

RAFAEL ARTUR DA SILVA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA LEUCOCITÁRIA COM O USO DE
PEGBOVIGRASTIM EM VACAS HOLANDESAS NO PÓS-PARTO**

GARANHUNS

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – RFRPE
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES – PGSRR**

RAFAEL ARTUR DA SILVA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA LEUCOCITÁRIA COM O USO DE
PEGBOVIGRASTIM EM VACAS HOLANDESAS NO PÓS-PARTO**

Dissertação apresentada ao programa de Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu

GARANHUNS

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

S586a Silva Júnior, Rafael Artur
Avaliação da resposta leucocitária com o uso de Pegbovigrastim
em vacas holandesas no pós-parto / Rafael Artur Silva Júnior. - 2018.
47 f. : il.

Orientador: Cláudio Coutinho Bartolomeu.

Dissertação (Mestrado em Sanidade e Reprodução de Ruminantes)-
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós –
Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, Garanhuns,
BR - PE, 2018.

Inclui referências

1. Bovino de leite - doenças
2. Bovino de leite - infecções
3. Ruminante I. Bartolomeu, Cláudio Coutinho, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – RFRPE
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SANIDADE E
REPRODUÇÃO DE RUMINANTES – PGSRR

USO DE PEGBOVIGASTRIM EM VACAS HOLANDEASAS NO PÓS
PARTO NO AGRESTE PERNAMBUCANO

Dissertação elaborada por
RAFAEL ARTUR DA SILVA JÚNIOR

Aprovada em 23/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Presidente da Banca – Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Prof. Dr^a Andrea Alice da Fonseca Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Prof. Dr. Pierre Castro Soares
Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, aos meus familiares, professores e amigos que me ajudaram na elaboração deste trabalho, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

- A minha família que é minha base, e me dá a força necessária para todas as conquistas da minha vida, principalmente meus pais, Antonia e Rafael.
- Aos meus amigos, que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, nos longos dias de experimento, em especial a Gabriela Silva, Caio Costa, Erik Tavares, Camila Alencar, Daniela Souza, Danila Farias, Ayna Arramis, Lays Albuquerque, Jerônimo Hugo, Jonas Nobrega, Rebeka Menezes e Marisa Genuino.
- Ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) pelo apoio a pesquisa e pelo fornecimento dos animais e laboratórios.
- A professora Andrea Alice pela ajuda e orientação nas análises citopatológicas, ao prof. Pierre Soares pelo apoio nas análises estatísticas.
- A FACEPE pela bolsa de estudo que ajudou na execução da pesquisa.
- Ao orientador, prof. Cláudio Coutinho pela confiança depositada, conhecimentos adquiridos e pela orientação essencial para a realização deste trabalho.
- Enfim, a todos que direta e indiretamente me ajudaram na realização deste.

RESUMO

O Brasil é o quarto maior produtor de leite do mundo, mesmo com um grande quantitativo de animais os rebanhos brasileiros ainda enfrentam vários problemas que impedem o aumento da produção, entre eles podemos destacar as infecções uterinas que acometem os animais no período de transição pós-parto. Diante disto objetivou-se neste trabalho avaliar a resposta leucocitária com o uso do pegbovigrastim em vacas holandesas no pós-parto. O experimento foi realizado na estação experimental do Instituto de Pesquisa Agronômica localizado em São Bento do Una, agreste de Pernambuco. Doze animais foram divididos em dois grupos, controle (GC) e tratamento (GT), onde o GT recebeu duas aplicações do produto, sete dias antes da data prevista para o parto e outra em até 24 horas após o parto, o GC recebeu nas mesmas condições do GT solução fisiológica de NaCl 0,09%. Todos os animais foram avaliados por meio de leucometria e citologia endometrial a cada sete dias desde a primeira aplicação até 21 dias após o parto. Os animais que receberam o pegbovigrastim obtiveram um resultado satisfatório na quantidade total de leucócitos ($p < .0001$), principalmente devido ao aumento de neutrófilos segmentados no qual o GT apresentou média geral de 10.467 cél/ μ L de sangue e o GC com média geral de 4.278 cél/ μ L ($p < 0,004$), contudo não houve variação na porcentagem de neutrófilos segmentados presentes no endométrio. Conclui-se que o tratamento é eficaz para aumento da quantidade de leucócitos, principalmente neutrófilos segmentados, no pós-parto.

Palavras chave: G-CSF, citologia, leucócitos, puerpério, imunidade uterina, hemograma.

ABSTRACT

Brazil is the fourth largest milk producer in the world, even with a large number of animals the Brazilian herds still face several problems that prevent the increase of production, among them we can highlight the uterine infections that affect animals in the postpartum. In view of this, the objective of this study was to evaluate the leukocyte response with the use of pegbovigrastim in postpartum Holstein cows. The experiment was carried out at the experimental station of the Agronomic Research Institute located in São Bento do Una, in the state of Pernambuco. Twelve animals were divided into two groups, control (CG) and treatment (TG), where TG received two applications of the product, seven days before the expected date of delivery and another one within 24 hours after delivery. The CG received at the same conditions saline solution 0.09% NaCl. All animals were evaluated by leukometry and endometrial cytology every 7 days from the first application to 21 days postpartum. The animals that received pegbovigrastim had a satisfactory result in the total amount of leukocytes ($p < .0001$), mainly due to the increase of segmented neutrophils in which TG presented a general mean of 10,467 cells / μL of blood and GC a mean of 4,278 cells / μL ($p < 0.004$), however there was no change in the percentage of segmented neutrophils present in the endometrium. It is concluded that the treatment is effective to increase the amount of leukocytes, mainly segmented neutrophils, in the postpartum period.

Key words: G-CSF, Cytology, Leukocytes, Puerperium, Uterine immunity, Blood Count.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de aplicações e coletas de material hematológico e uterino dos animais avaliados.....	35
Figura 2 – Média do número de neutrófilos segmentados circulantes em vacas Holandesas no período de transição pré e pós-parto tratadas ou não com pegbovigrastim (IPA, São Bento do Una – PE).....	40
Figura 3 – Média do número de leucócitos circulantes em vacas Holandesas no período de transição pré e pós-parto tratadas ou não com pegbovigrastim (IPA, São Bento do Una – PE).....	41
Figura 4 – Porcentagem de neutrófilos segmentados presentes no útero de vacas Holandesas no período de transição tratadas ou não com pegbovigrastim (IPA, São Bento do Una – PE).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise de variância das variáveis hematológicas em vacas Holandesas no período pós-parto tratadas ou não com pegbovigrastim (IPA, São Bento do Una – PE).....	37
Tabela 2 - Médias, desvio-padrão, medianas e percentis (P25 e P75) do leucograma em vacas Holandesas no período de transição tratadas ou não com pegbovigrastim (IPA, São Bento do Una – PE).....	38
Tabela 3 – Análise de variância do infiltrado neutrofílico uterino em vacas Holandesas no período de transição pré e pós-parto tratadas ou não com pegbovigrastim (IPA, São Bento do Una – PE).....	42
Tabela 4 - Médias, desvio-padrão, medianas e percentis (P25 e P75) da porcentagem total de infiltrado neutrofílico uterino em vacas Holandesas no período de transição tratadas ou não com pegbovigrastim (IPA, São Bento do Una – PE).....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	
3.1 Fisiologia da reprodução no período pós-parto	14
3.2 Microbiota uterina no pós-parto	15
3.3 Imunologia uterina.....	16
3.4 Papel dos hormônios na defesa uterina.....	19
3.5 Características leucocitárias no pós-parto.....	20
3.6 Infecções uterinas	20
4. REFERÊNCIAS	22
5. ARTIGO CIENTÍFICO: Efeito do uso do Pegbovigrastim sobre resposta leucocitária em vacas Holandesas no pós-parto.....	32

1. INTRODUÇÃO

Em 2010 a produção mundial de leite foi de 695,7 bilhões de litros, dos quais o Brasil contribuiu com 4,42% ou 30,7 bilhões de litros. Entre 2000 e 2010 a produção cresceu em média 4,4% ao ano, sendo a segunda maior taxa anual de crescimento do mundo. O primeiro lugar foi da China, com 17,61% (EMBRAPA, 2011). A produção de leite brasileira está evoluindo de sistemas menos produtivos para sistemas de produção envolvendo processos tecnológicos mais sofisticados e com animais de maior produtividade. (STOCK et al., 2008). Segundo Vilela (2002) a produção de leite ocupa espaço de destaque no agronegócio brasileiro e com perspectiva de expansão nos próximos anos.

De acordo com o IBGE (2015) o Brasil possui 215.199.488 bovinos, deste total 29.092.184 (13,52%) encontra-se na região Nordeste. O efetivo bovino do estado de Pernambuco (PE) consiste em 1.948.357 animais, destes 25,21% são vacas em lactação, sendo responsáveis pela produção de 855.102 litros de leite, gerando uma renda de cerca de R\$ 987.483,00. O município de São Bento do Una, localizado no agreste do estado de Pernambuco distante 215 Km da capital Recife, é responsável pela produção de 47.900 litros de leite, estabelecendo uma renda de R\$ 50.295,00 anuais (IBGE, 2015).

Apesar da grande quantidade de animais, o Brasil é um dos países que apresenta menor produtividade por vaca. Segundo Santos (2009) isso se deve ao baixo valor genético dos animais, refletindo em animais pouco produtivos, além do manejo inadequado e falhas no gerenciamento das empresas rurais. Desse modo medidas que visem minimizar tais problemas podem ser um fator importante para o aumento do lucro e para a permanência do produtor na cadeia produtiva do leite.

O impacto das infecções uterinas no desempenho do gado leiteiro, durante os anos de 1990 a 2005, foi estudado por Bell & Roberts (2007), e relataram que fatores como o número de partos da matriz, o número de bezerros no parto e a apresentação do bezerro estão relacionados com o aumento do número de endometrites nos animais. Segundo os mesmos autores, as infecções uterinas promovem aumento significativo no intervalo parto/concepção e conseqüentemente uma diminuição na produção de leite.

O estabelecimento de infecções microbianas uterinas pode ter conseqüências negativas para a função reprodutiva no pós-parto (KASIMANICKAM et al., 2004;

DOBSON et al., 2008; GAUTAM et al., 2009). De acordo com Esposito et al. (2014) o comprometimento da função imunológica sistêmica é uma das causas de doenças uterinas. O sistema imunológico desempenha um papel importante nos mecanismos de defesa uterina. Na biologia celular, a defesa contra bactérias é proporcionada por infiltrados uterinos de células polimorfonucleares (PMNs) que fagocitam e eliminam bactérias (GILBERT et al., 2007). Os PMNs são recrutados para o útero infectado por fatores quimiotáticos, como Interleucina-6 (IL-6) (ZERBE et al., 2003; METTE et al., 2010). Citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6, IL-8 (Interleucina-8) e TNF (Fator de Necrose Tumoral) podem acelerar a infiltração de PMNs no endométrio bovino após a infecção (FISCHER et al., 2010).

O fator estimulante de colônia (CSF) é um grupo de citocinas necessárias para a proliferação e diferenciação de uma variedade de células tronco hematopoiéticas. Esses fatores de crescimento são glicoproteínas distintas que se ligam a células por meio de um receptor comum. São produzidos por uma variedade de células, incluindo fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e células T (CULLOR, 1990). Cada CSF-alvo tende a estimular uma linhagem celular específica para expandir ou ativar sua função. A influência marcante do fator estimulante de colônia - Granulócitos (G-CSF) em populações de células fagocíticas sugere possíveis aplicações clínicas na prevenção de doenças infecciosas bacterianas, como a mastite e a metrite (CULLOR, 1990).

A metrite é definida como uma inflamação do útero, resultando em sinais sistêmicos da doença, incluindo febre, útero aumentado de volume com odor fétido e com descarga aquosa ou purulenta, nos primeiros 7 dias após o parto (SHELDON et al., 2006a). Entre estes podem haver fatores predisponentes, como retenção de placentas, maceração fetal ou parto distócico (FÖLDI et al., 2006; SHELDON et al., 2006a, b; CHAPWANYA, 2008).

