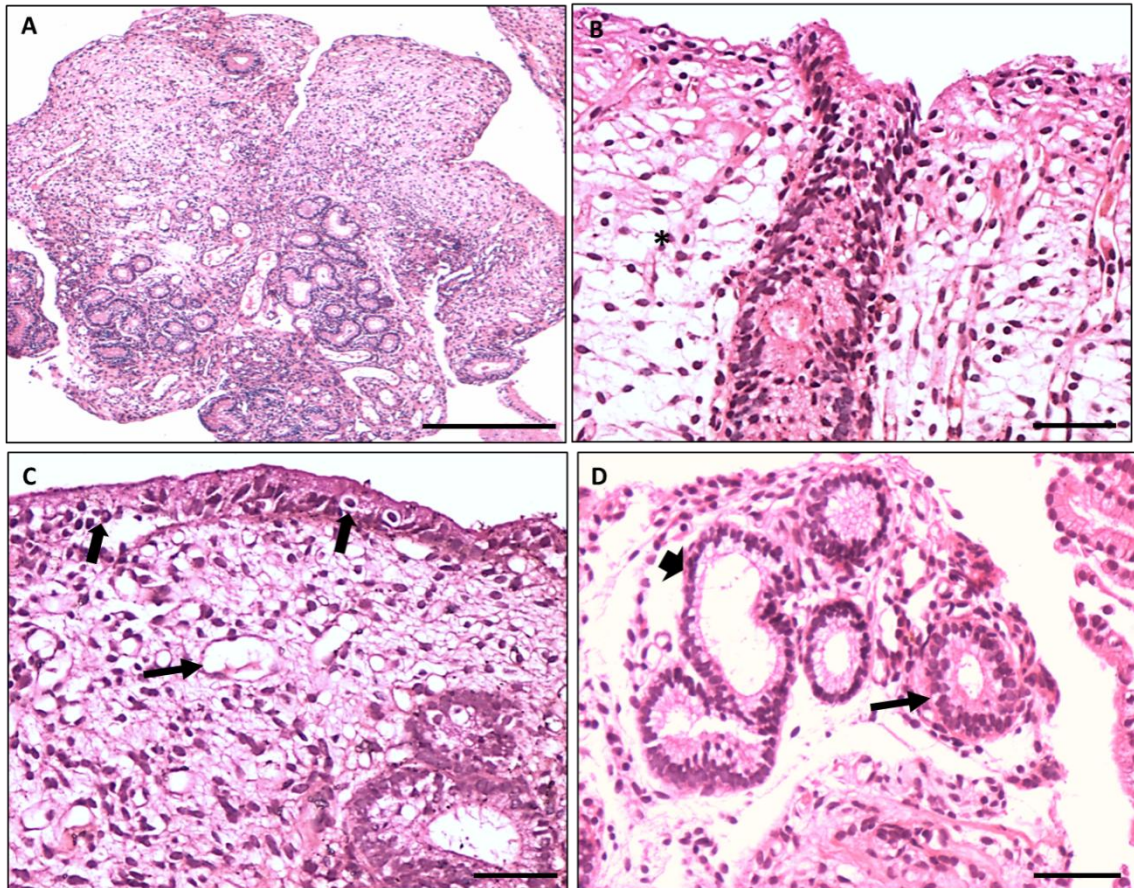


Figura 16: Fotomicrografias representativas do endométrio de animal do grupo experimental, na fase do estro, corados pela Hematoxilina-Eosina. A. Epitélio de revestimento ausente. Rarefação de glândulas no endométrio. Barra de calibração: 500 μm ; B. Estroma compacto edemaciado (*). Barra de calibração: 100 μm ; C. Epitélio de revestimento pseudo-estratificado, permeado por células inflamatórias (setas) e estroma compacto edemaciado e com capilares dilatados (seta fina). Barra de calibração: 100 μm ; D. Glândulas endometriais cuboidais com secreção supra e infranuclear (seta grossa) ou pseudoestratificado (seta fina). Barra de calibração: 100 μm .

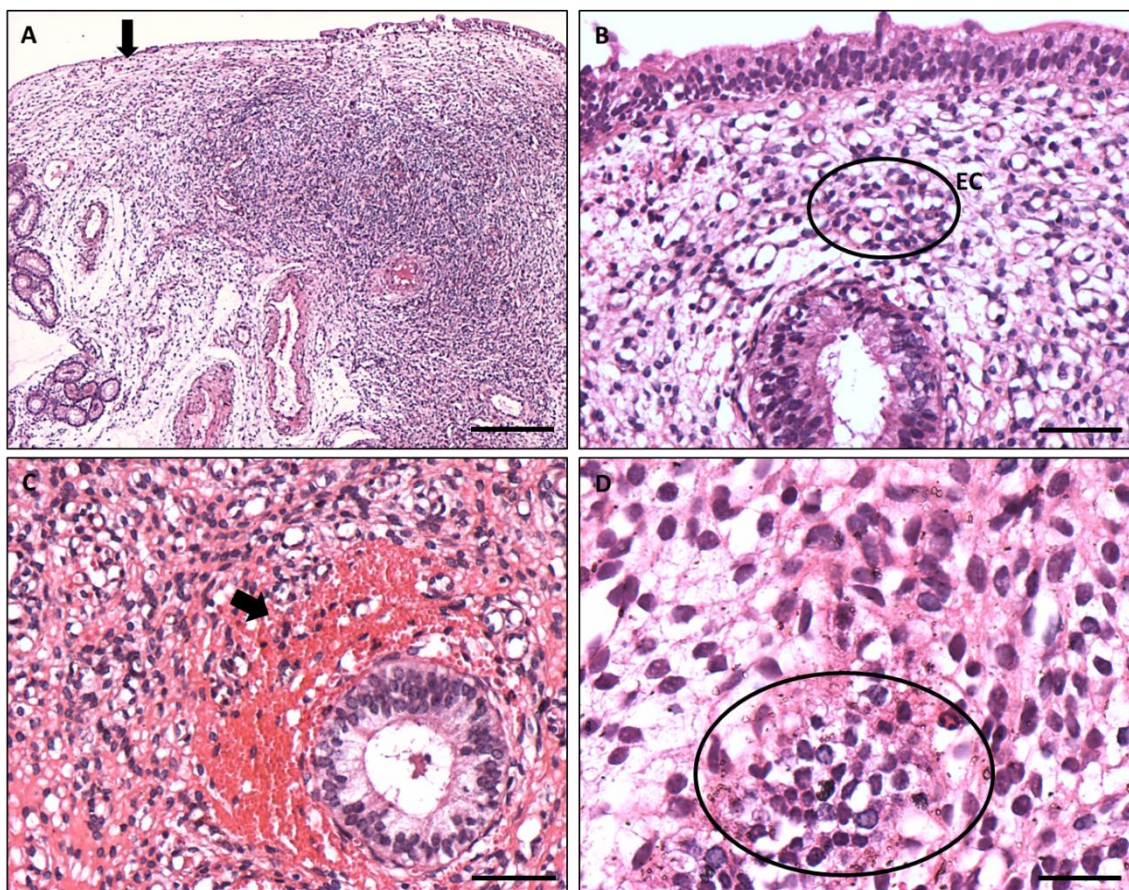


Figura 17: Fotomicrografias representativas do endométrio de animal do grupo experimental, na fase do diestro, corados pela Hematoxilina-Eosina. A. Epitélio de revestimento ausente (seta). Rarefação de glândulas no endométrio. Barra de calibração: 500 μ m; B. Estroma compacto edemaciado, foco inflamatório (círculo). Barra de calibração: 100 μ m; C. Hemorragia no estroma esponjoso e glândula endometrial proliferativa. Barra de calibração: 100 μ m; D. Foco inflamatório com eosinófilo no estroma esponjoso (círculo). Barra de calibração: 50 μ m.

Para avaliar possíveis diferenças histológicas entre os grupos estudados, análises estatísticas foram realizadas. Para edema e vasos, os dados estão apresentados em gráficos de distribuição pontuando os scores, por não serem diferentes estatisticamente. Em ambos os grupos avaliados (GC e GE) a maioria dos animais apresentaram edema estromal. A média para o GC foi 0,7 e para o GE 1,1, nas duas fases do ciclo estral. A Figura 18A, representa a distribuição do edema no estro, enquanto a 18B corresponde à fase do diestro.

A média dos scores para vasos endometriais foi de 0,8 para GC e 1,3 para o GE, no estro (Figura 19A); e 0,75 para GC e 1,5 no GE, na fase do diestro (Figura 19B). Apesar, de estatisticamente não haver diferença entre os grupos é possível observar que a pontuação foi maior no GE, em ambas as fases do ciclo, quando comparados ao GC.

A inflamação do endométrio foi observada nos dois grupos estudados. Os resultados estatísticos não apresentaram diferença significativa quando avaliada a inflamação total. Porém, os resultados obtidos considerando o tipo celular não revelaram diferença significativa no infiltrado por células PMN no GC, na fase do estro (Figura 20A). Na mesma fase reprodutiva do ciclo o score para células mononucleadas foi significativamente maior no GE quando comparado ao GC (Figura 20B). No diestro, como demonstrado na Figura 20C e D, o infiltrado inflamatório por células PMN e mononucleadas foi estatisticamente maior no GE em relação ao GC.

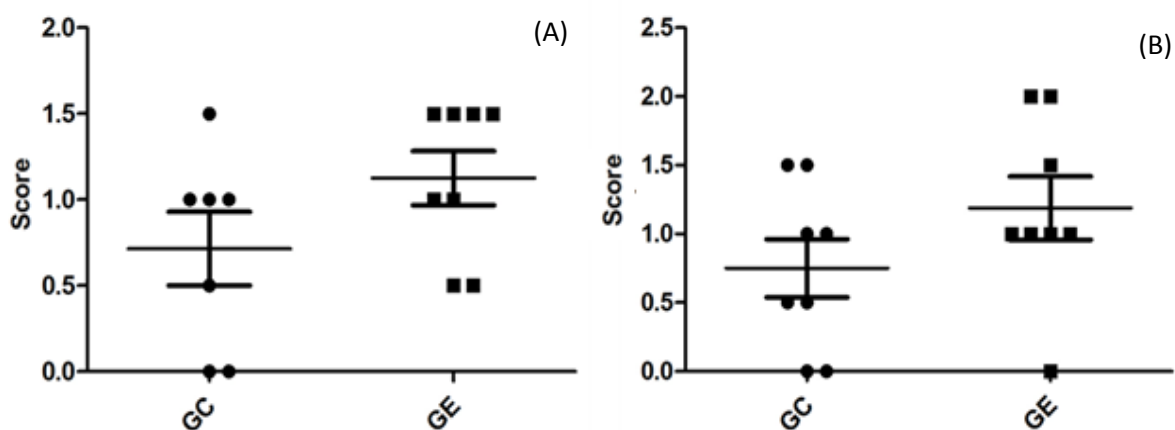


Figura 18: Gráfico de edema do endométrio bovino. O edema endometrial foi pontuado de acordo com o item 3.6.3 e expresso no gráfico comparando os grupos controle e experimental. A. Corresponde a fase estro; B. Corresponde ao diestro.

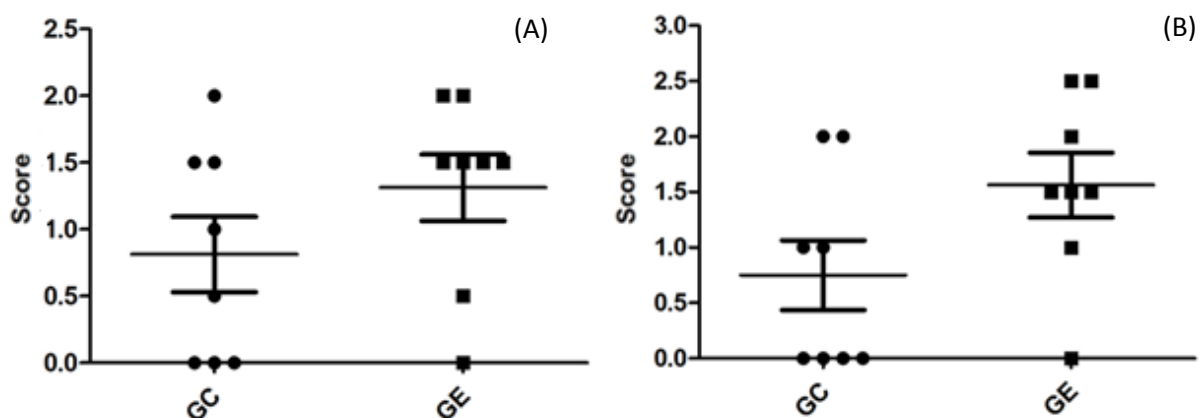


Figura 19: Gráfico de vasos do endométrio bovino. Os vasos presentes no endométrio foram pontuados de acordo com o item 3.6.3 e expressos no gráfico comparando os grupos controle e experimental. A. Corresponde a fase estro; B. Corresponde ao diestro.

