

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

GABRIELA PEREIRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE LESÕES CAUSADAS POR
LEPTOSPIRA SPP. EM ÚTERO BOVINO EM MODELO EXPLANTE**

UBERLÂNDIA

2018

GABRIELA PEREIRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE LESÕES CAUSADAS POR
LEPTOSPIRA SPP. EM ÚTERO BOVINO EM MODELO EXPLANTE**

Monografia apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Dra. Anna Monteiro Correia Lima

Co-orientadora: Prof^a. Msc. Dayane Olímpia Gomes

UBERLÂNDIA

2018

GABRIELA PEREIRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DE LESÕES CAUSADAS POR
LEPTOSPIRA SPP. EM ÚTERO BOVINO EM MODELO EXPLANTE**

Monografia apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Dra. Anna Monteiro Correia Lima

Co-orientadora: Prof^a. Msc. Dayane Olímpia Gomes

Uberlândia, 27 de junho de 2018.

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Anna Monteiro Correia Lima
(Orientadora – UFU)

Prof^a. Dra. Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi
(Examinadora – UFU)

Msc. Paula Batista de Alvarenga
(Examinadora – UFU)

AGRADECIMENTOS

Hoje parei para refletir sobre a minha experiência universitária e um imenso sentimento de gratidão preencheu-me quando percebi quão abençoada sou. Durante estes anos vivenciei experiências incríveis e engrandecedoras que fizeram de mim uma pessoa melhor, e fiquei mais feliz ainda ao ver as pessoas maravilhosas que caminham comigo.

Por isso escrevo este texto para agradecer, em primeiro lugar a Deus pelo dom da minha vida e por todas as bênçãos que recebo diariamente. À Nossa Senhora devo o meu ingresso à universidade e agradeço também por todas as batalhas vencidas e por sonhar os meus sonhos comigo.

De maneira muito especial agradeço aos meus pais, José Ângelo e Iolanda Maria por me apoiarem, ajudarem, pelas orações que foram fundamentais, pelo investimento e principalmente por todo amor.

Às minhas madrinhas, Maria José e Magali, agradeço por serem dois anjos na minha vida, por todo carinho e apoio. Também recordo-me da minha família querida que sempre torceu por mim. Muito obrigada de coração!

Aos meus amigos agradeço por tornarem essa jornada mais feliz e por serem minha família aqui em Uberlândia.

Ao GOU Santo Inácio de Loyola, agradeço por ser minha âncora e por representar um pedacinho do céu aqui nesta universidade.

Ao PET tenho muito carinho por ter me ensinado o trabalho em grupo, o profissionalismo e por tantas oportunidades, além do vínculo afetivo que pude construir dentro do grupo. Obrigada!

Agradeço aos meus professores, pois cada um deixou um ensinamento.

A Sabrinna agradeço por me fazer enxergar a vida de outra forma e me ajudar na construção do meu novo “eu”.

De maneira especial me recordo da participação de Ana, Igor, Lígia, Leoni e Anaíra, que me ajudaram neste trabalho com tanta boa vontade, disponibilidade e competência. A vocês o meu muito obrigada!

Agradeço a Nicolle por sua paciência, disponibilidade, atenção e aprendizado.

Com todo carinho agradeço a Prof^a Dr^a Alessandra por me ajudar tanto neste trabalho e em outros que desenvolvemos ao longo da graduação. Muito obrigada por seu empenho, paciência, atenção e sabedoria partilhada.

E sem mais delongas, agradeço de maneira especial à Prof^a Dr^a Anna Lima e a médica veterinária Msc. Dayane que me orientaram neste trabalho. Muito obrigada por se disponibilizarem a trabalhar comigo, pela atenção e por me ajudarem a desenvolver este trabalho.

RESUMO

No Brasil, cerca de 30% das vacas apresentam problemas reprodutivos que em grande parte estão relacionados à infecção por *Leptospira spp*, porém pesquisas que estudem a patogenia deste comprometimento ainda são restritas. Diante disto, objetivou-se com este trabalho investigar através de análises histopatológicas lesões ao tecido uterino colonizado *in vitro* por este agente utilizando o modelo *ex vivo*. investigar por meio de análises histopatológicas o tecido uterino colonizado por este agente. Para isso, inoculou-se *Leptospira spp*. sorovar Hardjo em fragmentos gravídicos e não gravídicos de útero de fêmea bovina saudáveis. Após incubação, os explantes foram processados e corados com hematoxilina e eosina e a leitura das lâminas histopatológicas foi feita classificando-as em escores de inflamação. Do total de tecido uterino avaliado, 50% (5/10) não apresentou nenhuma evidência de inflamação e a outra metade (5/10) evidenciou algum grau de inflamação. Dentro do grupo 1 (Útero não gravídico), 50% (3/6) dos fragmentos não apresentaram alterações inflamatórias, 33,3% (2/6) obtiveram escore de inflamação 1 e 16,6% (1/6) atingiu o escore de inflamação 2. Já no grupo 2 (Útero gravídico), 50% (2/4) das amostras não apresentaram elementos que caracterizassem processo inflamatório, e o restante (2/4) foi classificado com o escore de inflamação 1. Pelo teste de Wilcoxon verificou-se que não houve diferença significativa entre os escores de inflamação do grupo gravídico para o não gravídico (p-valor=0,906185616). Mesmo que brandas, não descarta-se que as alterações que ocorreram em parte dos tecidos avaliados possam interferir na reprodução. Aventa-se a hipótese de que por se tratar de um estudo realizado *in vitro* a resposta inflamatória não tenha sido tão expressiva como provavelmente ocorreria *in vivo*. Concluiu-se que com a investigação microscópica dos explantes uterinos cultivados foi possível verificar lesões inflamatórias de grau leve a moderado avaliados conforme padrão pré-estabelecido, porém o cultivo *in vitro* de fragmentos de útero bovino ainda é algo novo que precisa de maior investimento para se tornar uma ferramenta na elucidação da patogenia do comprometimento reprodutivo causado pela presença de *Leptospira spp*.

Palavras-chave: Histopatologia. Leptospirose bovina. Reprodução.