Para combater esses problemas e aumentar a produtividade dos animais é necessário estabelecer protocolos terapêuticos e de manejo visando aumentar a imunidade do animal no período crítico de transição. Para isso, estratégias de manejo são utilizadas visando melhoria na produção dos rebanhos. Entre elas destaca-se a administração de pegbovigrastim, forma modificada do fator estimulador de colônias de granulócitos bovinos (bG-CSF) conjugado com polietilenoglicol (PEG), pretendendo melhorar os índices produtivos dos animais produtores de leite, interferindo diretamente no combate a infecções no pós-parto.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar a resposta leucocitária com o uso de Pegbovigastim em fêmeas bovinas da raça Holandesa no período de transição pós-parto.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar pelo leucograma a resposta leucocitária sistêmica em fêmeas bovinas tratadas com pegbovigastim no pós-parto;
- Avaliar o quantitativo de neutrófilos no útero de fêmeas bovinas tratadas com pegbovigastim pela técnica de citologia esfoliativa no pós-parto;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO NO PERÍODO PÓS-PARTO

O período do puerpério é um processo fisiológico de modificações que ocorrem após o parto no sistema reprodutivo da fêmea, levando-a à recuperação das transformações ocorridas durante o período da prenhez, para finalmente atingir volume, tamanho, posição e adquirir novamente a capacidade reprodutiva para futura gestação (GRUNERT e BIRGEL, 1982). Esse período abrange uma fase de inatividade ovariana e sexual previamente ao retorno à ciclicidade. É variável e pode ser alterado por diversos fatores tais como a produção leiteira, amamentação, nutrição, escore de condição corporal (ECC) e condições uterinas (BALL e PETERS, 2004).

De acordo com Crowe (2008) o retorno à ciclicidade pode ser demorado em decorrência do balanço energético negativo (BEN), retenção de placenta, infecções uterinas e distocia. Shrestha et al. (2004) relatam que esse fato influencia na taxa de concepção e conseqüentemente no intervalo entre partos.

Somente após o retorno às condições uterinas normais de não gestante é que uma nova prenhez poderá se estabelecer. Estima-se que haja forte relação entre a involução uterina e o retorno à atividade ovariana pós-parto. O intervalo parto/concepção é dependente da involução uterina, e por sua vez, é resultante de manejo nutricional adequado, mecanismo de defesa uterino atuante e ausência de doenças reprodutivas e metabólicas (SHELDON et al., 2003). Ainda segundo Sheldon et al. (2003) a involução uterina é caracterizada pelo processo de regeneração do endométrio e eliminação da contaminação bacteriana, simultaneamente ao retorno da atividade cíclica ovariana (HERATH et al., 2006a).

Nas vacas leiteiras, o período do puerpério ou de transição é marcado por mudanças nutricionais, metabólicas, hormonais e imunológicas que têm impacto na incidência de infecções e doenças metabólicas (GOFF e HORST, 1997). Durante este período, as vacas estão em um estado de balanço energético negativo, que ocorre em virtude da demanda por nutrientes para a produção de leite que aumenta rapidamente e excede o suprimento de nutrientes fornecidos pela ingestão de alimentos (BAUMAN e CURRIE, 1980). Este balanço de energia negativo resulta em menores níveis glicêmicos e na mobilização de reservas corporais para fornecer energia adicional, levando a

concentrações sanguíneas elevadas de ácidos graxos não esterificados e ácido β -hidroxibutírico (BUSATO et al., 2002; DRACKLEY, 1999). Além disso, o cálcio e o fósforo são mobilizados para a síntese do leite, predispondo a uma diminuição nas suas concentrações sanguíneas (DRACKLEY et al., 2005).

Durante o período de transição, as vacas leiteiras experimentam um estado natural de imunossupressão, o que pode aumentar sua susceptibilidade a infecções uterinas e mamárias (SHELDON, 2004). Há estudos associando a disfunção do metabolismo de energia durante o pós-parto com o estado de imunossupressão. Alguns pesquisadores observaram que o balanço energético negativo e a ocorrência do fígado gordo agravam a imunossupressão do parto, proporcionando as vacas de leite a apresentarem metrite (WENSING et al., 1997; BOBE et al., 2004; HAMMON et al., 2006).

3.2 MICROBIOTA UTERINA NO PÓS PARTO

Durante o parto, a abertura das barreiras anatômicas constituídas pela vulva, vagina e cérvix possibilita a invasão do útero por bactérias ambientais, presentes nas fezes e na pele dos animais. Alterações nos mecanismos de defesa contribuem para a persistência de bactérias patogênicas e favorecem o estabelecimento de doenças. Modificações no ambiente uterino e atraso no retorno da atividade ovariana podem resultar em subfertilidade (SHELDON e DOBSON, 2004; SHELDON et al., 2006a; SHELDON et al., 2008a; SHELDON et al., 2009b). Em bovinos leiteiros, por exemplo, a diminuição na ingestão alimentar no período pré-parto e o aumento da demanda energética para produção leiteira modificam o estado nutricional e imunológico, o que pode favorecer a instalação de uma infecção uterina (SORDILLO et al., 2009).

Após o parto, alterações ocorridas no endométrio, juntamente com o fluido e debris celulares presentes no lúmen uterino, promovem rápida multiplicação bacteriana (AZAWI, 2008), sendo que, em mais de 90% das vacas, é possível observar a presença de bactérias no útero durante duas a três semanas após o parto. Porém, as bactérias são gradualmente eliminadas ao longo do processo de involução uterina normal (OLSON et al., 1986; MCENTEE, 1990; SHELDON e DOBSON, 2004; SHELDON, 2007). De acordo com Sheldon et al. (2008b) e Földi et al. (2006) 40% dos animais continuam neste quadro por mais uma semana. A colonização bacteriana, que pode evoluir para infecções uterinas dependendo do status imunológico do animal, pode ser originada pela presença

viral (Herpesvirus bovino tipo 4) e bacteriana (*Escherichia coli*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella*).

Os danos ao endométrio e a falha na atividade ovariana são as causas da infertilidade na ocorrência de doenças uterinas (SHELDON et al., 2008b). Dado que com ambiente uterino inadequado devido a infecção uterina suprimir a liberação da prostaglandina pelo endométrio e seu transporte para o ovário, pode ocorrer prolongamento da fase lútea e falha na ovulação. Desta forma, os animais emprenham tardiamente apresentando baixo desempenho reprodutivo (SHRESTHA et al., 2004).

3.3 IMUNOLOGIA UTERINA

Durante a maior parte do ciclo reprodutivo, o ambiente uterino encontra-se estéril, ou, potencialmente livre de microrganismos. Transitoriamente, o útero pode ser infectado por microrganismos invasores com potencial patogênico. A infecção do trato genital feminino superior durante a relação sexual está diretamente relacionada com a ocorrência de doença inflamatória pélvica e infertilidade em mulheres. Já as fêmeas bovinas são mais expostas a esse tipo de contaminação em propriedades que adotam a monta natural (MARTINS e BORGES, 2015).

Os principais mecanismos de defesa do útero após o parto são proporcionados por mudanças anatômicas, respostas fisiológicas, fagocitárias e inflamatórias, além da imunidade inata, que é a principal responsável pelo controle da contaminação bacteriana (SHELDON e DOBSON, 2004; AZAWI, 2008).

A imunidade inata é a principal responsável pela detecção dos microrganismos invasores e controle da infecção uterina em vacas, atuando por meio de respostas fisiológicas, fagocitárias e inflamatórias. Quando a imunidade inata não é capaz de combater a infecção, a imunidade adquirida é ativada (JANEWAY e MEDZHITOV, 2002; TAKEUCHI e AKIRA, 2010). A imunidade adquirida elabora respostas específicas para cada desafio antigênico, que podem ser do tipo humoral quando efetuada pelos linfócitos B, e/ou celular quando proporcionada pelos linfócitos T. A formação de uma memória imunológica confere proteção ao hospedeiro quando este entra em contato com o antígeno novamente (WERLING e JUNGI, 2003; SORDILLO et al., 2009).

O sistema imunológico desempenha um papel importante nos mecanismos de defesa uterina, embora esse mecanismo não seja totalmente compreendido. Na biologia

celular, a defesa contra bactérias infectantes é proporcionada por um infiltrado uterino de células polimorfonucleares que são células que fagocitam e eliminam bactérias (GILBERT et al., 2007), os PMNs são recrutados para o útero infectado por fatores quimiotáticos, como IL8 (ZERBE et al., 2003; METTE et al., 2010). Portanto este é um importante atrativo de quimiotaxia, o que aumenta o influxo de PMNs e outros leucócitos no útero bovino (GALVÃO et al., 2011). No âmbito molecular, a interleucina-6 e o TNF estimulam a produção de peptídeos antimicrobianos que auxiliam na eliminação de bactérias patogênicas (CHAPWANYA et al., 2009; SHELDON et al., 2011).

Citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6, IL-8 e TNF podem acelerar a infiltração de PMN no endométrio bovino após a infecção (FISCHER et al., 2010). Sendo assim o papel do TNF é estimular a expressão de IL-8 e adesão molecular às células endoteliais vasculares. Com isso a IL-8 desempenha um papel importante nos PMNs e na quimiotaxia de monócitos e na ativação de PMNs. Essas respostas, em última instância, aumentam a fagocitose e a morte bacteriana (ROACH et al., 2002; SHELDON et al., 2004a, b; GALVÃO et al., 2011).

Após o parto, os mecanismos de defesa relacionados com as imunidades inata e adquirida encontram-se debilitados devido à diminuição da ingestão de alimentos e ao aumento da demanda energética imposta pelo início de lactação. Com isso o quadro de imunodepressão sistêmica aumenta a suscetibilidade das vacas leiteiras de alta produção à ocorrência de infecções uterinas e outras doenças puerperais, comprometendo a produtividade e o retorno à reprodução (LEWIS, 1997; SORDILLO, 2009).

Histologicamente, o endométrio das fêmeas bovinas apresenta duas camadas: uma superficial, composta por células epiteliais colunares simples, e uma profunda, constituída de células estromais, células de defesa e vasos sanguíneos (MONTEIRO et al., 2003; DAVIES et al., 2008). As células adjacentes ao epitélio endometrial são unidas por “tight junctions”. Esse tipo de conexão é proporcionado por uma rede de proteínas transmembranares com domínios intra e extracelulares que interagem para manter forte adesão entre as células. As “tight junctions” mantêm a integridade da camada superficial do endométrio e restringem o contato entre os compartimentos apical e basolateral, controlando a permeabilidade paracelular. Portanto, o epitélio endometrial confere proteção contínua ao útero e é considerado uma barreira física importante contra microrganismos invasores (HICKEY et al., 2011; AMJADI, et al., 2014).

Ao entrarem em contato com microrganismos patogênicos, as células epiteliais do endométrio ativam mecanismos relacionados com as respostas imunológicas inata e adquirida em bovinos (HERATH et al., 2006b; TURNER et al., 2012). Assim, lesões e traumas ocorridos durante o parto afetam a integridade da camada epitelial do endométrio, favorecendo a exposição das células do estroma às bactérias presentes no ambiente uterino (POTTER et al., 2010). Conseqüentemente, a retenção de placenta pode causar danos adicionais ao endométrio, aumentando o risco de ocorrência de infecções uterinas (POTTER et al., 2010; MARTINS et al., 2013; MARTINS, 2014).

Embora o epitélio endometrial seja considerado a primeira linha de defesa, as células do estroma são mais abundantes, contribuindo de maneira significativa para combater a contaminação uterina (SHELDON e ROBERTS, 2010). Segundo alguns autores ao realizarem estudos *in vitro*, com células endometriais purificadas, foi observado que de maneira semelhante às células do epitélio, as células do estroma apresentam ampla capacidade de expressar receptores de padrões moleculares microbianos, os quais são responsáveis pelo reconhecimento inicial dos microrganismos invasores e pela ativação da resposta imunológica em bovinos (HERATH et al., 2006b; DAVIES et al., 2008; SWANGCHAN-UTHAI et al., 2012).

