



**GABRIELLA SANTOS**

**MASTITE SUBCLÍNICA REDUZ A  
OVULAÇÃO E A QUALIDADE DE OÓCITOS  
EM VACAS PRODUTORAS DE LEITE**

**LAVRAS – MG**

**2017**

**GABRIELLA SANTOS**

**MASTITE SUBCLÍNICA REDUZ A OVULAÇÃO E A QUALIDADE  
DE OÓCITOS EM VACAS PRODUTORAS DE LEITE**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Lavras, como parte das  
exigências do programa de Pós-  
Graduação em Ciências  
Veterinárias, área de  
concentração em Ciências  
Veterinárias, para obtenção do  
título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

**LAVRAS – MG**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Santos, Gabriella .

Mastite subclínica reduz a ovulação e a qualidade de oócitos  
em vacas produtoras de leite / Gabriella Santos. - 2017.

88 p. : il.

Orientador(a): José Nélío de Sousa Sales.

.  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Mastite. 2. Oócitos. 3. Exossomos. I. Sales, José Nélío de  
Sousa. . II. Título.

**GABRIELLA SANTOS**

**MASTITE SUBCLÍNICA REDUZ A OVULAÇÃO E A QUALIDADE  
DE OÓCITOS EM VACAS PRODUTORAS DE LEITE**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Lavras, como parte das  
exigências do programa de Pós-  
Graduação em Ciências  
Veterinárias, área de  
concentração em Ciências  
Veterinária, para a obtenção do  
título de Mestre.

APROVADA em 30 de Junho de 2017.

Prof. Dr. José Camisão de Souza	UFLA
Dr. Marcos Brandão Dias Ferreira	EPAMIG
Profa. Dra. Nadja Gomes Alves	UFLA

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2017**

*Dedico esse trabalho com todo o meu amor e gratidão aos meus pais,  
Everson Santos e Shirley Santos, que sempre foram meu exemplo de  
honestidade, determinação, perseverança e força. Sempre serei grata por  
tudo que fizeram por mim ao longo desta trajetória. Esta vitória é nossa!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por iluminarem o meu caminho e por me proporcionarem momentos bons e ruins que foram necessários para aumentar minha fé e me fortalecer.

Aos meus pais, Everson Santos e Shirley Santos, meus maiores incentivadores. Se hoje estou vencendo mais uma etapa é graças ao exemplo e orações de vocês. Passamos por muitos momentos de alegria e tristezas, mas sempre juntos, nos apoiando uns aos outros. Obrigada por me fazerem acreditar que meu lar sempre esteve dentro de mim, graças a isso nunca me senti sozinha. Amo vocês!

As minhas amadas irmãs, Ludmilla Santos Menezes e Priscilla Santos, sem o apoio e o exemplo de vocês nada disso seria possível. Obrigada por sonharem junto comigo. “Uma irmã é a que lhe dá seu guarda-chuva na tempestade e depois a acompanha para ver o arco-íris”. Muito obrigada pelos conselhos, puxões de orelha, risadas insanas, amizade e amor incondicional. Vocês duas são tudo para mim!

A todos os familiares que mesmo de longe torceram e rezaram por mim. Em especial, a minha Vovó Dica, Tia Cris e Tia Tataia, mulheres batalhadoras que nunca se deixaram abalar, exemplos de força e determinação. Em memória, agradeço à minha Vovó Flor e Vovô Flávio, que mesmo ausentes fisicamente, sempre estiveram presentes em orações.

Aos meus anjos da guarda, graças a eles sou veterinária, Zeus, Apolo e Hermes e ao pequeno raio de luz que veio alegrar nossa casa no momento de escuridão, Thor.

À minha inesquecível família “Sal no Cocho”, Sarah, Karen, Rayana, Laís, Efa e Bruno. Muito obrigada pela amizade que nem mesmo a distância e os problemas conseguiram abalar. Vocês me alegram, me ensinam, me completam e me envergonham também. Junto a vocês vivi um dos melhores momentos da minha vida. Nosso laço é eterno!

Aos meus amigos de infância e de uma vida inteira, sempre presentes, Carlos, Cleiton, Daniel, Gongon, Manu, Márcio, João Lucas,

Lívia, Ti, Virgínia e Vivi. Obrigada por me inspirarem e por fazerem parte da minha história. Desde sempre e para sempre!

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade oferecida.

Ao meu orientador, José Nélio, pela oportunidade, ensinamentos, paciência e exemplo. Muito obrigada por acreditar em mim e por tornar possível a concretização desse sonho.

Aos Pós-graduandos e aos colegas do Laboratório de Reprodução Animal pela ajuda na execução do trabalho. Em especial ao Miguel que muito me ajudou durante o experimento.

A todos os funcionários da Fazenda Vargem Grande, em especial ao Veterinário Paulo Barros, por permitir a realização da primeira parte do experimento e pela grande ajuda na execução do trabalho.

À EPAMIG, na pessoa do Dr. Marcos Brandão, por permitir a realização da segunda parte do experimento, por me acolher e não medir esforços para execução do trabalho. O senhor é um exemplo de Ser Humano e de profissional. Muito Obrigada por tudo!

Ao CENATTE embriões, na pessoa do amigo Roberti, pelo fornecimento do material para execução do experimento e por permitir a execução da parte laboratorial na empresa. Muito Obrigada pela ajuda, pelas horas de trabalho e pelos ensinamentos desde a minha graduação.