ABSTRACT

In Brazil, about 30% of the cows have reproductive problems that are largely related to infections caused by *Leptospira spp*, although researches investigating the pathogeny of this process are still limited. With this regard, the aim of this study was to investigate, by means of a histopathological analysis, the uterine tissue colonized by this agent. For this, *Leptospira spp*. sorovar Hardjo was inoculated in gravid and non-gravid uteri fragments of healthy cows. After incubation, the explants were processed and stained with hematoxylin and eosin, and the analysis of histology slides was performed by classifying them according to inflammation scores. From the total uteri tissue evaluated, 50% (5/10) did not show any evidence of inflammation, whereas the other half (5/10) exhibited a certain grade of inflammation. In group 1 (non-gravid uteri), 50% (3/6) of the fragments did not present inflammatory alterations, 33.3% (2/6) presented score 1 and 16.6% (1/6) reached score 2. Alternatively, 50% (2/4) of the samples in group 2 (gravid uteri) did not show any elements that could represent an inflammatory process, and the remaining samples (2/4) were classified as score 1. Wilcoxon test showed no significant differences in the inflammation scores between gravid and non-gravid groups ($p=0.906185616$). It could not be discarded that even the mild alterations that occurred in part of the tissue analyzed could in fact interfere with the reproduction. It is hypothesized that the inflammatory response observed in this in vitro study was not as expressive as it could be in vivo. In conclusion, that with the microscopic investigation of cultured uterine explants, it was possible to verify mild to moderate inflammatory lesions evaluated according to the pre-established standard, but in vitro culture of bovine uteri fragments is still a new method that requires more investment to become a tool in the elucidation of the pathogenesis of the reproductive disease caused by *Leptospira spp*.

Keywords: Bovine leptospirosis. Histopathology. Reproduction.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Caracterização histopatológica de escore de lesão em útero bovino com diferentes graus de alterações 20
- TABELA 2** Escore de lesão inflamatória para cada amostra de tecido uterino de vaca adulta avaliada no presente estudo 22

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Fotomicrografia de útero de fêmea bovina adulta. Grupo controle não inoculado com *Leptospira spp.* Coloração hematoxilina eosina, objetiva 10X. 23
- FIGURA 2** Fotomicrografia de útero não gravídico de fêmea bovina adulta inoculado com *Leptospira spp.* Fragmento com escore de lesão 2, apresentando áreas de fibrose (seta vermelha), vasos dilatados repletos de hemácias (seta preta), degeneração glandular cística (seta verde) e infiltrado inflamatório (leucócitos) (seta amarela). Coloração de hematoxilina eosina, objetiva 4X (A) e objetiva 10x (B). 24
- FIGURA 3** Fotomicrografia de útero gravídico de fêmea bovina adulta indicando lesão de escore 1. A seta vermelha indica degeneração glandular cística, a seta preta aponta alterações vasculares e a seta amarela indica célula inflamatória abaixo do epitélio de revestimento uterino. 24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Leptospirose: conceito e implicações	12
2.1.1	Morfologia	12
2.1.2	Principais sorovares	12
2.1.3	Transmissão e infecção	13
2.1.4	Metódos de diagnóstico	14
2.1.5	Leptospirose em bovinos	14
2.1.5.1	Histomorfologia uterina bovina	16
2.1.5.2	Imunidade uterina	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1	Sorologia	18
3.2	Preparo tecidual e cultivo dos explantes com <i>Leptospira spp.</i>	18
3.3	Protocolo de Histopatologia	19
3.4	Análise estatística	21
4	RESULTADOS	22
4.1	Reação no teste MAT	22
4.2	Análise histopatológica dos explantes	22
5	DISCUSSÃO	26
6	CONCLUSÃO	28
	REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

A lucratividade na pecuária está intimamente relacionada a um bom desempenho reprodutivo (CASARIN, 2018). Estima-se que, no Brasil, cerca de 30% das vacas apresentem baixos índices reprodutivos (BARUSELLI et al., 2012). Em estudos recentes, Libonati et al. (2018) e Arashiro et al. (2017) demonstraram que a repetição do estro foi o problema reprodutivo mais frequente e está fortemente associada à sororreatividade à leptospirose. Aborto é a segunda desordem reprodutiva que mais ocorreu e (ARASHIRO et al., 2017), sendo que a leptospirose tem sido comumente relatada como causa também deste acontecimento (LIBONATI et al., 2018).

Segundo Coelho (2014), a prevalência desta enfermidade em fêmeas bovinas abatidas em frigoríficos no município de São Luís– MA foi elevada, e o sorovar Hardjo apresentou maior frequência. Estes autores também afirmam que o bovino é considerado reservatório deste sorovar na disseminação e manutenção da leptospirose.

A disseminação de *Leptospira spp.* é caracterizada principalmente pela presença de animais doentes ou portadores assintomáticos que eliminam a bactéria pela urina, descargas cérvico-vaginais, fetos abortados e placenta, mantendo a doença endêmica na propriedade (FAINE et al., 1999; HASHIMOTO et al., 2012). Quando presentes, os sinais clínicos inespecíficos podem ser associados à várias patologias, como Brucelose, Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Diarréia Viral Bovina (BVD) (JUNQUEIRA; ALFIERI, 2006), e por isso é necessário a realização de exames laboratoriais para confirmar a presença desta infecção (JESUS, 2009).

Pesquisas têm demonstrado a presença de *Leptospira spp.* no útero, placenta e tuba uterina de bovinos (LOUREIRO, 2016), e isto explica porque na maioria das vezes a sintomatologia é de ordem reprodutiva como, estro irregular, abortos, nascimento de bezeros fracos, mumificação, natimortos, retenção de membranas fetais e infertilidade; ou produtiva como queda na produção de leite e mastites (ELLIS, 1994; BANCHIERO JUNIOR et al., 2014).

A patogenia desse comprometimento reprodutivo ainda não está completamente elucidada (LOUREIRO, 2016) e a exata patogênese da morte embrionária precoce e conseqüente repetição de estro ainda é desconhecida, mas sugere-se que a presença de leptospiros no ambiente uterino leve a uma inflamação

local suficiente para interferir na reprodução (ARENT et al., 2013; WANG et al., 2014).

Estudos que busquem elucidar a patogenia desse comprometimento reprodutivo se fazem necessários, e por esta razão objetivou-se nesta pesquisa investigar lesões à explante de tecido uterino colonizado *in vitro* por *Leptospira spp.* sorovar Hardjo por meio de avaliação histopatológica utilizando o modelo *ex vivo*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leptospirose: conceito e implicações

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial que acomete os animais domésticos, silvestres e o ser humano. Quando presente em animais de produção gera perdas econômicas significativas, sendo uma doença de importante repercussão também na saúde pública (BATISTA et al., 2004) devido à facilidade na transmissão, com alta morbidade, apesar da baixa mortalidade (FAINE et al., 1999).