A capacidade de modulação da resposta imunológica nas diferentes fases do ciclo estral, da gestação e do puerpério está diretamente relacionada com a fertilidade das fêmeas bovinas. LeBlanc (2012), Hansen (2013) e Williams (2013) hipotetizaram que variações individuais nos ajustes do sistema imunológico entre a concepção e o parto, e a reversão dessas mudanças no período pós-parto, implicam em suscetibilidade ou resistência às infecções uterinas.

As principais citocinas indutoras da granulopoiese são o fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF) e algumas interleucinas (IL-1, IL-3, IL-5 e IL-6), que aumentam o número de mitoses, diminuem o tempo de maturação e aumentam a liberação de granulócitos para o sangue periférico (FELDMAN et al., 2000; STOCKHAM & SCOTT, 2002).

O G-CSF é linhagem-específico, ou seja, exerce efeito somente sobre a linhagem neutrofílica (FELDMAN et al., 2000), e é produzido pelas células do estroma da medula óssea, fibroblastos, células endoteliais, monócitos e macrófagos, sob estímulo de

citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-3 e fator de necrose tumoral (TNF), e endotoxinas bacterianas (HENRY et al., 1998). O fator estimulante de colônia de granulócitos desenvolve importante papel na granulopoiese e atua na medula óssea aumentando a liberação de neutrófilos maduros do compartimento de reserva para a circulação, a proliferação e maturação de precursores granulocíticos e a função dos neutrófilos, aumentando sua capacidade de fagocitose, quimiotaxia e degranulação (HENRY et al., 1998; REWERTS & HENRY, 1998; FELDMAN et al., 2000).

3.4 PAPEL DOS HORMONIOS NA DEFESA UTERINA

O estrógeno e a $\text{PGF}_{2\alpha}$ são os principais hormônios envolvidos no mecanismo de defesa hormonal, sendo que a progesterona é considerada imunossupressora. A imunidade do ambiente uterino é reforçada durante o estro, quando o útero se encontra mais suscetível à invasão de patógenos, e suprimida durante a fase luteal, quando o útero é preparado para receber o concepto (LEWIS, 2003; AZAWI, 2008). Após o parto, o retorno ao estro na ausência de infecção uterina pode ser benéfico, uma vez que o aumento da concentração de estrógenos favorece a eliminação do conteúdo uterino e, conseqüentemente, a remoção dos patógenos. A ação indireta do estrógeno na limpeza do ambiente uterino é devida ao estímulo da produção de muco pelas glândulas endometriais e à atuação nas fibras musculares promovendo o aumento das contrações miométriais (HORTA, 1995; SHELDON et al., 2004a, FERNANDES e FIGUEIREDO, 2007; AZAWI, 2008).

Em vacas de parto eutócico, o aumento da concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ coincide com a redução dos níveis séricos de progesterona e aumento nos valores sanguíneos de estrógeno. Após o parto e a expulsão dos envoltórios fetais, as concentrações de progesterona vão reduzindo rapidamente, a menos que ocorram complicações decorrentes de retenção de placenta ou de instalações de processos infecciosos (GAMBARINI, 1989). De acordo com Levkut et al. (2002) as altas concentrações circulantes de hormônios, incluindo estrógeno, progesterona e glucocorticóides no momento do parto podem promover depressão do sistema imune.

No momento do parto há também grande liberação de cortisol, hormônio liberado pela glândula adrenal que pode interferir na contagem de leucócitos e na capacidade do organismo de responder a outros hormônios, como o estradiol e a progesterona.

(BAISHYA et al., 1994; KORNMATITSUK et al., 2002; SAUT & BIRGEL JUNIOR, 2006)

3.5 CARACTERÍSTICAS LEUCOCITÁRIAS NO PÓS-PARTO

A maioria dos autores apontam que as variações no leucograma ocorrem normalmente sob diferentes condições sanitárias, de manejo, ambientais e conforto. Várias equipes de pesquisa já demonstraram alterações nesses parâmetros no período puerperal (SANTOS, 2009).

De acordo com Nazifi et al. (2008) os leucócitos totais circulantes durante a prenhez ($6,45 \pm 2,30 \times 10^6$ células/mm³) são maiores do que no pós-parto recente ($5,53 \pm 1,46 \times 10^6$ células/mm³). Saut e Birgel Junior (2006) também chegaram a mesma conclusão, sendo as alterações determinadas principalmente por neutrófilos, linfócitos e eosinófilos.

As altas concentrações de estradiol que ocorrem no estro e no parto promovem mudanças no número e na proporção de leucócitos circulantes e relativa neutrofilia com desvio a esquerda (NOAKES et al., 2002). O quadro leucocitário parece se alterar devido ao aumento da secreção de hormônios do córtex adrenal, observado no final da gestação e na indução fisiológica do parto. Ahmadi et al. (2006) compararam as mudanças dos parâmetros leucocitários durante as diferentes fases do ciclo estral de fêmeas bovinas e concluíram que não houve variações significativas das células sanguíneas de defesa. Portanto, parece que o quadro leucocitário sofre maiores influências da liberação de glucocorticóides do que de hormônios esteróides.

3.6 INFECÇÕES UTERINAS

A expressão dos sinais clínicos dos diferentes quadros de infecção depende da interação entre sistema imunológico, condição do ambiente uterino, quantidade e patogenicidade dos agentes microbianos (SHELDON e DOBSON, 2004; SHELDON et al., 2006a; AZAWI, 2008). Sendo assim, falhas ocorridas nos mecanismos de defesa uterino podem resultar em quadros inflamatórios exacerbados e/ou persistentes, com diferentes graus de infecções uterinas, e em alguns casos pode levar à morte do animal (YUNHE et al., 2013).

Os casos de metrite puerperal aguda estão relacionados com a ocorrência de respostas inflamatórias uterina e sistêmica contra altas densidades de bactérias

patogênicas, como algumas cepas bacterianas de *E. coli*, principal microrganismo isolado no conteúdo uterino nas primeiras semanas após o parto. A *E. coli* aumenta a suscetibilidade do ambiente uterino à contaminação por patógenos anaeróbicos por meio da produção de fatores de crescimento e redução da atividade neutrofílica. A *E. coli* também está relacionada com a presença de sinais clínicos sistêmicos, devido à passagem da endotoxina LPS do ambiente uterino para a circulação sanguínea, o que pode desencadear quadros febris. Por outro lado, os quadros de endometrite estão relacionados com a permanência de bactérias patogênicas no útero além da terceira semana após o parto, e, conseqüentemente, com a persistência do quadro inflamatório. Sendo assim, os danos acarretados ao endométrio podem ser permanentes (LEWIS, 1997; DOHMEN et al., 2000; WILLIAMS et al., 2005; SHELDON, 2007; FÖLDI et al., 2008; SHELDON et al., 2009).

De acordo com a classificação histopatológica, a metrite está relacionada com a inflamação de todas as camadas do útero, enquanto a endometrite está associada à inflamação das camadas superficiais, que não se estendem além do estrato esponjoso (BONDURANT, 1999). Nos quadros de metrite, todas as camadas da parede uterina incluindo o endométrio, a submucosa, o miométrio e a serosa são afetadas pela resposta inflamatória, apresentando hemorragia, edema, infiltração de leucócitos e degeneração tecidual. Nos quadros de endometrite, são observadas alterações na superfície do epitélio uterino, com infiltração de células inflamatórias e congestão vascular relacionadas com atraso no processo de involução uterina. Durante o processo de recuperação do endométrio, pode ocorrer fibrose e leucocitose, seguidas de atrofia e depleção das glândulas endometriais. Em ambas as condições a mucosa encontra-se congestionada, verificando-se infiltrações de leucócitos em resposta a bactérias patogênicas, tais como *E. coli*, *T. pyogenes*, *F. necrophorum* e *P. melaninogenica* (BONDURANT, 1999; SHELDON e DOBSON, 2004; SHELDON et al., 2004c; CHAPWANYA et al., 2009; CHAPWANYA et al., 2010).

Diante do exposto a incidência de infecções uterinas é bastante variável dependendo da definição adotada para os quadros de infecção, do período após o parto no qual a doença é detectada, dos métodos de diagnóstico, da raça, da ordem de parto, das características do rebanho e das práticas de manejo (LEWIS, 1997; LEBLANC, 2002; BARLUND et al., 2008; DUBUC et al., 2010).

4. REFERÊNCIAS

- AHMADI, M.R.; NAZIFI, S.; GHASARI, H.R. Comparison of hormonal changes of estrous cycle with cytology of cervical mucosa and hematological parameters in dairy heifers. *Comparative Clinical Pathologic*, London, v.15, p.94-97, 2006.
- AMJADI, F.; SALEHI, E.; MEHDIZADEH, M. Aflatoonian. Role of the innate immunity in female reproductive tract. *Adv Biomed Res*, v.3, p.1-37, 2014.
- AZAWI, O.I. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.105, p.187-208, 2008.
- BAISHYA, N.; COOPER, M.J.; HART, I.C.; JACKSON, P.S.; FURR, B.J.A.; JENKIN, G.; POPE, G.S. Effects of luteolytic doses of prostaglandin F2 and cloprostenol on concentrations of progesterone, luteinizing hormone, folliclestimulating hormone, glucose, insulin, growth hormone, thyroxine, prolactin and cortisol in jugular plasma of lactating dairy cows. *British Veterinary Journal*, London, v.150, p.570-583, 1994.
- BALL, P.J.H.; PETERS, A.R. *Reproduction in cattle*. Grã Bretanha: Blackwell, 2004.
- BARLUND, C. S.; CARRUTHERS, T. D; WALDNER, C. L. et al. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*, v.69, p.714-723, 2008.
- BAUMAN, D.E.; CURRIE, W.B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, v.63, n.9, p.1514-1529, 1980.
- BELL. M.J.; ROBERTS, D.J. The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. *Theriogenology*, Stoneham, v. 68, p.1074-1079, 2007.
- BOBE, G.; YOUNG, J. W.; BEITZ, D. C. Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.3105-3124, 2004.
- BONDURANT, R. H. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.101-110, 1999.

BUSATO, A.; FAISSLER, D.; KÜPFER, U.; BLUM, J. W. Body Condition Scores in Dairy Cows: Associations with Metabolic and Endocrine Changes in Healthy Dairy Cows. *Journal of Veterinary Medicine*, v.49, p.455–460, 2002.

CHAPWANYA, A. Uterine disease in dairy cows: classification, diagnosis and key roles for veterinarians. *Ir. Vet. J.* v.61, p.183, 2008.

CHAPWANYA, A.; MEADE, K.G.; DOHERTY, M.L.; CALLANAN, J.J.; MEE, J.F.; O'FARRELLY, C. Histopathological and molecular evaluation of Holstein–Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology*, v.71, p.1396–1407, 2009.

CHAPWANYA, A.; MEADE, K. G.; NARCIANDI, F. et al. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research Tool in bovine reproduction. *Theriogenology*, v.73, p.988–994, 2010.

CROWE, M.A. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod Domest Anim.* v.43, p.20–28, 2008.

CULLOR, J. S.; FAIRLEY, N.; SMITH, W. L.; WOOD, S. L.; DELLINGER, J. D.; INOKUMA, M. S.; SOUZA, I. M. Hemogram changes in lactating dairy cows given human recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Veterinary Pathobiology, Stillwater*, v.27, n.5, p.311–316, 1990.

DAVIES, D.; MEADE, K.G.; HERATH, S.; ECKERSALL, P.D.; GONZALEZ, D.; WHITE, J.O.; CONLAN, R.S.; O'FARRELLY, C.; SHELDON, I.M. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod Biol Endocrinol*, v.6, p.1–12, 2008.

DOBSON, H.; WALKER, S.; MORRIS, M.; ROUTLY, J.; SMITH, R. Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows? *Animal* v.2, p.1104–1111, 2008.

DOHMEN, M. J. W.; JOOP, K.; STURK, A. et al. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology*, v.54, p.1019–1032, 2000.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 2259-2273, 1999.

DRACKLEY, J. K.; DANN, H. M.; NEIL DOUGLAS, G.; JANOVICK GURETZKY, N. A.; LITHERLAND, N.B.; UNDERWOOD, J. P.; LOOR, J. J. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital. J. Animal Science* v.4, p.323-344, 2005.

