

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**MARIANA DE OLIVEIRA ALMEIDA**

**EFEITO DO ÔMEGA-3 NA RESPOSTA IMUNE INATA EM CULTURAS DE  
ENDOMÉTRIO *EX VIVO* DE BOVINOS**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2019**

**MARIANA DE OLIVEIRA ALMEIDA**

**EFEITO DO ÔMEGA-3 NA RESPOSTA IMUNE INATA EM CULTURAS DE  
ENDOMÉTRIO *EX VIVO* DE BOVINOS**

Trabalho apresentado a banca examinadora como requisito à aprovação na disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II da graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.  
Orientador: Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut  
Coorientador: Luisa Cunha Carneiro

**UBERLÂNDIA – MG**

**2019**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÔMEGA-3 NA RESPOSTA IMUNE INATA  
EM CULTURAS DE ENDOMÉTRIO *EX VIVO* DE BOVINOS**

Trabalho apresentado à banca examinadora como  
requisito à aprovação na disciplina Trabalho de  
Conclusão de Curso II da graduação em Medicina  
Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut  
Universidade Federal de Uberlândia

Luisa Cunha Carneiro  
Pós- doutoranda na Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia - Universidade de São Paulo (FMVZ/USP)  
Departamento de Reprodução Animal

Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos  
Universidade Federal de Uberlândia

Layane Queiroz Magalhães  
Doutoranda pelo programa de Pós-graduação  
Ciências Veterinárias PPGCV/- UFU

Dedico esse trabalho aos meus pais e minha irmã que ao longo de minha jornada me deram forças, amor e todo amparo emocional e material para realizar este sonho de me tornar Médica Veterinária, sonho este que está cada dia mais próximo de se concretizar.

## AGRADECIMENTOS

Durante esses quase quatro anos e meio de faculdade vivi momentos que me despertaram as mais variadas formas de emoções e sentimentos. Confesso que não foi fácil chegar até aqui! Quantas vezes me deparei com incertezas e dificuldades que por hora quase me fizeram desistir e voltar para casa, mas hoje me sinto orgulhosa de mim mesma por chegar até aqui e por vencer cada etapa ao longo desses anos. Nessas últimas semanas me peguei pensando no que iria fazer da vida, ou o que seria de mim agora, essa neblina que aparece quando penso no futuro me assusta muito, só espero que o que Deus está preparando para mim seja algo tão surpreendente e emocionante quanto foi estar aqui e que me faça feliz do mesmo modo.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pois sem ele eu não teria chegado aonde cheguei. Ele me deu forças e guiou meu caminho ao longo da minha vida, e sou eternamente grata aos obstáculos, aos presentes e as pessoas que ele colocou em meu caminho. A ele dedico minha imensa gratidão.

Agradeço aos meus pais Rodrigo e Márcia por terem sido minha base, por terem me incentivado a seguir um sonho de criança, ser Médica Veterinária, a eles dedico o dia de hoje, pois foi graças a o apoio emocional e financeiro deles que consegui chegar até aqui, sei que não foi fácil, mas vocês têm todo o mérito dessa conquista por não terem desistido de mim, sem vocês eu não conseguiria, e meus sinceros obrigada por não permitirem. Eu amo vocês e amo tudo que fazem por mim.

Agradeço a minha irmã, Gabriela, que de todas as pessoas do mundo é a pessoa que mais me emociona falar sobre. Ela é minha melhor amiga, sempre esteve comigo havendo ou não distância, sempre respondeu minhas mensagens de desespero e todas as demais, nunca me negou atenção e carinho. E é com um orgulho imenso e os olhos cheios de água que venho te agradecer por tudo que sempre fez por mim, sou grata a Deus por ter te colocado em minha encarnação, você é minha vida e é a pessoa que sempre acreditou em mim com todo seu coração. Eu te amo e tenho você como a maior felicidade da minha existência.

Agradeço também meus cãezinhos, Príncipe, Lessie e Snoopy, eles que deram sentido a minha escolha e foram meus companheiros ao longo dessa jornada. Agradeço ainda toda minha família por ser quem são e por acreditarem em mim e se orgulharem.

Agradeço ao meu namorado, Davi Nunes, por ser meu amigo, meu companheiro e por ter sido tão paciente nessa etapa da escrita deste trabalho, sei que não foi fácil aturar minhas

mudanças inconstantes de humor, além disso, quero lhe agradecer por ter me ajudado inclusive na escrita deste. Você é uma pessoa incrível e sinto muito orgulho de te ter ao meu lado, amo você.

Agradeço minhas amigas que estiveram ao longo de quase quatro anos e meio me aturando e me dando forças para as batalhas diárias, em especial a Nathália dos Anjos, Kamylla Oliveira e Rafaella Bittencourt. Agradeço também as novas amigas que foram importantes na mesma proporção, em especial a Ana Júlia Rodrigues.

Agradeço a minha grande amiga e inspiração como Médica Veterinária, Ana Carolina Amorin, aquela que pude acompanhar em variados procedimentos e que ao longo do tempo construímos uma amizade sincera e pela qual sou muito grata.

Agradeço a família LASGRAN por terem me dado amparo científico, vocês me mostraram o lado emocionante de ser pesquisador e me fizeram aprender a lidar com as dificuldades que esse cargo carrega. Agradeço em especial ao meu orientador Prof. Dr. João Paulo Elsen Saut, primeiramente por ter aceitado me orientar, por ter sido tão paciente comigo e por ter me ensinado e me capacitado, sou muito grata por tudo. Agradeço também minha coorientadora, Luisa Cunha Carneiro, que me amparou nessa reta final e me ajudou a concluir este trabalho.

Agradeço também minha grande amiga e que está hoje presente em minha banca, Layane Queiroz Magalhaes, ela que foi uma mãe científica pra mim, que me acolheu no laboratório de braços abertos e me ensinou, além das tarefas científicas, a ser uma pessoa mais paciente e equilibrada, você é uma inspiração, muito obrigada por fazer parte da minha vida.

Agradeço minha irmã científica, Sara Pedrosa, só tenho a agradecer-lá pela imensa paciência, pelos diversos socorros tanto científicos quanto da vida, por termos compartilhado os momentos juntas e por todo o carinho que teve comigo ao longo desses anos, você vai sempre ser meu anjo da UFU, amo você.

Agradeço ao Prof. Dr. Geison Morel Nogueira por ser esse grande professor, que esteve sempre disposto a passar conhecimentos e me ouvir e me aguentar, o senhor é uma pessoa excepcional e um grande exemplo profissional para mim. Agradeço também a Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos por aceitar o convite para a banca examinadora deste trabalho de conclusão de curso e pelos grandes ensinamentos que me concedeu ao longo de suas disciplinas que foram de grande valia. Agradeço ao Prof. Dr. Diego Delfinol pela ajuda na coordenação deste projeto, me aceitando, de transferência, como sua orientada de Iniciação Científica.

Agradeço, por fim, à Universidade Federal de Uberlândia pelas oportunidades de aprendizado proporcionadas ao longo desses anos de graduação no curso de Medicina

Veterinária, principalmente pela oportunidade de participar do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), o qual foi de grande importância por me despertar o interesse em querer sempre saber mais e pesquisar para isso. Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica concedida a qual me ajudou muito nesse período de faculdade.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

## RESUMO

A especulação a respeito dos efeitos positivos da suplementação de bovinos com ácidos graxos poliinsaturados, como o ômega-3, vem sendo frequentemente descrito na literatura, buscando entender, além dos seus benefícios nutricionais, os efeitos pró e antiinflamatórios. Seus efeitos na reprodução de fêmeas bovinas ainda merecem maior atenção, sendo interessante a avaliação do comportamento destes ácidos em estudos *ex vivo*, onde há a possibilidade de maior controle sobre seus efeitos na inflamação e resposta imune inata. A hipótese deste estudo foi de que a adição prévia destes ácidos interfere no processo inflamatório em culturas de endométrio *ex vivo* quando desafiadas com lipopolissacarídeo (LPS). Para tanto, objetivou-se neste estudo avaliar o efeito do tratamento dos ácidos eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA) e  $\alpha$ -linolênico (LNA) em culturas de endométrio bovino *ex vivo* desafiadas com LPS, nas concentrações das interleucinas 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) e 6 (IL6). Foram coletados cinco tratamentos reprodutivos de bovinos, em abatedouro comercial, de fêmeas bovinas primíparas, não gestantes e sem evidências de doenças genitais. No laboratório, os fragmentos de endométrio foram processados e submetidos ao tratamento com os ácidos EPA, DHA e LNA por 24 horas e, após desafiadas com 1  $\mu$ g/mL LPS de *Escherichia coli*. Após 24 horas, as placas foram retiradas da estufa de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, e foram colhidos os sobrenadantes para avaliação da concentração das interleucinas IL1 $\beta$  e IL6 por meio da técnica de ELISA. Para realizar a análise estatística e confecção dos gráficos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados obtidos a partir desse experimento mostraram uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias IL1 $\beta$  e IL6 na presença dos ácidos, porém com mais eficiência do DHA e EPA do que no LNA. Concluiu-se com base nos dados dessa pesquisa que o uso dos ácidos graxos ômega 3 em explantes endometriais *ex vivo*, de vacas, foi capaz de induzir, na presença de LPS de bactérias gram negativas, uma resposta anti inflamatória satisfatória.

**Palavras-chave:** ácido docosahexaenóico, ácido eicosapentaenóico, ácidos graxos, ácido linolênico, ELISA, interleucinas.

## ABSTRACT

Speculation about the positive effects of supplementation of cattle with polyunsaturated fatty acids, such as omega-3, has been frequently described in the literature, seeking to understand, in addition to its nutritional benefits, pro and anti-inflammatory effects. Their effects on the reproduction of bovine females still deserve more attention, being interesting to evaluate the behavior of these acids in *ex vivo* studies, where there is the possibility of greater control over their effects on inflammation and innate immune response. The hypothesis of this study was that the previous addition of these acids interferes with the inflammatory process in *ex vivo* endometrial cultures when challenged with lipopolysaccharide (LPS). The objective of this study was to evaluate the effect of treatment of eicosapentaenoic acids (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and  $\alpha$ -linolenic acid (LNA) in LPS-challenged *ex vivo* bovine endometrium cultures on the concentrations of interleukins 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) and 6 (IL6). It was collected 5 reproductive tracts of cattle, in a commercial slaughterhouse, of primiparous non-pregnant bovine females without evidence of genital diseases. In the laboratory, endometrial fragments were processed and treated with EPA, DHA and LNA acids for 24 hours and, after challenge with 1  $\mu$ g / mL *Escherichia coli* LPS. After 24 hours, the plates were removed from the 5% CO<sub>2</sub> greenhouse at 37 ° C, and supernatants were collected for IL1 $\beta$  and IL6 interleukin concentration by ELISA. Statistical analysis and graphing were performed using the GraphPad Prism 6 statistical software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The results obtained from this experiment showed a decrease in the proinflammatory cytokines IL1 $\beta$  and IL6 in the presence of acids, but with more efficiency of DHA and EPA than in LNA. It was concluded from the data of this research that the use of omega 3 fatty acids in *ex vivo* endometrial explants of cows was able to induce, in the presence of gram negative bacteria LPS, a satisfactory antiinflammatory response.