A enfermidade é causada por bactérias patogênicas da ordem *Spirochaetales*, família *Leptospiraceae* e gênero *Leptospira* (BARANTON, 1995; QUINN et al., 2005).

A doença tem maior prevalência nas regiões de clima tropical (quente e úmido) e em locais de pobres condições sanitárias (BROWN; PRESCOTT, 2008). No Brasil esta zoonose é endêmica, sendo favorecida pelo clima quente e nas épocas de maior precipitação pluviométrica (CASTRO, 2010).

2.1.1 Morfologia

As leptospiras são bactérias Gram negativas, aeróbias obrigatórias, que medem 0,1µm de diâmetro e 6 a 20 µm de comprimento, possuem forma espiralada ou helicoidal, apresentam endoflagelos e motilidade ativa, com extremidade na forma de gancho (BARANTON, 1995; QUINN et al., 2005; VINH et al., 1986). Possuem também membrana citoplasmática e parede celular envolta por uma membrana externa com dupla camada composta de proteínas, fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (LPS) na camada externa. O LPS é também denominado endotoxina, um potente estimulador das respostas imunológicas (FAINE et al., 1999).

2.1.2 Principais sorovares

Dentre os sorovares patogênicos, a maioria encontra-se em três espécies que possuem distribuição global: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri*. Os

demais sorovares patogênicos estão distribuídos entre as espécies *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. kmetyi*, *L. noguchi*, *L. santarosai* e *L. weil* (AHMED et al., 2012a; 2012b).

As espécies de leptospira são agora classificadas por homologia do DNA e, dentro de cada espécie, vários sorovares são reconhecidos com base nas reações sorológicas. Soroviedades com antígenos em comum pertencem ao mesmo sorogrupo (ADLER; DE LA PENÃ MOCTEZUMA, 2010; LEVETT, 2001; PICARDAEU, 2013). São reconhecidos mais de 300 sorovares distintos distribuídos em 25 sorogrupos (PICARDAEU, 2013).

Diferentes sorovares de leptospira são prevalentes em certas regiões geográficas e estão associados a um ou mais hospedeiros de manutenção, que servem como reservatórios de infecção. Os hospedeiros de manutenção são muitas vezes espécies de vida selvagem e, às vezes, animais domésticos e gado (GROOMS, 2006).

2.1.3 Transmissão e infecção

A infecção do hospedeiro geralmente ocorre pelo contato com leptospiras no ambiente, pois fômites, carcaça de animais infectados, água e alimento contaminados com urina podem ser fontes desta bactéria. Pode ainda ocorrer a transmissão do agente por via transplacentária e venérea (CASTRO et al., 2010). Algumas das leptospiras podem escapar ao alcance do sistema imunológico e persistir nos túbulos renais, fígado, útero, olhos e meninge, e estes animais, mesmo que recuperados, tornam-se hospedeiros de manutenção e carregam a infecção de alguns dias a vários anos (CASTRO et al., 2010; PATEL et al., 2017).

A penetração do agente ocorre ativamente através das mucosas (ocular, digestiva, respiratória e genital), da pele escarificada e inclusive da pele íntegra, como ocorre quando da permanência por tempo prolongado em coleções de água contaminada (BRASIL, 1995). As leptospiras morrem rapidamente quando expostas a dessecação, pH abaixo de 6 ou acima de 8, radiação solar e temperaturas inferiores a 7° C ou superiores a 36° C (RIET-CORREA et al., 2007).

Em criações de bovinos, a disseminação leptospírica é caracterizada principalmente pela presença de animais doentes ou portadores assintomáticos que eliminam a bactéria pela urina, fluido vaginal, através de fetos abortados e placentas, mantendo a doença como endêmica na propriedade (AZIZI et al., 2014;

HASHIMOTO et al., 2012). A transmissão vertical tem sido demonstrada por meio da presença de leptospiros em fetos abortados, utilizando-se as técnicas de imunohistoquímica (ORLANDO et al., 2014), porém estudos de identificação desse microrganismo no útero são restritos, apesar de sua importância (PIRES, 2018).

2.1.4 Métodos de diagnóstico

Devido às dificuldades em diagnosticar a doença com base na apresentação clínica, já que os sinais são inespecíficos, é necessário o diagnóstico laboratorial para a confirmação dos casos (YERSIN et al., 1999), e estes incluem: soroglutinação microscópica de campo escuro (MAT), testes sorológicos (ELISA), PCR, entre outros (JESUS, 2009).

A técnica padronizada e recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e Ministério da Saúde no Brasil (BRASIL, 1995), estabelecida como padrão ouro para diagnóstico da leptospirose humana e animal é a soroglutinação microscópica de campo escuro (MAT) com antígenos vivos (CASTRO, 2010). O teste consiste principalmente na reação entre anticorpos presentes no soro contra os antígenos encontrados na superfície da *Leptospira* (ANZAI, 2006). Aplica-se esta técnica para visualização de *Leptospiras* devido ao reduzido diâmetro desta bactéria, sendo que desta forma são mais bem observadas (FAINE *et al.*, 1999).

Este método tem sido utilizado como teste populacional por ser uma técnica rápida na identificação de leptospiros na urina durante a fase de leptospiúria (LEVETT, 2001), sendo que os anticorpos podem ser revelados pela aglutinação com soro coletado entre o oitavo e décimo dia após o início do estado de leptospiemia (CASTRO et al., 2010).

2.1.5 Leptospirose em bovinos

Na espécie bovina, esta doença é responsável por elevadas perdas econômicas na pecuária mundial, pelo comprometimento no desempenho reprodutivo dos rebanhos acometidos devido a abortos, natimortos, infertilidade e perdas não produtivas por septicemia e nefrite (ELLIS, 1994; LEVETT, 2001; MINEIRO et al., 2010).

A infecção é de caráter agudo a crônico, com grande polimorfismo clínico (BANCHIERO JUNIOR et al., 2014; ELLIS, 1994). No entanto, a maioria dos animais apresenta uma forma crônica e silenciosa da doença, que é frequentemente negligenciada (LIBONATI, 2018).