DUBUC, J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; et al. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.93, p.5764-5771, 2010.

EMBRAPA. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistemaproducao/>. Acessado em 12 de junho de 2017. 2011.

ESPOSITO, G.; IRONS, P. C.; WEBB, E. C.; CHAPWANYA, A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v.144, p.60–71, 2014.

FELDMAN, B.F. et al. *Schalm's veterinary hematology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1344p. 2000.

FERNANDES, C. A. C.; FIGUEIREDO, A. C. S. Avanços na utilização de prostaglandinas na reprodução de bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, p.406-414, 2007.

FISCHER, C.; DRILLICH, M.; ODAU, S.; HEUWIESER, W.; EINSPANIER, R.; GABLER, C. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod. Fertil. Dev.* v.22, p.818–829, 2010.

FÖLDI, J.; KULCSAR, M.; PECSI, A.; HUYGHE, B.; DE SA, C.; LOHUIS, J.; COX, P.; HUSZENICZA, G. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* v.96, p.265–281, 2006.

FÖLDI, J.; PÉCSI, A.; SZABÓ, J. et al. The pathogens and cause of uterine diseases. In: 16th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2008, Hungary. *Anais... Hungary*: p.5, 2008.

GALVÃO, K.; SANTOS, N.; GALVÃO, J.; GILBERT, R.; 2011. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology*, v.76, p.290–299, 2011.

GAMBARINI, M. L. Untersuchungen zum Gerinnungstatus und zur Gesamtoestrogen- sowie Prostaglandinkonzentration in peripartalen Zeitraum beim Rind. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Veterinária, Hannover. 85p., 1989.

GAUTAM, G.; NAKAO, T.; YUSUF, M.; KOIKE, K. Prevalence of endometritis during the postpartum period and its impact on subsequent reproductive performance in two Japanese dairy herds. *Anim. Reprod. Sci.* v.116, p.175–187, 2009.

GILBERT, R.; SANTOS, N.; GALVÃO, K.; BRITTIN, S.; ROMAN, H. The relationship between postpartum uterine bacterial infection (BI) and subclinical endometritis (SE). *J. Dairy Sci.* v.90, p.469, 2007.

GOFF, J. P.; HORST, R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.1260-1268, 1997.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H. *Obstetrícia Veterinária*. Ed. Sulina, Porto Alegre, p.106-138, 1982.

HAMMON, D. S.; EVJEN, I. M.; DHIMAN, T. R.; GOFF, J. P.; WALTERS, J. L. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Veterinary Immunology and immunopathology*, v.113, n. 1-2, p.21-29, 2006.

HANSEN, P.J. Maternal immunological adjustments to pregnancy and parturition in ruminants and possible implications for postpartum uterine health: is there a prepartum-postpartum nexus? *J Anim Sci*, v.91, p.1639- 1649, 2013.

HENRY, C.J. et al. Veterinary uses of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Part I. Oncology. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.20, n.6, p.728-734, 1998.

HERATH, S. DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. *Journal of Reproductive immunology*, Amsterdam, v.69, p.13-22, 2006a.

HERATH, S.; FISCHER, D.P.; WERLING, D.; WILLIAMS, E.J.; LILLY, S.T.; DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology*, v.147, p.562-570, 2006b.

HICKEY, D.K.; PATEL, M.V.; FAHEY, J.V.; WIRA, C.R. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol*, v.88, p.185-194, 2011.

HORTA, A. E. M. Fisiologia do puerpério na vaca. In: VIII JORNADAS INTERNACIONALES DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 1995, Santander. Anais... Santander: AERA, p. 3-84, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2015. Efetivo dos rebanhos em 31.12 e variação anual, segundo as categorias. Quantidade e valor dos produtos de origem animal e variação anual. Disponível em: Acesso em: 03 de novembro de 2016.

JANEWAY, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annual Rev Immunol*, v.20, p.197-216, 2002.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T.; FOSTER, R.; GARTLEY, C.; LESLIE, K.; WALTON, J.; JOHNSON, W. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* v.62, p.9–23, 2004.

KORNMATITSUK, B.; VERONESE, M.C.; MADEJ, A.; DAHL, E.; ROPSTAD, E.; BECKERS, J.F.; FORSBERG, M.; GUSTAFSSON, H.; KINDHAL, H. Hormonal measurements in late pregnancy and parturition in dairy cows – possible tools to monitor foetal well being. *Animal Reproduction Science, Amsterdam*, v.72, p.153-164, 2002.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.2223-2236, 2002.

LEVKUT, M; PISTL, J.; REVAJOVÁ, V.; CHOMA, F.; LEVKUTOVÁ, M.; DÁVID, V. Comparison of immune parameters in cows with normal and prolonged involution time of uterus, *Vet Med, Czech*, v.47, n.10-11, p.277-282, 2002.

LEBLANC, S.J. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reprod Domest Anim*, v.47, suppl.5, p.18-30, 2012.

LEWIS, G.S. Uterine health and disorders. *J Dairy Sci*, v.80, p.984-994, 1997.

LEWIS, G. S. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. *Reprod. Biol. End.*, v.1, p.1-8, 2003.

MARTINS, T.M.; SANTOS, R.L.; PAIXÃO, T.A.; COSTA, E.A.; PIRES, A.C.; BORGES, A;M. Aspectos reprodutivos e produtivos de vacas da raça Holandesa com puerpério normal ou patológico. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.65, p.1348-1356, 2013.

MARTINS, T.M. Avaliação da imunidade inata uterina em vacas: transcrição endometrial de receptores de padrões moleculares microbianos no pós-parto e histopatologia após infusão de *Escherichia coli* inativada na fase de estro. 2014. 172p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, MG, 2014.

MARTINS, T. M.; BORGES, A. M. Imunologia Uterina e Fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte, v.39, n.1, p.129-135, jan./mar. 2015.

MCENTEE, K. Reproductive pathology of domestic mammals. Philadelphia: Lea & Febiger, p.125-131, 1990.

METTE, C.; CAMILLA DOOLEWEERDT, B.; STINE, J.; ANDERS MIKI, B.; HENRIK, L.J. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro-and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.138, p.95–105, 2010.

MONTEIRO, C.M.R.; FARIAS, E.C.; PERRI, S.H.V.; SOUZA, W.M. Estudo das características histológicas do útero e tubas uterinas de vacas e novilhas da raça Nelore. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.40, p.45-54, 2003.

NAZIFI, S.; AHMADI, M.R.; GHEISARI, H.R. Hematological changes of dairy cows in postpartum period and early pregnancy. *Comparative Clinical Pathologic*, London, v.17, p.157-163, 2008.

NOAKES, D.E.; PARKINSON, T.J.; ENGLAND, G.C.W.; ARTHUR, G.H. Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. 8th ed, Elsevier Science Ltda, p.129-212, 2002.

OLSON, J.D.; BRETZALAFF, K.N.; MORTIMER, R.G.; BALL, L. The metritis-pyometra complex. In: Morrow DA (Ed.). Current therapy in theriogenology. Philadelphia: Saunders, p.227-236, 1986.

POTTER, T.J.; GUITIAN, J.; FISHWICK, J.; GORDON, P.J.; SHELDON, I.M. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. Theriogenology, v.74, p.127-134, 2010.

REWERTS, J.M.; HENRY, C.J. Veterinary uses of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Part II. Infectious Diseases. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, v.20, n.7, p.823-827, 1998.

ROACH, D.R.; BEAN, A.G.D.; DEMANGEL, C.; FRANCE, M.P.; BRISCOE, H.; BRITTON, W.J. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. J. Immunol. v.168, p.4620-4627, 2002.

SAUL, J. P. E.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Influência do período pós-parto sobre o leucograma de fêmeas bovinas da raça holandesa. Braz. J. vet. Res. anim. Sci., São Paulo, v.43, n.5, p.588-597, 2006.

SANTOS, F.C. Uso De cloprostenol e cipionato de estradiol, durante o puerpério, sobre a saúde uterina e a eficiência reprodutiva em fêmeas girolando. Dissertação apresentada para obtenção do Grau de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2009.

SHELDON, I.M.; NOAKES, D.E.; RYCROFT, A. N.; DOBSON, H. The effect of intrauterine administration of estradiol on postpartum uterine involution in cattle. Theriogenology, Stoneham, v.59, p.1357-1371, 2003.

SHELDON, I. M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. Anim. Reprod. Sci., v.82-83, p.295-306, 2004.

SHELDON, I.M. The postpartum uterus. Veterinary Clinics Food Animal Practice, Philadelphia, v.20, p.569-591, 2004.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A. N. et al. The effect of intrauterine administration of estradiol on postpartum uterine bacterial infection in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.81, p.13-23, 2004a.

SHELDON, I.; BUSHNELL, M.; MONTGOMERY, J.; RYCROFT, A. Minimum inhibitory concentrations of some antimicrobial drugs against bacteria causing uterine infections in cattle. *Vet. Rec.* v.155, p.383–387, 2004b.

SHELDON, I.; RYCROFT, A.; ZHOU, C. Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle. *Vet. Rec.* v.154, p.289–293, 2004c.

SHELDON, I.M.; LEWIS, G.S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R.O. Defining postpartum uterine disease in dairy cattle. *Theriogenology*, v.65, p.1516-1530, 2006a.

SHELDON, I.M.; WATHES, D.C.; DOBSON, H. The management of bovine reproduction in elite herds. *Vet. J.* v.171, p.70–78, 2006b.

SHELDON, M. Endometritis in cattle: pathogenesis, consequences for fertility, diagnosis and therapeutic recommendations. *Part. Reprod.*, v.2, p.1-5, 2007.

SHELDON, I.M.; PRICE, S.B.; CRONIN, J.; GILBERT, R.O.; GADSBY, J.E. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Vet J.*, v.176, p.115-121, 2008a.

SHELDON, I.M.; WILLIAMS, E.J.; MILLER, A.N.A.; NASH, D.M.; HERATH, S. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J.*, v.176, p.115-121, 2008b.

SHELDON, I. M.; CRONIN, J.; GOETZE, L. et al. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.*, v.81, p.1025-1032, 2009.

SHELDON, I.M.; PRICE, S.B.; CRONIN, J.; GILBERT, R.O.; GADSBY, J.E. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.1-9, 2009b.

SHELDON, I.M.; ROBERTS, M.H. Toll-like receptor 4 mediates the response of epithelial and stromal cells to lipopolysaccharide in the endometrium. *PloS One*, v.5, 10p., 2010.

SHELDON, I.M.; CRONIN, J.; BORGES, A. The postpartum period and modern dairy cow fertility: Part 1: Uterine function. *Livest. Sci.* v.16, p.14–18, 2011.

SHRESTHA, H.K.; NAKAO, T.; SUZUKI, T.; HIGAKI, T.; AKITA, M. Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period postpartum on subsequent reproductive performance of highproducing Holstein cows. *Theriogenology*, v.61, p.1559-1571, 2004.

SORDILLO, L.M.; CONTRERAS, G.A.; AITKEN, S.L. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim Health Res Rev*, v.10, p.53-63, 2009.

STOCK, L.A.; CARNEIRO, A.V.; CARVALHO, G.R.; ZOCCAL, R.; MARTINS, P.C.; YAMAGUCHI, L.C.T. Sistemas de produção e sua representatividade na produção de leite no Brasil. In: Reunião da Associação Latino-americana de Produção Animal, Cuzco. Anais, ALPA. p.17-18, 2008.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Leukocytes. In: *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Iowa: Iowa State, c.3, p.49-83, 2002.

SWANGCHAN-UTHAI, T.; LAVENDER, C.R.M.; CHENG, Z.; FOULADI-NASHTA, A.A.; WATHES, D.C. Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide. *Biol Reprod*, v.87, p.1-13, 2012.

TAKEUCHI, O.; AKIRAS. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, v.140, p.805-820, 2010.

TURNER, M.L.; HEALEY, G.D.; SHELDON, I.M. Immunity and inflammation in the uterus. *Reprod Domest Anim*, v.47, suppl.4, p.402-409, 2012.

VILELA, D. Perspectivas para a produção de leite no Brasil. In: *Sinleite – Avanços em produção e manejo de bovinos leiteiros*, Lavras. Anais... Lavras: Universidade Federal de Lavras, p.225-248, 2002.