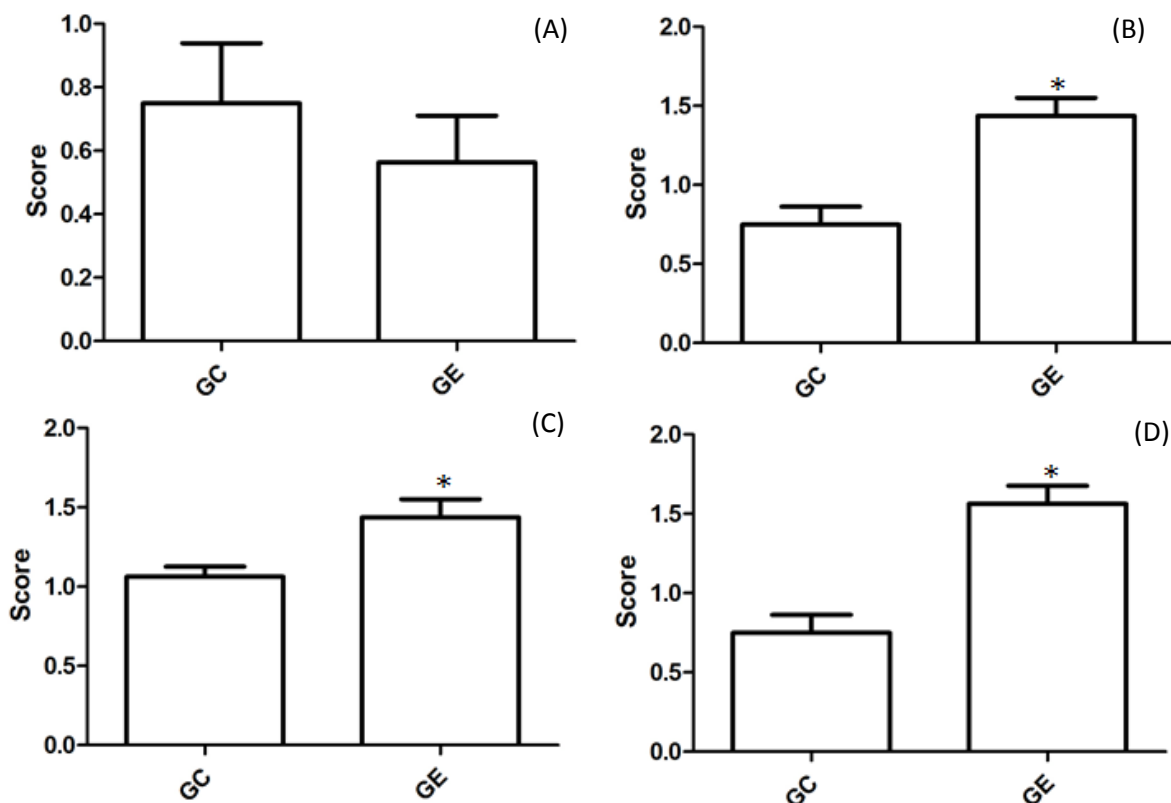


Figura 20: Gráfico de inflamação do endométrio bovino. A inflamação endometrial foi pontuada de acordo com o item 3.6.3 e a análise estatística foi realizada levando em consideração o tipo celular. O gráfico expressa as médias. A. Infiltrado por PMN na fase do estro; B. Infiltrado por células mononucleadas na fase do estro; C. Infiltrado por PMN na fase do diestro; D. Infiltrado por células mononucleadas na fase do diestro.

4.2.2 Histomorfometria glandular

A análise descritiva da histologia endometrial revelou a rarefação de glândulas uterinas nas fêmeas classificadas como repetidoras de cio. Com este dado, foram realizadas análises separadas (item 3.6.4). Os resultados obtidos da histomorfometria glandular revelaram que a área ocupada pelas glândulas uterinas endometriais foi significativamente maior no GC quando comparado ao GE (Figura 21 A e B). Esta diferença foi observada em ambas as fases do ciclo estral (estro e diestro). Além disso, há também uma elevação na área ocupada pelas glândulas quando o mesmo grupo é comparado nas diferentes fases.

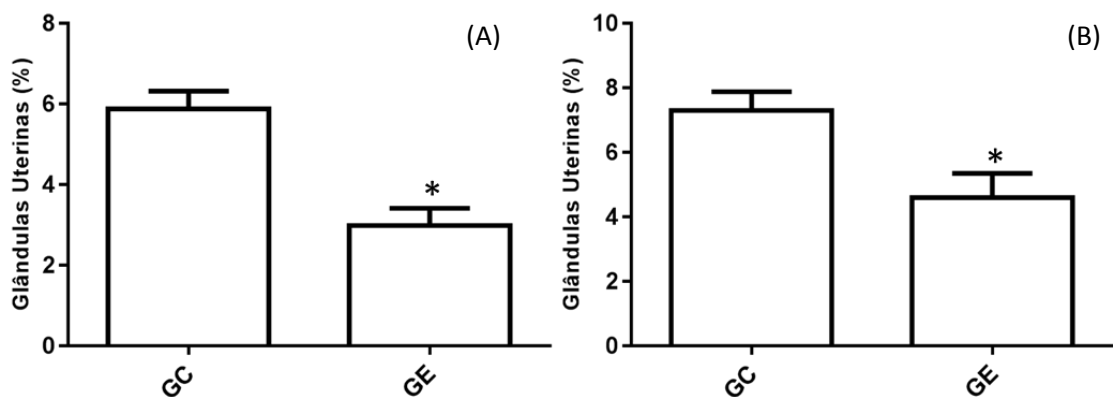


Figura 21: Dimensão das glândulas uterinas endometriais. Comparação da área ocupada pelas glândulas (%) / área total. A. Análise entre os grupos GC e GE na fase do estro; B. Análise na fase do diestro. $p < 0,005$

4.2.3 Histoquímica

Para avaliar a distribuição no endométrio de glicoconjugados, contendo no domínio glicana, unidades de galactose $\beta 1-3$ ligadas a unidades de *N*-acetilgalactosamina, foi utilizada a lectina biotinilada Jacalina. Para a detecção da unidade terminal de α -L-Fucose foi utilizada a lectina biotinilada UEAI. O padrão de marcação foi avaliado através da criação dos seguintes scores: negativo (-), muito fraco (-/+), fraco (+), moderado (++) e intenso (+++).

Na fase estro, ambos os grupos demonstraram reatividade para a lectina Jacalina. O score no epitélio de revestimento e glândulas uterinas foi fraco em ambos os grupos. No estrato compacto a reatividade foi fraca no GC e muito fraca no GE. No estrato esponjoso não houve marcação. Ainda na mesma fase do ciclo estral, utilizando a UEAI, a reatividade no epitélio de revestimento do GC foi fraca, enquanto no GE foi classificada como muito fraca, no entanto nas glândulas uterinas o score foi muito fraco para GC e moderado no GE. Em ambos os estratos, compacto e esponjoso a marcação foi predominantemente negativa (Tabela 2).

No diestro, utilizando a lectina Jacalina, a reatividade no GC foi fraca no epitélio de revestimento e nas glândulas uterinas; para o GE o score foi muito fraco no epitélio de revestimento e fraco nas glândulas uterinas. Em ambos os grupos, no estrato compacto, a reatividade foi muito fraca, enquanto no estrato esponjoso foi negativa. Na mesma fase do ciclo utilizando a lectina UEAI, a reatividade no epitélio

de revestimento e glândulas uterinas foi fraca no GC, já no GE, a marcação foi muito fraca no epitélio de revestimento e moderada nas glândulas uterinas. Nos estratos do endométrio a classificação foi predominantemente negativa.

Tabela 2: Reatividade de lectinas biotiniladas no endométrio bovino, fase do estro.

	Epitélio de Revestimento		Estrato Compacto		Estrato Esponjoso		Glândulas uterinas	
	JACALINA	UEAI	JACALINA	UEAI	JACALINA	UEAI	JACALINA	UEAI
GC	+	+	+	-/+	-	-	+	-/+
GE	+	-/+	-/+	-	-	-	+	++

Tabela 3: Reatividade de lectinas biotiniladas no endométrio bovino, fase do diestro.

	Epitélio de Revestimento		Estrato Compacto		Estrato Esponjoso		Glândulas uterinas	
	JACALINA	UEAI	JACALINA	UEAI	JACALINA	UEAI	JACALINA	UEAI
GC	+	+	-/+	+/-	-	-	+	+
GE	-/+	-/+	-/+	-	-	-	+	++

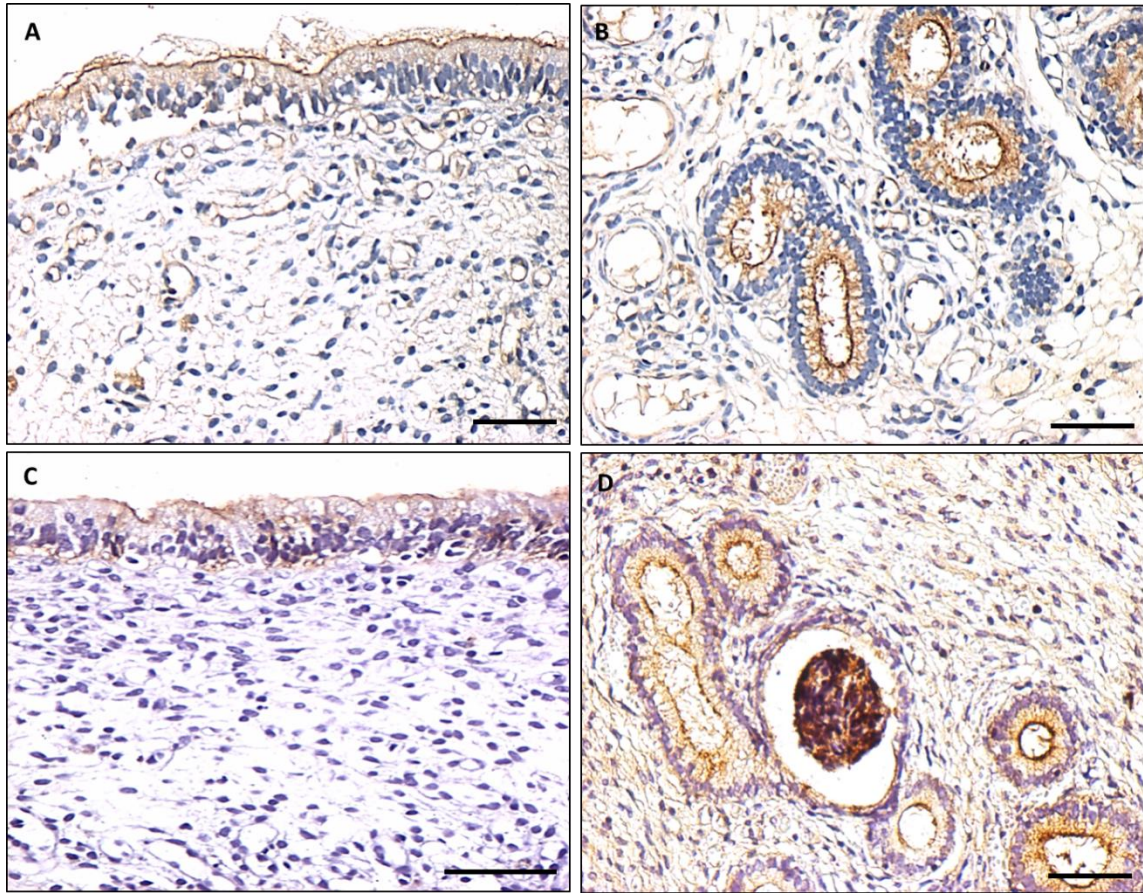


Figura 22: Fotomicrografias representativas de endométrio de animal controle, na fase do estro, coradas pela técnica histoquímica para lectinas. Lectinas biotiniladas foram detectadas pela estreptavidina conjugada à peroxidase. O substrato cromógeno para a detecção da peroxidase foi a diaminobenzidina seguida de contracoloração pela hematoxilina. Reatividade para a lectina jacalina no epitélio de revestimento do endométrio A. e nas glândulas endometriais; B. Reatividade para a lectina UEA1 biotinilada no epitélio de revestimento endometrial; C. e nas glândulas endometriais D. Barra de calibração: 100 μ m.

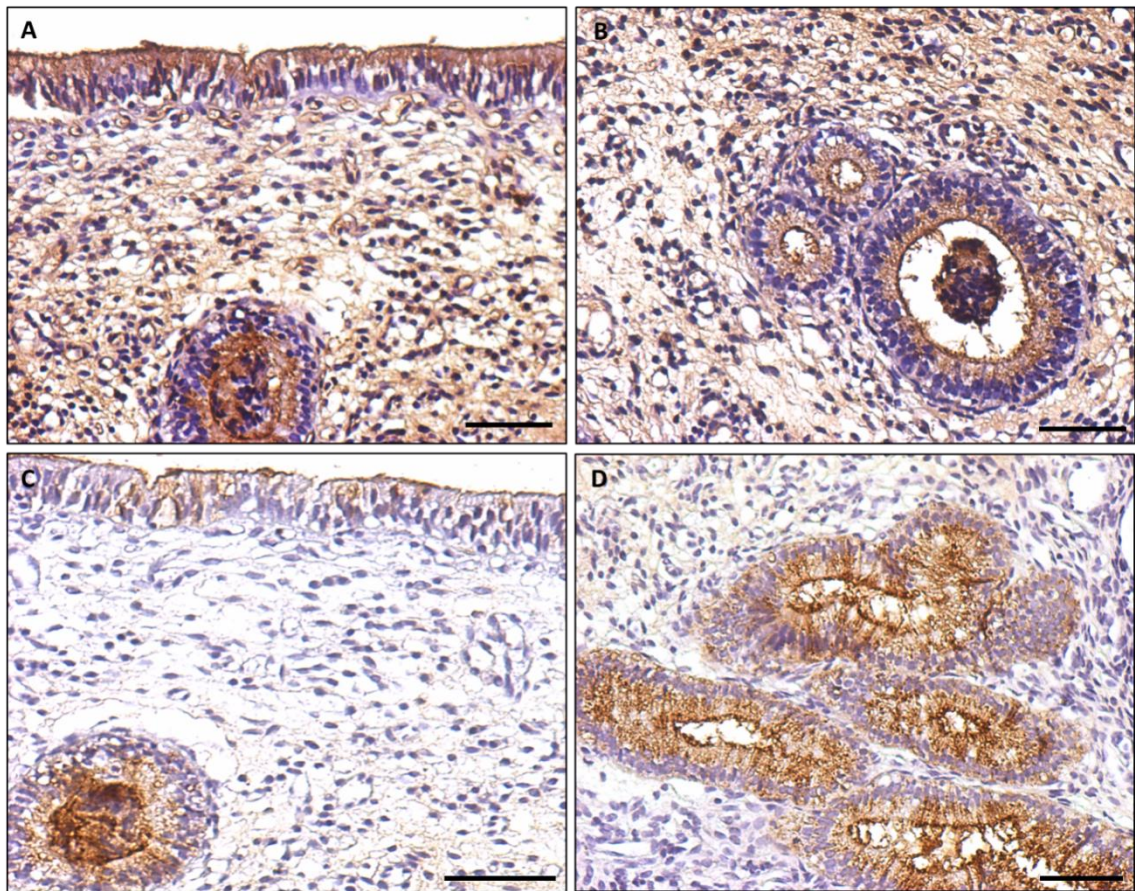


Figura 23. Fotomicrografias representativas de endométrio de animal controle, na fase do diestro, coradas pela técnica histoquímica para lectinas. Lectinas biotiniladas foram detectadas pela estreptavidina conjugada à peroxidase. O substrato cromógeno para a detecção da peroxidase foi a diaminobenzidina seguida de contracoloração pela hematoxilina. Reatividade para a lectina jacalina no epitélio de revestimento do endométrio A. e nas glândulas endometriais B. Reatividade para a lectina UEAI biotinilada no epitélio de revestimento endometrial C. e nas glândulas endometriais D. Barra de calibração: 100 μ m.