A causa mais comum da leptospirose entre os bovinos é a infecção por leptospira pertencente ao sorovar Hardjo (GROOMS, 2006). Estimativas recentes da prevalência da infecção por leptospira em uma amostra de unidades leiteiras dos EUA indicaram que a infecção geral da prevalência do rebanho foi de aproximadamente 35-50%, com a maioria dessas infecções devido ao sorovar Hardjo (GROOMS, 2005), concordando com resultados obtidos por Favero (2001), que encontrou predomínio do sorovar Hardjo nos 21 estados brasileiros em que realizou seu estudo. Outros estudos soro-epidemiológicos realizados em diversos estados brasileiros por outros autores também revelam a disseminação do sorovar Hardjo no rebanho bovino nacional, sendo que a prevalência da doença variou entre 27,83% e 74,5% (ABUCHAIM; DUTRA, 1985; MADRUGA et al., 1980; MOREIRA et al., 1979; TEDESCO, 1997).

Foram identificados dois tipos de sorovar Hardjo sorologicamente indistinguíveis, mas geneticamente distintos: *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo (tipo hardjoprajitno) e *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo (tipo hardjo-bovis). Sorovar Hardjo tipo hardjo-bovis é comum nas populações de gado em todo o mundo; Tipo hardjoprajitno é isolado principalmente de gado no Reino Unido (GROOMS, 2006).

A infecção persistente do trato genital bovino masculino e feminino é uma característica proeminente das infecções por sorovar Hardjo e pode durar mais de 12 meses (LEONARD, 1992). O isolamento de *Leptospira sp.* do trato genital de touros naturalmente infectados revela ser este um importante sítio de infecção via sêmen e coito, além de sugerir a possibilidade de transmissão venérea (DHALIWAL et al., 1996). A localização precisa da infecção persistente no trato genital feminino não é conhecida, (ELLIS et al., 1986) e a patogênese das afecções reprodutivas não é claramente compreendida. Presumivelmente a presença de leptospira no útero de vacas infectadas interfere na implantação do embrião ou outros eventos da gravidez (GROOMS, 2006). Os dados precisos para a frequência do aborto atribuível à leptospirose são limitados. Em estudo realizado na Irlanda do Norte, o sorovar

Hardjo foi reconhecido como responsável por quase metade de todos os abortos bovinos (ELLIS et al., 1985).

Outras causas comuns de leptospirose no gado incluem os sorovares pomona e grippotyphosa (GROOMS, 2006).

2.1.5.1 Histomorfologia uterina bovina

O útero é o local do trato reprodutor feminino no qual o conceito se desenvolve. Em bovinos é composto por três regiões: cérvix, corpo e um par de cornos uterinos (SAMUELSON, 2007).

A parede uterina é constituída pelas camadas serosa, muscular e mucosa, denominadas, respectivamente, perimétrio, miométrio e endométrio, sendo que a região muscular é subdividida em circular interna e longitudinal externa e caracteriza-se por ser ricamente innervada e vascularizada (BACHA; BACHA, 2003).

O epitélio endometrial é colunar pseudo-estratificado. Glândulas endometriais se estendem no interior da lâmina própria e desempenham importante função de transferência de substâncias da mãe para o feto, incluindo o ferro (DA SILVA MARQUES et al., 2007). A região de submucosa juntamente com o epitélio forma a zona funcional que abriga fibras reticulares, diversas artérias espirais e inúmeras células, dentre elas, fibrócitos, leucócitos, mastócitos e macrófagos. Externo a esta região, há a zona basal, que compreende tecido conjuntivo frouxo com menor celularidade e artérias retas (SAMUELSON, 2007).

Nos cornos uterinos existem pregas arredondadas bem vascularizadas chamadas de carúnculas. Estas estruturas fazem a fixação placentária e são desprovidas de glândulas endometriais (SAMUELSON, 2007).

2.1.5.2 Imunidade uterina

As infecções uterinas afetam negativamente a eficiência reprodutiva do rebanho e estão entre as principais causas de infertilidade e descarte involuntário (LEFEBVRE & STOCK, 2012). Esta afecção em fêmeas bovinas desencadeia inúmeros processos relacionados a imunidade endometrial e dependes de hormônios esteróides, somatotrofinas e possivelmente proteínas reguladoras locais, como as galectinas (SHELDON et al., 2009).

As células endometriais possuem receptores Toll-like que reconhecem elementos patogênicos, como DNA bacteriano, lipídios e lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram negativas, e a partir disto secreta citocinas, peptídeos antimicrobianos e quimiocinas. Estas últimas atraem neutrófilos e macrófagos para eliminar as bactérias, embora a persistência de neutrófilos esteja associada a endometrite subclínica e infertilidade (SHELDON et al., 2009).

A doença uterina também afeta a função ovariana, pois causa um crescimento mais lento dos folículos dominantes no ovário, menores concentrações de estradiol no plasma periférico e a presença de LPS neste órgão leva a redução da liberação de GnRH do hipotálamo e LH da hipófise diminuindo ainda mais a capacidade de ovular um folículo dominante (SHELDON et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sorologia

Em visita a um frigorífico comercial localizado no município de Uberlândia, MG, coletou-se sangue de 12 vacas adultas abatidas aparentemente saudáveis. Esse material foi identificado e permaneceu em repouso para que a coagulação acontecesse e o soro fosse obtido. Os tubos foram refrigerados e levados ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – FAMEV/UFU, onde passaram por processamento e foi realizado o teste de Soroaglutinação Microscópica de Campo Escuro (MAT) para os seguintes sorovares de *Leptospira spp.*: Australis, Autumnalis, Batavie, Brasiliensis, Bratislava, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Djasiman, Grippytyphosa, Guaricura, Hardjobovis, Hardjoprajitino, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Sjroe, Shermani, Tarassovi, Wolffi, M1009, Estirpe roedor e M36/11.

Destes mesmos animais apreendeu-se os úteros para posteriormente serem processados e cultivados.

3.2 Preparo tecidual e cultivo dos explantes com *Leptospira spp.*

Foram coletados úteros macroscopicamente saudáveis de 12 fêmeas bovinas em idade reprodutiva. Destes, cinco estavam gravídicos no terço inicial da gestação e sete não gravídicos. O material foi devidamente identificado e embalado em sacos plásticos individuais, refrigerado e acondicionado em caixa isotérmica para ser levado ao Laboratório de Saúde em Grandes Animais (LASGRAN) da Universidade Federal de Uberlândia - FAMEV/UFU, onde seria processado em um período máximo de duas horas após a coleta.

No laboratório, os úteros foram lavados externamente com álcool 70%, abertos por uma tesoura estéril que incidiu longitudinalmente no corno uterino e lavados internamente.