WENSING, T.; KRUIP, T.; GEELEN, M. J. H.; WENTING, G. H., VAN DEN TOP, A. M. Postpartum fatty liver in high-producing dairy cows in practice and in animal studies. The connection with health, production and reproduction problems. *Comparative Hematology International*, n.7, p.167-171, 1997.

WERLING, D.; JUNGI, T.W. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol*, v.91, p.1-12, 2003.

WILLIAMS, E. L.; FISHER, D. P.; PFEIFFER, D. U. 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.

WILLIAMS, E.J. Drivers of post-partum uterine disease in dairy cattle. *Reprod Dom Anim*, v.48, suppl.1, p.53-58, 2013.

YUNHE, F.; BO, L.; XIAOSHENG, F. et al. Lipopolysaccharide increases Toll-like receptor 4 and downstream Toll-like receptor signaling molecules expression in bovine endometrial epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.151, p.20-27, 2013.

ZERBE, H.; SCHUBERTH, H.J.; ENGELKE, F.; FRANK, J.; KLUG, E.; LEIBOLD, W. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology*, v.60, p.209–223, 2003.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito do uso do Pegbovigrastim sobre resposta leucocitária em vacas Holandesas no pós-parto

Resumo

Com o objetivo de avaliar a resposta leucocitária pelo uso do pegbovigrastim em vacas Holandesas no puerpério, foram acompanhadas 12 fêmeas, divididas em dois grupos, o grupo controle recebendo o placebo (solução fisiológica NaCl 0,09%) e o grupo tratamento recebendo o pegbovigrastim. Os animais receberam de acordo com o grupo tratamento, duas doses, sendo a primeira sete dias antes da data prevista da parição e a segunda com até 24 horas após o parto. Coletou-se amostras sanguíneas para avaliação da contagem total e diferencial de leucócitos no sétimo dia antes do parto, no dia do parto e com sete, quatorze e 21 dias pós-parto, e obteve-se células por meio de citologia esfoliativa no útero em três momentos, com 7, 14 e 21 dias pós-parto. Houve variação na quantidade de leucócitos ($p < .0001$) entre os grupos, principalmente devido ao aumento na quantidade de neutrófilos segmentados, o grupo tratamento no sétimo dia pós-parto apresentou $19.935,5 \pm 11.453,38$ cél/ μ L de sangue enquanto que o grupo controle apresentou $3.395,75 \pm 1518,87$ cél/ μ L de sangue ($p < 0,0004$). Não houve diferenças significativas na citologia uterina. Pode-se concluir que o pegbovigrastim causa um aumento das células polimorfonucleares circulantes principalmente neutrófilos segmentados no pós-parto.

Palavras chave: Neutrófilos, puerpério, citologia uterina, G-CSF.

Abstract

In order to evaluate the leukocytic response with the use of pegbovigrastim in Holstein cows in the puerperium, 12 females were divided into two groups: the control group receiving placebo (NaCl physiological solution 0.09%) and the treatment group receiving pegbovigrastim. The animals received, according to the treatment group, two doses, the first being seven days before the expected date of calving and the second with up to 24 hours postpartum. Blood samples were collected for evaluation of the total and differential count of leukocytes on the seventh day before delivery, on the day of delivery and at 7, 14 and 21 days postpartum. Also, cells were obtained by exfoliative cytology in the uterus in three moments, with 7, 14 and 21 days postpartum. There was a variation in the number of leukocytes ($p < .0001$) between the groups, mainly due to the increase in

1 the amount of segmented neutrophils, the treatment group on the seventh day postpartum
2 presented $19,935.5 \pm 11,453.38$ cells / μL of blood while the control group had $3,395.75$
3 ± 1518.87 cells / μL of blood ($p < 0.0004$). There were no significant differences in uterine
4 cytology. It can be concluded that pebovigrastim causes an increase in circulating
5 polymorphonuclear cells, mainly segmented neutrophils at postpartum.

6 Key words: Neutrophils, puerperium, uterine cytology, G-CSF.

7 **Introdução**

8 O Brasil produziu em 2010, 30,7 bilhões de litros de leite, totalizando 4,42% da
9 produção mundial. Na década de 2000 a produção cresceu em média 4,4% ao ano, a
10 segunda maior taxa anual de crescimento do mundo (EMBRAPA, 2017). Segundo Vilela
11 (2002) a produção de leite ocupa espaço de destaque no agronegócio brasileiro e com
12 perspectiva de expandir nos próximos anos.

13 O efetivo bovino do estado de Pernambuco (PE) é de 1.948.357 animais, onde
14 25,21% das vacas ordenhadas são responsáveis pela produção de 855.102 litros de leite,
15 gerando uma renda de cerca de R\$ 987.483,00. O município de São Bento do Una,
16 localizado no agreste de PE, distante 215 Km da capital Recife, é responsável pela
17 produção de 47.900 litros de leite, estabelecendo uma renda de R\$ 50.295,00 anuais
18 (IBGE, 2015).

19 Apesar da grande quantidade de animais, o Brasil é um dos países que apresenta
20 menor produtividade por vaca, isso se deve ao baixo valor genético dos animais, o que se
21 reflete em animais pouco produtivos, além do manejo inadequado e falhas no
22 gerenciamento das empresas rurais (SANTOS, 2009). Medidas que visem minimizar tais
23 problemas podem ser um fator importante para o aumento do lucro e para a permanência
24 do produtor na cadeia produtiva do leite.

25 Bell e Roberts (2007) estudaram o impacto das infecções uterinas no desempenho
26 do gado leiteiro, durante os anos de 1990 e 2005, e relataram que fatores como o número
27 de partos da matriz, o número de bezerros no parto e a apresentação do bezerro no parto
28 estão relacionados com o aumento do número de endometrites nas vacas. De acordo com
29 o mesmo estudo, as infecções uterinas promovem aumento significativo no intervalo
30 parto/concepção e na produção de leite das vacas.

31 O fator estimulante de colônia (CSF) é um grupo de citocinas necessárias para a
32 proliferação e diferenciação de uma variedade de células tronco hematopoiéticas. Esses

1 fatores de crescimento são glicoproteínas distintas que se ligam às células por meio de
2 um receptor comum. São produzidos por uma variedade de células, incluindo
3 fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e células T (CULLOR, 1990). Cada CSF-
4 alvo tende a uma linhagem celular específica para expandir ou ativar sua função. A
5 influência marcante do fator estimulante de colônia - Granulócitos (G-CSF) em
6 populações de células fagocíticas sugere possíveis aplicações clínicas na prevenção de
7 doenças infecciosas bacterianas, como a mastite e a metrite (CULLOR, 1990).

8 Gautam et al. (2009) e Bell e Roberts (2007) destacam em seus estudos sobre
9 endometrite, o grande impacto negativo que esta afecção apresenta quanto ao
10 desempenho reprodutivo, fazendo-se necessário a adoção de práticas que melhorem a
11 imunidade dos animais.

12 Para combater os problemas reprodutivos e conseqüentemente aumentar a
13 produtividade dos animais é necessário estabelecer protocolos terapêuticos e de manejo
14 visando aumentar a imunidade do animal no período crítico de transição. Para isso,
15 estratégias de manejo são utilizadas desejando melhoria na produção dos rebanhos. Entre
16 elas pode-se destacar a administração de pegbovigrastim, forma modificada do fator
17 estimulador de colônias de granulócitos bovinos (bG-CSF) conjugado com
18 polietilenoglicol (PEG), com o objetivo de prolongar o tempo de permanência do fármaco
19 no sangue. Pretendendo a melhora dos índices produtivos dos animais produtores de leite,
20 por meio do combate a infecções no período de transição.

21 Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito da administração de
22 pegbovigrastim sobre a resposta leucocitária sistêmica e uterina em fêmeas bovinas da
23 raça Holandesa no pós-parto.

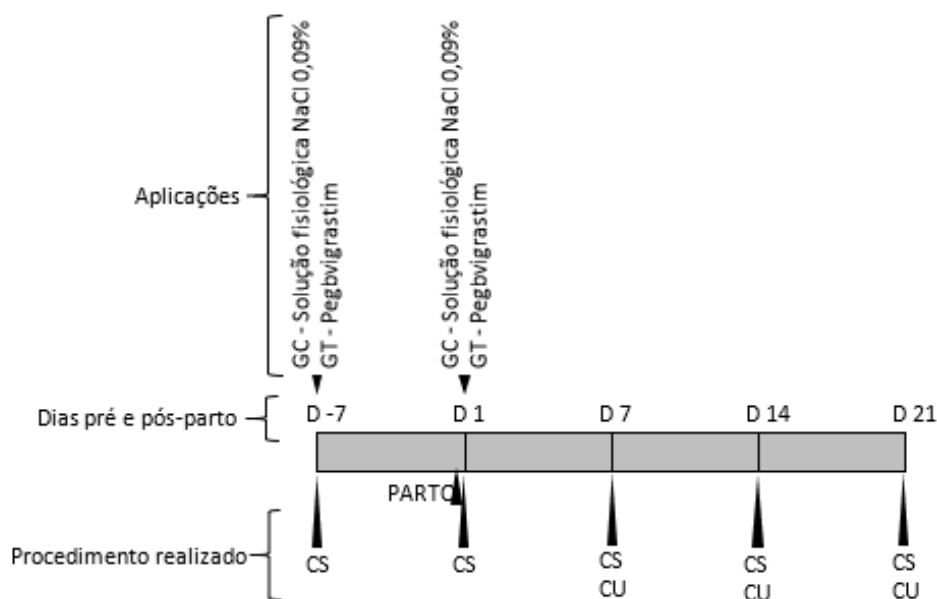
24 **Material e Métodos**

25 O experimento foi realizado na Estação Experimental de São Bento do Una,
26 pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizada no município de
27 São Bento do Una (latitude 08°31'36"S e longitude 36°27'35"O) no agreste
28 pernambucano, 614 metros acima do nível do mar, com clima tropical tipo Aw segundo
29 classificação climática de Köppen-Geiger (RUBEL e KOTTEK, 2010), temperatura
30 média anual de 22,0°C e pluviosidade média anual de 288 milímetros.

31 Foram acompanhadas 12 (doze) vacas pluríparas da raça Holandesa, do sétimo dia
32 antes do parto até o 21º dia pós-parto. As vacas apresentaram, antes do parto, peso médio

1 de 500,0 ± 15,0 kg e produção média de leite de 20,0 ± 0,5 kg, manejadas em sistema de
 2 confinamento “free stall”, com fornecimento água *ad libitum* e de dieta total (volumoso,
 3 concentrado e mineral) formulada de acordo com as exigências nutricionais de produção
 4 para a categoria animal estudada (NRC, 2001). Os animais foram previamente
 5 sincronizados e inseminados, sendo possível estabelecer a data prevista do parto. As vacas
 6 foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos de 6 (seis) animais: grupo tratamento
 7 (GT), que recebeu duas aplicações, por via subcutânea, no pescoço, de pegbovigrastim,
 8 seguindo as recomendações do fabricante, sendo a primeira aproximadamente sete dias
 9 antes da data esperada do parto e a segunda até 24 horas pós-parto; grupo controle (GC),
 10 que recebeu duas aplicações, por via subcutânea, no pescoço, de solução fisiológica de
 11 NaCl 0,09% seguindo o mesmo protocolo do grupo tratado. Foi utilizada uma
 12 amostragem de 66,7% (4 animais) de cada grupo, para realizar a leucometria.

13 No período compreendido entre o sétimo dia antes da previsão do parto e 21 dias
 14 pós-parto foram colhidas amostras de sangue, para a realização do leucograma, em cinco
 15 momentos diferentes: sete dias antes do parto (D -7), até 24 horas após o parto (D1), sete
 16 dias pós-parto (D7), 14º dia pós-parto (D14) e 21 dias pós-parto (D21). Realizou-se,
 17 também, coletas de material uterino por meio de citologia esfoliativa endometrial em três
 18 momentos diferentes: sete dias pós-parto (D7), 14º dia pós-parto (D14) e 21 dias pós-
 19 parto (D21) (Figura 1).