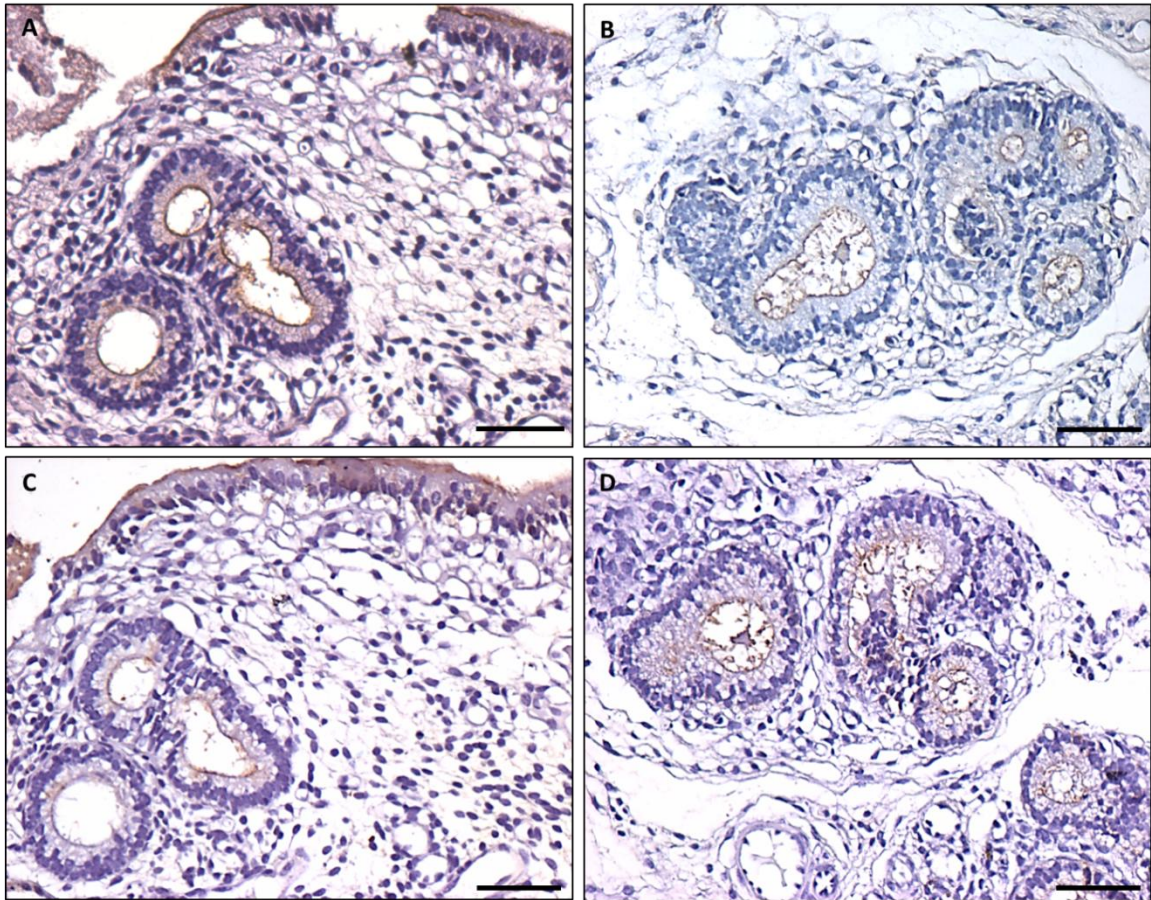


Figura 24. Fotomicrografias representativas de endométrio de animal do grupo experimental, na fase do estro, coradas pela técnica histoquímica para lectinas. Lectinas biotiniladas foram detectadas pela estreptavidina conjugada à peroxidase. O substrato cromógeno para a detecção da peroxidase foi a diaminobenzidina seguida de contracoloração pela hematoxilina. Reatividade para a lectina jacalina no epitélio de revestimento do endométrio A. e nas glândulas endometriais B. Reatividade para a lectina UEAI biotinilada no epitélio de revestimento endometrial C. e nas glândulas endometriais D. Barra de calibração: 100 μ m.

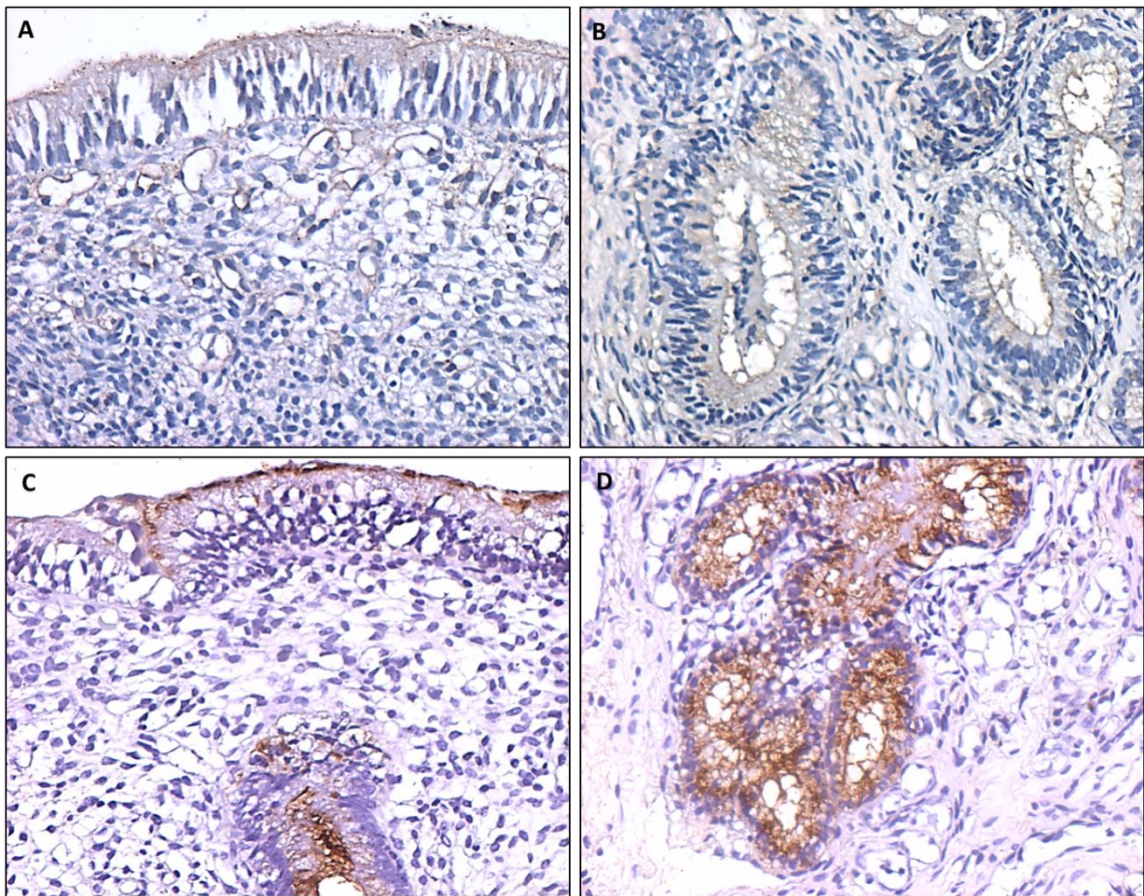


Figura 25. Fotomicrografias representativas de endométrio de animal do grupo experimental, na fase do diestro, corado pela técnica histoquímica para lectinas. Lectinas biotiniladas foram detectadas pela estreptavidina conjugada à peroxidase. O substrato cromógeno para a detecção da peroxidase foi a diaminobenzidina seguida de contracoloração pela hematoxilina. Reatividade para a lectina jacalina no epitélio de revestimento do endométrio A. e nas glândulas endometriais B. Reatividade para a lectina UEAI biotinilada no epitélio de revestimento endometrial C. e nas glândulas endometriais D. Barra de calibração: 100 μ m.

4.3 Purificação de mucinas do lavado uterino

Após a diálise e centrifugação os sobrenadantes dos lavados uterinos foram liofilizados, dissolvidos em 10 mM de tampão Tris-Cl pH 7,0 contendo 170mM de NaCl e fracionados em uma coluna de TSK gel SW 4000G. Os cromatogramas obtidos mostraram a presença de dois picos simétricos principais a um comprimento de onda de 280 nm, tanto para lavados uterinos de vacas repetidoras de cios (GE) como para as não repetidoras (GC) (Fig. 4). O primeiro pico foi eluído no volume de exclusão da coluna, cujo limite de exclusão para proteínas globulares é 7.00.000 Da, enquanto o segundo pico apresentou uma massa molecular aparente de 67,000 Da. A análise dos dois picos principais de proteínas, pela reação com PAS, demonstrou que apenas o primeiro pico era constituído por glicoproteínas. As frações identificadas como glicoproteínas foram reunidas, concentradas, dialisadas contra água destilada, liofilizadas e caracterizadas como mucinas, pela composição monossacarídica.

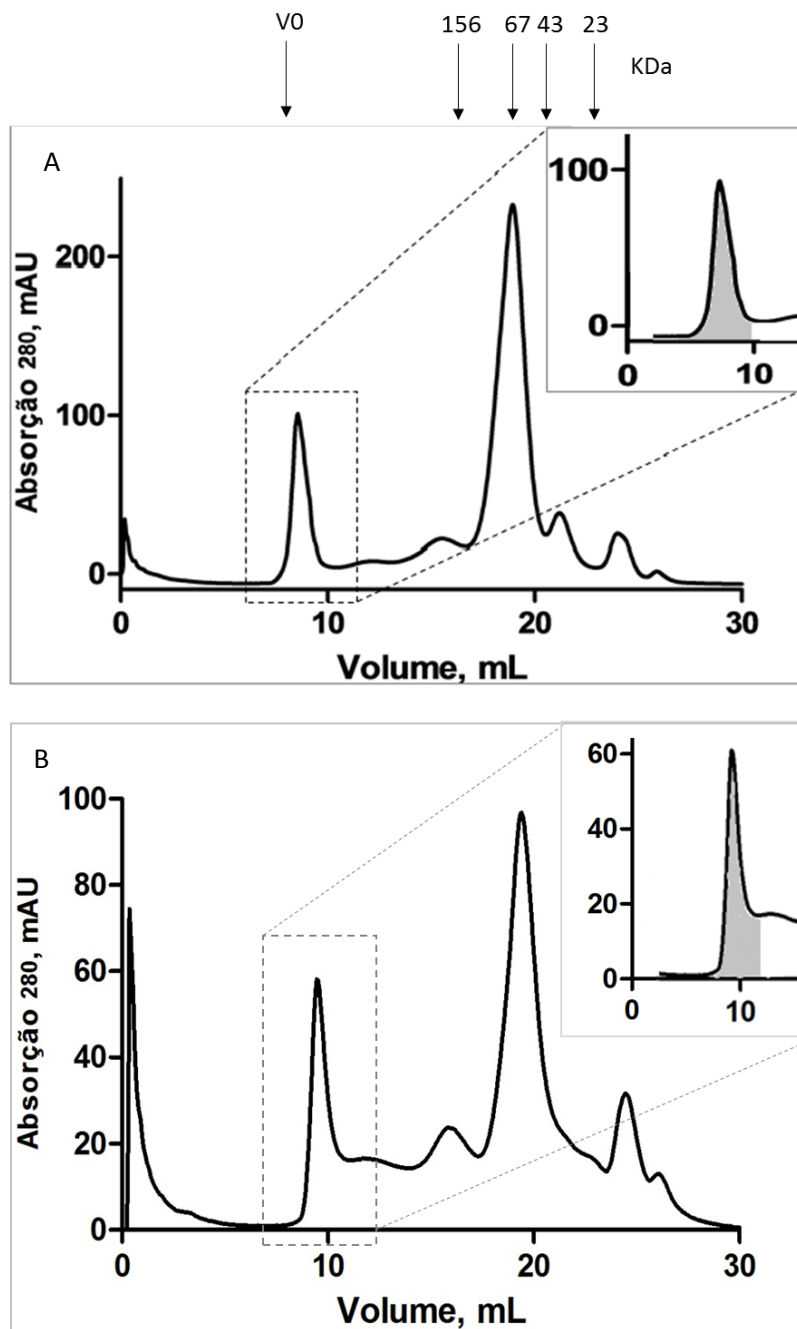


Figura 26: Cromatografia do lavado uterino, em coluna TSK G4000 SW. Tampão de corrida: Tris HCl 10 mM em NaCl 170 mM, pH 7. A área destacada corresponde às frações que foram reunidas após o ensaio/PAS. A. GC; B. GE.

4.3.1 Determinação da composição da mucina uterina

A composição dos monossacarídeos foi determinada utilizando cromatografia gás-líquida (GC) e cromatografia gás líquida acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os cromatogramas obtidos mostraram a presença dos metil-glicosídeos trimetilsililados derivados de unidades de Fuc, Gal, GalNAc e GlcNAc em todas as mucinas purificadas (Figuras 27A e 27B). O derivado do Neu5Ac estava presente em quantidade traço. Os tempos de retenções dos derivados foram idênticos aos encontrados para metil-glicosídeos trimetilsililados de amostras autênticas às unidades de Fuc, Gal, GalNAc, GlcNAc e Neu5Ac. O padrão de fragmentação observado nos espectros de massas do cromatograma de íons totais confirmou a presença destas unidades monossacarídicas (Figura 28A cromatograma de íons totais e do grupo controle e 28B cromatograma de íons totais do grupo experimental).

A origem de alguns íons-fragmentos considerados representativos para a identificação dos metil-glicosídeos trimetilsililados estão representados nas figuras 29, 30 e 31; e foram incluídos, também, para facilitar o entendimento dos espectros de massas apresentados nas figuras 32, 33, 34 e 35. Apesar dos espectros de massas derivados de hexofuranose e hexopiranose apresentarem, basicamente, os mesmos fragmentos, eles podem ser facilmente identificados pela intensidade relativa entre os fragmentos m/e 204 e m/e 217, sendo o de m/e 204 mais abundante, nos espectros derivados de hexopiranose.

A relação molar entre Fuc:Gal:GalNAc:GlcNAc obtida pela integração das suas respectivas áreas pela cromatografia gás-líquida demonstrou uma marcante diferença na composição das cadeias oligossacarídicas das mucinas isoladas entre os grupos das vacas repetidoras as não repetidoras de cio (Tabelas 4 e 5), a análise estatística demonstrou que a diferença entra os grupos é significativa.