**Keywords:** docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, fatty acids, linolenic acid, ELISA, interleukins.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Apresentação esquemática das etapas do experimento e dos grupos experimentais -----	28
<b>Figura 2</b> - Exemplo da distribuição dos poços em cada placa, com um dos ácidos, EPA, seguindo os horários de 0-24 Hrs e 0-48 Hrs -----	31
<b>Figura 3</b> - Realização da pesagem dos expantes e do Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para dosagem das concentrações de IL6 -----	32
<b>Figura 4</b> - Resposta das interleucinas IL1 $\beta$ e IL6 de endométrio bovino <i>ex vivo</i> com diferentes concentrações de EPA frente à exposição ao lipopolissacarídeo-----	33
<b>Figura 5</b> - Resposta das interleucinas IL1 $\beta$ e IL6 de endométrio bovino <i>ex vivo</i> com diferentes concentrações de DHA frente à exposição ao lipopolissacarídeo -----	34
<b>Figura 6</b> - Resposta das interleucinas IL1 $\beta$ e IL6 de endométrio bovino <i>ex vivo</i> com diferentes concentrações de LNA frente à exposição ao lipopolissacarídeo -----	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células Apresentadoras de Antígeno
BEM	Balanco Energético Negativo
COEX	Órgão Ex Vivo
DHA	Ácido Docosaheptaenóico
EPA	Eicosapentaenoico
E2	Estrógeno
IFN	Intérferons
IG	Imunoglobulinas
IGF1	Fator de Ativação Plaquetária
IL	Interleucina
LNA	$\alpha$ -Linolênico
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
MAMP's	Padrões Moleculares Microbianos
NK	<i>Natural Killers</i>
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PB	Proteína Bruta
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
FP	Receptores de Prostaglandina F2 $\alpha$
RNA	Ácido Ribonucleico
RRP	Receptor de Reconhecimento Padrão
TLR	Receptor tipo <i>toll-like</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
NRL's	<i>NOD-like receptors</i>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS .....	16
2.2 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1 Aspectos Gerais de Imunologia.....	17
3.2 Inflamação.....	18
3.2.1 Cascata da Inflamação.....	20
3.3 Imunidade e Morfologia do Útero .....	21
3.4 Importantes Infecções Uterinas Relacionadas à Inflamação .....	23
3.5 Ácidos Graxos Poliinsaturados Essenciais (PUFA's) .....	26
4. METODOLOGIA.....	28
4.1 Animais e coleta de amostras .....	28
4.2 Delineamento Experimental .....	28
4.3 Coleta de Amostras .....	29
4.4 Processamento das Amostras .....	29
4.5 Realização do ELISA.....	31
4.6 Análises Estatísticas.....	32
5. RESULTADOS .....	33
6. DISCUSSÃO .....	35
7. CONCLUSÃO .....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39



## 1. INTRODUÇÃO

A vaca leiteira, ao longo de sua vida, é submetida a ciclos repetidos de estresse físico e metabólico que estão intimamente relacionados ao período gestacional, parição e a lactação. Juntamente a esses eventos ocorrem mudanças na liberação de hormônios e imunomodulações, caracterizadas por depressões na resposta imune o que está associado muitas vezes ao aparecimento de doenças (MALLARD et al., 1997).

No periparto o gado leiteiro encontra-se mais suscetível a diversas doenças metabólicas e infecciosas o que está relacionado a alterações fisiológicas e a perda no potencial antioxidante total, levando a um estresse oxidativo, além de uma diminuição da capacidade funcional dos leucócitos, dessa forma resultando em níveis inadequados de vitaminas e oligoelementos necessários para otimizar defesas antioxidantes. O que se observa ainda é que essa tensão metabólica tem aumentado com as práticas de gestão do gado, onde são selecionados geneticamente os animais que produzem em maior escala (SORDILLO; AITKEN, 2009). Nas últimas três semanas de gestação, o feto tem sua máxima exigência de nutrientes e, paralelo a isso, a vaca pode ter uma redução de 10% a 30% na ingestão de matéria seca, quando comparado ao início do período seco. Esse comportamento no final da gestação pode ser observado por diversas outras espécies (FILHO et al., 2010).

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) são adquiridos na dieta e fundamentais para o desenvolvimento, saudável, desde etapas na fase embrionária até a vida adulta, estando envolvidos, portanto, em processos biológicos, onde sua deficiência está relacionada a doenças especialmente de origem metabólica (COLSON; GHANDOUR; REKIMA, 2019). Esses PUFAs, para saúde humana, têm propriedades benéficas como efeitos anticarcinogênicos, antioxidantes e atuam na redução da gordura no corpo, além da estimulação do sistema imunológico (MOLLICA, 2019)..

Dentre os principais PUFAs, destaca-se os ácidos graxos ômega 3 (n-3) e 6 (n-6) , que são precursores de mediadores lipídicos, como os eicosanoides, derivados do Omega-3 os quais são de grande importância para a regulação da inflamação. Esses eicosanoides derivados do PUFA n-3 possuem propriedades antiinflamatórias relacionadas à sua capacidade de inibir a formação de eicosanoides n-6 derivados de PUFA (WALL et al., 2010). O termo ômega-3 refere-se a uma família de PUFAs, onde a posição da sua dupla ligação encontra-se no carbono 3, contando o carbono metílico como um carbono (CALDER, 2012)

Pesquisas têm observado que os PUFAs podem interferir na resposta imune por meio da produção de citocinas e moléculas responsáveis pela regulação da resposta imune

(LESSARD; GAGNON; PETIT, 2003). Eles regulam diversas funções no organismo, dentre elas podemos citar pressão sanguínea, coagulação do sangue, correto desenvolvimento e funcionamento do cérebro e sistema nervoso, possuem também um importante papel na regulação da resposta inflamatória por meio da produção de mediadores inflamatórios, os eicosanoides (WALL et al., 2010).

A suplementação com PUFAs em ruminantes é essencial, e ainda, há disponível diversas fontes desses PUFAs, incluindo forrageiras, linhaça, óleo de peixe e farinha de peixe (GULLIVER et al., 2012). Estudos evidenciaram que a ingestão de óleo de peixe rico em ômega-3 altera a produção de citocinas e as propriedades funcionais dos macrófagos, linfócitos e outras células imunocompetentes, reduzindo dessa forma as reações inflamatórias e produção de interleucinas 1 e 6 (IL1 e IL6) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (LESSARD; GAGNON; PETIT, 2003).

A inflamação é um mecanismo normal de defesa do hospedeiro, o qual fornece proteção contra infecções ou outros problemas que vierem a agredir o organismo. A inflamação inicia o processo de morte de patógenos e está intimamente envolvida no processo de reparo dos tecidos auxiliando na reparação de sua homeostase (CALDER, 2012).

Em estudos epidemiológicos e experimentais realizados em seres humanos, foi evidenciado que a suplementação com cadeias longas de ômega-3 carregam consigo propriedades cardiovasculares e anti-inflamatórias benéficas e que o consumo do mesmo é insuficiente na maioria das dietas ocidentais (REGO et al., 2005). As propriedades anti-inflamatórias de ácidos graxos, principalmente ômega 3 (EPA) são devidas a competição com o ácido araquidônico como substrato para ciclooxigenases e 5-lipoxigenase (SIMOPOULOS; SIMOPOULOS, 2013).

## 2. OBJETIVOS

### 2.2 Objetivo Geral

Objetivou-se neste estudo avaliar o efeito dos derivados do Omega 3: ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA) e  $\alpha$ -Linolênico (LNA) em culturas de endométrio bovino *ex vivo* desafiadas com (LPS), nas concentrações das interleucinas 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) e 6 (IL-6).

### 2.2 Objetivos Específicos

A pesquisa suporta-se na hipótese de que a adição prévia destes ácidos graxos (EPA, DHA e LNA) interfere no processo inflamatório em culturas de endométrio *ex vivo* quando desafiadas com lipopolissacarídeo (LPS). Portanto, o entendimento destes efeitos na inflamação e resposta imune no endométrio de vacas poderá, futuramente, por meio da nutrição, servir de ferramentas na modulação da inflamação endometrial no pós-parto.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Aspectos Gerais de Imunologia

A resposta imune é de suma importância no reconhecimento e defesa contra agentes potencialmente patogênicos, de forma a impedir a ocorrência de infecções disseminadas que podem culminar em graves consequências, mantendo dessa forma o equilíbrio entre o organismo e a presença de patógenos. Existem dois tipos de sistema imune, um inato e outro Adaptativo (CARVALHO; ARAÚJO; CARVALHO, 2004; SOUSA, 2014).

O Sistema Imune Inato é aquele que nasce com o indivíduo, portanto é a primeira linha de defesa do organismo, prevenindo e controlando a invasão de patógenos. Essa é composta por células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e Linfócitos *natural killer* (NK). Esse sistema é responsável por reconhecer padrões moleculares associados a patógenos, os PAMP's, por meio dos receptores de reconhecimento de padrões (RRP), porém não consegue diferenciá-los entre si, possuindo, baixa especificidade (WIRA et al., 2005; SOUSA, 2014; MACHADO, ).

Quando há o reconhecimento dos PAMP's pelos RRP's pode haver diretamente a ativação de mecanismos efetores da imunidade inata, como fagocitose, indução de síntese de peptídeos antimicrobianos, e de óxido de nitrogênio sintase em macrófagos (JANEWAY, 1998). Em fêmeas bovinas os receptores de reconhecimento padrões identificados no endométrio são classificados em *Toll-like receptors* (TLR's) e *NOD-like receptors* (NLR's) (MARTINS; SANTOS; MUNIZ, 2014). Quando há o reconhecimento dos PAMP's pelos TLR's ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, TNF, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 resultando na resposta inflamatória propriamente dita (CHI et al., 2006).

Os PAMP' são moléculas conservadas como componentes da parede celular e de ácidos nucleicos presentes nos patógenos. Os TLR's são responsáveis pelo reconhecimento dos PAMP's , sendo o TLR4 o membro mais bem caracterizado do grupo. O TLR4 é amplamente expressado por células hematopoiéticas e não hematopoiéticas e é capaz de reconhecer o LPS de bactérias gram positivas por meio de dois co-receptores que são CD14 e MD2 (TURNER; HEALEY; SHELDON, 2012).

Os TLR's são responsáveis pelo reconhecimento dos PAMP's, sendo o TLR4 o membro mais bem caracterizado do grupo, este é amplamente expressado por células hematopoiéticas e não hematopoiéticas e é capaz de reconhecer o LPS por meio de dois co-receptores que são CD14 e MD2 (TURNER; HEALEY; SHELDON, 2012).