20 CS = Coleta sanguínea, CU = Citologia uterina, GC = Grupo controle, GT = Grupo tratamento.

21 Figura 1 - Esquema de aplicações e coletas de material hematológico e uterino dos
 22 animais avaliados
 23

1 As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular externa,
2 utilizando-se vacutainer constituído de agulhas 25 x 8 mm (21G), acopladas a tubos
3 siliconizados, contendo uma solução aquosa de etileno diamino tetracetato tripotássico
4 (EDTA-K3) a 15 %, e com vácuo suficiente para aspirar 4 ml de sangue.

5 A contagem pelo método manual de leucócitos foi realizada em câmara de
6 Neubauer de acordo com Weiser (2012). Com o sangue *in natura* foram confeccionados
7 dois esfregaços sanguíneos destinados à contagem diferencial de leucócitos. Esses
8 esfregaços, após secarem, foram corados utilizando o kit panótico rápido, de acordo com
9 o protocolo recomendado pelo fabricante. Em cada esfregaço sanguíneo foram
10 identificados 100 leucócitos e classificados, de acordo com suas características
11 morfológicas e tintoriais, em neutrófilos com núcleo em bastonete, neutrófilos com
12 núcleo segmentado, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos.

13 Para realização da citologia esfoliativa, a amostra foi obtida por meio de escova
14 ginecológica humana adaptada para grandes animais, segundo descrito por
15 KASIMANICKAM et al. (2004). As escovas ginecológicas estéreis, apresentadas em
16 pacotes unitários, foram primeiramente cortadas (ajustando-as para 10 cm de
17 comprimento) e posteriormente encaixadas a um aplicador de sêmen convencional sem o
18 mandril. Somente então, após a fixação no aplicador, a embalagem plástica do lado da
19 escova foi rompida. A escova acoplada ao aplicador permaneceu revestida com uma
20 bainha de inseminação artificial convencional. A extremidade da bainha foi cortada para
21 permitir a passagem da escova. A coleta foi realizada de acordo com Santos (2009).

22 Após a coleta o aplicador foi cuidadosamente retirado da vaca e imediatamente, o
23 material foi transferido para lâminas por imprint em triplicata. As lâminas foram fixadas
24 imediatamente em álcool metílico e encaminhadas ao laboratório de Histopatologia do
25 Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, onde se procedeu a coloração. A
26 coloração foi realizada utilizando o kit panótico rápido seguindo a mesma técnica
27 realizada para esfregaços sanguíneos. Após a coloração as lâminas foram visualizadas em
28 microscópio óptico, com aumento de 40 vezes, em que foram contadas 100 células e
29 diferenciando-as em neutrófilos segmentados e demais tipos celulares, com o objetivo de
30 avaliar o infiltrado de neutrófilos no tecido pesquisado.

31 O modelo experimental utilizado foi inteiramente casualizado com dois grupos e
32 seis repetições por grupo, categorizados com base nos períodos do pré-parto, parto e pós-

1 parto. Os dados foram testados quanto à sua distribuição normal, utilizando-se o teste de
 2 Kolmogorov-Smirnov, sendo expressos em medidas de tendência central e processados
 3 utilizando-se o procedimento GLM do SAS - Statistical Analysis System (SAS, 2009)
 4 para análise de variância (ANOVA) como medida repetida no tempo. No caso de
 5 significância da ANOVA, o contraste de médias foi realizado pela diferença mínima
 6 significativa do teste de Student-Newman-Keuls. Foi considerado 5 % de probabilidade
 7 para análise dos dados.

8 **Resultados e discussão**

9 Em relação aos grupos verificou-se variação na quantidade total de leucócitos,
 10 linfócitos, neutrófilos segmentados, eosinófilos e monócitos. Entre os momentos
 11 verificou-se variação na quantidade de neutrófilos segmentados, sendo esta variável
 12 também a única que apresentou diferenças significativas na interação entre grupos e
 13 momentos (Tabela 1).

14 Tabela 1 -Análise de variância das variáveis hematológicas em vacas Holandesas no
 15 período pós-parto tratadas ou não com pegbovigrastim (IPA, São Bento do Una – PE)

Variáveis Hematológicas	Efeito de ANOVA		
	Grupos	Momentos	Grupos x Momentos
Leucócitos	<.0001	0,1398	0,0860
Linfócitos	0,0099	0,9350	0,8404
Neutrófilos segmentados	0,0004	0,0286	0,0190
Bastonetes	0,1779	0,7419	0,7785
Eosinófilos	0,0003	0,0761	0,0818
Monócitos	0,0005	0,6225	0,4820

16

17 No sétimo dia pós-parto houve variação na quantidade de neutrófilos segmentados
 18 entre os animais do grupo tratamento, bem como, existiu variação na média geral desta
 19 variável entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Médias, desvio-padrão, medianas e percentis (P25 e P75) do leucograma em vacas Holandesas no período de transição tratadas ou não com 38 pegbovigastim (IPA, São Bento do Una – PE)

Grupos	Dias de coleta (pré e pós-parto)					MG
	D -7	D 1	D 7	D 14	D 21	
Leucócitos Totais						
Controle	14.385 ± 2.793,87 14.700 (12.180; 16.170)	14.910 ± 6.658,47 14.280 (9.870; 19.950)	12.442 ± 5.038,18 13.020 (8.820; 16.065)	11.760 ± 5.550,78 11.340 (7.980; 15.540)	13.380 ± 3.505,85 14.160 (10.815; 15.945)	13.376^{b*}
Tratamento	16.170 ± 4.828,48 17.325 (12.390; 19.950)	29.347 ± 7.701,35 28.985 (24.885; 33.810)	35.332 ± 11.932,95 37.170 (26.355; 44.310)	23.887 ± 12.192,52 20.160 (16.695; 31.080)	22.010 ± 6.090,89 21.315 (18.060; 25.961)	25.350^a
MG	15.278^{A**}	17.695^A	17.824^A	22.129^A	23.888^A	
Linfócitos						
Controle	7.833 ± 2.399,11 8.400 (6.043,5; 9.622,5)	7.752,75 ± 2.698,77 8.240,5 (6.030; 9.475,5)	7.863,25 ± 3.973,63 8.245 (5.393; 10.333,5)	6.601,25 ± 2.576,85 7.581 (4.937; 8.265,5)	7.129 ± 2.757,22 6.640 (4.649; 10.098)	7.452^b
Tratamento	8.823,5 ± 3.069,74 7.382,5 (7.206; 10.441)	12.778,50 ± 4.899,78 11.292,5 (9.713; 15.843)	12.108,50 ± 4.144,33 11.993 (9.030; 1.518)	12.682,75 ± 10.554,57 8.771,5 (6.701; 18.664)	13.167,67 ± 5.648,77 12.886 (7.665; 18.952)	11.846^a
MG	8.328^A	9.642^A	9.986^A	10.148^A	10.266^A	
Neutrófilos Segmentados						
Controle	4.349,25 ± 2.053,67 ^{Aa} 4.338,5 (2.633; 6.065)	5.708,5 ± 4.579,68 ^{Aa} 4.572 (2.105; 9.311,5)	3.395,75 ± 1.518,87 ^{Ba} 3.137,5 (2.293; 4.498)	4.017,5 ± 3.399,96 ^{Aa} 2.652,5 (2.159; 5.876)	3.799 ± 1.031,25 ^{Aa} 3.825 (2.755; 4.817)	4.278^b
Tratamento	5.014,5 ± 2.879,15 ^{Ab} 4.607 (3.059; 6.969)	12.289,25 ± 4.685,12 ^{Aab} 13.091,5 (9.023; 15.555)	19.935,5 ± 11.453,38 ^{Aa} 20.330,5 (10.212; 29.658)	8.183,75 ± 1.462,35 ^{Ab} 8.391,5 (7.089; 9.278)	5.726 ± 2.071,42 ^{Ab} 5.678 (3.679; 7.821)	10.467^a
MG	4.682	4.763	6.101	8.999	11.666	
Bastonetes						
Controle	82 ± 164 0 (0; 164)	233 ± 466 0 (0; 466)	14,75 ± 29,5 0 (0; 29)	67,25 ± 81,3034 0,5 (0; 1)	57,33 ± 99,3042 0 (0; 172)	92,6^a
Tratamento	37,25 ± 74,5 0 (0; 74)	515 ± 1.030 0 (0; 1.030)	674,75 ± 1.140,16 165 (0; 1.349)	242,25 ± 398,4356 68.5 (0; 484)	200,67 ± 347,5649 0 (0; 602)	341^a
MG	59,6^A	374^A	344,8^A	154,8^A	129^A	
Eosinófilos						
Controle	397,75 ± 284,8981 310,5 (195; 600)	383,5 ± 441,0453 288 (39; 728)	377,75 ± 584,8341 130,5 (59; 696,5)	126 ± 154,3178 94,5 (0; 252)	413,34 ± 392,4976 459 (0; 781)	335,8^b
Tratamento	473 ± 152,7154 495,5 (345; 600)	1.104,25 ± 920,9247 863,5 (541; 1.667)	765 ± 380,4392 731 (443; 1.086)	1.098,75 ± 850,2425 1.059,5 (407; 1.790,)	2.149 ± 628,2316 2.184 (1.504; 2.759)	1.063,7^a
MG	435,4^B	743,9^{AB}	571,4^{AB}	612,4^{AB}	1.281,2^A	
Monócitos						
Controle	1.038,5 ± 857,8261 1.039,5 (437; 1.640)	833 ± 282,0142 811 (604; 1.062)	791,5 ± 424,9584 642,5 (520; 1.062)	948 ± 466,419 930 (592; 1.304)	910,67 ± 126,1599 918 (781; 1.033)	904^b
Tratamento	1.821,5 ± 1.116,23 1.783 (1.135; 2.507)	2.661 ± 1.505,82 3.021 (1.687; 3.634)	1.849,25 ± 597,8519 2.023,5 (1.482; 2.216)	1.731,5 ± 751,2521 1.806(1.130; 2.333)	1.274 ± 210,1523 1.226 (1.092; 1.504)	1.898,7^a
MG	1.430^A	1.747^A	1.320,4^A	1.339,8^A	1.092,3^A	

1 MG = Média Geral. * Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença ao nível de 5% de probabilidade. ** Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferenças ao nível de
2 5% de probabilidade.

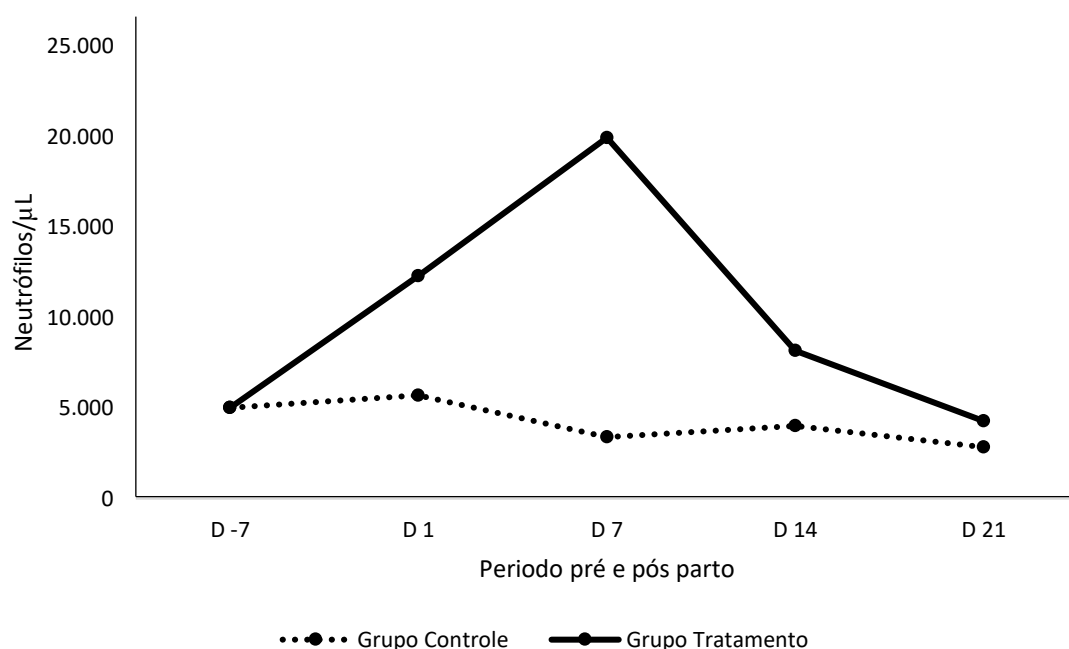
1 As alterações no leucograma de bovinos observadas durante o parto são típicas de
2 uma resposta leucocitária a um quadro de estresse (ESIEVO e MOORE, 1979). Segundo
3 Weiser (2007) o aumento do número de leucócitos no momento do parto está relacionado
4 a processos inflamatórios ocorridos nesta fase de vida da vaca. Taylor (2000) indica que
5 há um aumento gradual de leucócitos à medida que o parto se aproxima, observando-se
6 um pico de aproximadamente 13.000 cel/ μ L nove horas após o parto, voltando aos valores
7 normais três dias após a parição. Esta amplificação do número de leucócitos antes do
8 parto foi observada em todos os animais estudados nesta pesquisa, porém houve um
9 aumento significativo entre os animais do grupo tratado quando comparado aos animais
10 do grupo controle neste período, entre sete dias antes do parto e no dia da parição,
11 evidenciando a ação do pegbovigastim no acréscimo de leucócitos circulantes no animal.