Ao Dr. Juliano da Silveira, do Laboratório de Biologia Molecular da USP, por me acolher de braços abertos. Muito obrigada pela hospitalidade, pela paciência e principalmente pelos ensinamentos. Foi uma grande honra trabalhar com você. Além de ser um dos melhores profissionais que já conheci, é também, um exemplo de humildade e simplicidade.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular da USP, em especial a Ana Clara e Alessandra, com vocês passei um dos melhores momentos do meu mestrado, admiro muito o profissionalismo e caráter de vocês. Muito obrigada pela ajuda, pelos ensinamentos, pela companhia, almoços, risadas e amizade. Torço muito pela vitória de vocês.

*“Deus nos concede, a cada dia,  
uma página de vida nova no  
livro do tempo. Aquilo que  
colocamos nela, corre por  
nossa conta.”*

Chico Xavier

## RESUMO GERAL

Avaliou-se a relação entre a mastite pela contagem de células somáticas (CCS) e a dinâmica folicular, ovulação, qualidade dos oócitos e das células do cumulus, concentração e tamanho de exossomos em vacas produtoras de leite. Vacas cruzadas (*Bos taurus* – Holandesa x *Bos indicus* – Gir) foram distribuídas em grupo controle (CCS<200.000 células/mL de leite) e o grupo mastite (CCS>400.000 células/mL de leite). No experimento 1 (Dinâmica folicular), as vacas (n=57) foram submetidas à avaliações ultrassonográficas a cada 24 horas, a partir da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (D8) até 48 horas depois (D10). A partir do D10, as avaliações foram realizadas a cada 12 horas, até a ovulação ou até 96 horas após a retirada do dispositivo de progesterona, visando o acompanhamento do crescimento final do folículo dominante e da ovulação. No experimento 2 (Avaliação dos oócitos, das células do cumulus e do fluído folicular), as vacas (n=23) foram submetidas às aspirações foliculares, precedidas pela sincronização da emergência da onda de crescimento folicular. Os níveis de genes alvo em células do cumulus (*BCL2*, *BAX*, *PI3K*, *PTEN*, *FOXO3*) foram avaliados pelo ensaio de *Real Time Polymerase Chain Reaction*. No fluído folicular foram isolados exossomos para avaliação da concentração e tamanho das partículas. A taxa de ovulação (P=0,09) e de oócitos viáveis (P=0,01), foram maiores em animais do grupo controle, [controle 77,42% (24/31) e mastite 57,69% (15/26)] e [controle 59,1% (130/220) e mastite 41,9% (125/298)], respectivamente. A dinâmica de crescimento folicular não diferiu entre os grupos. Verificou-se maior número de oócitos degenerados (P=0,001) em animais do grupo mastite. Na avaliação da expressão gênica em células do cumulus, observou-se maior abundância de transcritos para *BAX* (P=0,003) em vacas do grupo mastite. Ainda, vacas com mastite apresentaram diâmetro de exossomos com menor média (P=0,03) e menor

moda ( $P=0,02$ ). Em conclusão, houve efeito da mastite sobre a ovulação, qualidade oocitária e diâmetro dos exossomos do fluido folicular.

**Palavras-chave:** Mastite. Bovino. Células Somáticas. Oócitos. Cumulus. Exossomos.

## GENERAL ABSTRACT

The aim was to evaluate the association between mastitis by somatic cell count (SCC) on follicular dynamics, ovulation, quality of oocytes and cumulus cells, concentration and size of exosomes in milk producing cows submitted to synchronization of ovulation. Cross cows (*Bos taurus* – Holstein x *Bos indicus* – Gir) were distributed in a control group (SCC<200.000 cells/mL milk) and the mastitis group (SCC>400.000 cells/mL milk). In the experiment 1 (follicular dynamics), the cows (n=57) were submitted to ultrasonographic evaluations every 24 hours, after the removal of the progesterone intravaginal device (D8) up to 48 hours later (D10). From the D10, evaluations were performed every 12 hours until ovulation, or up to 96 hours after withdrawal of the progesterone device, aiming at monitoring the final growth of the dominant follicle and the ovulation. In experiment 2 (Evaluation of oocytes, cumulus cells and follicular fluid), cows (n=23) were submitted to follicular aspiration, preceded by synchronization of the emergence of follicular growth wave. The levels of target genes in cumulus cells (*BCL2*, *BAX*, *PI3K*, *PTEN*, *FOXO3*) were evaluated by the Real Time Polymerase Chain Reaction assay. In the follicular fluid, exosomes were isolated to evaluate the concentration and size of the particles. The ovulation rate (P =0,09) and viable oocytes rate (P=0,01) were higher in control animals, [control 77,42% (24/31) and mastitis 57,69% (15/26)] and [control 59,1% (130/220) and mastitis 41,9% (125/298)], respectively. The follicular growth dynamics did not differ between the groups. There was a higher number of degenerate oocytes (P=0,001) were observed in animals from the mastitis group. In the evaluation of gene expression in cumulus cells, the greater abundance of *BAX* transcripts (P=0,003) was observed in cows in the mastitis group. Also, cows with mastitis had exosomes diameter with lower mean (P=0,03) and

lower mode ( $P=0,02$ ). In conclusion, there was effect of mastitis on ovulation, oocyte quality and diameter of exosomes of follicular fluid.