Já o Sistema Imune Adaptativo se desenvolve após a exposição a patógenos, onde após a exposição destes pelas células apresentadoras de antígenos (APC's), há um reconhecimento pelos receptores expressos na superfície de linfócitos T e B. Após haverá uma ativação dos linfócitos, onde se iniciará a produção de citocinas, síntese de anticorpos e citotoxicidade (WIRA et al., 2005; AOKI; NARUMIYA, 2012). Esse sistema elabora uma resposta mais específica para cada desafio antigênico que venha a enfrentar, gerando uma memória imunológica que será responsável pela proteção do hospedeiro na próxima vez em que ele entrar em contato com esse mesmo antígeno (MARTINS; SANTOS; MUNIZ, 2014).

Quando há o envolvimento de anticorpos, resposta humoral, nela há a produção de imunoglobulinas mediada pelos linfócitos B. Já quando a infecção é provocada por um patógeno intracelular, resposta do tipo celular, essa ocorre a partir dos linfócitos T. Os linfócitos T-helper são classificados com base nas citocinas produzidas, onde o Th1 produz as citocinas pró-inflamatórias (IL2, interferon gama, TNF, pex.) que ativam macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos. Já o Th2 produz citocinas anti-inflamatórias, por exemplo IL5 e IL4 (PERINI et al., 2010)

No organismo do animal, podem ser liberados dois tipos de citocinas, as pró-inflamatórias que são aquelas que promovem a inflamação e as anti-inflamatórias. Os agentes pró-inflamatórios são quimiocinas que facilitam a passagem de leucócitos da circulação para os tecidos, e ainda, a cascata de mediadores inflamatórios é induzida pelas citocinas IL-1, fator de necrose tumoral (TNF) e em alguns casos TNF-g. Já os agentes anti-inflamatórios bloqueiam ou suprimem essa cascata da inflamação, dentre elas podemos citar a IL-4, IL-10, IL-13 e TGF $\beta$  que suprimem a produção de IL-1 e TNF (DINARELLO, 2000).

### **3.2 Inflamação**

O processo inflamatório é desencadeado por vários tipos de injúria tecidual e com ela vem associado alguns sinais, como rubor, calor, aumento de volume e dor, estes, podem desaparecer, ou persistir e se tornarem crônicos. Nos locais onde há um processo inflamatório, ocorre um recrutamento de células inflamatórias como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, principalmente pela ativação de quimiocinas (AOKI; NARUMIYA, 2012). A inflamação pode ser aguda, começando rapidamente e podendo durar alguns dias; ou subaguda que acontece entre a aguda e a crônica podendo durar de duas a seis semanas; e ainda, há aquela inflamação crônica, que é lenta, podendo durar meses ou anos (PAHWA., 2018).

A inflamação aguda é uma resposta benéfica e limitada que ocorre durante o desafio infeccioso, tem como principal característica o infiltrado leucocitário, que é inicialmente neutrofílico e após 24 a 48 horas há um predomínio de células monocíticas. Durante a reposta de fase aguda há alterações nas concentrações de diversas proteínas plasmáticas, as proteínas de fase aguda, que aumentam ou diminuem em 25% durante um distúrbio inflamatório (GABAY, 2006).

Durante a inflamação há a produção de citocinas, as quais estimulam a produção de proteínas de fase aguda, dentre as citocinas destaca-se a IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , fator de crescimento transformador- $\beta$  e possivelmente IL-8, que são produzidos principalmente por macrófagos e monócitos no local da inflamação (GABAY, 2006).

A principal citocina estimuladora de proteínas de fase aguda pelo fígado é a IL-6, ela possui atividade tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Sua síntese se dá pelos monócitos, células endoteliais, fibroblastos, entre outras células, como resposta a microorganismos e a outras citocinas como a IL-1 e o TNF. Em um indivíduo sadio sua função durante uma inflamação aguda, é suprimir o nível de citocinas pró-inflamatórias de forma a não comprometer o nível de citocinas anti-inflamatórias (GABAY, 2006; PECKLE et al., 2013). Ela é a principal citocina pró-inflamatória responsável pela maturação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação e manutenção de linfócitos T citotóxicos e células NK (MARCIO et al., 2011).

As características presentes na inflamação aguda se mantêm conforme esta torna-se crônica, dentre elas pode-se citar a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade capilar e migração de neutrófilos para o tecido infectado através da parede capilar. Em contrapartida há uma mudança na composição dos glóbulos brancos onde macrófagos e linfócitos começam a substituir os neutrófilos (PAHWA., 2018).

Por outro lado, a inflamação crônica é um fenômeno persistente e potencialmente causador de danos teciduais, além disso, está relacionada histologicamente com a presença de células mononucleares como macrófagos e linfócitos (GABAY, 2006). Ela pode resultar de algumas variantes como falha na eliminação do agente que causa uma inflamação aguda, exposição a um nível baixo de determinado material estranho, distúrbios autoimunes, episódios recorrentes de inflamação aguda, indutores inflamatórios e bioquímicos como produtos finais de glicação avançada (AGE's), entre outros (PAHWA., 2018).

A inflamação crônica pode ser dividida em duas categorias, sendo a primeira a proliferativa inespecífica, onde tecido de granulação inespecífico, composto por células mononucleares e com proliferação de fibroblastos, tecido conjuntivo, vasos e células epiteliai;

e a inflamação crônica granulomatosa, caracterizada pela presença de lesões nodulares distintas ou por granulomas formados por uma agregação de macrófagos ativados ou ainda por células epiteliais geralmente cercadas por linfócitos (PAHWA., 2018)

### 3.2.1 Cascata da Inflamação

O acontecimento da resposta inflamatória depende da comunicação intercelular por moléculas solúveis, genericamente conhecidas como citocinas, incluindo quimiocinas, interleucinas (IL), fatores de crescimento e interferons (IFN); essas quando em baixas concentrações são muito ativas, sendo capazes de ligar a poucos receptores presentes na superfície das células induzindo então alterações na síntese de ácido ribonucleico (RNA) e na síntese proteica. Além disso, tem efeitos sobre crescimento e diferenciação de alguns tipos celulares, sendo que entre elas há considerável sobreposição e redundância. Em síntese suas ações dependem do estímulo, do tipo celular e da presença de outros mediadores ou receptores (GALLEY, 2014)

Os INF's são responsáveis por modular a atividade de outras células, em especial a produção de IL8 e o fator de ativação plaquetária (PAF), a produção de anticorpos pelas células b e a ativação de macrófagos citotóxicos. Já os fatores de crescimento atuam regulando a diferenciação, proliferação, atividade e função de alguns tipos celulares como os fatores estimuladores de colônias (GALLEY, 2014).

Em um processo inflamatório, por exemplo, quando há o aparecimento da endotoxina LPS na circulação sanguínea ocorre o desencadeamento da resposta imune inata, nesse momento haverá a produção de mediadores pró-inflamatórios primários, IL1 e TNF (GALLEY, 2014).

A IL1 é produzida primariamente por macrófagos, monócitos e por células dendríticas. Ela pode ser de dois tipos, IL1 $\alpha$  e IL1 $\beta$ . A IL1 $\beta$  induz inflamação sistêmica provocando febre, além de produzir substância P, óxido nítrico e moléculas de adesão endotelial (MARCIO et al., 2011). A IL6 é uma citocina produzida por um número de diferentes tipos celulares como fibroblastos, macrófagos, linfócitos T e B, células endoteliais, células da glia e queratinócitos; é responsável por estimular a síntese de imunoglobulinas e a produção de proteínas de fase aguda pelo fígado (AKIRA et al., 1990)

A TNF é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos T. é um dos mediadores mais potentes e precoces durante uma resposta inflamatória, porém de meia vida curta com apenas 20 minutos. Possui importantes

ações como ativar a coagulação, estimular a expressão ou liberação de moléculas de adesão, de PGE2, de fator ativador de plaquetas, glicocorticoides e eicosanoides, e influenciar a apoptose celular (MARCIO et al., 2011).

A partir da liberação de IL1 e TNF inicia-se uma cascata inflamatória, onde há a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios, que são enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), moléculas de adesão endotelial e quimiocinas e a partir deles há a liberação de prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico, e ativação e migração de neutrófilos, nesse momento a inflamação está estabelecida. A liberação de citocinas anti inflamatórias modula essa cascata da inflamação, dessa forma, citocinas como IL4, IL10 e IL13 suprimem a produção de IL1, TNF, IL8 e moléculas de adesão vascular (DINARELLO, 2000).

### 3.3 Imunidade e Morfologia do Útero

Como principais barreiras anatômicas que protegem o útero do meio externo contaminado, encontra-se a vulva, o vestibulo (com a presença de um esfíncter muscular) e o colo do útero (com anéis colágenos revestidos por mucosa). Há ainda outras barreiras que dificultam a contaminação desse ambiente, como as barreiras físicas onde se destaca o muco cervico-vaginal; além da barreira imunológica através da ação de células inflamatórias polimorfonucleares e anticorpos humorais (AZAWI, 2008). As contrações do miométrio também são fundamentais como mecanismo de defesa pós parto, onde há eliminação do conteúdo uterino desfavorecendo a multiplicação bacteriana (MARTINS; BORGES, 2012).

As bactérias presentes no útero pós parto são detectadas inicialmente pelo sistema imune inato, onde os PAMP's ou os MAMP's (padrões moleculares microbianos) são reconhecidos pelos RRP's, como os receptores Toll-like (TLR), nas células endometriais e estromais, pelos neutrófilos e macrófagos. Após o reconhecimento, há uma ativação da sinalização pelos TLR nas células endometriais, que desencadeia uma resposta inflamatória, e então há a liberação de citocinas e quimiocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8), , peptídeos antimicrobianos, proteínas de fase aguda e de prostaglandinas (MARTINS; SANTOS; MUNIZ, 2014; MARTINS; BORGES, 2015; SHELDON et al., 2017).

A liberação de citocinas causam aumento de temperatura, além de gerar um *Feedback* positivo visando aumentar a mobilização celular e a imunidade do organismo. Além disso, as citocinas pró-inflamatórias liberadas estimulam a secreção hepática de proteínas de fase aguda, de forma que essas aumentam em torno do parto e vão diminuindo conforme a eliminação bacteriana e involução uterina (SHELDON; DOBSON, 2004).

A endotoxina LPS é um dos PAMPs mais estudados, caracterizado como um lipossacarídeo presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas, responsável pela patogenicidade de alguns patótipos de *Escherichia coli*, e está relacionado com a ocorrência de infecções uterinas em vacas pós parto (MARTINS; BORGES, 2015).

Os receptores TLR's expressos, nas células epiteliais e estromais do endométrio são essenciais para a detecção de LPSa ligação entre eles, estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, quimiocinas como CXCL1 e CCL20 e prostaglandina E2. Ainda, foi observado que a resposta imune inata ao LPS depende da presença de TLRs, especialmente o do tipo TLR4 nas células estromais e endometriais presentes no trato genital feminino (SHELDON; ROBERTS, 2010; MARTINS; SANTOS; MUNIZ, 2014).