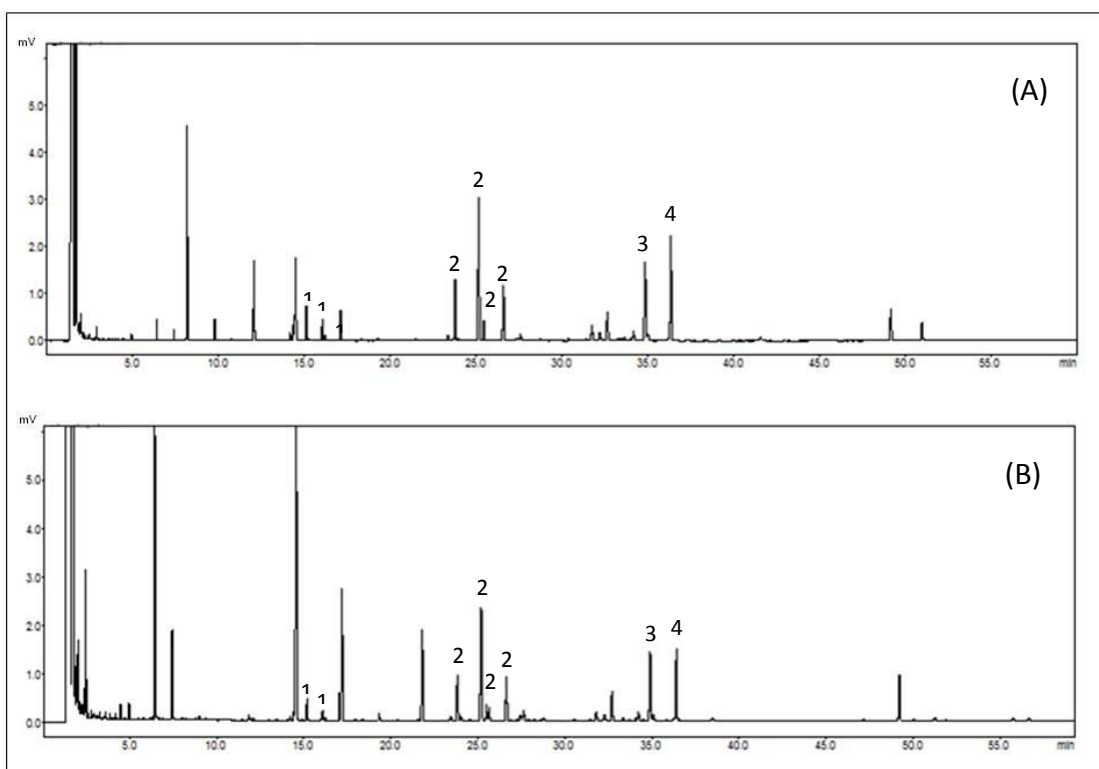


Figura 27: Perfil cromatográfico dos metil-glicosídeos trimetilsililados obtidos após metanólise e trimetilsililação da mucina purificada do lavado uterino. Os picos assinalados correspondem aos metil-glicosídeos trimetilsililados derivados de (1) Fuc, (2) Gal, (3) GalNAC, (4) GlcNAc. A. Corresponde ao cromatograma do GC; B. Corresponde ao cromatograma do GE.

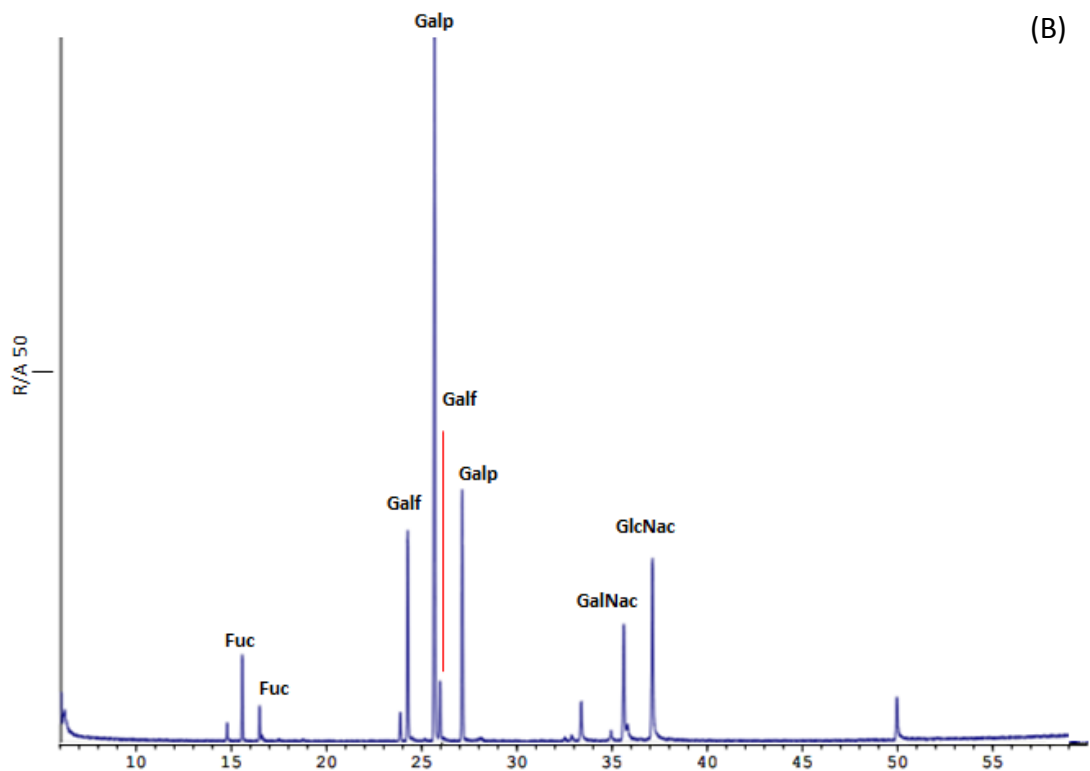
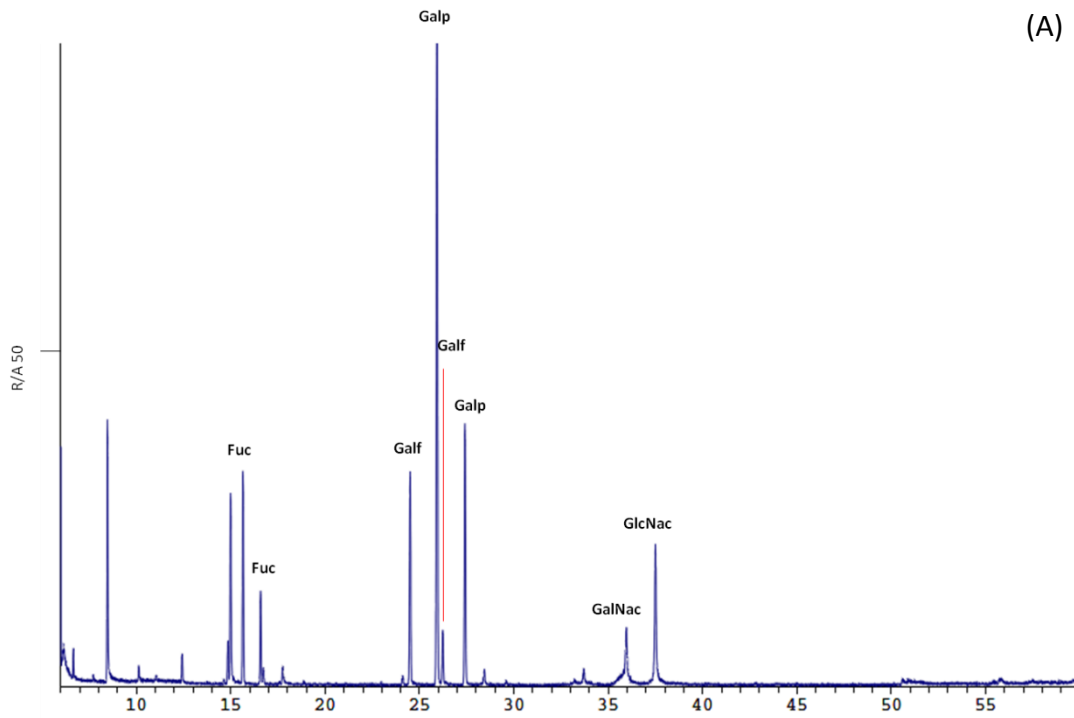


Figura 28: Perfil cromatográfico obtido pela análise por CG-MS dos metil-glicosídeos trimetilsililados obtidos após metanólise e trimetilsililação da mucina purificada do lavado uterino. Os picos assinalados correspondem a Fucose, Galfuranose (Galf), Galpiranose (Galp), GalNAC e GlcNAC. A. GC; B. GE.

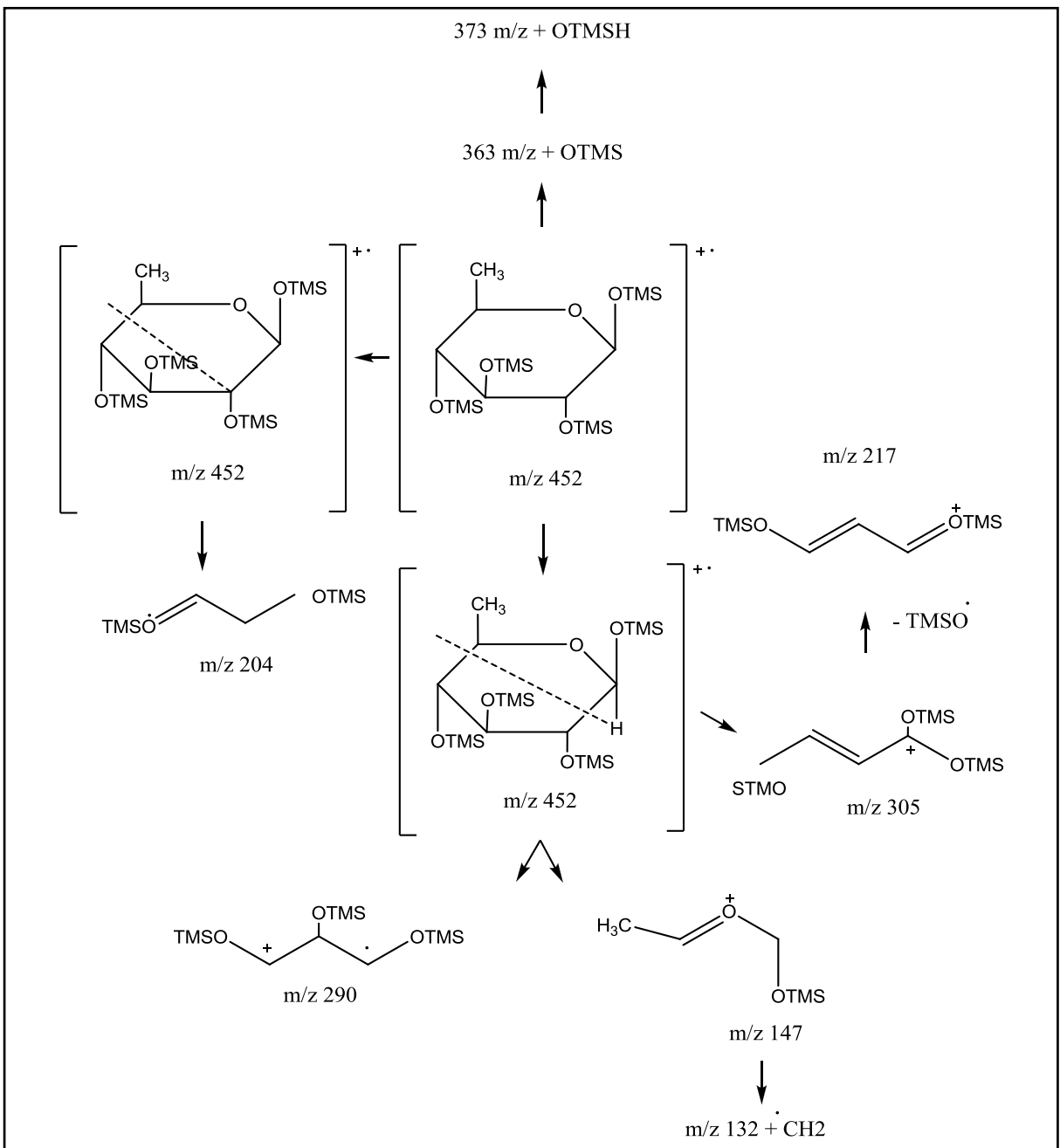


Figura 29: Esquema de fragmentação de metil-6-deoxi-hexopiranosídeos trimetilsililados.