**Keywords:** Mastitis. Bovine. Somatic Cells. Oocyte. Cumulus. Exosomes.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Abundância dos genes marcadores de apoptose ( $\pm$ EPM) relacionada aos animais com CCS<200.000 células/mL de leite (grupo controle) e CCS>400.000 células/mL de leite (grupo mastite), obtidas após amplificação por PCR em tempo real,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  – método comparativo de expressão gênica relativa.....84
- Figura 2- Média ( $\pm$ EPM) e moda ( $\pm$ EPM) de diâmetro dos exossomos isolados do fluido folicular de vacas com CCS<200.000 células/mL de leite (grupo controle) e CCS>400.000 células/mL de leite (grupo mastite),  $a \neq b$  ( $P=0,02$ ) e  $x \neq y$  ( $P=0,03$ ).....84

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Sequência dos primers específicos, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no GenBank ou referências.....85
- Tabela 2- Efeito da mastite na dinâmica folicular em vacas cruzadas (*Bos taurus* – Holandesa x *Bos indicus* – Gir) submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação.....86
- Tabela 3- Efeito da mastite sobre a quantidade e qualidade oocitária de vacas cruzadas (*Bos taurus* – Holandesa x *Bos indicus* – Gir) submetidas à aspiração folicular.....86

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTB	Hormônio Adrenocorticotrópico
ACTH	<i>Beta Actin</i>
AIC	<i>Akaike's an Information Criterion</i>
AKT	<i>Protein Kinase B</i>
BAX	<i>BCL2 Associated X Protein</i>
BCL2	<i>B Cell Leucemia/Lymphoma 2</i>
BE	Benzoato de Estradiol
BMP15	<i>Bone Morphogenetic Protein 15</i>
CA	Califórnia
Ca <sup>+2</sup>	Cálcio
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCOs	Complexo Cumulus-oócitos
CCS	Contagem de Células Somáticas
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CE	Cipionato de Estradiol
CESR	Campo Experimental Santa Rita
CL	Corpo Lúteo
Cl <sup>-</sup>	Íon Cloreto
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
D	Dia
DEL	Dias em Lactação
DMPBS	<i>Dulbecco's Modified Phosphate Buffered Saline</i>
DMR	Região Diferencialmente Metilada
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNase	Enzima que degrada Ácido Desoxirribonucléico
E2	Estradiol
ECC	Escore de Condição Corporal
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
EPM	Erro Padrão da Média
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
EUA	Estados Unidos da América
FD	Folículo Dominante
FF	Fluído Folicular
FOXO3	<i>Forkhead Box 03</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
G+	Gram positiva
G-	Gram negativa
GDF9	<i>Growth Differentiation Factor 9</i>
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HAS2	<i>Hyaluronan Synthase 2</i>
IA	Inseminação Artificial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	<i>International Dairy Federation</i>
IFN- $\gamma$	Interferon Gama

IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
<i>IGF1</i>	<i>Insulin Like Growth Factor 1</i>
<i>IGF2</i>	<i>Insulin Like Growth Factor 2</i>
<i>IGF1R</i>	<i>Insulin Like Growth Factor 1 Receptor</i>
<i>IGF2R</i>	<i>Insulin Like Growth Factor 2 Receptor</i>
IGFBP	Proteína Ligadora de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IGFBPase	Enzima da Proteína Ligadora de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IL-1	Interleucina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
ILV	Vesículas Intraluminais
IM	Intra-Muscular
IN-62	Instrução Normativa número 62
IQO	Índice de Qualidade Oocitária
i.v.	Intra-Venosa
LH	Hormônio Luteinizante
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MCV	Corpos Multivesiculares
Mg <sup>+2</sup>	Magnésio
MG	Minas Gerais
miRNA	Micro RNA
MPF	Fator de Promoção de Mitose
n	Número
Na <sup>+</sup>	Íon Sódio
NMC	Conselho Nacional de Mastite
NO	Óxido Nítrico
Nox	Nitrato e Nitrito
<i>NPM2</i>	<i>Nucleoplasmin 2</i>
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OPU	Aspiração Folicular
OSFs	Fatores Secretados por Oócitos
P4	Progesterona
PAMPs	Padrões Moleculares Associados À Patógenos
PBS	Tampão Fosfato-Salina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGE	Prostaglandina E
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$
<i>PI3K</i>	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<i>PPIA</i>	<i>Peptidylprolyl Isomerase A</i>
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
<i>PTX3</i>	<i>Pentraxin 3</i>

PVA	Álcool Polivinílico
PVP	Solução Polivinil Pirrolidona
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
<i>RPL15</i>	<i>Ribossomal Protein L15</i>
RT	Transcrição Reversa
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativo
SP	São Paulo
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformante Beta
TLR	<i>Toll-like</i> Receptor
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
<i>TNFAIP6</i>	<i>Tumor Necrosis Factor Inducible Gene 6 Protein</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFLA	Universidade Federal de Lavras
USP	Universidade de São Paulo
UNESP	Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho
US	Ultrassonografia

### LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor
mL	Mililitros
>	Maior
L	Litros
%	Porcentagem
kDa	Kilodanton
min	Minutos
mm	Milímetro
®	Marca Registrada
MG	Miligrama
ng	Nanograma
UI	Unidades Internacionais
MHz	Megahertz
h	Hora
mmHG	Milímetro de Mercúrio
°C	Graus Celsius
g	Gramas
µg	Micrograma
pg	Picograma
G	Constante Gravitacional
nm	Nanômetro
µm	Micromolar
µL	Microlitro
s	Segundos
ms	Millessegundos
R <sup>2</sup>	Coefficiente de Determinação
x	Vezes
±	Mais ou Menos

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>18</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
2.1 Mastite .....	20
2.2 Contagem de células somáticas .....	22
2.3 Citocinas .....	23
2.3.1 Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ).....	24
2.3.2 Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ).....	25
2.3.3 Interleucina 6 (IL-6).....	25
2.3.4 Interleucina 10 (IL-10).....	26
2.4 Relação entre a mastite e a reprodução.....	26
2.5 Dinâmica folicular .....	30
2.6 Importância dos exossomos na reprodução e na mastite .....	32
2.7 Qualidade do fluido folicular e oócitos.....	33
2.8 Qualidade oocitária.....	34
2.8.1 Expressão de genes de qualidade oocitária.....	34
2.8.2 Expressão de genes ligados à expansão das células do cumulus .....	36
2.8.3 Expressão de genes ligados à apoptose das células do cumulus.....	37
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO .....</b>	<b>60</b>
<b>ARTIGO 1 – MASTITE SUBCLÍNICA REDUZ A OVULAÇÃO E A QUALIDADE DE OÓCITOS EM VACAS PRODUTORAS DE LEITE .....</b>	<b>60</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

Em 2014, o Brasil ocupava a quinta posição no ranking mundial de produção de leite, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), com produção de 35,2 bilhões de litros de leite, sendo a produtividade média por vaca de 1.525 L/vaca/ano (IBGE, 2014). Apesar da baixa produção brasileira, nos últimos anos a produtividade de vacas leiteira aumentou significativamente em função do melhoramento genético, melhora no manejo e na nutrição e pela utilização de novas biotecnologias. Porém, a intensa seleção genética e o manejo nutricional das vacas direcionaram o consumo de energia para produção de leite, prejudicando outras funções fisiológicas, principalmente a reprodução (LEROY et al., 2008). Esses fatores também favoreceram a ocorrência de distúrbios metabólicos e infecciosos, dentre os quais se destaca a mastite (HALASA et al., 2007).

Mastite é a inflamação da glândula mamária, usualmente causada por bactérias, classificada em clínica ou subclínica de acordo com os sinais apresentados pelo animal. As bactérias produzem toxinas que estimulam a resposta imunológica. Os produtos microbianos são reconhecidos por receptores do tipo *toll-like* (TLR), presentes na superfície de células epiteliais e leucócitos (TAPPING et al., 2000; GOLDAMMER et al., 2004). O reconhecimento bacteriano induz a produção e secreção de algumas citocinas pró-inflamatórias (DIAMOND et al., 2000; LEHTOLAINEN et al., 2004; ISOBE et al., 2009; ISOBE et al., 2011; ZHANG et al., 2014), as quais são responsáveis pela reação inflamatória e migração de leucócitos para o úbere (PERSSON et al., 2003).

O parâmetro indicador mais utilizado para detecção de mastite subclínica é a contagem de células somáticas (CCS) no leite, que agem em defesa do organismo contra o agente causador da infecção (KEHRLI & SHUSTER, 1994). A CCS é composta por células epiteliais de descamação da glândula mamária e por leucócitos (SANTOS & FONSECA, 2007). Órgãos fiscalizadores e governos de vários países se baseiam nos valores de

CCS para exigirem qualidade do leite aos produtores. O governo brasileiro decretou a Instrução Normativa número 62, IN-62 (Brasil, 2011), em vigor, exigindo que a CCS média do rebanho esteja abaixo de 400.000 células/mL de leite. Entretanto, vacas com CCS acima de 200.000 células/mL de leite, mesmo sem nenhum sinal clínico adicional, são consideradas como portadoras de mastite subclínica (LUKAS et al., 2005; CHEBEL, 2007).

O primeiro estudo que correlacionou a ocorrência de mastite à redução na fertilidade relatou que vacas com mastite clínica causada por bactérias gram negativas (G-) tiveram maior intervalo entre estro e menor duração da fase luteínica (MOORE et al., 1991). Estudos posteriores confirmaram a correlação negativa entre a mastite e a fertilidade de vacas (SCHRICK et al., 2001; HANSEN et al., 2004; SANTOS et al., 2004; MOORE et al., 2005). Vacas com mastite atrasaram o retorno ao estro e à primeira inseminação artificial (IA) após o parto, e tiveram maior número de serviços por concepção (SCHIRICK et al., 2001; MAIZON et al., 2004; LAVON et al., 2011a). Além disso, as taxas de concepção (LOEFFLER et al., 1999; SANTOS et al., 2004) e prenhez (HARMAN et al., 1996) foram menores em vacas com infecção mamária, indicando possível efeito no desenvolvimento oocitário e embrionário.