Para este experimento, utilizou-se a proposta de cultura de órgãos *ex vivo* de endométrio bovino, conforme técnica descrita por Borges, Healey e Sheldon (2012).

A coleta dos explantes endometriais foi realizada com auxílio de um *punch* estéril de biópsia (KRUUSE®) de 8mm de diâmetro e os fragmentos foram retirados da

região intercaruncular, sendo um fragmento por útero, ou seja, 12 amostras ao todo. Este material foi então encaminhado para o cultivo tecidual.

Dez fragmentos foram incubados com *Leptospira interrogans*, sorovar Hardjobovis e dois não, compondo o grupo controle. Este processo ocorreu em placas com meio próprio para cultivo celular RPMI 1640 (GIBCO®) e em cada tecido inoculou-se um mililitro do meio líquido Ellinghausen McCullough-Johnson-Harris (EMJH) contendo 2×10^8 leptospiplas/ml. Para manutenção celular das amostras, as placas foram incubadas por 24 horas em estufa de 5% CO₂ a 37°C (HERATH, 2006).

Após esse período, o sobrenadante foi retirado e os explantes encaminhados para o processamento da técnica histopatológica.

3.3 Protocolo de Histopatologia

Os explantes foram armazenados em solução de formol tamponado 10 % por 24 horas e posteriormente em álcool 70 % até o processamento da técnica de histologia.

No laboratório de Histopatologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), preparou-se as amostras para leitura em microscopia óptica a partir do protocolo desenvolvido pelo próprio laboratório, baseado nas técnicas descritas por Junqueira e Carneiro (2004).

Para a desidratação dos tecidos, estes passaram pela sequência de soluções a seguir: meia hora em álcool 85%; meia hora em álcool 95%; uma hora em álcool absoluto 1; uma hora em álcool absoluto 2; uma hora em álcool absoluto 3, finalizando esta etapa com a secagem do material. Em seguida a diafanização foi feita com três imersões em xilol 1, xilol 2 e xilol 3, respectivamente, sendo cada uma de 15 minutos.

Desta forma, as amostras estavam prontas para serem emblocados em parafina, e este processo também ocorreu em três etapas de 15 minutos cada e, posteriormente, foram levadas por 45 minutos à estufa a 56°C. Logo prosseguiu-se com a fabricação dos blocos. Com a ajuda de um micrótomo, secções de 2µm foram retiradas e colocadas em superfície de água aquecida e depois sobre lâminas de vidro para que a coloração fosse feita com a técnica Hematoxilina e Eosina (HE):

Para desparafinar, primeiramente, as lâminas foram mergulhadas em Xilol 1 por 5 minutos e em xilol 2 pelo mesmo tempo. Prosseguiu-se com a hidratação a partir de álcool absoluto 1 e 2, ambos por 3 minutos, e álcool 95% 1 e 2 também por 3 minutos cada. Finalmente, lavou-se as lâminas em água corrente por 10 minutos.

Para corar as amostras, as lâminas ficaram emergidas por um minuto e meio em hematoxilina de Harris e um minuto e meio em eosina. Posteriormente a cada coloração realizou-se lavagem em água corrente por 10 minutos.

A desidratação ocorreu com a passagem rápida das lâminas pela sequência a seguir: álcool 95% 1, álcool 95% 2, álcool absoluto 1, álcool absoluto 2, xilol 1 e xilol 2.

Para finalizar, colocou-se a lamínula por cima do corte e após o processamento espera-se as lâminas secarem.

As lâminas com secções histológicas foram lidas e classificadas segundo o escore de lesão inflamatória descrito por Chapwanya et al. (2009) (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização histopatológica de escore de lesão em útero bovino com diferentes graus de alterações.

Escore de lesão	Descrição histopatológica do útero
0	Nenhuma evidência de inflamação, tecido uterino inerte, quiescente.
1	Inflamação de baixo grau, pouca infiltração de linfócitos e células plasmáticas, poucas áreas fibróticas, degeneração glandular cística, alterações vasculares.
2	Inflamação moderada que mostra leucócitos proeminentes, pequena fibrose periglandular ou vascular no sangue, menor degeneração glandular cística.
3	Inflamação grave, alta infiltração de células polimorfonucleares, atrofia da glândula uterina, degeneração cística e necrose, fibrose extensa de vasos sanguíneos, infiltração de neutrófilos e macrófagos no endométrio, sítios isolados de edema, congestionamento vascular, hemorragia, ruptura ou perda epitelial.

Fonte: CHAPWANYA et al. (2009)

3.4 Análise estatística

Para comparar os resultados obtidos no grupo 1 (úteros não gravídicos) com o grupo 2 (úteros gravídicos) foi realizada análise estatística a partir do teste não paramétrico de Wilcoxon com um intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Reação no teste de Soroaglutinação microscópica em campo escuro (MAT)

Após avaliação sorológica de cada animal que coletou-se o útero para o presente estudo, constatou-se que apenas um bovino estava reagente à infecção prévia por leptospirose com o título de 1:200 para *Leptospira santarosai*, sorogrupo Serjoe, sorovar Guaricura (Tabela 2).

4.2 Análise histopatológica dos explantes

A leitura das lâminas histopatológicas de explantes de útero bovino inoculados com *Leptospira interrogans* e submetidos ao método de coloração por hematoxilina e eosina (HE) demonstrou que 50% (5/10) do total de tecido uterino avaliado não apresentou nenhuma evidencia de inflamação, e a outra metade (5/10) evidenciou algum grau de inflamação (Tabela 2).

Tabela 2 - Escore de lesão inflamatória para cada amostra de tecido uterino de vaca adulta avaliada no presente estudo.