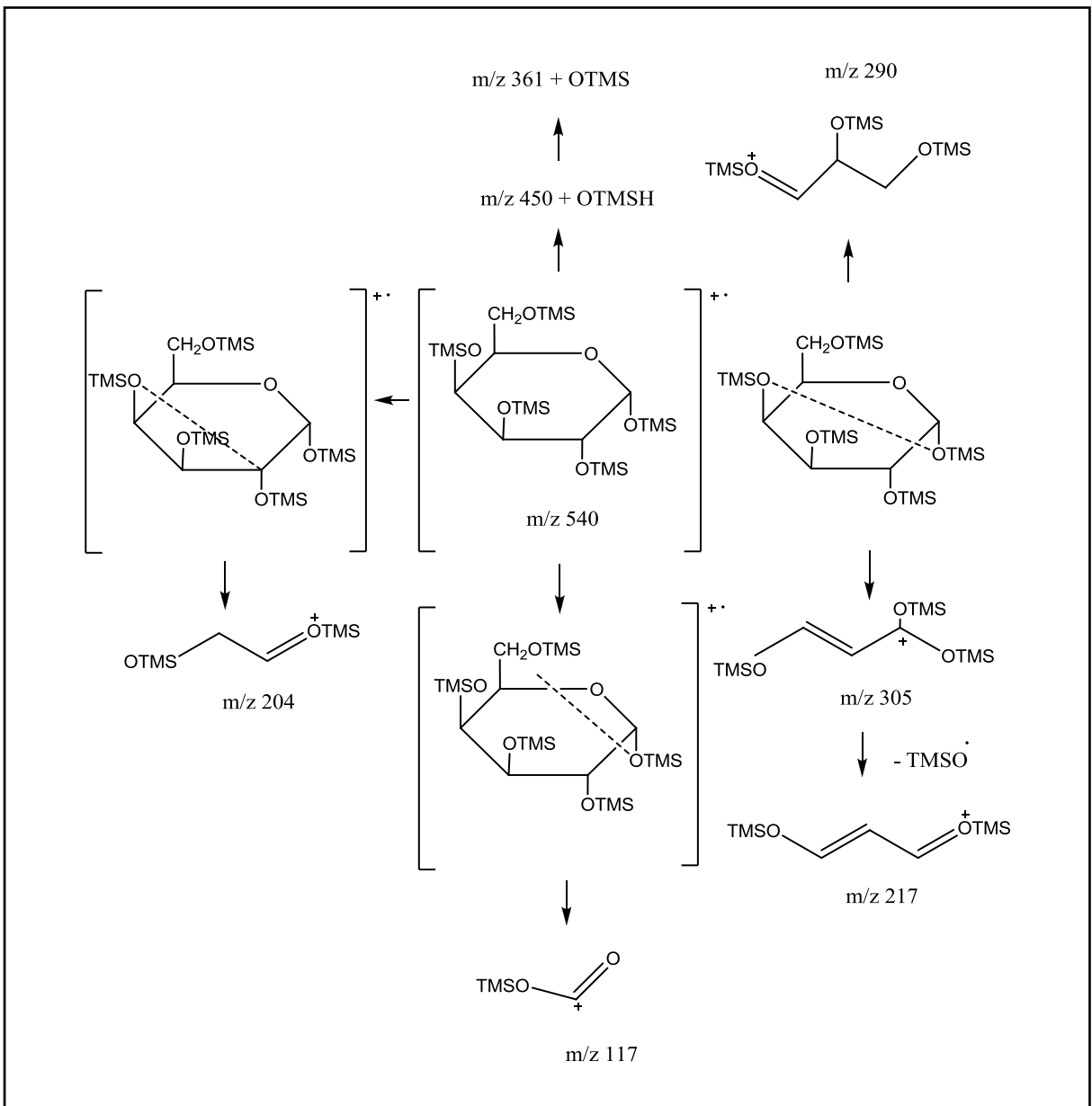


Figura 30: Esquema de fragmentação de meti-hexopiranosídeos trimetilsililados

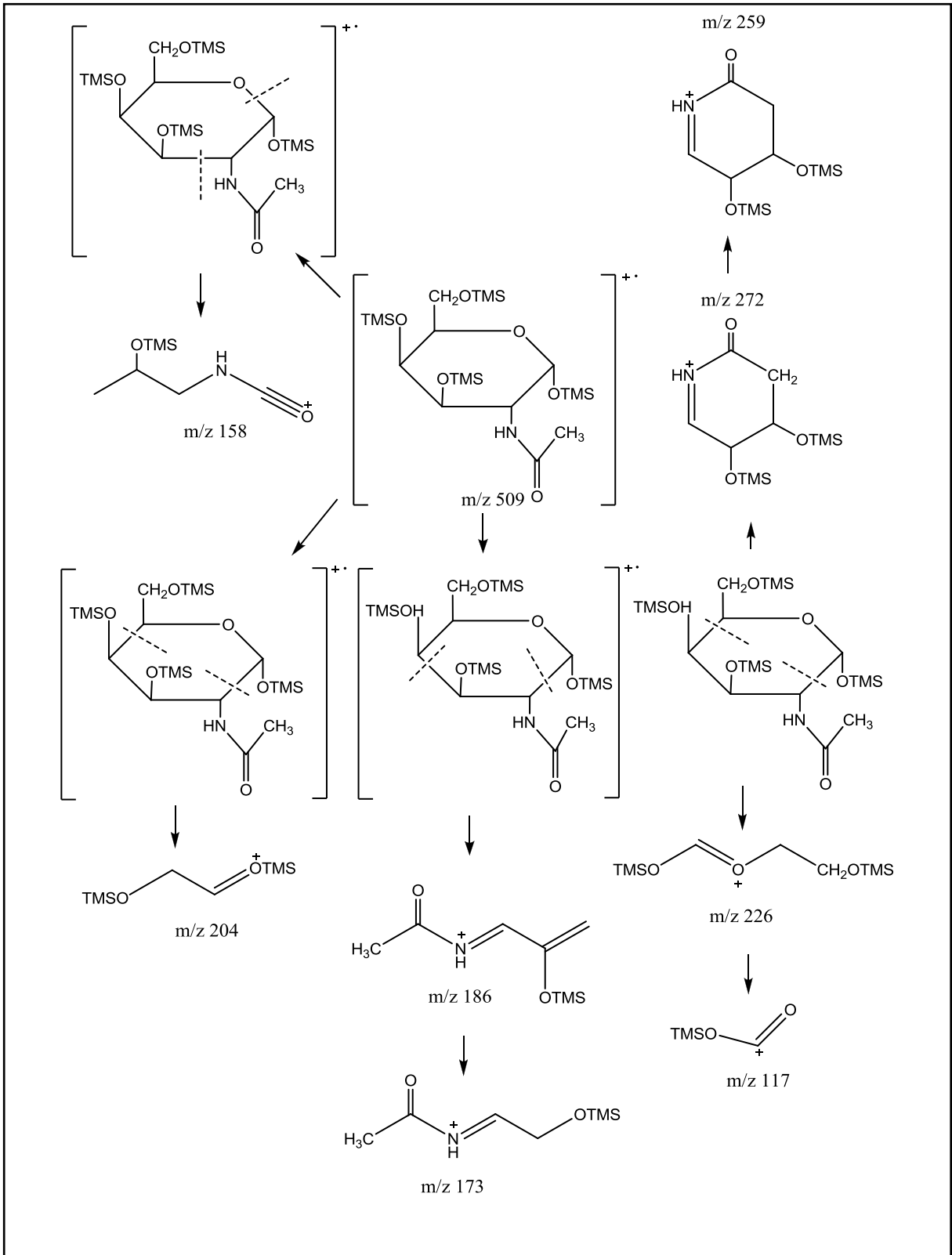


Figura 31: Esquema de fragmentação de *N*-acetil metil-hexopiranosídeos trimetilsililados.

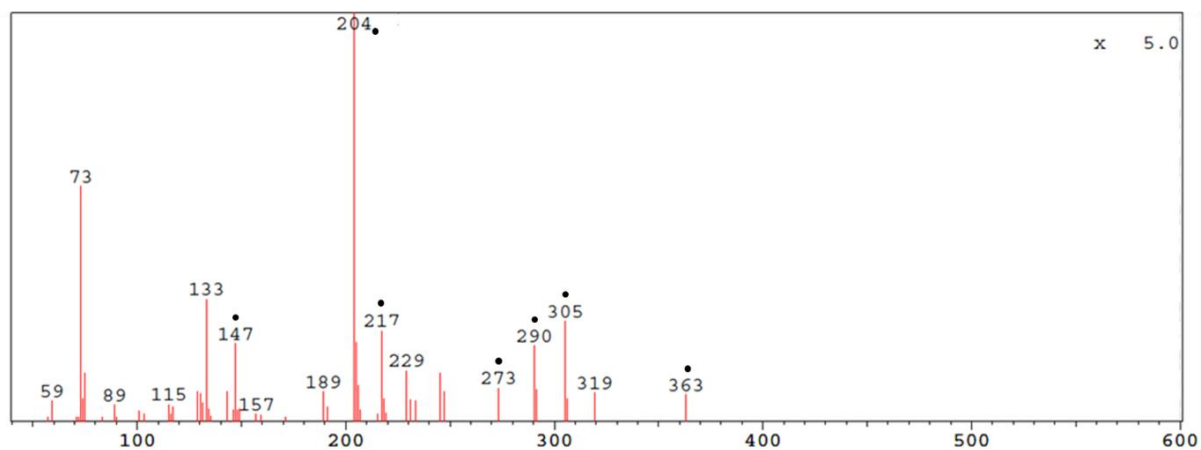


Figura 32: Espectro de massas referente aos picos de Fuc obtidos do cromatograma da figura 28. Detecção por impacto de elétrons.

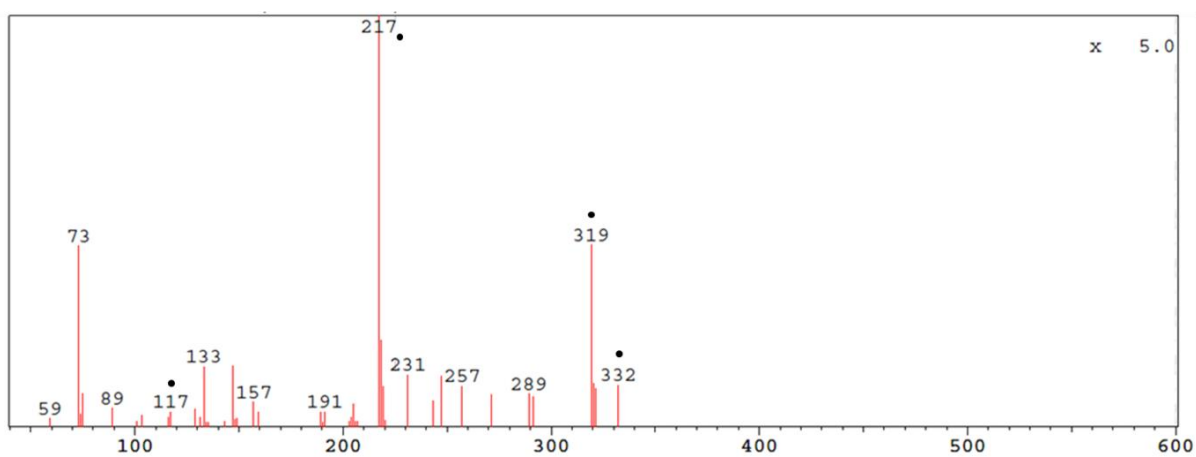


Figura 33: Espectro de massas referentes aos picos de Galf obtidos do cromatograma da figura 28. Detecção por impacto de elétrons.

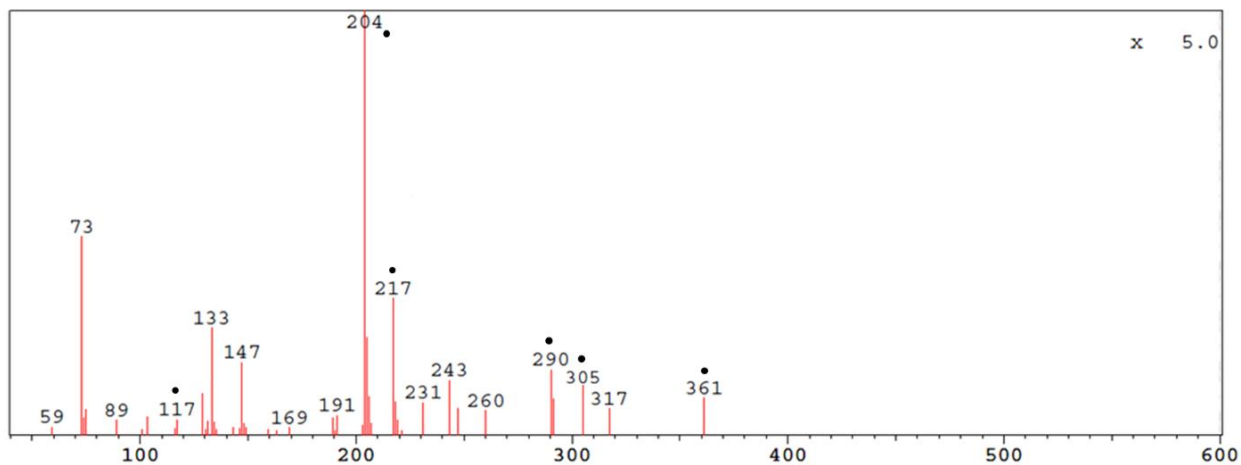


Figura 34: Espectro de massas referentes aos picos Galp obtidos do cromatograma da figura 28. Detecção por impacto de elétrons.

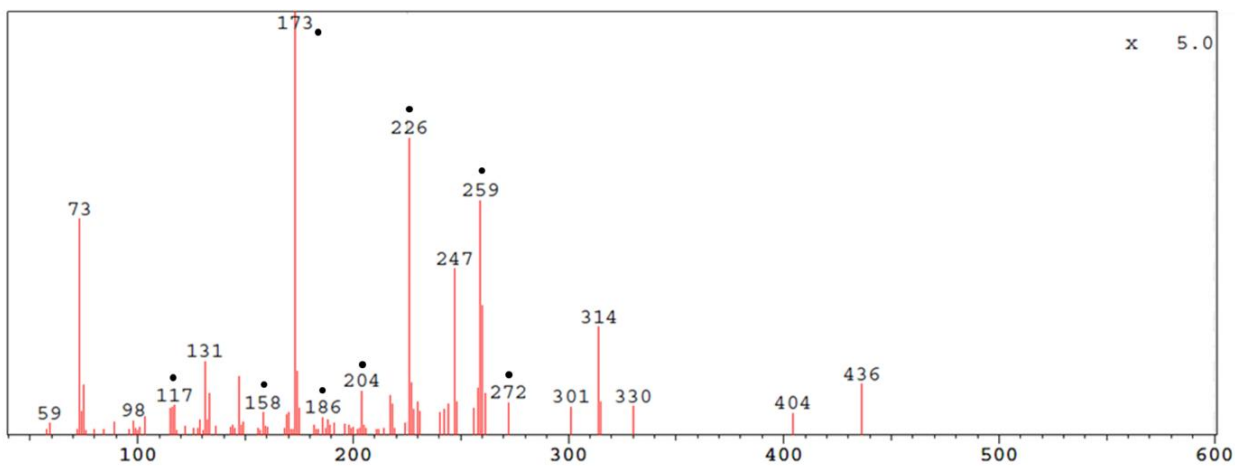


Figura 35: Espectros de massas referentes aos picos GalNAc e GlcNAc obtidos do cromatograma da figura 28. Detecção por impacto de elétrons.

Tabela 4: Composição química das mucinas do lavado uterino das fêmeas do grupo controle

Relação molar					
Animal	Galactose	Fucose	N-acetilgalactosamina	N-acetilglucosamina	Ácido Siálico
1	4.8	0.8	1.0	1.5	*
2	4.9	0.7	1.0	1.4	*
3	4.7	0.7	1.0	1.5	*
4	4.8	0.7	1.0	1.5	*

* Traços

Tabela 5: Composição química das mucinas do lavado uterino das fêmeas do grupo experimental

Relação molar					
Animal	Galactose	Fucose	N-acetilgalactosamina	N-acetilglucosamina	Ácido Siálico
1	2.2	0.3	1.0	1.00	*
2	2.3	0.25	1.0	1.0	*
3	2.1	0.28	1.0	0.9	*
4	2.0	0.27	1.0	0.8	*

* Traços

4.4 Análise dos lipídios endometriais por espectrometria de massas

Um conjunto de pseudo-íons moleculares foi obtido dos componentes moleculares presentes no endométrio de vacas repetidoras e não repetidoras de cio, em um espectrômetro de massa ORBITRAP equipado com uma fonte de ionização de electrospray. Posteriormente, o conjunto destes íons foi submetido a uma análise multivariada usando o modelo OPLS-DA para investigar as diferenças endometriais no estro e diestro entre as vacas repetidoras e não repetidoras de cio. As figuras 36 e 37 mostram uma tendência de separação completa entre os dois grupos, indicando distintos perfis moleculares no endométrio de fêmeas repetidoras de cio (n=10) quando comparadas a fêmeas férteis (n=10). No estro os íons de m/z 615.3, 765.5, 969.6, 619.5, 635.5, 649.5, 651.5, 659.5, 793.6, 864.5, 865.5, 1176.7, 1388.9, 937.7 e 729.5 atribuídos a glicerolipídios, glicerofosfolipídios e esfingolipídios respectivamente foram responsáveis pela separação dos dois grupos enquanto que no diestro os grupos foram separados pelos íons também atribuídos a glicerolipídios, glicerofosfolipídios e esfingolipídios de m/z 723.4, 806.6, 874.4, 875.4, 1057.5, 1135.7, 701.4, 832.6, 833.7, 957.5, 1058.5, 1062.8, 937.4, 725.6, 897.4 e 938.4. As constituições desses íons obtidas por espectrometria de massa de alta resolução e pesquisa em banco de dados como o Metlin estão apresentadas nas Tabelas 6, 7, 8 e 9.