Na oocitogênese, ocorrem uma série de modificações moleculares e celulares necessárias para o oócito completar a primeira fase da meiose e ter fertilização bem sucedida com formação de zigoto, pré e pós-implantação (COTICCHIO et al., 2004). O desenvolvimento e a maturação dos oócitos são dependentes da ação hormonal, da presença e quantidade de genes transcritos e de substâncias presentes no fluído folicular (EDWARDS, 1974; BILODEAU-GOESEELS, 2003). O fluído folicular (FF) que envolve o oócito é de origem plasmática (EDWARDS, 1974). Portanto, a elevação das citocinas pró-inflamatórias no plasma durante a mastite pode afetar a composição do FF, o desenvolvimento oocitário e a expressão de genes específicos no oócito e nas células do cumulus (BILODEAU-GOESEELS, 2003; ASAF et al., 2014). Acredita-se que as citocinas não são liberadas de

forma livre na circulação sanguínea, mas associadas à exossomos que são vesículas extracelulares responsáveis pela comunicação entre células (KONADU et al., 2015).

Diante da escassez de pesquisas relacionadas aos impactos direto da mastite na reprodução. Surge a necessidade de realização de estudos que correlacionem a mastite pela CCS e a dinâmica folicular, ovulação, qualidade dos oócitos e das células do cumulus, concentração e tamanho de exossomos do fluido folicular em vacas produtoras de leite.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Mastite**

Segundo o Conselho Nacional de Mastite (NMC, 1996), a mastite é a inflamação da glândula mamária com o propósito de destruir ou neutralizar o agente causador e preparar o tecido para a cura ou recuperação da função normal. A etiologia dessa doença pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa. Os quadros infecciosos são os mais comuns, podendo haver o envolvimento de fungos, protozoários, algas, vírus, destacando-se as bactérias que invadem o úbere pelo esfíncter do teto, se multiplicam nos alvéolos e produzem toxinas que lesam o tecido mamário. Por apresentarem alterações patológicas no tecido glandular, vacas com mastite possuem modificações físico-químicas na composição do leite, alteração na coloração, aparecimento de coágulos e presença de leucócitos (RADOSTITS, 2002).

A mastite pode ser classificada quanto à sua forma de manifestação em clínica ou subclínica. Na mastite clínica há sinais clínicos que evidenciam a inflamação da glândula mamária (edema, aumento de temperatura, rubor, dor e alterações macroscópicas do leite: presença de coágulos e pus). O animal doente também possui sinais sistêmicos, tais como: depressão, desidratação, diminuição da ingestão de alimentos e queda na produção de leite (SANTOS & FONSECA, 2007). Em casos de mastite subclínica não existem alterações visíveis de inflamação ou anormalidades no leite. Contudo, ocorre queda na produção e mudanças na composição do

leite, como aumento da CCS, de íons cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), de sódio ( $\text{Na}^+$ ), de proteínas séricas e diminuição da caseína, lactose e gordura (RADOSTITS et al., 2002). A presença do micro-organismo pode ser detectada por cultura microbiológica e a inflamação pode ser diagnosticada pelo teste de condutividade ou CCS (NMC, 1996). A mastite subclínica é a forma da doença mais frequente nos rebanhos e se não tratada pode evoluir para a mastite clínica (SCHRICK et al., 2001).

Outra forma de classificação da mastite é pelas características do agente causador, podendo a mastite ser dividida em ambiental ou contagiosa. Porém, o *Staphylococcus coagulase negativo* (SCN) não se enquadra nessa classificação, pois é considerado agente secundário, ou seja, habita naturalmente a pele e úbere, podendo colonizar o canal do teto sem causar mastite (NMC, 1999).

Os agentes contagiosos são transmitidos de vaca para vaca, sendo a principal fonte de contaminação a glândula mamária de animais infectados. A transmissão ocorre durante a ordenha (SANTOS & FONSECA, 2007). Os principais patógenos da mastite contagiosa são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Corynebacterium bovis* (MARQUES, 2006).

Na mastite ambiental os micro-organismos são transmitidos do ambiente para o animal. A principal fonte de contaminação é o habitat da vaca (solo, cama, esterco, água). A contaminação normalmente ocorre nos intervalos entre as ordenhas. Os principais patógenos ambientais são os gram positivos (G+) como *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Micrococcus spp.* e os gram negativos como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp* e *Proteus spp.* (SANTOS & FONSECA, 2007).

A principal medida de controle da mastite é a prevenção, identificação da existência do problema, da dinâmica da infecção, dos agentes causadores e tratamento dos animais infectados.

## 2.2 Contagem de células somáticas

A CCS é composta por células epiteliais da glândula mamária e por leucócitos (SANTOS & FONSECA, 2007). Em caso de infecção microbiana da glândula mamária ocorre elevação da CCS no leite (ALMEIDA, 2004). Valores acima de 200.000 células/mL de leite são indicativos de mastite subclínica (LUKAS et al., 2005; CHEBEL, 2007). Além da infecção mamária, outros fatores podem interferir na CCS, como a época do ano, condições climáticas, raça, estágio de lactação, produção de leite, número de lactações, estresse, problemas nutricionais, efeito do rebanho e doenças intercorrentes (MÜLLER, 2002).

Órgãos fiscalizadores e governos de vários países se baseiam nos valores de CCS para exigirem qualidade do leite aos produtores. O limite máximo legal para a União Européia, Nova Zelândia e Austrália é de 400.000 células/mL de leite e para o Canadá e Estados Unidos da América (EUA), os limites estabelecidos por lei são de, respectivamente, 500.000 e 750.000 células/mL de leite (SARGEANT et al., 1998).