Para que haja o reconhecimento do LPS pelo receptor TLR4 há a necessidade da expressão dos co-receptores como o *Cluster of Differentiation 14* (CD14) e o fator mieloide de diferenciação do tipo 2 (MD2) para então ser ativada a resposta inflamatória endometrial (MARTINS; BORGES, 2015). No geral, a resposta das células endometriais e estromais por *E. coli* são mediadas por TLR4 que se liga ao LPS do patógeno, induzindo a secreção da quimiocina IL-8 e da citocina IL-6 (SAUT et al., 2014).

Quando o sistema imune do animal se depara com a presença de bactérias patogênicas são recrutados inicialmente, para o ambiente uterino, os neutrófilos, que são atraídos principalmente pela IL-8. Logo em seguida, macrófagos e linfócitos são recrutados para auxiliar na eliminação de tal patógeno. Porém durante o pós parto, a função neutrofílica está reduzida, fato que se deve a alterações metabólicas que ocorrem no início da lactação, onde observa-se um quadro de imunossupressão e aparecimento de infecções uterinas (MARTINS; BORGES, 2015).

Em estudos *ex vivo* do endométrio, observou-se que quando há redução de glicose, há uma diminuição na secreção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL8 em resposta ao LPS ou lipopeptídeos. Foi observado ainda que a diminuição da glutamina, quando na presença de glicose abundante, reduz em 50% a resposta de IL1 $\beta$ , IL-6 e IL8 ao LPS. Na ausência de glicose e glutamina houve uma redução significativa da resposta inflamatória endometrial para LPS, com o fornecimento apenas de glicose houve um aumento na inflamação enquanto que com o fornecimento apenas da glutamina isso não foi observado. Dessa forma supõe-se que a resposta imune inata efetiva no endométrio depende da disponibilidade de glicose, da glicólise e de abundância de glutamina (SHELDON et al., 2017).

Durante o pós- parto, uma importante ação da defesa humora é estabelecida, onde observa-se um aumento dos títulos de algumas Imunoglobulinas (Ig), como a IgM, IgA e IgG.

Sendo que a IgA atua na proteção contra agentes patogênicos na porção caudal do trato reprodutivo e a IgG, presente no conteúdo uterino, protege o útero contra bactérias e toxinas (MARTINS; BORGES, 2012).

A defesa hormonal também tem a sua importância, onde os principais hormônios envolvidos são a Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) e o estrógeno (E<sub>2</sub>), sendo a primeira uma molécula pró-inflamatória que estimula a produção de citocinas que promovem a síntese de leucotrienos B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) que são quimiotáticos e atraem neutrófilos, estimulam a fagocitose e a função dos linfócitos na superfície do endométrio; ao passo que o E<sub>2</sub> promove aumento do fluxo sanguíneo em direção ao útero, atraindo células de defesa, além de facilitar a liberação de conteúdo uterino ao aumentar a produção de muco e estimular a contração do miométrio (MARTINS; BORGES, 2012).

### **3.4 Importantes Infecções Uterinas Relacionadas à Inflamação**

Em vacas recém paridas é a imunidade inata a principal responsável pelo controle da contaminação uterina atuando por meio de respostas fisiológicas com a produção de muco pelas glândulas endometriais e contração do miométrio; respostas fagocitárias como a atração de neutrófilos para o ambiente uterino; e ainda com resposta inflamatória como promover a remoção dos patógenos e cicatrização dos tecidos (MARTINS; SANTOS; MUNIZ, 2014).

Durante o pós-parto, há um maior risco de se desenvolver doenças uterinas o que se deve há um estresse metabólico gerado pela produção de leite, esse último quase sempre associado a um balanço energético negativo onde há no sangue uma diminuição de glicose, glutamina e (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1(IGF-1; além disso, há também nesse período uma quebra nas barreiras anatômicas da vulva, vagina e cérvix que possibilita uma infecção ascendente do útero por microorganismos presentes no ambiente, nas fezes, na pele e no trato genital. Esse quadro leva a uma depleção na resposta imune, favorecendo o estabelecimento dessas doenças uterinas; o que se explica pelo fato de que os sistemas de metabolismo energético, imunidade inata e reprodução, evoluíram por milênios de forma que se tornaram altamente integrados, onde o estresse de um deles afeta os demais (MARTINS; SANTOS; MUNIZ, 2014; SHELDON et al., 2017).

Uma alta quantidade de bactérias é observada no pós-parto há de vacas, ,aquelas, provenientes tanto do meio ambiente, quanto da microflora uterina residente. Paralelamente a esse quadro acontece uma produção de leite elevada que propicia o desenvolvimento de doenças bacterianas do endométrio desses animais, onde cerca de 40% dos animais

desenvolvem metrite com aproximadamente 10 dias pós parto e após três semanas 15% dos animais apresentam um quadro de endometrite subclínica (SHELDON et al., 2017).

A presença dessas bactérias está intimamente relacionada com lesões endometriais e inflamação, tal fato leva a um atraso na involução uterina; além disso, essa infecção leva a uma diminuição da secreção hipofisária do hormônio luteinizante (LH), o que dificulta o crescimento folicular e conseqüentemente a ovulação. Portanto, a presença de doenças uterinas pós parto estão relacionadas com baixas taxas de concepção, aumento do intervalo entre partos e de primeiro serviço, além de aumentar a taxa de descarte pela não concepção (WILLIAMS et al., 2005).

As duas infecções uterinas que mais acometem esse período são a metrite, inflamação de todas as camadas uterinas, ocorre com maior frequência em rebanhos leiteiros, e a endometrite envolve apenas tecidos glandulares e endométrio e comumente não está associada a quadros sistêmicos, sendo um processo geralmente mais crônico do útero após o parto (CAMARGO; ZAPPA, 2012).

Foi definido por Kasimanickam (2014) que vacas com corrimento vaginal fétido e febre, onde a temperatura retal ultrapassa 39,5 °C, nos primeiros 14 dias pós parto, são classificadas como animais com metrite. Já as vacas com endometrite clínica, são aquelas com presença de secreção uterina mucopurulenta ou purulenta entre 28-35 dias pós parto. Enquanto a endometrite subclínica seria aquela onde há mais de 18% de neutrófilos polimorfonucleares na citologia endometrial e com 28-35 dias pós parto. As principais bactérias que acometem o trato reprodutivo nesse período são *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella melaninogenicus*, essas estão correlacionados com aumento da inflamação endometrial e doença clínica mais grave (WILLIAMS et al., 2005). Dessa forma a contaminação bacteriana uterina depende do equilíbrio entre contaminação bacteriana e dos mecanismos de defesa do animal (SHELDON; DOBSON, 2004).

Na metrite há um histórico de parto recente, com até 10 dias pós parto. Ela é caracterizada clinicamente por pirexia (temperatura retal acima de 39,5°C), com descarga vulvar purulenta e fétida, frequentemente encontra-se relacionada com a involução tardia do útero (SHELDON; DOBSON, 2004; CAMARGO; ZAPPA, 2012).

A endometrite clínica refere-se a uma inflamação do endométrio, sendo na maioria dos casos polimicrobiana, podendo ser diagnosticada por meio de toque retal em casos onde observa-se um espessamento do endométrio, além da presença de um conteúdo líquido abundante no útero, e por meio de um exame histológico onde verifica-se uma ruptura do

epitélio de superfície, a presença de células inflamatórias e congestão vascular. A perda do endométrio pode acarretar em uma persistência de  $\text{PGF2}\alpha$  que pode levar a persistência do corpo amarelo (SHELDON; DOBSON, 2004; MARTINS; CÉSAR, 2009). Alguns estudos caracterizam endometrite clínica quando há presença de descarga uterina purulenta ou diâmetro cervical maior que 7.5 cm após 20 dias depois do parto, ou ainda quando há descargas muco purulentas após 26 dias da data do parto (CAMARGO; ZAPPA, 2012).

Na endometrite subclínica, uma doença de caráter crônico, há ausência de sinais clínicos, porém na citologia uterina observa-se presença de neutrófilos, geralmente ocorre com 30 dias após a data do parto. Observa-se como única sintomatologia, indireta, a repetição de cio (CAMARGO; ZAPPA, 2012). Em vacas diagnosticadas com endometrite observa-se um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias que incluem interleucina (IL) -1a,  $\text{IL1}\beta$ , IL6, IL8 e fator de necrose tumoral (TNFa) (DICKINSON; GRIEBEL; PALMER, 2019).

A endotoxina das bactérias Gram-negativas pode ser absorvida no lúmen uterino pós parto, para a circulação periférica, podendo impedir o aumento pré ovulatório, esperado de LH para ovulação, em novilhas, provocando persistência de cistos foliculares. Essa endotoxina inibe a secreção pulsátil de LH na hipófise, suprimindo a capacidade de resposta da hipófise a pulsos endógenos ou exógenos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (SHELDON; DOBSON, 2004).

Existem alguns fatores de risco que explicam as variações individuais no desenvolvimento de doenças uterinas. Dentre eles podemos destacar a exposição de um animal a um desafio bacteriano maior que a competência de seu sistema imunológico; falhas nos mecanismos de defesa local e/ou sistêmico deixando a limpeza uterina deficiente; o efeito imunossupressor da progesterona; a presença de células do próprio sistema imunológico que atuam inibindo a resposta inflamatória como os macrófagos M2 que secretam IL3, IL4 e IL10; perda da camada epitelial do endométrio no momento do parto que leva a redução da síntese de receptores de padrões moleculares microbianos, mucinas e peptídeos antimicrobianos; alguns posicionamentos uterinos também podem favorecer o aparecimento de doenças, por dificultarem a drenagem de conteúdo remanescente da gestação e de produtos provenientes da resposta inflamatória, favorecendo a persistência de microorganismos com potencial patogênico (MARTINS; BORGES, 2015).

### 3.5 Ácidos Graxos Poliinsaturados Essenciais (PUFA's)

Os (PUFA's) são representados pelas famílias de Ômega 3 e Ômega 6 (ALMEIDA, 2006). O ômega 3 é encontrado em dietas com óleo de peixes, esse é rapidamente incorporado pelos fosfolipídeos da membrana celular, sendo um indício de que eles provavelmente tem função em variados aspectos nas células (SIMOPOULOS; SIMOPOULOS, 2013).

Os mamíferos não possuem enzimas necessárias para sintetizar PUFA's, dessa forma, o que mantém seus níveis na circulação sanguínea é principalmente a ingestão alimentar, e parece estar relacionado também com fatores genéticos e nutricionais. (FARZANEH-FAR et al., 2009). Existem várias fontes de ômega 3 para a dieta de ruminantes, entre eles linhaça, óleo de peixe e farinha de peixe purificados (GULLIVER et al., 2012). Os peixes de água fria como o salmão, o atum contém maior conteúdo de EPA e DHA (derivados do Ômega 3) pois seus lipídeos são estocados na carne (CAROLINA; OLIVEIRA, 2013).