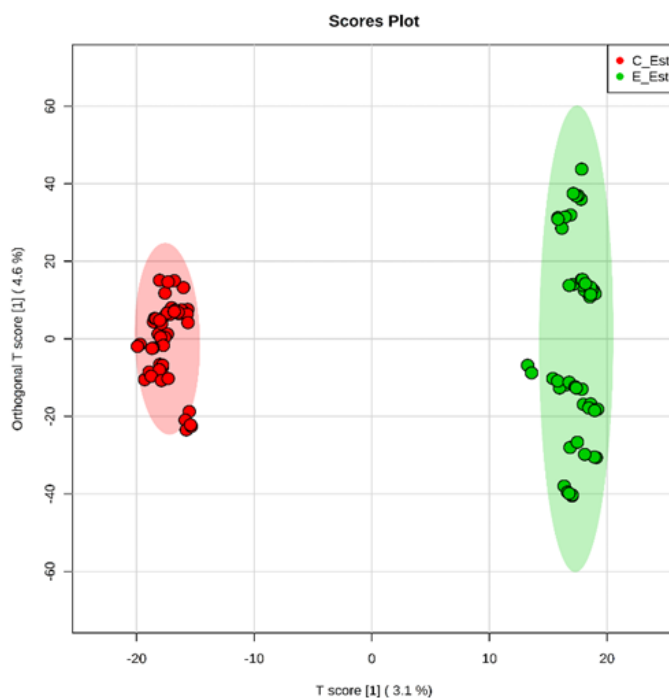


Figura 36: Pseudo-íons moleculares foram obtidos em espectrômetro de massa ORBITRAP. Posteriormente, o conjunto destes íons foi submetido a uma análise multivariada usando o modelo OPLS-DA para investigar as diferenças endometriais entre os grupos controle e experimental na fase estro, grupo controle (pontos vermelhos) e grupo experimental (pontos verdes).

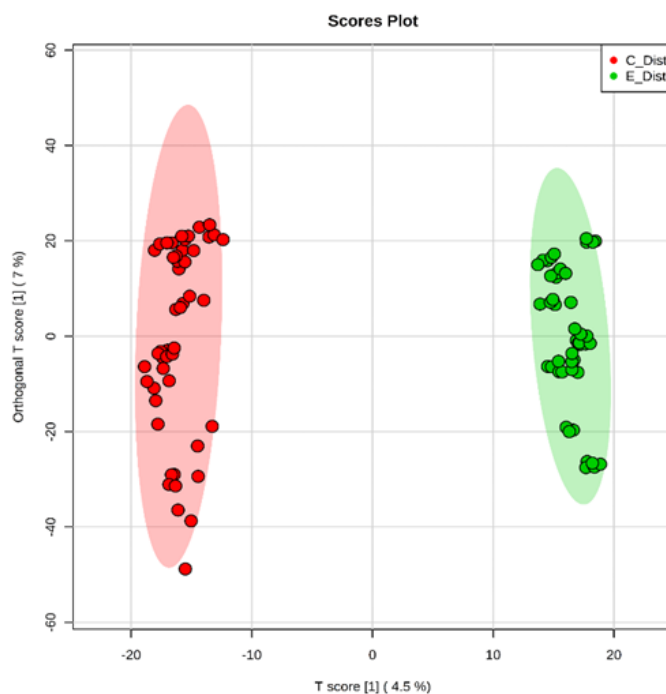


Figura 37: Pseudo-íons moleculares foram obtidos em espectrômetro de massa ORBITRAP. Posteriormente, o conjunto destes íons foi submetido a uma análise multivariada usando o modelo OPLS-DA para investigar as diferenças endometriais entre os grupos controle e experimental na fase diestro, grupo controle (pontos vermelhos) e grupo experimental (pontos verdes).

Tabela 6: Fosfolipídios endometriais responsáveis pela discriminação entre vacas não repetidoras e repetidoras de cio no estro

	Experimental (<i>m/z</i>)	Massa Teórica	Estrutura Química	Composto (NC-LD)	Aduto	Erro (ppm)
GC	615.3865	615.3868	C29H59O11P	PI (20:0)	[M+H] ⁺	0
	765.5946	765.5980	C43H83O8P	PA (40:1)	[M+2Na-H] ⁺	4
	969.6407	969.6402	C51H95O13P	PI (42:2)	[M+Na] ⁺	0
GE	619.5282	619.5272	C37H72O5	DG (34:0)	[M+Na] ⁺	1
	635.5219	635.5227	C40H68O5	DG (37:5)	[M+Li] ⁺	1
	649.5404	649.5383	C41H70O5	DG (38:5)	[M+Li] ⁺	3
	651.5516	651.5505	C47H72O2	DG (44:4)	[M+Li] ⁺	1
	659.5439	659.5462	C45H74O5	DG (42:7)	[M+H-2H2O] ⁺	4
	793.6077	793.6082	C45H87O7P	PA (42:0)	[M+Na] ⁺	0
	864.5316	864.5367	C48H76NO10P	PS (42:9)	[M+Li] ⁺	5
	865.5364	865.5355	C46H83O10P	PG (40:4)	[M+K] ⁺	0

Tabela 7: Fosfolipídios endometriais responsáveis pela discriminação entre vacas não repetidoras e repetidoras de cio no diestro

	Experimental (<i>m/z</i>)	Massa Teórica	Estrutura Química	Composto (NC-LD)	Aduto	Erro (ppm)
GC	723.4914	723.4935	C39H73O8P	PA (38:5)	[M+Na] ⁺	2
	806.6026	806.6010	C47H86NO7P	PE (42:4)	[M+2Na-H] ⁺	1
	874.4612	874.4605	C46H72NO10P	PS (40:9)	[M+2Na-H] ⁺	0
	875.4626	875.4657	C43H75O13P	PI (34:4)	[M+2Na-H] ⁺	3
	1057.5351	1057.5371	C47H89O19P3	PIP2 (38:2)	[M+Li] ⁺	1
	1135.7977	1135.8532	C41H20D62O22P4	PIP3 (32:0)	[M+Na] ⁺	4
GE	701.4389	701.4388	C37H65O10P	PG (31:4)	[M+H] ⁺	0
	832.6185	832.6191	C47H88NO7P	PE (42:4)	[M+Na] ⁺	0
	833.6221	833.6266	C46H89O10P	PG (40:1)	[M+H] ⁺	5
	860.7417	860.7394	C50H102NO7P	PC (42:0)	[M+H] ⁺	5
	957.5477	957.5463	C51H83O13P	PI (42:8)	[M+Na] ⁺	1

Tabela 8: Esfingolípídios endometriais responsáveis pela discriminação entre vacas não repetidoras e repetidoras de cio no estro

	Experimental (<i>m/z</i>)	Massa Teórica	Estrutura Química	Composto (NC-LD)	Aduto	Erro (ppm)
	1176.7485	1176.7445	C58H107NO22	H3F1Cer (42:1)	[M+Li] ⁺	3
GC	1388.9152	1388.9146	C72H131N3O23	H2N2 Cer (44:2)	[M+H-H2O] ⁺	0
	937.7702	937.7689	C121H207N7O63	H2N1A5 Cer (40:1)	[M+2Na+H] ³⁺	1
GE	729.5919	729.5905	C41H81N2O6P	SM (36:2)	[M+H] ⁺	1

Tabela 9: Esfingolípídios endometriais responsáveis pela discriminação entre vacas não repetidoras e repetidoras de cio no diestro

	Experimental (<i>m/z</i>)	Massa Teórica	Estrutura Química	Composto (NC-LD)	Aduto	Erro (ppm)
	1058.5385	1058.5366	C94H168N2O48	H8N1Cer (38:1)	[M+H+Na] ²⁺	1
	1162.8254	1162.8187	C62H115NO18	H3Cer (44:2)	[M+H] ⁺	5
GC	937.4732	937.4739	C84H146N4O40	H3N1A2Cer (34:1)	[M+H+Na] ²⁺	0
	725.6923	725.6896	C95H167N5O47	H2N1F1A2Cer (36:1)	[M+2Na+H] ³⁺	3
	897.4804	897.4802	C82H144N4O38	H2N1F1Cer (34:1)	[M+2H] ²⁺	0
	938.4769	938.4817	C84H148N4O40	H3N1A2Cer(36:1)	[M+H+Na] ²⁺	5

4.4.1 Biomarcadores lipídicos de fertilidade e ou repetição de cio

Os dados da tabela demonstram que na fase do estro no grupo controle foram identificados, fosfatidilinositois, ácido fosfatídico, triosilceramida, pentasialilgangliosideo (GP2c) e na fase do diestro, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilinositolbis-fosfato, fosfatidilinositoltris-fosfato, triosilceramidas, disialilgangliosideos (GD1).

Na fase do estro, no grupo experimental, foram identificados: diacilgliceróis, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina e esfingomielina e na fase do diestro fosfatidilgliceróis, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina e fosfatidilinositol.

5 DISCUSSÃO

A pecuária leiteira pode ser afetada por diversos fatores, sendo, a eficiência reprodutiva considerada uma das mais importantes para manter, do ponto de vista econômico, a produção viável. O número de artigos que descrevem as possíveis causas de doenças reprodutivas é crescente. Destaque é dado à repetição de cio em vacas leiteiras. A repetição de cio é definida pelo número de inseminações necessárias para o nascimento de um bezerro vivo saudável (Zemjanis, 1980). Acima de três inseminações fracassadas, a repetição de cio pode ser considerada. Nesta dissertação as fêmeas classificadas como repetidoras de cio passaram, em média, cinco vezes pelo procedimento de inseminação, até o nascimento do bezerro.

A repetição de cio em vacas leiteiras pode ter diferentes etiologias, porém, a que ocorre com maior frequência é a endometrite sub-clínica, que consiste em um quadro de infecção persistente do endométrio, mucosa uterina, sem sintomatologia clínica. De acordo com Leblanc (2014) até 30% das vacas recém-paridas desenvolvem endometrite sub-clínica.

Sendo o útero o órgão determinante para que ocorra uma gestação bem-sucedida, os remodelamentos celulares e moleculares são fundamentais em cada fase do ciclo gestacional para permitir a fecundação, implantação e gestação (Imakawa *et al.*, 2017). Com essa premissa, o nosso trabalho teve o objetivo de identificar as possíveis alterações no conteúdo de glicoproteínas e lipídios que possam ocorrer no endométrio bovino, comparando fêmeas férteis com as repetidoras de cio. Paralelamente, a avaliação histopatológica do tecido endometrial, nos dois grupos de animais foi determinada.

Atualmente, um dos métodos de diagnóstico utilizados para repetição de cio, causada por endometrite subclínica, é a análise citológica através da contagem de neutrófilos PMN, por ser a primeira resposta do sistema imune inato. A contagem de PMN acima de 14% já pode indicar a patologia e levar ao aumento de intervalo entre partos (Lee *et al.*, 2018). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram infiltrado inflamatório, na classificação da inflamação total, sem diferença significativa em ambos os grupos estudados. No entanto, na análise do tipo celular, foi possível evidenciar maior infiltrado inflamatório por PMN no grupo controle na fase do estro. Por outro lado, as células mononucleares, incluindo linfócitos, foram predominantes

no grupo de fêmeas repetidoras de cio. Os resultados histológicos obtidos no grupo controle podem indicar uma resposta imunológica imediata que auxilia o organismo na depuração bacteriana e involução uterina, como sugerido por Chapwanya *et al.* (2012). Esses autores observaram que a contagem de neutrófilos e o aumento da expressão de genes pró-inflamatórios ocorrem de maneira fisiológica em fêmeas recém-paridas e sugerem que a desregulação deste processo é que pode gerar doenças reprodutivas. Em contrapartida, em fêmeas classificadas como repetidoras de cio a contagem de células MON, incluindo focos linfocitários, foi predominante. Os resultados obtidos nesta dissertação sugerem uma condição de inflamação crônica, confirmada não apenas pela presença de células mononucleadas, mas também pela rarefação das glândulas uterinas nas fêmeas repetidoras. O artigo de Palomares *et al.* (2018) demonstra que fêmeas bovinas, consideradas subférteis, possuem infiltração de células MON distribuídas pelo endométrio e ao redor das glândulas uterinas, além de glândulas císticas e fibrose periglandular, sugerindo que as alterações encontradas são características de infecção crônica e estão diretamente relacionadas à diminuição da eficiência reprodutiva em vacas leiteiras.