O governo brasileiro, com objetivo de promover melhoria na qualidade do leite e de seus derivados, decretou em 29 de dezembro de 2011 a IN-62 (Brasil, 2011), exigindo que até julho de 2016 os valores de CCS e CBT (contagem bacteriana total), estivessem abaixo de 400.000 células/mL e 100.000 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de leite, respectivamente. Entretanto, os produtores não se adequaram à instrução e o governo prorrogou o prazo para adequação aos padrões de qualidade até julho de 2018 (Brasil, 2016).

Apesar de nos EUA o limite máximo legal de CCS ser maior que o do Brasil, a média norte americana em 2012 foi de 200.000 células/mL de leite. Apenas 3,3% dos rebanhos dos EUA apresentaram CCS média maior que 600.000 células/mL e somente 1,5% dos rebanhos estavam fora dos padrões exigidos por lei (NORMAN et al., 2014).

A utilização da CCS como estimativa da saúde mamária é aplicável apenas para rebanhos com maior prevalência de patógenos contagiosos. Os

agentes ambientais geralmente não elevam os valores de CCS (NMC, 1999). Dessa forma, muitas infecções podem não ser detectadas quando se avalia apenas esse parâmetro (NMC, 1998). Além disso, a CCS ainda se mantém elevada por algum tempo após o fim da infecção, podendo gerar falsos positivos (SCHEPERS et al., 1997).

### **2.3 Citocinas**

Citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas externas, hidrossolúveis, com tamanho variando entre 8 e 31 kDa e atuam por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras), podendo ter ações pró ou antiinflamatórias de acordo com o microambiente na qual são produzidas (CURFS et al., 1997; LIN et al., 2000; SOMMER & WHITE, 2010). As citocinas pró-inflamatórias são produzidas por células de defesa (leucócitos) em resposta a estímulo desencadeado por antígenos. Os micro-organismos, em especial as bactérias, possuem moléculas conhecidas como toxinas, comumente encontradas em sua superfície, que constituem os padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Os PAMPs ativam a resposta imune inata, por interação com diferentes receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRR), dentre os quais estão à família TLRs (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). Os TLRs se destacam por seu papel central na ligação a patógenos e início da resposta inflamatória (JANEWAY & MEDZHITO, 2002).

Em animais acometidos pela mastite, as citocinas pró-inflamatórias, são transportadas pela corrente sanguínea, possivelmente associadas aos exossomos, iniciando a reação inflamatória no tecido mamário e induzindo a migração de leucócitos para o úbere (PERSSON et al., 2003). Assim, a elevação das citocinas pró-inflamatórias no plasma durante a mastite afeta a composição do fluido folicular e interfere na qualidade do oócito (ASAF et al., 2014), pois o FF é de origem plasmática (EDWARDS, 1974).

As citocinas pró-inflamatórias também impactam negativamente o eixo hipotálamo, hipófise e ovários, resultando em produção anormal de

GnRH (SHELDON et al., 2008), conseqüentemente, redução da pulsatilidade e amplitude do LH (PETER et al., 1989; KUJJO et al., 1995). Tais deficiências hormonais prejudicam o desenvolvimento folicular e a ovulação, o que resulta em ovulação atrasada ou não ovulação, falhas na fertilização e morte embrionária (HANSEN et al., 2004).

### **2.3.1 Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )**

O TNF- $\alpha$ , conhecido como caquexina, é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos T (OLIVEIRA et al., 2011). O TNF- $\alpha$  é considerado um dos mediadores mais precoces e potentes da resposta inflamatória. Embora a sua meia vida plasmática seja de 20 minutos, esse curto período de tempo é suficiente para desencadear mudanças hemodinâmicas e ativar outras citocinas (CURFS et al., 1997; RAEBURN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011).

O TNF- $\alpha$  produzido na glândula mamária de animais com mastite é secretado na corrente sanguínea e atinge o endométrio e as tubas uterinas (LEHTOLAINEN et al., 2004). Nessa região do trato reprodutivo, o TNF- $\alpha$  induz a produção de PGF2 $\alpha$  (SKARZYNSKI et al., 2000; WIJAYAGUNAWARDANE et al., 2003). A PGF2 $\alpha$  provoca contração da musculatura lisa tubárica (WEEMS et al., 2006) e lise do corpo lúteo (MOORE & O'CONNOR, 1993), interferindo no desenvolvimento inicial do embrião e promovendo aborto em animais gestantes (WEEMS et al., 2006). Além dos já citados efeitos, o TNF- $\alpha$  também prejudica a produção de andrógenos pelas células da teca e reduz a produção de estradiol pelas células da granulosa (SPICER & ALPIZAR, 1994; WILLIAMS et al., 2008).

Em estudos realizados em camundongos, observou-se que o TNF- $\alpha$  provocou redução no número de células da massa celular interna de embriões e reduziu a sobrevivência embrionária (PAMPFER et al., 1994; WUU et al., 1999). A adição de TNF- $\alpha$  ao meio de maturação de oócitos bovinos reduziu a taxa de produção de embriões *in vitro* (SOTO et al., 2003b). Enquanto, a adição de TNF- $\alpha$  no meio de fertilização de oócitos

bovinos resultou em aumento da apoptose em blastômeros (HANSEN et al., 2004).