Grupo	Amostra	Sorologia para Leptospirose	Escore da lesão
Controle	CN*	Negativo	-
	CG*	Negativo	-
1: Útero não gravídico	1	Negativo	0
	2	Negativo	0
	3	Negativo	0
	4	Negativo	1
	5	Negativo	1
	6	Negativo	2
2: Útero gravídico	1	Positivo	0
	2	Negativo	1
	3	Negativo	1
	4	Negativo	0

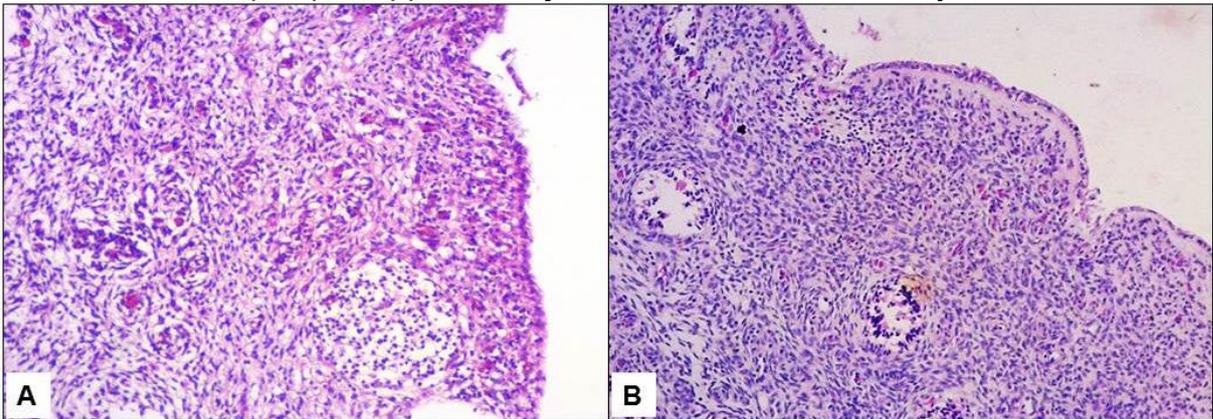
Fonte: A Autora.

*Fragmento de útero não gravídico

**Fragmento de útero gravídico

Dos elementos do grupo controle, a lâmina de útero não gravídico (CNG) exibiu algumas células inflamatórias residentes, principalmente linfócitos, e não apresentava alterações vasculares e teciduais. Já o controle do grupo gravídico (CG) continha maior número de glândulas endometriais e baixo número de células inflamatórias que concentravam-se abaixo do epitélio de revestimento uterino (Figura 1).

Figura 1- Fotomicrografia de útero de fêmea bovina adulta. Grupo controle não inoculado com *Leptospira spp.* Coloração hematoxilina eosina, objetiva 10X.

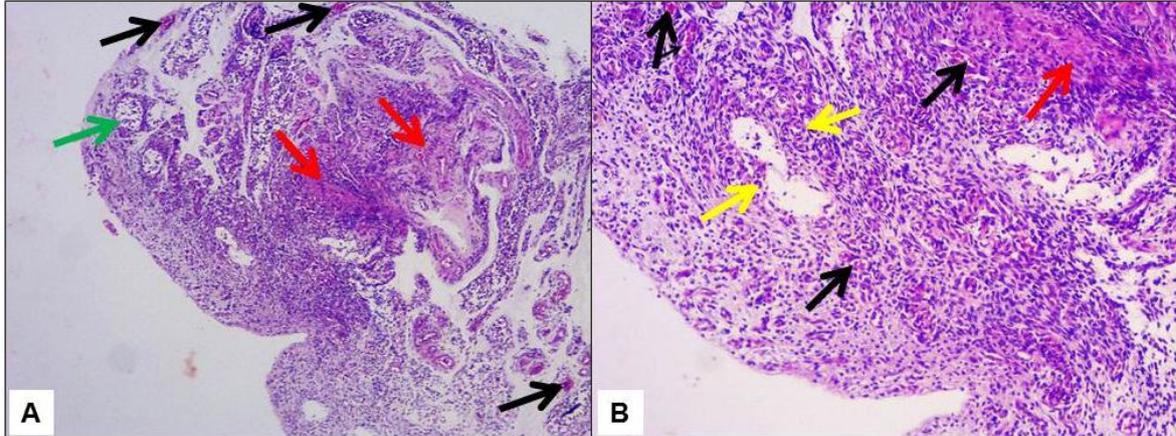


Fonte: A autora.

(A) útero não gravídico (CNG); (B) útero gravídico (CG).

Das amostras de útero não gravídico, 50% (3/6) não apresentaram alterações inflamatórias, 33,3% (2/6) obtiveram escore de lesão 1 e 16,6% (1/6) atingiu o escore de lesão 2 (Figura 2). Nota-se que o infiltrado inflamatório está ao redor das glândulas endometriais.

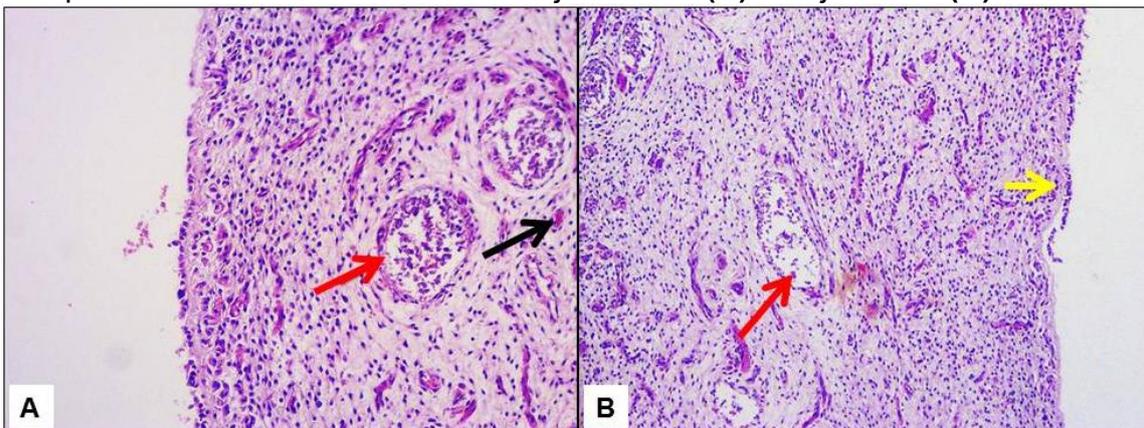
Figura 2 - Fotomicrografia de útero não gravídico de fêmea bovina adulta inoculado com *Leptospira spp.* Fragmento com escore de lesão 2, apresentando áreas de fibrose (seta vermelha), vasos dilatados repletos de hemácias (seta preta), degeneração glandular cística (seta verde) e infiltrado inflamatório (leucócitos) (seta amarela). Coloração de hematoxilina eosina, objetiva 4X (A) e objetiva 10x (B).



Fonte: A autora.

Já na avaliação dos fragmentos de útero gravídico, 50% (2/4) das amostras não apresentou elementos que caracterizassem processo inflamatório, e o restante (2/4) foi classificado com o escore de lesão 1 (Figura 3). Neste caso, as amostras apresentaram pouca quantidade de células inflamatórias que se concentram logo abaixo do epitélio de revestimento.