Vários trabalhos demonstraram que, durante o ciclo estral, ocorrem no endométrio alterações celulares e moleculares que são vitais para a implantação do embrião. Uma importante modificação observada no epitélio uterino e no epitélio glandular, necessária para a prenhez, é a expressão regulada de mucina-1 (MUC1) durante o ciclo estral (Achache e Revel, 2006). Nesta dissertação, visando identificar as diferenças na distribuição e expressão de glico-epítomos característicos desta mucina (MUC1), realizamos um estudo histoquímico do endométrio de vacas repetidoras e não repetidoras, utilizando as lectinas Jacalina e UEAI. Nossos resultados demonstraram que a MUC1, presente no tecido endometrial bovino, apresenta terminais de Gal β 1-3GalNAc e α -Fucose e que estes glico-epítomos estão presentes em ambas as fases do ciclo estral de todas as fêmeas do GC e GE. A intensidade das marcações pelas duas lectinas demonstrou, também, que não ocorre variação na abundância destes glico-epítomos durante o ciclo estral, entre as vacas repetidoras e não repetidoras de cio. A marcação com a lectina Jacalina demonstrou que as unidades terminais de Gal β 1-3-GalNAc estavam distribuídas no epitélio de revestimento, estrato compacto e glândulas uterinas. O resultado de marcação com a lectina UEAI apresentou um padrão de distribuição, para as

unidades terminais de L-Fucose, semelhante ao observado para as unidades terminais de Gal β 1-3GalNAc. Estudos realizados em ratos demonstraram, também, que a expressão da MUC1 do tecido endometrial estava inalterada durante o ciclo estral (Desouza *et al.*, 1998). No entanto, como a MUC1 atua como uma molécula antiaderente, a sua expressão precisa ser reduzida na superfície do tecido endometrial, durante a fase receptiva de implantação. A propriedade antiaderente da MUC1 é atribuída à presença do ectodomínio longo que se estende para além do glicocálice (Meseguer *et al.*, 1998). Esta projeção impede estericamente, a interação do blastocisto com os receptores de adesão que estão presentes na superfície do endométrio. Assim, vários trabalhos sugerem que a MUC1 exerce uma ação repelente sobre o embrião até que ele encontre o local adequado para a implantação (Wesseling *et al.*, 1996; Aplin, 1997; 1999). Carson *et al.* 1998

A distribuição e regulação da expressão de MUC1 variam ao longo do ciclo estral e entre as espécies. Em alguns animais como camundongo, rato e porco, a MUC1 é regulada negativamente no endométrio receptivo, antes da implantação do blastocisto, quando os níveis de progesterona são altos (Braga e Gendler, 1993; Surveyor *et al.*, 1995; Bowen *et al.*, 1996; Desouza *et al.*, 1998). Em humanos foi verificado que ocorre um aumento da expressão da MUC1 no período de pré-implantação, sugerindo que a MUC1 seja responsável em direcionar o embrião, temporal e espacialmente, para o local adequado, sendo necessário um processo de remoção da MUC1 para que ocorra a implantação (Aplin, 1997; Meseguer *et al.*, 1998; Meseguer *et al.*, 2001; Thathiah e Carson, 2004)

Em conjunto, os nossos resultados demonstram que não é possível separar as vacas repetidoras e não repetidoras de cio, baseando-se na expressão e na distribuição dos glico-epitopos presentes na MUC1, do tecido endometrial.

Outro fator essencial para o desenvolvimento do concepto é a secreção endometrial, presente no lúmen uterino conhecido como histotrofo. O histotrofo, além de interagir diretamente com o embrião, durante todo o processo de implantação no endométrio, protege o tecido uterino do ataque de microrganismos. O histotrofo é uma mistura complexa, rica em glicoproteínas que contém, entre outros componentes, secreções das glândulas endometriais, proteínas séricas, fatores de crescimento, carboidratos e lipídios, representando um microambiente para o desenvolvimento embrionário (Ashworth, 1995).

Em bovino, o principal componente glicoprotéico do histotrofo foi identificado como sendo constituído de mucinas formadoras de gel do tipo MUC-2 e MUC-5B (Alfattah *et al.*, 2015). O conhecimento sobre a estrutura das cadeias oligossacarídicas destas mucinas é fundamental para a descoberta de glico-marcadores que permitem distinguir vacas repetidoras de cio das não repetidoras. Como as alterações estruturais das cadeias oligossacarídicas de mucinas modificam as suas propriedades biológicas, em diversos eventos, incluindo o reconhecimento celular (Varki e Gagneux, 2017), nesta dissertação foi realizada a análise da composição monossacarídica das mucinas purificadas do fluido uterino, visando diferenciar vacas repetidoras das não repetidoras de cio.

Os resultados das análises de determinação monossacarídica demonstraram que as cadeias oligossacarídicas das mucinas purificadas do lavado uterino bovino são constituídas de fucose, galactose, N-acetilgalactosamina e N-acetilglucosamina. Surpreendentemente, a análise não demonstrou a ocorrência de ácido siálico, um componente sempre presente em mucinas. O ácido siálico é o nome genérico de uma família de monossacarídeos ácidos de nove átomos de carbonos que está, predominantemente, localizado nas extremidades não redutoras das cadeias de oligossacarídicas de glicoproteínas e glicolipídios (Varki e Gagneux, 2017). A ausência de ácido siálico nas mucinas isoladas dos lavados uterinos pode ser atribuída à ação de sialidases endometriais e ou bacterianas presentes no tecido uterino; ou ao fato de que a expressão de sialiltransferases nas glândulas endometrias esteja sob um processo de regulação negativa, durante o ciclo estral.

Embora as cadeias oligossacarídicas das mucinas do lavado uterino sejam constituídas de fucose, galactose, N-acetilgalactosamina e N-acetilglucosamina, os dados obtidos da relação molar entre estes monossacarídeos mostram diferenças significativas marcantes entre o grupo de vacas repetidoras e não repetidoras de cio. Sugerimos, assim, que o padrão da relação molar entre os monossacarídeos constituintes das cadeias oligossacarídicas, das mucinas do lavado, possa ser um potencial glico-marcador, para discriminar vacas repetidoras e não repetidoras de cio. Neste contexto, a caracterização estrutural das cadeias oligossacarídicas das mucinas é fundamental para validar o padrão de relação molar como glico-marcador.

Além de glicoproteínas, os lipídios são componentes estruturais de membrana das células que compõem o endométrio e, funcionam, também, como moléculas de

sinalização, modulando os processos envolvidos com o desenvolvimento embrionário. Nesta dissertação, nós identificamos nas fases estro e diestro os lipídios endometriais que discriminam as vacas repetidoras e não repetidoras de cio. A maioria dos lipídios identificados está envolvida em vias de sinalização que regulam vários fenômenos celulares essenciais, como transdução de sinal, tráfego de vesículas, dinâmica do citoesqueleto de actina, adesão, proliferação e motilidade (Toker, 2002; Di Paolo e De Camilli, 2006; Hammond e Balla, 2015). Em nosso trabalho, nós observamos a predominância de diacilgliceróis como os lipídios característicos de vacas repetidoras de cio, sugerindo que o acúmulo deste mensageiro secundário possa alterar os componentes moleculares do tecido endometrial, comprometendo o desenvolvimento embrionário. Uma função importante descrita para os diacilgliceróis, em particular daqueles derivados do fostatidilinositol, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato e fosfatidilcolina, é a modulação de processos vitais na fisiologia celular, ativando membros da família de enzimas proteína cinase c (PKC) (Sun *et al.*, 2013). Além de sua função como mensageiro secundário, os diacilgliceróis são uma fonte importante de ácido araquidônico, uma molécula sinalizadora e precursora de prostaglandinas e leucotrienos (Funk, 2001). A importância das prostaglandinas, no processo da implantação embrionária, é conhecida e está bem demonstrada em modelos animais. Em camundongos, as prostaglandina I2 e prostaglandina E2 formadas pela ação da COX-2 são essenciais para a ovulação, fertilização, implantação e decidualização (Chakraborty *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 1997; Segi *et al.*, 2003). Outro lipídio identificado nesta dissertação e característico de vacas repetidoras de cio foi a esfingomielina (36:2) que apresenta função de modular os componentes do tecido endometrial. As esfingomielinas são importantes componentes estruturais de membranas biológicas e, quando hidrolisada produzem metabolitos bioativos como ceramida, esfingosina, e esfingosina 1-fosfato que desempenham papel importante na proliferação, diferenciação e apoptose celulares (Hannun e Obeid, 1995). Belaz *et al.* (2016) estudando a distribuição de fosfolipídios presentes no oviduto e útero de bovinos, demonstraram que o aumento do conteúdo de esfingomielina correlaciona com a maior receptividade do endométrio ao embrião. Outro exemplo do papel crítico dos esfingolipídios na reprodução foi à demonstração de que a eliminação dos genes da esfingosinacinaase causa o acúmulo da base esfingoide e a redução de

fosfatidiletanolamina, induzindo a perda precoce da gravidez, pelo comprometimento da decidualização e perda da estabilidade dos vasos sanguíneos uterinos (Mizugishi *et al.*, 2007). Por outro lado, há evidências de que a esfingosina 1-fosfato, o produto do metabolismo da esfingomielina, desempenha importante papel na adaptação do útero à gravidez (Jeng *et al.*, 2007). Como o ciclo da esfingomielina produz moléculas que induzem sinais apoptóticos e mitogênicos quais ajudam a regular o arranjo molecular no tecido uterino, visando tornar o endométrio receptivo, o desequilíbrio destes sinais durante o ciclo estral pode comprometer o desenvolvimento embrionário.

Em vacas não repetidoras de cio, diferente dos resultados encontrados em vacas repetidoras de cio, os lipídios de sinalização celular predominante são da família dos fosfoinosítídeos e gangliosídeos. Os fosfoinosítídeos são fosfolipídios formados pela fosforilação sequencial no anel mio-inositol do fosfatidilinositol, produzindo fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) e fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3), entre outros compostos (Hammond e Balla, 2015). O PIP2 e o PIP3 são importantes lipídios que regulam várias funções celulares, incluindo a sobrevivência celular, a proliferação, o tráfego de membranas, o rearranjo do citoesqueleto, e a expressão gênica (Hammond e Balla, 2015). Eles podem exercer sua função indiretamente como precursores de mensageiros secundários, como o diacilglicerol e o inositol 1,4,5-trifosfato, ou diretamente interagindo com moléculas de proteínas efetoras e, assim, orquestrar a organização espaço-temporal das cascatas de transdução de sinal intracelular. Embora o papel que os fosfoinosítídeos desempenham no tecido uterino de bovinos relacionado com a receptividade endometrial não seja conhecido, alterações na produção e no metabolismo destes fosfolipídios estão associadas com várias doenças, incluindo câncer, diabetes, inflamação e doenças cardíacas. Com relação aos gangliosídeos, as vacas não repetidoras de cio apresentam, no estro, um pentasialogangliosídeo (GP2c) e no diestro três trisialgangliosídeos (GD1). Se, esta mudança no perfil de gangliosídeos está associada a um papel importante na biologia uterina, relacionado ao desenvolvimento embrionário, permanece a ser estudado. Em mamíferos, alguns gangliosídeos podem interferir na resposta imunológica mediada por célula (Ravindranath *et al.*, 2007; Mahata *et al.*, 2015). Por exemplo, GM1 e GM2 podem suprimir a proliferação de células T mediada por interleucina IL-2; e GM3 e GD1a

podem induzir a produção de IL-10 por linfócito T humanos (Bergelson, 1995). Além disso, os gangliosídeos são glico-marcadores de diferenciação durante a embriogênese, oncogênese e diferenciação linfóide (Hakomori, 2004).

Um resultado original obtido nestes estudos foi à identificação do pentasialogangliosídeo (GP2c). Até o momento, não há descrição na literatura da presença deste gangliosídeo em sistemas biológicos. Há relato da presença de pentasialogangliosídeos (GP1c) no cérebro humano (Miller-Podraza *et al.*, 1991). É possível correlacionar a presença de GP2c em vacas não repetidoras de cio, fase estral, no entanto, mais estudos são necessários para esta afirmação.

Em relação aos fosfolipídios poli-insaturados PG (31:4); PG (40:4); PI (34:4); PI (42:8); PA (38:5); PS (40:9); PS (42:9); e PE (42:4) uma particularidade destes lipídios é modular a função endometrial por serem potencial fonte de ácido araquidônico. Nos GC e GE estes fosfolipídios poli-insaturados foram identificados. Trabalhos realizados em camundongos demonstram que fosfolipídios contendo o ácido araquidônico quando co-localizados com a COX-2 desempenham um importante papel no desenvolvimento embrionário através do aumento da angiogênese do tecido endometrial (Burnum *et al.*, 2009).

Após a análise e discussão do conjunto dos resultados obtidos nesta dissertação é possível propor domínios glicídicos variações quantitativas nos componentes sacarídicos de mucinas isoladas do lavado uterino; e domínios lipídicos obtidos do tecido endometrial presença de esfingomielina e ausência do gangliosídeo GP2c como biomarcadores em fêmeas bovinas com repetição de cio.

6 CONCLUSÃO

Uma gestação bem-sucedida é dependente da composição e função do trato reprodutivo. Nesta dissertação foram comparadas fêmeas bovinas férteis e repetidoras de cio, as análises histopatológicas evidenciaram diferenças inflamatórias entre os grupos, assim como foram identificados lipídios diferentes. A caracterização das mucinas evidenciou a mesma composição monossacarídica, porém com relação molar diferente entre as fêmeas não repetidoras e repetidoras de cio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHACHE, H.; REVEL, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. **Human reproduction update**, v. 12, n. 6, p. 731-746, 2006. ISSN 1460-2369.

ADAMS, G. et al. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 72-80, 2008. ISSN 0093-691X.

ALFATTAH, M. A. et al. The expression of mucin genes in the bovine endometrium in comparison to cervix during the peri-oestrous period. 2015.

APLIN, J. D. Adhesion molecules in implantation. **Reviews of reproduction**, v. 2, n. 2, p. 84-93, 1997. ISSN 1470-1626.

_____. MUC-1 glycosylation in endometrium: possible roles of the apical glycocalyx at implantation. **Human Reproduction**, v. 14, n. suppl_2, p. 17-25, 1999. ISSN 1460-2350.

ASHWORTH, C. J. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. **Livestock Production Science**, v. 44, n. 2, p. 99-105, 1995. ISSN 0301-6226.

BAUERSACHS, S. et al. Transcriptome studies of bovine endometrium reveal molecular profiles characteristic for specific stages of estrous cycle and early pregnancy. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 116, n. 07, p. 371-384, 2008. ISSN 0947-7349.

BAUERSACHS, S. et al. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 889-908, 2005. ISSN 0952-5041.

BELAZ, K. R. A. et al. Phospholipid profile and distribution in the receptive oviduct and uterus during early diestrus in cattle. **Biology of reproduction**, v. 95, n. 6, p. 127, 1-11, 2016. ISSN 0006-3363.

BERGELSON, L. D. Serum gangliosides as endogenous immunomodulators. **Immunology today**, v. 16, n. 10, p. 483-486, 1995. ISSN 0167-5699.

BLANDER, J. M.; SANDER, L. E. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 3, p. 215, 2012. ISSN 1474-1741.

BONNETT, B. N. et al. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 2, p. 155, 1991.

BOWEN, J. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C. Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vivo. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 5, p. 1098-1106, 1996. ISSN 0006-3363.

BRAGA, V.; GENDLER, S. J. Modulation of Muc-1 mucin expression in the mouse uterus during the estrus cycle, early pregnancy and placentation. **Journal of cell science**, v. 105, n. 2, p. 397-405, 1993. ISSN 0021-9533.