Os ácidos graxos ômega 3 degradam e formam o EPA e o DHA compreendendo uma pequena proporção de ácidos graxos totais. Estes estão disponíveis nos locais de inflamação aguda, sendo detectados em exsudatos inflamatórios no local da lesão tecidual, poucos minutos após a lesão. São liberados via edema por meio de proteínas transportadoras como a albumina e por meio da ativação celular das membranas celulares por meio das enzimas fosfolipase A2 secretoras seletivas que hidrolisam os fosfolipídios para liberar ácidos graxos livres (SERHAN; PETASIS, 2011; DUVALL; LEVY, 2015).

Estudos em humanos e em animais mostraram fortes evidências de que uma alimentação rica em ômega-3 altera a produção de citocinas e propriedades funcionais de macrófagos, linfócitos e outras células imunocompetentes. Atuando como um importante imunomodulador das reações imunes, reduzindo, geralmente, reações inflamatórias e produção de interleucinas IL1, IL6 e de TNF (LESSARD; GAGNON; PETIT, 2003). A supressão da síntese de citocinas provavelmente é alcançada em nível de transcrição, visto que o mRNA da IL1 encontra-se diminuído (SIMOPOULOS; SIMOPOULOS, 2013).

Seu efeito imunomodulador se dá pela redução da quimiotaxia de monócitos e neutrófilos que ajudam a modular a resposta inflamatória em suas fases iniciais. E como imunorregulador atua reduzindo a proliferação de linfócitos T citotóxicos quando em resposta a citocinas pró inflamatórias e a produção de mediadores e TNF (CASTILHO; CAMPOS; MELLO, 2015).

A EPA constitui a origem das resoluções da série E e o DHA resoluções da série D (RvD), proteção em D1 e maresina. As resolvinas são biossintetizadas endogenamente durante a fase

de resolução da inflamação. Estudos em animais mostraram que RvE1, RvE2 e RvE3 provocam a inibição da migração de leucócitos e neutrófilos associada a uma redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias e um aumento na atividade fagocítica de macrófagos. Os efeitos anti-inflamatórios de RvE1 e RvE2 podem ser atribuídos à sua capacidade de se ligar ao ChemR23, um receptor acoplado à proteína G e ao receptor 1 de leucotrieno B4, que é um receptor do leucotrieno, eicosanóide pró-inflamatório (CRISTINA et al., 2015).

Diversas vias bioquímicas estudadas comprovam esse efeito antiinflamatório dos ácidos graxos ômega 3, observa-se que o EPA compete por substrato com os ácidos araquidônicos em membranas celulares, para a produção de cicloxigenase e eicosanóides derivados da lipoxigenase dessa forma reduz a produção de derivados considerados pró-inflamatórios como é o caso da prostaglandina E2 ; além disso, os mediadores inflamatórios formados a partir do EPA são menos potentes que os liberados pelo ácido araquidônico, resultando em um efeito antiinflamatório mais brando; os ácidos graxos estão relacionados com efeitos inibitórios na expressão da molécula de adesão e quimiotaxia; e ainda podem inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (FARZANEH-FAR et al., 2009; CASTILHO; CAMPOS; MELLO, 2015).

Pouco se sabe do efeito dessa dieta nas respostas imune celular e humoral em vacas. Portanto uma melhor compreensão desses efeitos no sistema imunológico, em diferentes estágios fisiológicos, podem ajudar a determinar condições nutricionais que otimizem a resposta imune da vaca leiteira (LESSARD; GAGNON; PETIT, 2003).

## 4. METODOLOGIA

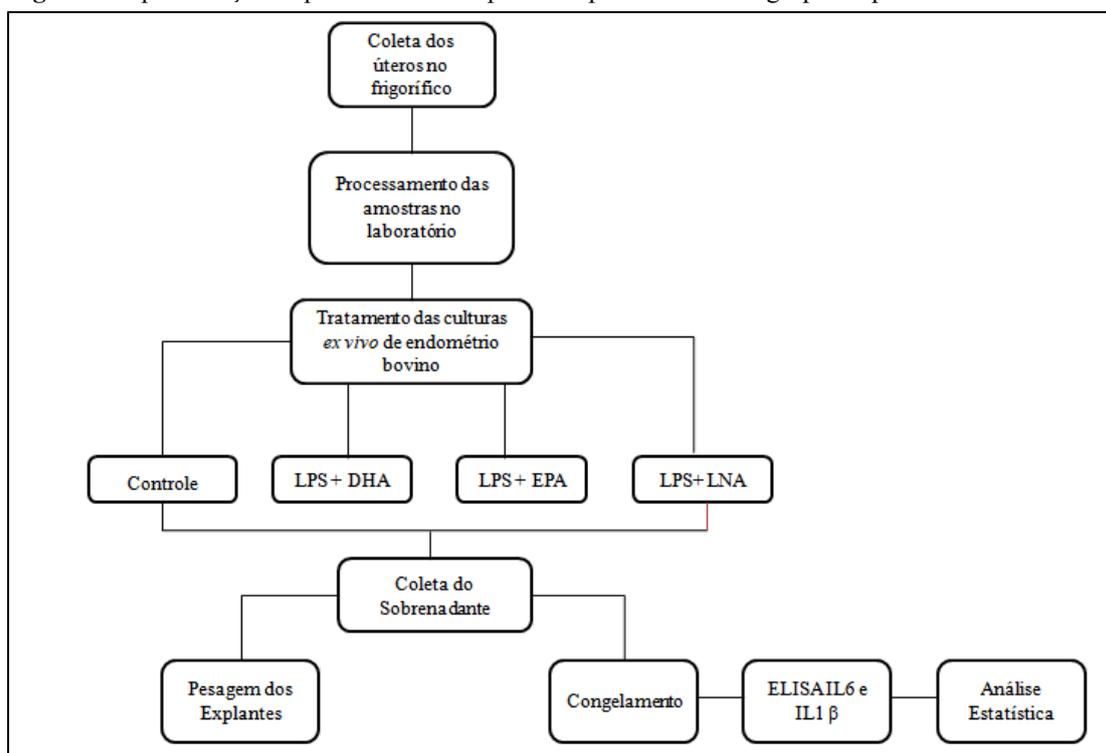
### 4.1 Animais e coleta de amostras

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Saúde em Grandes Animais (LASGRAN) da Universidade Federal de Uberlândia – FAMEV/UFU. Foram utilizados úteros de novilhas da raça mestiça Aberdeen Angus com Nelore, não gestantes e ausentes de doenças clínicas aparentes.

### 4.2 Delineamento Experimental

Inicialmente foi feita a coleta de cinco úteros no frigorífico de novilhas mestiças Aberdeen Angus com Nelore, os quais foram levados ao laboratório, onde foram selecionados. Os endométrios foram expostos e lavados, em seguida, foram coletados fragmentos com o auxílio um *punch* estéril. Os fragmentos direcionados aos tratamentos com os ácidos eicosapentaenoico, docosahexaenóico e  $\alpha$ -linolênico nas concentrações de 50mg/ml, 100mg/ml, 200mg/ml e 400mg/ml para cada ácido, sendo que havia um grupo controle, sem a adição de ácido, e, após, desafiados com LPS (1 $\mu$ g/mL). Após o período de cultivo *in vitro* de 24 horas, o sobrenadante foi coletados, armazenados e congelados para posterior realização de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para dosagem das citocinas IL1 $\beta$  e IL6.

**Figura 1:** Apresentação esquemática das etapas do experimento e dos grupos experimentais



### 4.3 Coleta de Amostras

Os úteros das vacas foram coletados no abatedouro, inseridos em sacos plásticos e armazenados em caixas térmicas adequadamente refrigeradas, para então serem transportados até o Laboratório, para posterior processamento do material. Foi feita uma inspeção macroscópica dos úteros, onde foram aprovados para uso no experimento somente aqueles não gestantes e sem evidência macroscópica de doenças.

### 4.4 Processamento das Amostras

Após a seleção dos úteros, foi realizado, de forma individual, o processamento dos mesmos. A superfície externa do órgão foi lavada com álcool 70%, em seguida, com o auxílio de uma tesoura estéril, realizou-se uma incisão longitudinal no corno uterino com presença de corpo lúteo predominante.

Após a exposição do endométrio, o mesmo foi lavado com solução de Dulbecco's phosphate-buffered (D-PBS; Sigma-Aldrich® Ltd, Dorset, UK), suplementado com 50UI/mL de penicilina, 50µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich®). Foi utilizado um *punch* estéril (KRUUSE®) de 8 mm próprio para biópsia, onde foram retirados os fragmentos de endométrio (explantes) de regiões intercarunculares, inseridos em 25ml de solução de Hank's Balanced Salt (HBSS; Sigma-Aldrich®), suplementado com 50UI/mL de penicilina (Sigma-Aldrich®) 50µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich®).

Os explantes foram levados à cabine de fluxo laminar, onde realizou-se duas lavagens na solução HBSS suplementada com 50 UI/mL penicilina, 50 µg/mL estreptomicina e 2,5 µg/mL anfotericina B por 5 minutos, evitando movimentos abruptos para que os explantes não fossem mecanicamente estimulados, e em seguida transferidos para placas de cultura celular de 24 poços. Em cada poço foi adicionado 1mL de meio completo de cultura, composto por RPMI 1640 (GIBCO®), soro fetal bovino (Cultilab®), suplementado com 50UI/mL de penicilina, 50µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich®).

Visando avaliar a influência de ômega-3 na produção de interleucinas IL1β e IL6 pelo endométrio bovino quando submetido ao LPS, os explantes foram submetidos previamente ao tratamento com o ácido eicosapentaenóico (90.110; C20: 5, n-3), ácido docosahexaenóico (90.310; C22: 6, n-3) e α-Linolênico (90.210; C18: 3, n-3), adquirido da Cayman Chemical

(Ann Arbor, MI, EUA). Antes de tratar as células, 1mg/400ul etanol de EPA, DHA, e LNA foram dissolvidos em 600ul de etanol e formando uma solução estoque de 0,1mg/ul, congelada em *eppendorfs* contendo 35ul.