Figura 3 - Fotomicrografia de útero gravídico de fêmea bovina adulta indicando lesão de escore 1. A seta vermelha indica degeneração glandular cística, a seta preta aponta alterações vasculares e a seta amarela indica célula inflamatória abaixo do epitélio de revestimento uterino. Objetiva 10X (A) e objetiva 4x (B).



Fonte: A autora.

(A) Amostra 2; (B) Amostra 3.

Comparando as respostas inflamatórias dos grupos 1 e 2 pelo teste de Wilcoxon é possível afirmar que não foram encontradas diferenças significativas entre os escores de lesão inflamatória do grupo gravídico para o não gravídico desta pesquisa (p-valor=0,906185616).

5 DISCUSSÃO

O fato de 50% (5/10) das amostras analisadas no presente estudo não apresentarem sinal de inflamação na presença da bactéria inoculada e 50% expressarem algum grau de alteração concorda com o resultado obtido por Oliveira et al. (2016), o qual observou discreto infiltrado inflamatório em 48,8% (20/41) dos tecidos vaginais de vacas com leptospirose analisados, e em 51,2% (21/41) não encontrou alterações dignas de nota.

Dos cortes histológicos de útero não gravídico, 50% (3/6) não apresentaram alterações inflamatórias e apenas uma amostra (16,6%) atingiu o escore de inflamação 2, que foi a reação inflamatória mais evidente analisada no presente estudo. Já em relação aos úteros gravídicos, 50% (2/4) das amostras não demonstraram sinais de inflamação e apenas dois fragmentos uterinos (50%) atingiram escore de inflamação 1. Deve-se considerar que estas alterações no ambiente uterino, mesmo que brandas, possam ter relevância para a reprodução, já que elas podem interferir na implantação e manutenção da gestação por envolver alterações glandulares e vasculares.

Nenhum tecido analisado apresentou o escore de inflamação 3, que seria um estado grave e avançado do processo inflamatório.

Através da comparação obtida pelo método estatístico de Wilcoxon é possível afirmar que não houve diferença significativa entre os grupos infectados por *Leptospira* spp. Pode-se notar que tanto o grupo gravídico quanto o grupo não gravídico não apresentou reação inflamatória significativa.

A infecção uterina por leptospira causa ao útero infiltração de células inflamatórias no endométrio e lesões que incluem necrose, hiperemia, aumento do número de neutrófilos, linfócitos e macrófagos, dilatação cística das glândulas endometriais ou atrofia associada ao comprometimento do desempenho reprodutivo (CORDEIRO et al., 1989), mas talvez, por se tratar de um estudo realizado *in vitro*, a resposta inflamatória não tenha sido tão expressiva como provavelmente ocorreria *in vivo*.

A presença deste agente no útero de vaca é pouco estudada (LIBONATI, 2018), e por se tratar de um estudo inédito, há de se considerar também a possibilidade do tempo de exposição do explante à bactéria e a concentração de leptospiros inoculada não terem sido suficientes para suscitar grandes alterações ao

ambiente uterino, diferente do que ocorreu no trabalho desenvolvido por Herath et al. (2006) com a bactéria *Escherichia coli*.

Por último, relembra-se que o critério de seleção para participar deste experimento era o útero estar macroscopicamente ileso, porém atenta-se ao fato dos fragmentos não terem sido analisados microscopicamente antes da inoculação da *Leptospira spp.*, e por isso aventa-se a hipótese de que as amostras uterinas utilizadas nesta pesquisa já poderiam ter alguma infecção prévia ao estudo.

6 CONCLUSÃO

Com a investigação microscópica dos explantes uterinos cultivados foi possível verificar lesões inflamatórias de grau leve a moderado avaliados conforme padrão pré-estabelecido. Porém, como a infecção experimental realizada por cultivo in vitro de fragmentos uterinos ainda é algo novo, será necessário um investimento maior para esta técnica se tornar uma ferramenta na elucidação da patogenia do comprometimento reprodutivo causado pela presença de *Leptospira spp.* no útero de fêmea bovina, por se tratar de uma reação complexa frente a este agente.

REFERÊNCIAS

ABUCHAIM, D. M.; DUTRA, N. L. F. Prevalência da leptospirose em bovinos da bacia leiteira de Porto Alegre/RS. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v.13, p.55-60, Dez. 1985.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, Jan. 2010.

AHMED, A.; GROBUSCH, M. P.; KLATSER, P.; HARTSKEERL, R. A. Molecular approaches in the detection and characterization of Leptospira. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, 2012, a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/2155-9597.1000133>>. Acesso em: maio de 2018.

AHMED, A.; KLAASEN, H. L. B. M.; VAN DER VEEN, M.; VAN DER LINDEN, H.; GORIS, M. G. A.; HARTSKEERL, R. A. Evaluation of real-time PCR and culturing for the detection of leptospires in canine samples. **Advances in Microbiology**, p. 162–170, 2012, b.

ANZAI, E. K. **Utilização da PCR para o Diagnóstico da Leptospirose em Cães naturalmente infectados por Leptospira spp.** Londrina: UEL, 2006. 48 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ARASHIRO, E. K. N. et al. Repetition of estrus is the most frequent reproductive problem after breeding in dairy cattle from Rio de Janeiro, Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 7, 2017.

ARENT, Z. et al. Isolation of leptospires from genital tract of sheep. **Veterinary Record**, v. 173, n. 23, p. 582-582, 2013.

AZIZI, S.; KHEIRANDISH, R.; RAHIMI, E. Comparison of polymerase chain reaction and Warthin-Starry techniques to detect Leptospira spp. in kidneys of slaughtered cattle. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 81, n. 1, p. 1-6, Jan. 2014.

BACHA JR., W. J.; BACHA, L. M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 2003. 457 p.

BANCHIERO JÚNIOR, A. M. D. et al. Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em rebanhos bovinos leiteiros no Município de Guaíra, SP. **PUBVET**. 263 ed. Londrina, v. 8, n. 14, Jul. 2014.

BARANTON, G.; OLD, I. G. The Spirochaetes: a different way of life. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, Paris, v. 93, n. 2, p. 63-95, Out. 1995.