### **2.3.2 Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ )**

A IL-1 $\beta$  é uma glicoproteína de 31 kDa secretada principalmente por macrófagos e monócitos. Atua de forma sistêmica no organismo (SUTTERWALA et al., 2006). A IL-1 $\beta$  exerce atividade pirógena, inibindo a própria função. Essa citocina pró-inflamatória atua no hipotálamo, estimulando a secreção de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na hipófise posterior. Na hipófise anterior, o CRH estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) que, na região fasciculada do córtex da glândula adrenal, estimula a produção de corticosteróides. Esses últimos inibem a síntese de IL-1 (VARELLA & FORTE, 2001). A IL-1 $\beta$  também participa na regulação da resposta imune, reações inflamatórias e hematopoiese (BRADDOCK & QUIN, 2004).

Dentre as citocinas envolvidas na fisiopatologia da mastite, a IL-1 $\beta$  é uma das mais avaliadas, pois provoca resposta local, pela migração transepitelial de neutrófilos para a glândula mamária e resposta sistêmica por induzir febre (WATSON et al., 2011). A IL-1 $\beta$  estimula a enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, que é a responsável pela transformação do ácido araquidônico em prostaglandinas (TOWNSON & PATE, 1994). Logo, a IL-1 $\beta$  está relacionada à síntese de prostaglandina E (PGE) e de PGF2 $\alpha$  (NISHIMURA et al., 2004; MAJEWSKA et al., 2010). O aumento da PGF2 $\alpha$  resulta em lise do corpo lúteo e na consequente redução na concentração de progesterona e morte embrionária (HOCKETT et al., 2000). Porém, o aumento de PGE resulta em fase lútea prolongada interferindo na ovulação e concepção (HERATH et al., 2009).

### **2.3.3 Interleucina 6 (IL-6)**

A IL-6 é uma glicoproteína de 22 a 27 kDa, secretada por macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e células da glia, sendo o TNF- $\alpha$  e a IL-1 potentes indutores. A IL-6 causa febre e ativa o eixo hipotálamo, hipófise e adrenal (SOMMER & WHITE, 2010; OLIVEIRA et

al., 2011). Além disso, a IL-6 induz e controla a síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante a infecção. Nakajima et al. (1997) foram os pioneiros a determinarem a atividade de IL-6 no leite e no soro de vacas naturalmente acometidas pela mastite por coliformes. Verificaram que a IL-6 apresentou concentração 20 vezes maior no leite do que no soro. Na reprodução, verificou-se que, o aumento da concentração de IL-6 bloqueou a ação do FSH nas células da granulosa dos folículos ovarianos, diminuindo a secreção de estradiol, a expressão do estro e a ovulação (ALPIZAR & SPICER, 1994).

#### **2.3.4 Interleucina 10 (IL-10)**

A IL-10 é um polipeptídeo não glicosado com cerca de 8 kDa, sintetizado em células imunológicas e tecidos neuroendócrino e neural (LIN et al., 2000). Sua principal função é inibir as citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, estimulando a produção endógena de citocinas antiinflamatórias (ASADULLAH et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

Vacas com mastite possuem altas concentrações sanguíneas de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, apresentam baixas concentrações de IL-10, visto que essa citocina tem ação antiinflamatória.

A IL-10 apresenta papel crucial na reprodução e, seus níveis encontram-se elevados em fêmeas gestantes e em fêmeas com ciclos estrais regulares. O estrógeno e a progesterona estimulam a produção de IL-10 (PICCININI et al., 2000).

#### **2.4 Relação entre a mastite e a reprodução**

A fertilidade de vacas produtoras de leite vem reduzindo de forma progressiva (DISKIN & MORRIS, 2008). Tal redução é atribuída à intensa seleção genética que privilegiou a partição de nutrientes para a produção de leite em detrimento a outras funções fisiológicas, como a reprodução (LEROY et al., 2008). A baixa circulação de hormônios esteróides (VASCONCELOS et al., 1999), falhas no desenvolvimento oocitário e embrionário (SARTORI et al., 2002), estresse térmico (VASCONCELOS et

al., 2011; DEMETRIO & VASCONCELOS, 2011), além de doenças infecciosas como a mastite (SCHRICK et al., 2001; HANSEN et al., 2004; SANTOS et al., 2004), também estão envolvidos na redução da eficiência reprodutiva.

O primeiro estudo que relacionou a ocorrência de mastite com redução na fertilidade relatou que vacas com mastite clínica causada por bactérias gram negativas apresentaram maior intervalo entre estros e menor duração da fase luteínica (MOORE et al., 1991). Estudos posteriores também relataram os efeitos deletérios da mastite sobre a reprodução de vacas leiteiras (BARKER et al., 1998; SCHRICK et al., 2001; SANTOS et al., 2004; HERTL et al., 2010). Barker et al. (1998) observaram declínio da fertilidade em vacas com mastite clínica. Schrick et al. (2001) constataram que vacas com mastite clínica ou subclínica no pós parto recente atrasaram para a realização do primeiro serviço, aumentaram os dias em aberto e serviço por concepção. Além disso, os animais com mastite subclínica que evoluíram para clínica apresentaram perdas significativas no desempenho reprodutivo. Santos et al. (2004) verificaram redução de 64% na probabilidade de concepção em vacas que apresentaram mastite subclínica entre a IA e o diagnóstico de gestação. Em outro estudo, observaram maior impacto da mastite sobre a probabilidade de concepção quando a doença ocorria 15 dias antes ou 36 dias depois de IA (HERTL et al., 2010). Além disso, vacas que apresentaram mastite clínica nos primeiros 45 dias de gestação, tiveram 2,7 vezes mais riscos de abortarem nos 90 dias de gestação (RISCO et al., 1999). Posteriormente, verificou-se que vacas com mastite clínica em qualquer fase da lactação foram 1,6 vezes mais propensas a perderem a prenhez (MCDUGALL et al., 2005). Ainda, vacas com CCS acima de 300.000 células/mL de leite antes da IA foram 2,4 vezes mais susceptíveis a perderem a gestação entre 28 e 40 dias (MOORE et al., 2005). Valores de CCS acima de 150.000 células/mL antes da primeira IA pós parto foram associados com, redução na taxa de prenhez após IA em 10 pontos percentuais (LAVON et al., 2011a).