Após a coleta dos explantes, onde foram coletados 26 explantes por animal, em um total de cinco animais, esses foram submetidos a tratamentos distintos. O primeiro explante foi tratado apenas com meio de cultivo completo composto por 500 mL de RPMI 1640, 50mL de FBS, 5mL de Penicilina/Estreptomicina, 5mL de Anfotericina B, constituindo o controle. Nas primeiras 0-24 horas, para avaliação do ácido DHA cultivou-se quatro explantes em meio de cultivo completo contendo DHA (50mg/ml, 100mg/ml, 200mg/ml e 400mg/ml), para a avaliação do ácido EPA cultivou-se quatro explantes em meio de cultivo completo contendo EPA (50mg/ml, 100mg/ml, 200mg/ml e 400mg/ml) e por fim, para a avaliação do ácido LNA cultivou-se quatro explantes em meio de cultivo completo contendo LNA (50mg/ml, 100mg/ml, 200mg/ml e 400mg/ml). Após as 24 horas o sobrenadante foi retirado, o grupo controle permaneceu apenas com as diferentes concentrações e os outros explantes com os ácidos foram tratados com solução de LPS 1µg/mL (Ultrapure LPS, E. coli 0111:B4; InvivoGen, San Diego, CA, USA) em meio de cultivo completo e nesse momento foram tratadas também com LPS 1µg/mL dois explantes sem ácido.. Cada explante foi mantido em seu respectivo poço da placa de cultivo por 24 horas, em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de vapor. Após 24 horas os explantes foram individualmente pesados em balança de precisão (AX200 Marte® Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e o sobrenadante de cada poço foi congelado a -20°C para posterior dosagem das concentrações de IL6 e IL12B por meio de ELISA. Abaixo um esquema de como foi dispostos os poços de cada placa, o mesmo foi feito para os demais ácidos (figura 2).

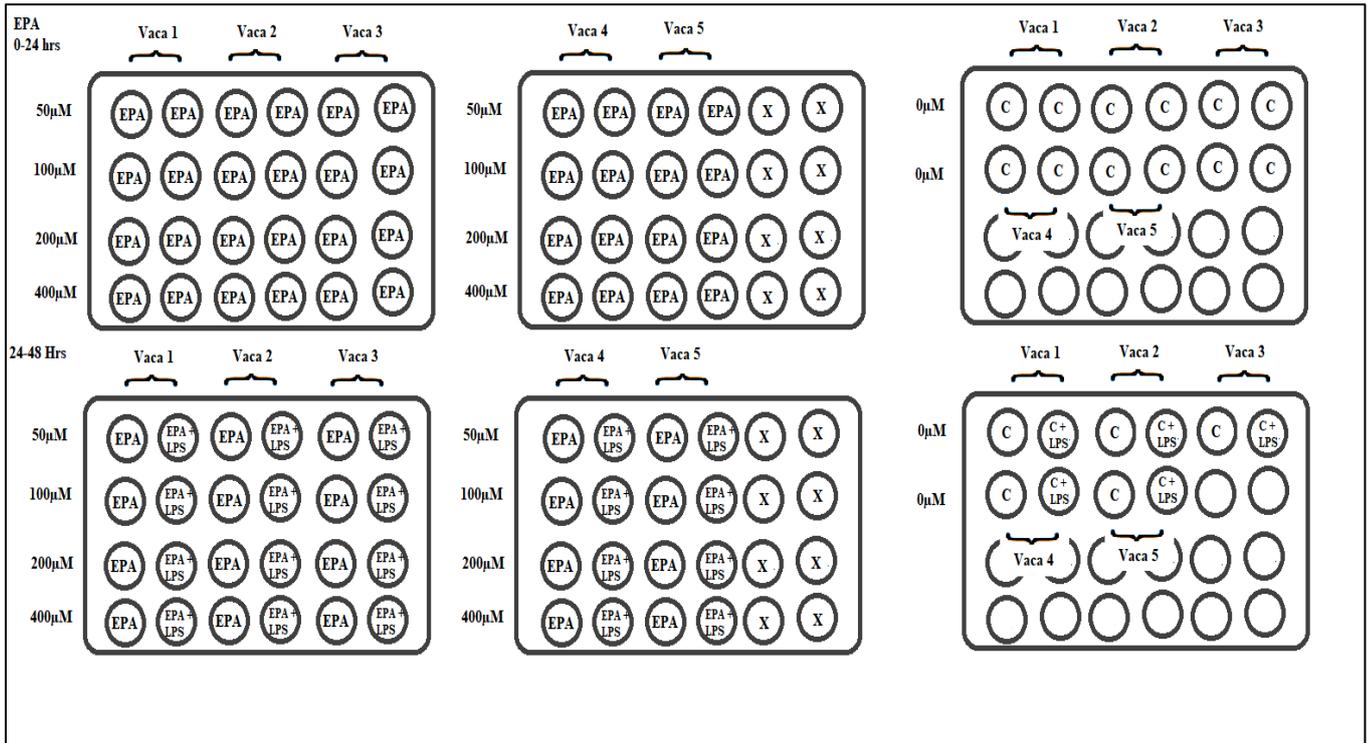


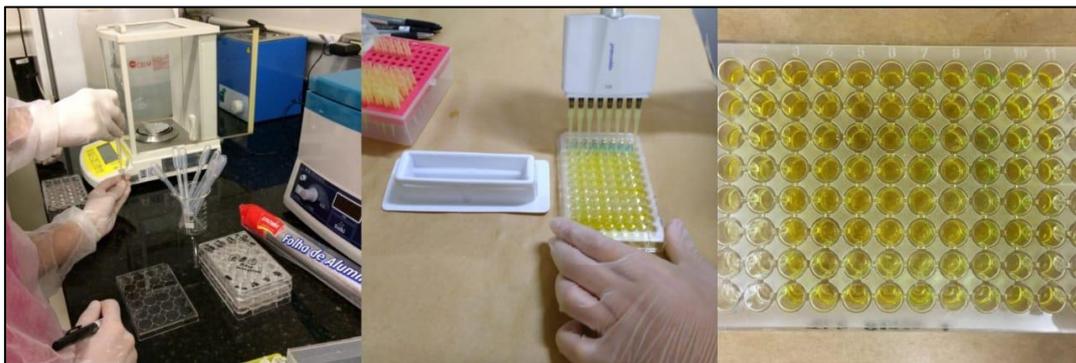
Figura 2 – Exemplo da distribuição dos poços em cada placa, com um dos ácidos, EPA, seguindo os horários de 0-24 Hrs e 0-48 Hrs

#### 4.5 Realização do ELISA

As concentrações de IL6 e IL1 $\beta$  presentes no sobrenadante de cada amostra foram mensuradas pela técnica de ELISA sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante incluídas nos kits de ELISA, específico para cada citocina, (ThermoScientific® Bovine IL6 Reagent kit; ThermoScientific® Bovine IL1 $\beta$  Reagent kit). Primeiramente as placas de ELISA eram sensibilizadas com anticorpo de captura diluído em solução Phosphate Buffered Saline (PBS) e permaneciam em temperatura ambiente overnight. No dia seguinte, as placas eram lavadas três vezes com wash buffer, em seguida era feito o bloqueio adicionando-se reagente diluente em cada poço, mantendo-se as placas em temperatura ambiente por uma hora. Após esse intervalo, as placas eram novamente lavadas três vezes com wash buffer, as amostras ou solução padrão eram adicionadas aos seus respectivos poços e as placas permaneciam em temperatura ambiente por duas horas. Posteriormente, as placas eram lavadas três vezes com wash buffer e adicionava-se anticorpo de detecção diluído no reagente diluente em cada poço, as placas eram mantidas em temperatura ambiente durante mais duas horas. Decorrido esse tempo, as placas eram lavadas três vezes com wash buffer, adicionava-se solução diluída de Streptavidin-HRP em cada poço e deixava-se as placas em temperatura

ambiente por 20 minutos, protegidas da incidência direta da luz. Logo depois, as placas eram lavadas três vezes com wash buffer, adicionava-se solução substrato em cada poço e mantinha-se as placas em temperatura ambiente por 20 minutos, novamente protegidas da incidência direta da luz. Em seguida, adicionava-se stop solution (ácido sulfúrico) em cada poço e agitava-se cuidadosamente as placas. 27 Rapidamente transportava-se as placas, ao abrigo da luz, até o aparelho SpectraMax® M2/M2e (Molecular Devices Corporation, San Jose, CA, USA) em que se fazia a leitura da densidade óptica utilizando-se os filtros de 450nm e 570nm no programa SoftMax Pro Software (Molecular Devices Corporation). Os valores obtidos eram transcritos para o programa Microsoft® Office Excel e realizava-se a correção subtraindo o valor encontrado no filtro de 450nm pelo valor encontrado no filtro de 570nm. Os resultados obtidos eram, então, analisados pelo programa MyAssays Analysis Software Solutions® (<https://www.myassays.com/>). Para cada amostra foram obtidas duas concentrações em pg/mL, sendo posteriormente calculada a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação e o erro padrão da média desses valores. Por fim, calculava-se a concentração de interleucina pelo peso do explante, obtendo-se os valores em pg/mg, os quais foram utilizados na análise estatística. Algumas etapas do procedimento estão ilustradas na figura 3.

**Figura 3** - Realização da pesagem dos expantes e do Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para dosagem das concentrações de IL6



Fonte: LASGRAN - UFU, 2019.

#### 4.6 Análises Estatísticas

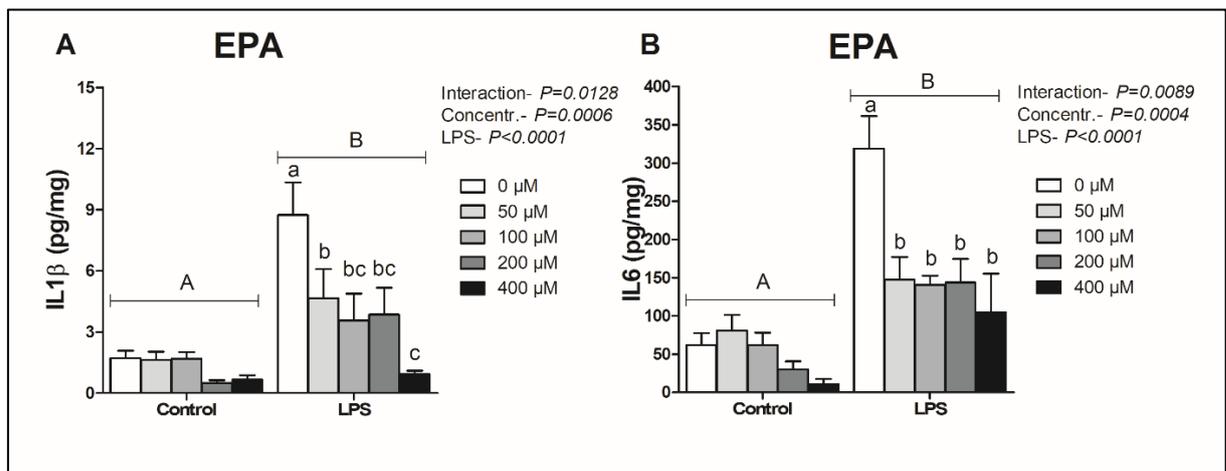
Para realizar as análises estatísticas e confecção dos gráficos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e o fator animal foi considerado como unidade experimental. Os dados foram tabulados em planilhas

do programa Microsoft Excel e a estatística descritiva apresentada em média e erro padrão da média.