12 De acordo com Saut e Birgel Junior (2006), que estudaram a influência do
13 período pós-parto sobre o leucograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa, verificaram
14 que as variações observadas no leucograma foram decorrentes, particularmente, às
15 alterações no número de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. Eles observaram diminuição
16 gradativa do número de leucócitos entre seis e oito dias pós-parto, a partir deste momento
17 os valores leucocitários oscilam sem que qualquer tendência de diminuição ou aumento
18 possa ser verificada. Dados semelhantes foram obtidos neste estudo, nas vacas do grupo
19 controle, logo após o parto, houve uma diminuição do número de leucócitos,
20 principalmente devido à queda nos valores de neutrófilos segmentados. Já no grupo que
21 recebeu o pegbovigastim o número de neutrófilos segmentados continuou aumentando
22 até sete dias pós-parto, contribuindo para o aumento da quantidade total de leucócitos.

23 O útero de uma vaca no pós-parto é contaminado por uma grande quantidade de
24 bactérias (SHELDON, 2004; SHELDON et al., 2006; AZAWI, 2008), mas a evolução
25 para uma doença uterina depende do sistema imune da vaca, assim como a espécie e
26 quantidade do patógeno (SHELDON et al., 2006). No útero, a defesa celular contra
27 bactérias é realizada por leucócitos polimorfonucleares (DHALIWAL et al., 2001). Os
28 quais exercem um papel importante, pois são a primeira linha de defesa contra a
29 colonização de bactérias no útero (HAMMON e GOFF, 2006). O processo usado pelas
30 células polimorfonucleares para eliminar os patógenos envolve primeiramente fagocitose.
31 Depois ocorrem reações que irão culminar na produção de peróxido de hidrogênio e
32 hipoclorito que irão reagir com os patógenos eliminando-os (HAMMON e GOFF, 2006).
33 Segundo Zerbe et al. (1996) a atividade dos fagócitos polimorfonucleares continua alta

1 durante o período periparto mas a sua capacidade de eliminar patógenos está
2 comprometida.

3 Houve variação no número de neutrófilos segmentados circulantes entre os grupos
4 estudados. Dentre os momentos estudados, houve uma alteração significativa no grupo
5 tratado com pegbovigrastim no sétimo dia pós-parto, comprovando a eficácia do
6 tratamento no aumento da resposta neutrofílica, que segundo Hussain e Daniel (1992),
7 Lewis (1997), Sheldon e Dobson (2004), Hammon et al. (2006) e Azawi (2008) a invasão
8 do ambiente uterino por neutrófilos segmentados em resposta ao desafio proporcionado
9 pela presença de bactérias é considerada a mais importante resposta fagocitária. O
10 pegbovigrastim promove um aumento dessas células circulantes que podem reforçar a
11 resposta imune caso haja infecções bacterianas. Houve variações nas médias de
12 neutrófilos segmentados que ocorreram no período estudado, entre sete dias antes da data
13 prevista do parto até 21 dias pós-parto, evidenciando um pico de células sete dias após a
14 parição coincidindo com o sétimo dia após a aplicação da segunda dose do medicamento
15 (Figura 2).



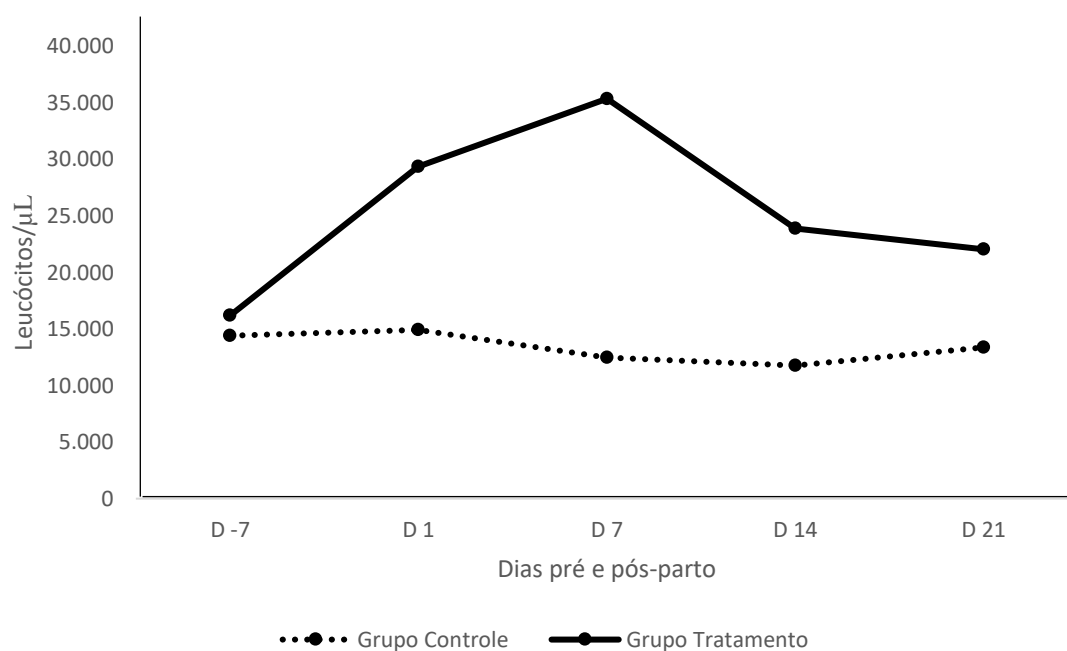
16
17 Figura 2 – Média do número de neutrófilos segmentados circulantes em vacas Holandesas
18 no período de transição pré e pós-parto tratadas ou não com pegbovigrastim (IPA, São
19 Bento do Una – PE)

20 Foi observado aumento do número total de leucócitos, principalmente de
21 neutrófilos segmentados até sete dias após a aplicação da segunda dose do

1 pegbovigrastim, em seguida, há diminuição da quantidade dessas células circulantes,
2 evidenciando a ação do produto até sete dias após a sua aplicação.

3 A regulação da imunidade do endométrio depende de hormônios esteroides e
4 somatotrofinas (SHELDON et al. 2009). Estes hormônios interagem entre si
5 influenciando a função imune do trato reprodutivo. O aumento de progesterona suprime
6 a produção de muco cervical, a contratilidade miometrial, a secreção glandular uterina e
7 a atividade fagocítica dos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) do útero, criando as
8 condições ideais para uma infecção uterina a curto prazo (LEBLANC 2008).

9 Foi verificado no grupo controle, um leve aumento numérico antes do parto
10 seguido de uma diminuição numérica da quantidade de leucócitos a partir do parto,
11 diferindo do grupo tratamento, onde foi observado um aumento contínuo no número total
12 de leucócitos até sete dias após o parto, coincidindo com o sétimo dia após a segunda
13 aplicação do pegbovigrastim (Figura 3).



14

15 Figura 3 – Média do número de leucócitos circulantes em vacas Holandesas no período
16 de transição pré e pós-parto tratadas ou não com pegbovigrastim (IPA, São Bento do Una
17 – PE)

18

19 Del Vecchio et al. (1994) demonstraram que em vacas de corte no pós-parto que
20 receberam infusões intrauterinas de *A. Pyogenes* e *E. Coli* quando as concentrações de
21 progesterona eram basais não desenvolveram infecção uterina, mas quando a infusão foi
feita no momento em que se tinha um corpo lúteo e a concentração de progesterona estava

1 aumentada, todas as vacas desenvolveram infecção uterina. Mostrando a relação da
 2 progesterona sobre a imunidade uterina. Nesta fase o epitélio uterino é menos permeável
 3 a bactérias, como resultado, o sistema leucocitário é estimulado mais tardiamente.
 4 (GUNNINK, 1973).

5 Diferente da progesterona, o estrógeno potencializa a defesa imunológica do útero
 6 ao aumentar a vascularização do endométrio, aumentar a contratilidade do miométrio e
 7 favorecer a produção de muco, auxiliando na limpeza do ambiente uterino (SHELDON
 8 et al., 2003; AZAWI, 2008). Não se sabe se o estrógeno causa um aumento absoluto na
 9 atividade fagocítica e bactericida, ou se o aumento observado é simplesmente quando
 10 comparado ao momento de domínio da progesterona (LEBLANC 2008). A imunidade
 11 do ambiente uterino é reforçada durante o estro, quando o útero se encontra mais
 12 suscetível à invasão de patógenos, e suprimida durante a fase luteal, quando o útero é
 13 preparado para receber o concepto (LEWIS, 2003; AZAWI, 2008).

14 Durante a gestação há um aumento nos níveis de progesterona, produzidos pelo
 15 corpo lúteo e pela placenta do animal, que causa uma diminuição do número de células
 16 de defesa circulantes no organismo, ao se aproximar do parto, ocorre um aumento da
 17 quantidade de estrógeno circulante, induzindo ao aumento do número de leucócitos, como
 18 foi observado nos grupos estudados. Logo após o parto os níveis de estrógenos diminuem
 19 e conseqüentemente decrescem o número de leucócitos (SHELDON, 2004).

20 Neste estudo também foram avaliados a quantidade de infiltrado neutrófilos
 21 presentes no útero, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nem
 22 entre os momentos avaliados (Tabela 3).

23 Tabela 3 – Análise de variância do infiltrado neutrofílico uterino em vacas Holandesas
 24 no período de transição pré e pós-parto tratadas ou não com pegbovigrastim (IPA, São
 25 Bento do Una – PE)

	Efeito de ANOVA		
	Grupos	Momentos	Grupos x Momentos
% de neutrófilos	0,5878	0,4835	0,5797

26

27 A invasão do ambiente uterino por neutrófilos em resposta ao desafio
 28 proporcionado pela presença de bactérias é considerada a mais importante resposta
 29 fagocitária (HUSSAIN e DANIEL, 1992; LEWIS, 1997; SHELDON e DOBSON, 2004;

1 HAMMON et al., 2006; AZAWI, 2008). Na presença de patógenos, os neutrófilos são as
 2 células de defesa recrutadas mais rapidamente da circulação sanguínea para o ambiente
 3 uterino (SHELDON e DOBSON, 2004).