- BARUSELLI, P. S. et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, n. s4, p. 134-141, 2012.
- BATISTA, C. S. A. et al. Soroprevalência de leptospirose em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, n.2, p. 131-136, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v41n2/25230.pdf>>. Acesso em: 15 jun 2017.
- BORGES, Á. M.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Explants of Intact Endometrium to Model Bovine Innate Immunity and Inflammation *Ex vivo*. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 6, p. 526–539, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de leptospirose**. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1995. 98 p.
- BROWN, K.; PRESCOTT, J. Leptospirosis in the family dogs: a public health perspective. **Canadian Medical Association Journal**, Canadá, v. 178, n.4, p. 399-401, 2008. Disponível em:
< <http://www.cmaj.ca/cgi/content/full/178/4/399> >. Acesso em: 15 jun 2017.
- CASARIN, J. et al. Bacteriological, cytological and histopathological evaluation of the reproductive tract of slaughtered cows. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 1, p. 53-58, 2018.
- CASTRO, J. R. et al. Leptospirose canina - Revisão de literatura. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 31, 136 ed., 2010.
- 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.
- COELHO, E. L. M. et al. Prevalência de leptospirose em fêmeas bovinas abatidas em frigoríficos no município de São Luís, MA. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 2, p. 111-115, 2014.
- CORDEIRO, J. L. F.; BARROS, S. S.; NEVES, J. P. Avaliação histopatológica do endométrio de vacas leiteiras com catarro genital. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 13, n. 1, p. 7-14, 1989.
- DA SILVA MARQUES, R. et al. Caracterização morfológica da região intercaruncular uterina de vacas e búfalas gestantes. **Biotemas**, v. 20, n. 3, p. 103-114, 2007.
- DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; DOBSON, H. Presence of antigen and antibodies in serum and genital discharges of heifers after experimental intrauterine inoculation with *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. **Research in Veterinary Science**, v. 60, n. 2, p. 157-162, 1996.
- ELLIS, W. A. et al. Bovine leptospirosis: some clinical features of serovar hardjo infection. **The Veterinary Record**, v. 117, n. 5, p. 101-104, 1985.

- ELLIS, W. A. et al. Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the genital and urinary tracts of non-pregnant cattle. **The Veterinary Record**, v. 118, n. 1, p. 11-13, 1986.
- ELLIS, W. A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 10, n. 3, p. 463-478, 1994.
- FAINE, S. et al. *Leptospira* and leptospirosis. **Melbourne: MediSci**, 1999, v. 2.
- FAVERO, M. et al. Leptospirose bovina-variantes sorológicas predominantes em colheitas efetuadas no período de 1984 a 1997 em rebanhos de 21 estados do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 68, n. 2, p. 29-35, 2001.
- GROOMS, D. L.; BOLIN, C. A. Diagnosis of fetal loss caused by bovine viral diarrhoea virus and *Leptospira* spp. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 21, n. 2, p. 463-472, 2005.
- GROOMS, D. L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 624-628, 2006.
- HASHIMOTO, V. Y. et al. Prevalência e fatores de risco associados à *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos da região centro-sul do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 99-105, 2012.
- HERATH, S. et al. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. **Endocrinology**, v. 147, n. 1, p. 562-570, 2006.
- JESUS, N. H. **Meios Diagnósticos da Leptospirose Canina**. Mossoró, UFERSA, 2009. 21 f. Monografia - Curso de Especialização em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2009.
- JUNQUEIRA, J. R. C; ALFIERI, A. A. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 2, 2006.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488 p.
- LEFEBVRE, R.C; STOCK, A. E. Therapeutic efficiency of antibiotics and prostaglandin F_{2α} in postpartum dairy cows with clinical endometritis: an evidence-based evaluation. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 1, p. 79-96, 2012.
- LEONARD, F. C. et al. Duration of urinary excretion of leptospires by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **The Veterinary Record**, v. 131, n. 19, p. 435-439, 1992.

LEVETT, P.N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n.2, p. 296–326, 2001.

LIBONATI, H. A. et al. Leptospirosis is strongly associated to estrus repetition on cattle. **Tropical animal health and production**, p. 1-5, 2018.

LOUREIRO, A. P. et al. Detecção de *Leptospira* sp. em muco cervico-vaginal de vacas sugere importância do portador vaginal na epidemiologia da leptospirose bovina. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 2, p. 93-93, 2016.

MADRUGA, C.R.; AYCARDIE; PUTT, N. Freqüência de aglutininas anti-leptospira em bovinos de corte da região sul de cerrado do Estado de Mato Grosso. **Arquivo da escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v.32, p.245-249, 1980.

MINEIRO, A. L. B. B. et al. Pesquisa de sorovares de leptospiros em rebanho bovino leiteiro no estado do Piauí, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 129-132, 2010.

MOREIRA, E. C. et al. Leptospirose bovina. I. Aglutininas anti-leptospiros em soros sanguíneos de bovinos de Minas Gerais. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v.31, p.375-388, 1979.

OLIVEIRA, F. S. et al. Avaliação histológica e imuno-histoquímica da colonização vaginal por *Leptospira* em vacas com fluido vaginal positivo à PCR. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. 1, p. 163-167, 2016.

ORLANDO, D. R. et al. Caracterização morfológica e imuno-histoquímica de lesões em casos de aborto bovino bacteriano e viral no sul de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 974-980, 2014.

PATEL, J. M. et al. Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Spontaneous Leptospirosis in Bovines. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 6, n. 12, p. 1723-1728, 2017.

PICARDEAU, M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.

PIRES, B. C. et al. Occurrence of uterine carriers for *Leptospira interrogans* on slaughtered cows. **Microbial pathogenesis**, v. 114, p. 163-165, 2018.

QUINN, P. J. et al. Espiroquetas. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.179-188.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3. ed. Santa Maria: Palloti, v.1, 2007.

SAMUELSON, A. D. **Tratado de histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 527 p.

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.

TEDESCO, L. A. Leptospirose: uma doença que se expande e assusta. **Revista Balde Branco**, n. 9, p. 44-48, 1997.

VINH, T; ADLER, B. E. N.; FAINE, S. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. **Microbiology**, v. 132, n. 1, p. 103-109, 1986.

YERSIN, C.P. et al. Field evaluation of a one-step dipstick assay for the diagnosis of human leptospirosis in the Seychelles. **Tropical Medicine & International Health**, v.4, n.1, Jan, p.38-45. 1999.

WANG, W. et al. *Leptospira interrogans* induces uterine inflammatory responses and abnormal expression of extracellular matrix proteins in dogs. **Microbial pathogenesis**, v. 75, p. 1-6, 2014.