BRIDGER, P. et al. Validation of primary epitheloid cell cultures isolated from bovine placental caruncles and cotyledons. **Theriogenology**, v. 68, n. 4, p. 592-603, 2007. ISSN 0093-691X.

BROCKHAUSEN, I.; SCHACHTER, H.; STANLEY, P. O-GalNAc glycans. In: (Ed.). **Essentials of Glycobiology. 2nd edition**: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

BURNUM, K. E. et al. Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation. **Journal of lipid research**, v. 50, n. 11, p. 2290-2298, 2009. ISSN 0022-2275.

BUSO, R. R. Retenção de placenta e endometrite subclínica: prevalência e relação com o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras mestiças. 2015.

CARNEIRO, L. C.; CRONIN, J. G.; SHELDON, I. M. Mechanisms linking bacterial infections of the bovine endometrium to disease and infertility. **Reproductive Biology**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2016. ISSN 1642-431X.

CHAKRABORTY, I. et al. Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. **Journal of molecular endocrinology**, v. 16, n. 2, p. 107-122, 1996. ISSN 0952-5041.

CHAPWANYA, A. et al. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1396-1407, 2009. ISSN 0093-691X.

CHAPWANYA, A. et al. The postpartum endometrial inflammatory response: a normal physiological event with potential implications for bovine fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 8, p. 1028-1039, 2012. ISSN 1448-5990.

CLARKE, I. Two decades of measuring GnRH secretion. **Reproduction (Cambridge, England) Supplement**, v. 59, p. 1-13, 2002. ISSN 1477-0415.

D'ANGELO, G. et al. Glycosphingolipids: synthesis and functions. **The FEBS journal**, v. 280, n. 24, p. 6338-6353, 2013. ISSN 1742-4658.

DESOUZA, M. M. et al. Reduction of mucin-1 expression during the receptive phase in the rat uterus. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 6, p. 1503-1507, 1998. ISSN 0006-3363.

DHARMARAJ, N.; WANG, P.; CARSON, D. D. Cytokine and progesterone receptor interplay in the regulation of MUC1 gene expression. **Molecular endocrinology**, v. 24, n. 12, p. 2253-2266, 2010. ISSN 0888-8809.

DI PAOLO, G.; DE CAMILLI, P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. **Nature**, v. 443, n. 7112, p. 651, 2006. ISSN 1476-4687.

DUNLAP, K. A. et al. Progesterone and placentation increase secreted phosphoprotein one (SPP1 or osteopontin) in uterine glands and stroma for histotrophic and hematotrophic support of ovine pregnancy. **Biology of reproduction**, v. 79, n. 5, p. 983-990, 2008. ISSN 0006-3363.

DYCE, K. M.; WENSING, C. J.; SACK, W. O. **Tratado de anatomia veterinária**. Elsevier Brasil, 2004. ISBN 8535213929.

ESPEJEL, M.; MEDRANO, A. Histological Cyclic Endometrial Changes in Dairy Cows: An Overview. Review. **Journal of Dairy and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 8, p. 2017, 2017.

EUGENE, P. The synthesis of cytidine diphosphate choline, cytidine diphosphate ethanolamine and related compounds. **J Biol Chem**, v. 222, p. 185, 1956.

FAHY, E. et al. A comprehensive classification system for lipids. **European journal of lipid science and technology**, v. 107, n. 5, p. 337-364, 2005. ISSN 1438-7697.

FAHY, E. et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. **Journal of lipid research**, v. 50, n. Supplement, p. S9-S14, 2009. ISSN 0022-2275.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **science**, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001. ISSN 0036-8075.

GALINA, C. S.; ORIHUELA, A. The detection of estrus in cattle raised under tropical conditions: What we know and what we need to know. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 1, p. 32-38, 2007. ISSN 0018-506X.

GILBERT, R. O. et al. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p. 1879-1888, 2005. ISSN 0093-691X.

GUNDLING, N.; DREWS, S.; HOEDEMAKER, M. Comparison of two different programmes of ovulation synchronization in the treatment of ovarian cysts in dairy cows. **Reproduction in domestic animals**, v. 50, n. 6, p. 893-900, 2015. ISSN 0936-6768.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**: São Paulo: Manole 2004.

_____. **Reproduction in farm animals**. John Wiley & Sons, 2013. ISBN 1118710703.

HAGIWARA, M. K. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. Elsevier, 2014. ISBN 8535271023.

HAKOMORI, S. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 76, n. 3, p. 553-572, 2004. ISSN 0001-3765.

HAMMOND, G. R.; BALLA, T. Polyphosphoinositide binding domains: Key to inositol lipid biology. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 6, p. 746-758, 2015. ISSN 1388-1981.

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. **Trends in biochemical sciences**, v. 20, n. 2, p. 73-77, 1995. ISSN 0968-0004.

HOLUB, B.; KUKSIS, A. Metabolism of molecular species of diacylglycerophospholipids. In: (Ed.). **Advances in lipid research**: Elsevier, v.16, 1978. p.1-125. ISBN 0065-2849.

IMAKAWA, K. et al. Continuous model of conceptus implantation to the maternal endometrium. **Journal of Endocrinology**, v. 233, n. 1, p. R53-R65, 2017. ISSN 0022-0795.

IUPA, C. UB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids.(Recommendations 1997) 2000. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem**, v. 55, p. 311-326, 1988.

JENG, Y.-J. et al. Progesterone-induced sphingosine kinase-1 expression in the rat uterus during pregnancy and signaling consequences. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 4, p. E1110-E1121, 2007. ISSN 0193-1849.

JOSHI, R. P. et al. The ζ isoform of diacylglycerol kinase plays a predominant role in regulatory T cell development and TCR-mediated ras signaling. **Sci. Signal.**, v. 6, n. 303, p. ra102-ra102, 2013. ISSN 1945-0877.

JULIEN, S. et al. How do gangliosides regulate RTKs signaling? **Cells**, v. 2, n. 4, p. 751-767, 2013.

KASIMANICKAM, R. et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 62, n. 1-2, p. 9-23, 2004. ISSN 0093-691X.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; KASTELIC, J. Mucin 1 and cytokines mRNA in endometrium of dairy cows with postpartum uterine disease or repeat breeding. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 952-958. e2, 2014. ISSN 0093-691X.

KHAN, M. S.; DOSOKY, N. S.; WILLIAMS, J. D. Engineering lipid bilayer membranes for protein studies. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 11, p. 21561-21597, 2013.

KOBAYASHI, N. et al. Differential subcellular targeting and activity-dependent subcellular localization of diacylglycerol kinase isozymes in transfected cells. **European journal of cell biology**, v. 86, n. 8, p. 433-444, 2007. ISSN 0171-9335.

KOJIMA, F.; PATTERSON, D. Guide to Estrus Synchronization of Beef Cattle. **University of Missouri-Columbia Extension Publications# MM101**, 2003.

LEBLANC, S. Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. **Animal**, v. 8, n. s1, p. 54-63, 2014. ISSN 1751-7311.

LEE, S. C. et al. Cytological endometritis in dairy cows: diagnostic threshold, risk factors, and impact on reproductive performance. **Journal of veterinary science**, v. 19, n. 2, p. 301-308, 2018. ISSN 1229-845X.

LIEBICH, H.-G. **Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis**. Schattauer Verlag, 2010. ISBN 3794526929.

LIM, H. et al. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 197-208, 1997. ISSN 0092-8674.

LÓPEZ-GATIUS, F. Factors of a noninfectious nature affecting fertility after artificial insemination in lactating dairy cows. A review. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p. 1029-1041, 2012. ISSN 0093-691X.

LÓPEZ-GATIUS, F. et al. Screening for high fertility in high-producing dairy cows. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1678-1689, 2006. ISSN 0093-691X.

MAHATA, B. et al. TALEN mediated targeted editing of GM2/GD2-synthase gene modulates anchorage independent growth by reducing anoikis resistance in mouse tumor cells. **Scientific reports**, v. 5, p. 9048, 2015. ISSN 2045-2322.

MCMANUS, J. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain technology**, v. 23, n. 3, p. 99-108, 1948. ISSN 0038-9153.

MEIER, S. et al. Changes in uterine endometrial phospholipids and fatty acids throughout the oestrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 57, n. 3, p. 341-349, 1997. ISSN 0952-3278.

MENDIS, L. **Distribution of Lipids in the Human Brain and their Differential Expression in Alzheimer's Disease: A Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Imaging Mass Spectrometry (MALDI-IMS) Study**. 2016. ResearchSpace@ Auckland

MESEGUER, M. et al. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 2, p. 590-601, 2001. ISSN 0006-3363.

MESEGUER, M.; PELLICER, A.; SIMON, C. MUC1 and endometrial receptivity. **Molecular human reproduction**, v. 4, n. 12, p. 1089-1098, 1998. ISSN 1460-2407.

MILLER-PODRAZA, H.; MÅNSSON, J.-E.; SVENNERHOLM, L. Pentasialogangliosides of human brain. **FEBS letters**, v. 288, n. 1-2, p. 212-214, 1991. ISSN 0014-5793.

MIZUGISHI, K. et al. Sphingolipid pathway regulates innate immune responses at the fetomaternal interface during pregnancy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 4, p. 2053-2068, 2015. ISSN 0021-9258.

MIZUGISHI, K. et al. Maternal disturbance in activated sphingolipid metabolism causes pregnancy loss in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 10, p. 2993-3006, 2007. ISSN 0021-9738.

MURRAY, R. K. et al. **Harper's illustrated biochemistry**. McGraw-Hill, 2014. ISBN 0071389016.

NOAKES, D. E. **Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2009. ISBN 070203990X.

OBEID, L. M. et al. Programmed cell death induced by ceramide. **Science**, v. 259, n. 5102, p. 1769-1771, 1993. ISSN 0036-8075.

PALOMARES, R. A. et al. Chronic inflammatory and degenerative endometrial lesions in subfertile Criollo Limonero cattle; a B. taurus Latin-American breed threatened with extinction; A case-control study. **Animal reproduction science**, v. 197, p. 22-32, 2018. ISSN 0378-4320.

PARKER, P. et al. Bovine Muc1 inhibits binding of enteric bacteria to Caco-2 cells. **Glycoconjugate journal**, v. 27, n. 1, p. 89-97, 2010. ISSN 0282-0080.

PENITENTE-FILHO, J. M. et al. Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes. **Animal Science Journal**, v. 86, n. 2, p. 148-152, 2015. ISSN 1344-3941.

PEREZ-VILAR, J.; HILL, R. L. Mucin family of glycoproteins. 2004. ISSN 0124437109.

PICCINNO, M. et al. Effects of d-cloprostenol on different layers and regions of the bovine uterus during the follicular and luteal phases. **Theriogenology**, v. 96, p. 92-96, 2017. ISSN 0093-691X.

POTTER, T. J. et al. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 127-134, 2010. ISSN 0093-691X.

RAMSEY, K. A.; RUSHTON, Z. L.; EHRE, C. Mucin agarose gel electrophoresis: western blotting for high-molecular-weight glycoproteins. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 112, 2016.

RAVINDRANATH, M. H. et al. Immunogenic gangliosides in human ovarian carcinoma. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 353, n. 2, p. 251-258, 2007. ISSN 0006-291X.

ROTH, Z. et al. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of reproduction and fertility**, v. 120, n. 1, p. 83-90, 2000. ISSN 1470-1626.

ROYAL, M. et al. The genetic relationship between commencement of luteal activity and calving interval, body condition score, production, and linear type traits in Holstein-Friesian dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 11, p. 3071-3080, 2002. ISSN 0022-0302.

SALILEW-WONDIM, D. et al. Clinical and subclinical endometritis induced alterations in bovine endometrial transcriptome and miRNome profile. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 218, 2016. ISSN 1471-2164.

SEGI, E. et al. Expression of messenger RNA for prostaglandin E receptor subtypes EP4/EP2 and cyclooxygenase isozymes in mouse periovulatory follicles and oviducts during superovulation. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 3, p. 804-811, 2003. ISSN 0006-3363.

SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 6, p. 1025-1032, 2009. ISSN 0006-3363.

SHELDON, I. M. et al. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. **Reproduction**, v. 148, n. 3, p. R41-R51, 2014. ISSN 1741-7899.

SPENCER, T. E. et al. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 65-78, 2006. ISSN 1448-5990.

SUN, Y. et al. Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate: targeted production and signaling. **Bioessays**, v. 35, n. 6, p. 513-522, 2013. ISSN 0265-9247.

SURVEYOR, G. A. et al. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. **Endocrinology**, v. 136, n. 8, p. 3639-3647, 1995. ISSN 0013-7227.

THATHIAH, A.; CARSON, D. D. Mt1-mmp mediates muc1 shedding independent of tace/adam17. **Biochemical Journal**, v. 382, n. 1, p. 363-373, 2004. ISSN 0264-6021.

TOKER, A. Phosphoinositides and signal transduction. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 59, n. 5, p. 761-779, 2002. ISSN 1420-682X.

VARKI, A.; GAGNEUX, P. Biological functions of glycans. In: (Ed.). **Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition**: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.

VENABLE, M. E. et al. Role of ceramide in cellular senescence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 51, p. 30701-30708, 1995. ISSN 0021-9258.

VERCESI FILHO, A. et al. Parâmetros genéticos entre características de leite, de peso e a idade ao primeiro parto em gado mestiço leiteiro (Bos taurus x Bos indicus). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 983-990, 2007. ISSN 0102-0935.

WAGENER, K. et al. Endometrial mRNA expression of selected pro-inflammatory factors and mucins in repeat breeder cows with and without subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 90, p. 237-244, 2017. ISSN 0093-691X.

WANG, C. et al. Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during the bovine oestrous cycle and their association with progesterone levels. **Reproduction**, v. 134, n. 2, p. 365-371, 2007. ISSN 1470-1626.

WESSELING, J.; VAN DER VALK, S. W.; HILKENS, J. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. **Molecular biology of the cell**, v. 7, n. 4, p. 565-577, 1996. ISSN 1059-1524.

YANG, B. et al. Primary replication and invasion of the bovine gammaherpesvirus BoHV-4 in the genital mucosae. **Veterinary research**, v. 48, n. 1, p. 83, 2017. ISSN 1297-9716.

ZEHN, D.; LEE, S. Y.; BEVAN, M. J. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. **Nature**, v. 458, n. 7235, p. 211, 2009. ISSN 1476-4687.

ZEMJANIS, R. Repeat breeding or conception failure in cattle; Current therapy in theriogenology. **Morrow. D. A, WB Saunders Company Philadelphia. Pp**, v. 205, 1980.