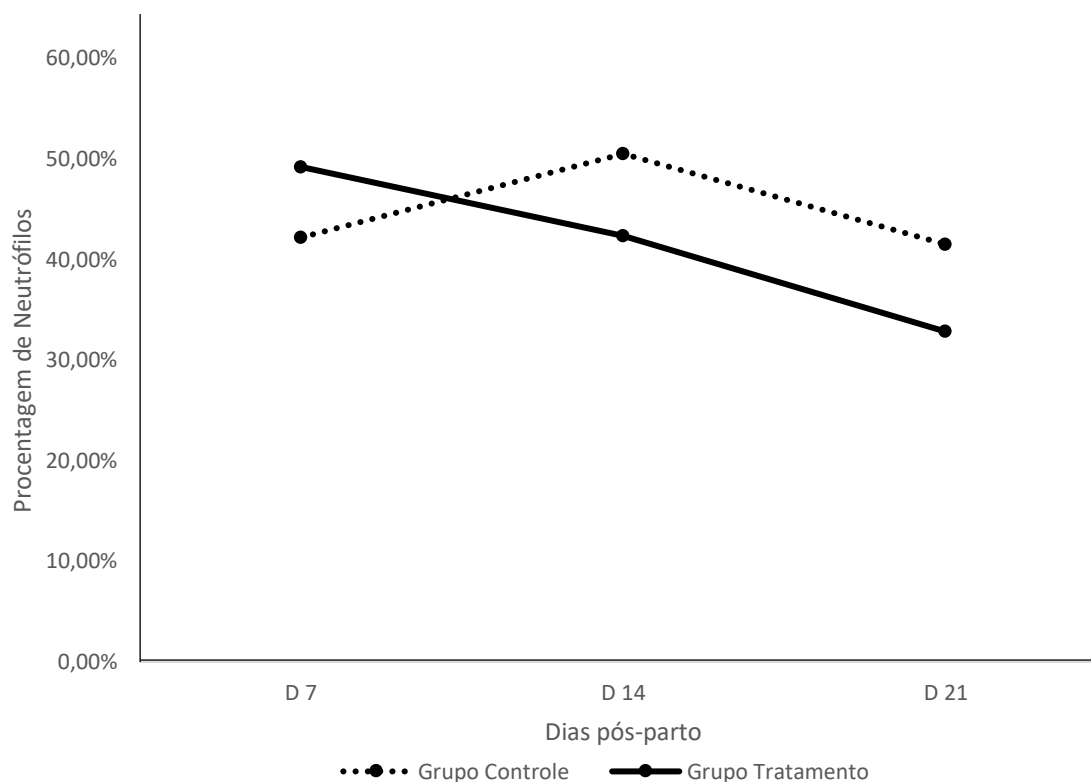
4 Segundo Marques Júnior (1988) e Hussain e Daniel (1992) no pós-parto recente,
 5 as carúnculas promovem a migração dessas células da circulação sanguínea para a
 6 superfície do endométrio por meio da quimiotaxia. Sheldon (2004) estabeleceu que vacas
 7 que apontam na citologia uterina valores acima de 18% de neutrófilos segmentados, entre
 8 o 21° e 33° dia pós-parto, apresentam endometrite de caráter subclínica. Foi observado
 9 em todos os animais valores acima do estabelecido por Sheldon (2004) para a indicação
 10 de endometrite subclínica (Tabela 4), contudo não se pode afirmar que os animais
 11 apresentavam esta enfermidade, mesmo sendo muito comum a ocorrência dela no pós-
 12 parto.

13 Tabela 4 - Médias, desvio-padrão, medianas e percentis (P25 e P75) da porcentagem total
 14 de infiltrado neutrofílico uterino em vacas Holandesas no período de transição tratadas
 15 ou não com pegbovigastim (IPA, São Bento do Una – PE)

Grupos	Dias de coleta pós-parto			
	D 7	D 14	D 21	MG
Controle	42,16 ± 17,04	50,50 ± 20,44	42,50 ± 23,33	44,72 ^{a*}
	38,50 (27; 61)	52,50 (43; 69)	47,00 (18; 62)	
Tratamento	49,20 ± 15,17	42,33 ± 27,43	32,83 ± 12,19	41,00 ^a
	53,00 (34; 59)	50,00 (15; 67)	37,50 (25; 40)	
MG	45,36 ^{A**}	46,41 ^A	37,17 ^A	

16 MG = Média Geral. *Letras minúsculas iguais indicam números estatisticamente iguais entre os grupos,
 17 **letras maiúsculas iguais indicam números estatisticamente semelhantes entre os momentos avaliados.

18 Ao observar os dados obtidos neste estudo, pode-se observar uma tendência de
 19 diminuição da porcentagem de neutrófilos no grupo tratamento, mais rapidamente do que
 20 a observada no grupo controle, indicando que houve tendência de resposta neutrofílica
 21 mais rápida nos animais que receberam o pegbovigastim (Figura 4).



1 Figura 4 – Porcentagem de neutrófilos segmentados presentes no útero de vacas
 2 Holandesas no período de transição tratadas ou não com pegbovigrastim (IPA, São Bento
 3 do Una – PE)

4 Ahmadi et al. (2006) ao realizarem citologia endometrial no período pós-parto de
 5 vacas Holandesas verificaram que durante os 25 a 30 dias pós-parto, a porcentagem de
 6 neutrófilos foi de $8,44\% \pm 0,45$, indicando que os animais estudados possivelmente
 7 apresentavam infecções uterinas de caráter subclínica, no entanto se observou uma
 8 tendência de melhor recuperação nos animais tratados com o pegbovigrastim.

9 Conclusão

10 Nas condições em que este estudo foi realizado, o produto causa aumento na
 11 quantidade total de leucócitos nos animais tratados com o pegbovigrastim, principalmente
 12 neutrófilos segmentados.

13 Referências

14 AHMADI, M.R.; NAZIFI, S.; GHASARI, H.R. Comparison of hormonal changes of
 15 estrous cycle with cytology of cervical mucosa and hematological parameters in dairy
 16 heifers. Comparative Clinical Pathologic, London, v.15, p.94-97, 2006.

17 AZAWI, A. I. Postpartum uterine infection in cattle. Animal Reproduction Science,
 18 v.105, p.187-208, 2008.

- 1 BELL, M.J.; ROBERTS, D.J. The impact of uterine infection on a dairy cow's
2 performance. *Theriogenology*, Stoneham, v.68, p.1074-1079, 2007.
- 3 CULLOR, J. S.; FAIRLEY, N.; SMITH, W. L.; WOOD, S. L.; DELLINGER, J. D.;
4 INOKUMA, M. S.; SOUZA, I. M. Hemogram changes in lactating dairy cows given
5 human recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Veterinary Pathobiology*,
6 Stillwater, v.27, n.5, p.311–316, 1990.
- 7 DEL VECCHIO, R.P.; MATSAS, D.J.; FORTÍN, S.; SPONENBERG, D.P.; LEWIS,
8 G.S. Spontaneous uterine infections are associated with elevated prostaglandin F2 α
9 metabolite concentrations in postpartumdairy cows. *Theriogenology*, v.41, p.413-421,
10 1994.
- 11 DHALIWAL, G.S.; MURRAY, R.D.; Z. WOLDEHIWET, Z. Some aspects of
12 immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Animal*
13 *Reproduction Science*, v.67, p.135–152, 2001.
- 14 EMBRAPA. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/sistemaproducao/>. Acessado
15 em 12 de junho de 2017.
- 16 ESIEVO, K. A.; MOORE, W. E. Effects of dietary protein and stage of lactation on the
17 hematology and erythrocyte enzymes activities of high-producing dairy cattle. *Research*
18 *in Veterinary Science*, v.26, n.1, p.53-58, 1979.
- 19 GUNNINK, J.W. Een Onderzoek naar het Afweermecanisme Van De Uterus.
20 University of Utrecht, Ph.D. Thesis, p.143–160, 1973.
- 21 HAMMON, D.S.; GOFF, J.P. Immune Function and Energy Status in Holstein Cows with
22 Uterine Infections. In: Mid-South Ruminant Nutrition Conference, 2006.
- 23 HAMMON, D.S.; EVJEN, I.M.; DHIMAN, T.R. et al. Neutrophil function and energy
24 status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.*,
25 v.113, p.21-29, 2006.
- 26 HUSSAIN, A.M.; DANIEL, R.C.W. Phagocytosis fluid and blood neutrophils and
27 hematological changes in postpartum cows following normal and abnormal parturition.
28 *Theriogenology*, v.37, p.1253-1267, 1992.
- 29 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Produção da
30 Pecuária Municipal 2015. Efetivo dos rebanhos em 31.12 e variação anual, segundo as

- 1 categorias. Quantidade e valor dos produtos de origem animal e variação anual.
2 Disponível em: Acesso em: 03 de novembro de 2016.
- 3 KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T.; FOSTER, R.; GARTLEY, C.; LESLIE, K.;
4 WALTON, J.; JOHNSON, W. Endometrial cytology and ultrasonography for the
5 detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v.62,
6 p.9–23, 2004.
- 7 LEBLANC, S.J. “Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance:
8 A review” *The Veterinary Journal*, v.176, p.102-114, 2008.
- 9 LEWIS, G.S. Uterine health and disorders. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.984-994, 1997.
- 10 LEWIS, G.S. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock.
11 *Reprod. Biol. End.*, v.1, p.1-8, 2003.
- 12 MARQUES JÚNIOR, A.P. Leucocyte chemotaxis activity by cotiledons of dairy cows
13 with normal delivery and retained placenta. Thesis (PhD) - University of Illinois, Urbana-
14 Champaign, Illinois. 182f, 1988.
- 15 NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirements of dairy cattle. 7th
16 edition, revised. National Research Council. National Academy Press, Washington, 408
17 p. 2001.
- 18 RUBEL, F.; KOTTEK, M. Observed and projected climate shifts 1901-2100 depicted by
19 world maps of the Köppen-Geiger climate classification. *Meteorologische Zeitschrift*,
20 Stuttgart, v.19, p.135-141, 2010.
- 21 SANTOS, F.C. Uso de cloprostenol e cipionato de estradiol, durante o puerpério, sobre a
22 saúde uterina e a eficiência reprodutiva em fêmeas Girolando. Dissertação de Mestrado,
23 Universidade Federal de Goiás, 2009.
- 24 SAUL, J. P. E.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Influência do período pós-parto sobre o
25 leucograma de fêmeas bovinas da raça holandesa. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo,
26 v.43, n.5, p.588-597, 2006.
- 27 SHELDON, I.M.; NOAKES, D.E.; RYCROFT, A.N. et al. The effect of intrauterine
28 administration of estradiol on postpartum uterine involution in cattle. *Theriogenology*, v.
29 59, p. 1357-1371, 2003.

- 1 SHELDON, I.M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*,
2 v.82-83, p.295-306, 2004.
- 3 SHELDON, I.M. The postpartum uterus. *Vet. Clin. Food Anim*, v.20, p.569-591, 2004.
- 4 SHELDON I.M., LEWIS G.S.; LEBLANC, S.; GILBERT, R.O. Defining postpartum
5 uterine disease in cattle. *Theriogenology*, v.65, p.1516-1530, 2006.
- 6 SHELDON, I.M.; WILLIAMS, E.J.; MILLER, A.N.A.; NASH, D.M.; HERATH, S.
7 Uterine diseases in cattle after parturition. *UKPMC Funders Group*, v.176, p.115-121,
8 2009.
- 9 STATISTICAL ANALYSES SISTEM INSTITUTE, Inc 2009. *SAS user's guide: Statics*
10 *Version*, 2009. SAS, Cary, N. C.
- 11 TAYLOR, J. A. Leukocyte response in ruminants. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G;
12 JAIN, N. C. *Schalm's veterinary hematology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams
13 & Wilkins, p. 391-404, 2000.
- 14 VILELA, D. Perspectivas para a produção de leite no Brasil. In: *Sinleite – Avanços em*
15 *produção e manejo de bovinos leiteiros*, 3., 2002, Lavras. *Anais...* Lavras: Universidade
16 Federal de Lavras, p.225-248, 2002.
- 17 WEISER, G. Interpretação da resposta leucocitária nas doenças, in: THRALL, M. A.
18 *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo: Roca, 2007.
- 19 WEISER, G. Laboratory technology for veterinary medicine. In: THRALL, M.A. (Ed.).
20 *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2.ed. Philadelphia: Lippincott Williams &
21 Wilkins, p.3-36, 2012.
- 22 ZERBE, E.; SCHUBERTH, H.J.; HODEMAKER, M.; GUNERT, E.; LEIBOLD, W. A
23 new model system for endometritis basic concepts and characterization of phenotypic and
24 functional properties of bovine uterine neutrophils. *Theriogenology*, v.46, p.1339–1356,
25 1996.