Para avaliar as diferenças nas concentrações de IL1 $\beta$  e IL6 foi realizado two-way ANOVA e após com pós-teste de Bonferroni ( $P < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

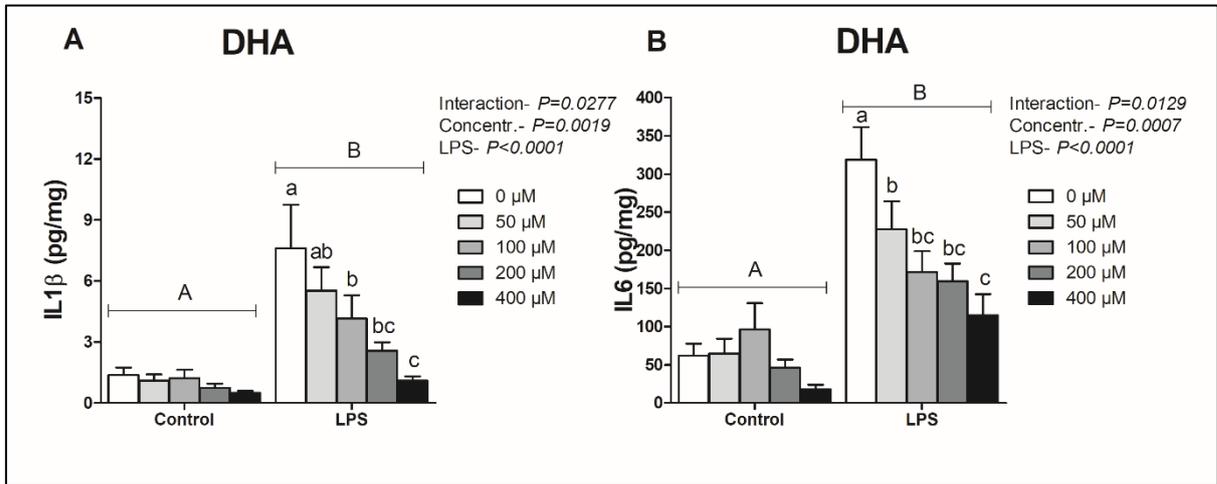
Quando os explantes foram tratados com EPA, sem serem desafiados com LPS (grupo controle) não houve diferença significativa no acúmulo de IL6 e IL1 $\beta$  nas variadas concentrações (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M e 400  $\mu$ M) (Figura 4). Já as células tratadas com LPS houve uma resposta significativa ao LPS a qual foi dependente da concentração do EPA, porém já se mostrou significativa na concentração de 50  $\mu$ M para as duas citocinas IL6 e IL1 $\beta$  ( $P < 0,05$ ), no entanto a diminuição da IL1 $\beta$  foi mais expressiva na concentração de 400  $\mu$ M, quando comparada a concentração anteriormente citada (Figura 4).



**Figura 4 - Resposta das interleucinas IL1 $\beta$  e IL6 de endométrio bovino *ex vivo* com diferentes concentrações de EPA frente à exposição ao lipopolissacarídeo.** Os endométrios bovinos foram agrupados conforme a ausência de LPS, portanto apenas nas diferentes concentrações dos ácidos (0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M) das primeiras 24 horas, representando o grupo controle (A). Enquanto o outro grupo (B) foi realizados após as 24 horas sendo os explantes contendo EPA desafiado com LPS, nas diferentes concentrações. Para avaliar as diferenças nas concentrações de IL1 $\beta$  e IL6 foi realizado two-way ANOVA e após com pós-teste de Bonferroni ( $P < 0,05$ ).

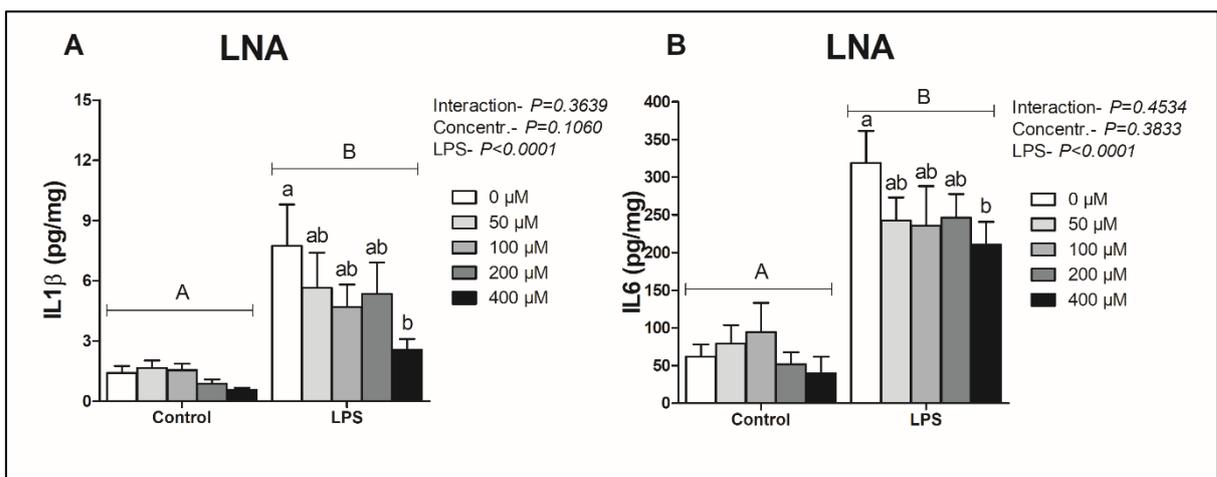
Com relação ao tratamento dos explantes com DHA, no grupo controle, não houve diferenças no acúmulo de IL6 e IL1 $\beta$  (Figura 3;  $P > 0,05$ ). Após o desafio com LPS observou-se que houve uma redução gradativa e significativa dependente da concentração de DHA.

Sendo que na IL1 $\beta$  foi possível ter uma diferença significativa com 100  $\mu$ M e a IL6 com 50 $\mu$ M (figura 5).



**Figura 5 - Resposta das interleucinas IL1 $\beta$  e IL6 de endométrio bovino *ex vivo* com diferentes concentrações de DHA frente à exposição ao lipopolissacarídeo.** Os endométrios bovinos foram agrupados conforme a ausência de LPS, portanto apenas nas diferentes concentrações dos ácidos (0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M) das primeiras 24 horas, representando o grupo controle (A). Enquanto o outro grupo (B) foi realizados após as 24 horas sendo os explantes contendo DHA desafiado com LPS, nas diferentes concentrações. Para avaliar as diferenças nas concentrações de IL1 $\beta$  e IL6 foi realizado two-way ANOVA e após com pós-teste de Bonferroni ( $P < 0,05$ ).

Quando o LNA foi utilizado, observou-se que apenas na maior concentração (400  $\mu$ M) houve uma redução significativa das citocinas IL1 $\beta$  e IL6. (Figura 6).



**Figura 6 - Resposta das interleucinas IL1 $\beta$  e IL6 de endométrio bovino *ex vivo* com diferentes concentrações de LNA frente à exposição ao lipopolissacarídeo.** Os endométrios bovinos foram agrupados conforme a ausência de LPS, portanto apenas nas diferentes concentrações dos ácidos (0  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M,

200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ ) das primeiras 24 horas, representando o grupo controle (A). Enquanto o outro grupo (B) foi realizado após as 24 horas sendo os explantes contendo LNA desafiado com LPS, nas diferentes concentrações. Para avaliar as diferenças nas concentrações de IL1 $\beta$  e IL6 foi realizado two-way ANOVA e após com pós-teste de Bonferroni ( $P < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

O LPS, utilizado no presente estudo, é o principal componente estrutural da parede celular de bactérias gram-negativas, é reconhecido pelos receptores do tipo TLR4, nesse momento haverá a liberação de citocinas como a IL6 e IL1 $\beta$  (SHELDON; ROBERTS, 2010). No presente estudo avaliou-se o efeito do desafio com LPS sobre a produção de IL6 e IL1 $\beta$ , quando as mesmas eram tratadas com os diferentes ácidos, pelas culturas de endométrio bovino *ex vivo*. Observou-se que a porcentagem de acúmulo de IL6 e IL1 $\beta$  foi significativamente menor, quando na presença de DHA e EPA, do que quando na presença de LNA, onde este último precisou de altas concentrações do ácido para mostrar um efeito antiinflamatório.

Os achados de ELISA deste experimento mostraram que há sim uma resposta antiinflamatória quando as células, previamente estimuladas com LPS, são tratadas com Ômega 3, esses resultados comprovam o efeito antiinflamatório descrito por Lessard, 2003 e WALL et al., 2010. Esses resultados são reforçados pelo trabalho de Lessard, 2003, onde foram comparadas três dietas mistas totais que consistiram em suplemento baseados em FLA que é a linhaça inteira (contém LNA), sais de cálcio de óleo de palma, Megalac ou soja micronizada (SOY), Os três tratamentos foram projetados para produzir concentrações similares de PB, extrato etéreo e NEL e foram formulados para atender aos requisitos de vacas com média de 580 kg de peso corporal e produziram 40 kg / d de leite com 3,5% de gordura observou-se, cinco dias após o parto, que a resposta proliferativa de linfócitos e a concentração de PGE2 no das vacas alimentadas com linhaça inteira foi reduzida em comparação com as que receberam soja micronizada.

Em um estudo realizado com a suplementação de d-fagomina, PUFAs  $\omega$ -3, ou ambos, por 23 semanas, em ratos mostrou que os níveis plasmáticos de ácido araquidônico pró-inflamatório foram menores nos grupos suplementados com PUFAs  $\omega$ -3. Nesse estudo foi mostrado também que o EPA e o DHA reduziram os níveis de vários derivados da ARA, mediadores lipídicos pró-inflamatório (HEREU et al., 2019).

Um estudo realizado em éguas utilizando explantes endometriais avaliou a influência na secreção de Prostaglandina (PG), PGF2 e PGE2, quando tratados com ácido araquidônico, DHA e LNA e após desafiados com LPS e ocitocina. Sabe-se que o aumento da secreção de PG, devido à inflamação uterina, causa regressão do corpo lúteo resultando em perda embrionária, para isso é interessante inibir ou reduzir a secreção da mesma. Nesse estudo observou que a ocitocina estimulou a liberação de PG o que também foi observado com o tratamento com LPS, porém em menor extensão do que com a ocitocina. Observou também que o tratamento com EPA não influenciou a liberação de PG, nesse estudo, enquanto que o DHA reduziu a concentração dos mesmos nos explantes. Esse estudo mostra-se diferente do nosso quanto a não influência do EPA nessa resposta, porém está em concordância quanto a avaliação do DHA que se mostra reduzindo a resposta inflamatória e neste caso reduzindo consequentemente produção de PG reduzindo perdas embrionárias (PENROD et al., 2013).

Outro estudo observou os efeitos de subprodutos de peixes nas interações lipídicas-proteicas nos microdomínios de células luteais bovinas, a estrutura desses microdomínios estão associados com a sinalização de PGF2 $\alpha$ , dessa forma a alteração do mesmo pode levar à diminuição da sinalização de PGF2 $\alpha$ , aumentando assim a taxa de gravidez. As células que foram tratadas com óleo de peixe e nos animais suplementados com farinha de peixe, observou-se uma porcentagem menor de marcadores de microdomínio e receptor de receptores de prostaglandina F2 $\alpha$  (FP) em microdomínios (P <0,05). Porém, nos animais suplementados com farinha de peixe obtiveram uma maior porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3. Os resultados mostraram que os subprodutos de peixes influenciam a proteína lipídica e a interações em microdomínios lipídicos em células luteais bovinas (PLEWES et al., 2018).

Resultados contraditórios foram mostrados em um experimento realizado em humanos, onde um grupo foi suplementado com ômega-3 e o outro foi mantido como grupo controle, nos seus resultados não foram observados diferenças significativas tanto na concentração de TNF  $\alpha$  e nem na concentração de IL6, observaram apenas que houve uma diminuição instantânea na concentração de TNF  $\alpha$  e IL6 no início da fase de administração do ômega-3 e esta é seguida por um aumento subsequente (YAN et al., 2019).

Baseado no resultado encontrado supõe-se que o fato de que o LNA precisa estar em altas concentrações para mostrar um efeito anti-inflamatório, pode estar relacionado com a origem do mesmo, óleo vegetal, enquanto que os outros ácidos mostraram esse efeito em menores concentrações e estes são de origem animal, óleo de peixe. Em um estudo realizado por Chen (2018) a partir da ingestão líquida de LNA por peixes mostrou que esse LNA, a

maior parte dele é bioconvertido, sendo  $\beta$ -oxidado, isso pode explicar uma das razões pelas quais a oferta abundante de LNA na dieta não aumenta significativamente o n-3 LC-PUFA na circulação final, esse estudo difere do nosso por se tratar de ingestão de LNA e não pelo tratamento deste em fragmentos de tecido (explantes endometriais no nosso estudo), porém colabora com nossa suspeita a respeito da menor expressão desse ácido quanto seu efeito antiinflamatório.

## 7. CONCLUSÃO

Conclui-se, com base nos dados dessa pesquisa, que o uso dos ácidos graxos ômega 3 em explantes endometriais *ex vivo*, de vacas, foi capaz de induzir na presença de LPS, uma resposta anti inflamatória dose-dependente. Pode-se observar uma diferença nessa resposta entre os ácidos DHA e EPA com o LNA, onde os primeiros se mostraram mais eficientes, pois esse efeito antiinflamatório foi observado em concentrações menores desses ácidos, enquanto o LNA precisou de uma maior concentração para alterar essa resposta imune.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S. et al. A nuclear factor for IL-6 expression ( NF-IL6 ) is member of a C / EBP family a. **The EMBO Journal**, v. 9, n. 6, p. 1897–1906, 1990.

ALMEIDA, V. V. De. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6 : importância e ocorrência em alimentos acids : importance and occurrence in foods. **COMMUNICATION**, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006.

AOKI, T.; NARUMIYA, S. Prostaglandins and chronic inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 6, p. 304–311, 2012.

AZAWI, O. I. Postpartum uterine infection in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 187–208, 2008. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/anireprosci](http://www.elsevier.com/locate/anireprosci)>.

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes : nutrition or pharmacology. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 3, p. 545–662, 2012.

CAMARGO, I.; ZAPPA, V. ENDOMETRITE EM BOVINOS : REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 18, 2012.

CAROLINA, A.; OLIVEIRA, D. M. Ácido graxo n-3: os benefícios do consumo de um alimento com alegação de propriedades funcionais. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 02, p. 40–54, 2013.

CARVALHO, L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, E. M. Immune response mechanisms to infections \*. **Continuing Medical Education**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.

CASTILHO, T. de; CAMPOS, A. C.; MELLO, E. Artigo Original EFEITO DO ÁCIDO GRAXO ÔMEGA-3 NA CICATRIZAÇÃO DE ANASTOMOSE COLÔNICA EM RATOS. **ABCD**, v. 28, n. 4, p. 258–261, 2015.

CHI, H. et al. Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 ( MKP-1 ) in innate immune responses. **PNAS**, v. 1, 2006.

COLSON, C.; GHANDOUR, R. A.; REKIMA, S. Diet Supplementation in  $\omega$  3 Polyunsaturated Fatty Acid Favors an Anti-Inflammatory Basal Environment. **nutrients**, p. 1–17, 2019.

CRISTINA, R. et al. EPA- and DHA-derived resolvins ' actions in inflammatory bowel disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 1859, p. 1–9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.050>>.

DICKINSON, R.; GRIEBEL, P.; PALMER, C. Theriogenology Characterization of cytokine gene expression in uterine cytobrush samples of non-endometritic versus endometritic postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 126, p. 128–139, 2019.

DINARELLO, C. A. impact of basic research on tomorrow ' s Proinflammatory Cytokines \*. **CHEST**, v. 118, n. 2, p. 503–508, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1378/chest.118.2.503>>.

DUVALL, M. G.; LEVY, B. D. Author ' s Accepted Manuscript. **European Journal of Pharmacology**, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.001>>.

FARZANEH-FAR, R. et al. Inverse association of erythrocyte n-3 fatty acid levels with inflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease : The Heart and Soul Study. **Atherosclerosis**, v. 205, p. 538–543, 2009.

FILHO, A. et al. Balanço energético negativo Antônio. **PUBVET**, v. 04, n. 11, p. 61801, 2010.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 6, p. 1–6, 2006.

GALLEY, H. F. **The immuno-inflammatory cascade The immuno-inflammatory cascade**. 1996.

GULLIVER, C. E. et al. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of

sheep and cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 131, n. 1–2, p. 9–22, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.02.002>>.

HEREU, M. et al. Combined Buckwheat d -Fagomine and Fish Omega-3 PUFAs Stabilize the Populations of Gut Prevotella and Bacteroides While Reducing Weight Gain in Rats. **nutrients**, v. 11, p. 2–14, 2019. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/nutrients](http://www.mdpi.com/journal/nutrients)>.

JANEWAY, R. M. e C. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. **IMMUNOLOGY**, v. 10, p. 351–353, 1998.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; KASTELIC, J. P. Theriogenology Mucin 1 and cytokines mRNA in endometrium of dairy cows with postpartum uterine disease or repeat breeding. v. 81, p. 952–958, 2014.

LESSARD, M.; GAGNON, N.; PETIT, H. V. Immune Response of Postpartum Dairy Cows Fed Flaxseed 1. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 8, p. 2647–2657, 2003. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73860-0](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73860-0)>.

MACHADO, S. L. R. **Imunologia Básica e Aplicada à Análises Clínicas.pdf**. [s.l: s.n.]

MALLARD, B. A. et al. Effects of growth hormone, insulin-like growth factor-I, and cortisol on periparturient antibody response profiles of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 60, n. 1–2, p. 61–76, 1997.

MARCIO, C. et al. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 255–265, 2011.

MARTINS, C. D. F.; CÉSAR, B. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE ENDOMETRITE EM. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 12, 2009.

MARTINS, T. da M.; BORGES, Á. M. Imunologia uterina e fertilidade Uterine immunology and fertility. **Revista Brasileira de Reprodução Animal - Belo Horizonte**, v. 39, p. 129–135, 2015.

MARTINS, T. M.; BORGES, Á. Avaliação uterina em vacas durante o puerpério. **Revista**

**Brasileira de Reprodução Animal - Belo Horizonte**, v. 35, n. 1974, p. 433–443, 2012.

MARTINS, T. M.; SANTOS, R. L.; MUNIZ, C. S. Imunidade inata uterina em vacas após o parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal - Belo Horizonte**, v. 38, n. 2014, p. 214–219, 2014.

MOLLICA, M. P. Milk From Cow Fed With High Forage / Concentrate Ratio Diet : Beneficial Effect on Rat Skeletal Muscle Inflammatory State and Oxidative Stress Through Modulation of Mitochondrial Functions and AMPK Activity. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. January, p. 1–12, 2019.

PAHWA., R. **Chronic inflammationStatPearls**, 2018. .

PECKLE, M. et al. Molecular epidemiology of *Theileria equi* in horses and their association with possible tick vectors in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitology Research**, v. 112, n. 5, p. 2017–2025, 2013.

PENROD, L. V et al. Effects of oxytocin , lipopolysaccharide ( LPS ), and polyunsaturated fatty acids on prostaglandin secretion and gene expression in equine endometrial explant cultures. **DAE**, v. 44, n. 1, p. 46–55, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2012.09.002>>.

PERINI, L. et al. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6 : metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Communication**, v. 23, n. 6, p. 1075–1086, 2010.

PLEWES, M. R. et al. In fl uence of omega-3 polyunsaturated fatty acids from fi sh oil or meal on the structure of lipid microdomains in bovine luteal cells ☆. **Animal Reproduction Science**, v. 193, n. March, p. 40–57, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.036>>.

REGO, O. A. et al. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid , omega-3 and other fatty acids in milk fat from grazing dairy cows. **LIVESTOCK PRODUCTION SCIENCE**, v. 95, p. 27–33, 2005.

SAUT, J. P. E. et al. Ovarian steroids do not affect bovine endometrial cytokine or chemokine

responses to *Escherichia coli* or LPS in vitro. **Reproduction**, 2014.

SERHAN, C. N.; PETASIS, N. A. Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution. **CHEMICAL REVIEWS**, p. 5922–5943, 2011.

SHELDON, I. M. et al. Mechanisms linking metabolic stress with innate immunity in the endometrium. **Journal of Dairy Science**, n. June, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217308329>>.

SHELDON, I. M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 83, p. 295–306, 2004.

SHELDON, I. M.; ROBERTS, M. H. Toll-Like Receptor 4 Mediates the Response of Epithelial and Stromal Cells to Lipopolysaccharide in the Endometrium. v. 5, n. 9, 2010.

SIMOPOULOS, A. P.; SIMOPOULOS, A. P. Journal of the American College of Nutrition Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and. **Journal of the American College of Nutrition**, n. November, p. 37–41, 2013.

SORDILLO, L. M.; AITKEN, S. L. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 104–109, 2009.

SOUSA, E. **Instituto Informação - Imunologia**. [s.l: s.n.]

TURNER, M. L.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Immunity and Inflammation in the Uterus Microbial Infection of the Uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 402–409, 2012.

WALL, R. et al. Fatty acids from fish : the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 5, p. 280–289, 2010.

WILLIAMS, E. J. et al. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine

bacterial infection and the immune response in cattle. **Theriogenology**, v. 63, p. 102–117, 2005.

WIRA, C. R. et al. Innate and adaptive immunity in female genital tract : cellular responses and interactions. **Immunological Reviews**, v. 206, p. 306–335, 2005.

YAN, S. et al. Associations between Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Anti-Inflammatory Effects in Patients with Digestive System Cancer : A Meta- Analysis Associations between Omega-3 Fatty Acid Supplementation and. **NUTRITION AND CANCER**, v. 5581, 2019.