Em vacas com mastite crônica, Rahman et al. (2012) verificaram que a quantidade de folículos entre 1 a 3 mm e 4 a 7 mm não foi afetada pelo grau da infecção. Entretanto, a mastite teve efeito negativo no número de folículos com diâmetro maior que 8 mm. Além disso, o grau de intensidade da mastite não teve efeito sobre o número de folículos primordiais e primários. No entanto, vacas severamente acometidas apresentaram menor número de folículos secundários. Ainda, verificou-se menor expressão de *GDF-9* (*growth differentiation factor 9*) em folículos primordiais, primários e secundários, conseqüentemente menores taxas de maturação oocitária, fertilização e de clivagem.

Estudos relataram que os efeitos da mastite sobre a reprodução eram independentes do tipo de bactéria causadora, tanto bactérias G- quanto G+ apresentaram mesma patogenicidade (BARKER et al., 1998; SCHRICK et al., 2001; SANTOS et al., 2004). Em pesquisas posteriores, foi observado que os dois tipos bacterianos reduzem a fertilidade. Porém, as bactérias G- apresentavam efeitos mais deletérios (HERTL et al., 2010). Em ratas, a dose de ácido lipoteicóico, componente da parede celular de bactérias G+, necessária para afetar a fertilidade foi menor que a dose de LPS, componente da membrana externa de bactérias G-, (KAJIKAWA et al., 1998). Outros autores relataram que a redução na fertilidade é na grande maioria desencadeada pelo LPS (SOTO et al., 2003b; HANSEN et al., 2004).

Os mecanismos pelos quais a mastite pode afetar o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras ainda não estão totalmente conhecidos. A infecção intramamária pode levar ao aumento das concentrações séricas de cortisol (HOCKETT et al., 2000), além de causar uma série de alterações clínicas, tais como: febre, aumento da permeabilidade vascular, aumento da contagem de leucócitos no sangue, maior frequência cardíaca e respiratória, processos imune e inflamatórios (SOTO et al., 2003a; HANSEN et al., 2004). A mastite desencadeia na produção de moléculas bioativas (citocinas pró-inflamatórias) que podem prejudicar os tecidos do trato reprodutivo (HANSEN et al., 2004). Dentre as citocinas pró-inflamatórias destacam-se a

IL-1 $\beta$ , a IL-6 e o TNF- $\alpha$ . Além disso, o eixo hipotálamo, hipófise e ovários são potenciais alvos da mastite, pois vacas acometidas possuem menor secreção de GnRH (BATTAGLIA et al., 1997), menor pulsatilidade e amplitude de LH, menor produção de estradiol (HOCKETT et al., 2005), menor manifestação do estro (HOCKETT et al., 2000) e interrupção do crescimento folicular (HERATH et al., 2007).

A invasão da glândula mamária por bactérias leva a liberação de LPS, proteoglicanos e outras moléculas bioativas, desencadeando na resposta imune e inflamatória. Conseqüentemente ocorre aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias a partir da glândula mamária, linfonodos e outros locais, incluindo os tecidos do trato reprodutivo. Certas citocinas pró-inflamatórias inibem diretamente as funções oocitárias e embrionárias (HANSEN et al., 2004). O TNF- $\alpha$  provoca distúrbio no processo de maturação do oócito e pode induzir a apoptose em embriões (SOTO et al., 2003b). O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  estimulam a secreção de PGF2 $\alpha$  em vários tecidos incluindo o endométrio (DAVIDSON et al., 1995; SKARZYNSKI et al., 2000). O óxido nítrico também tem sua síntese aumentada pelo estímulo do LPS, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  e PGF2 $\alpha$ . Em concentrações normais, o NO está envolvido na esteroidogênese, desenvolvimento folicular e ovulação. Porém, em animais com mastite, ocorre excesso na produção de NO que se associa ao oxigênio formando o peroxinitrito oxidante. O peroxinitrito oxidante tem efeito deletério sobre os tecidos, causando a luteólise, induzindo a apoptose e prejudicando a maturação embrionária (PEREZ et al., 1998; ATHANASSAKIS et al., 2000). A hipertermia associada à ação pirogênica de várias citocinas pró-inflamatórias é uma das principais causas de inibição do desenvolvimento oocitário, ovulação e morte embrionária (DUTT, 1963).

Alguns autores induziram a infecção intramamária com endotoxinas de *E.coli* (G-) e *S. aureus* (G+) com objetivo de avaliar os efeitos da mastite sobre o desenvolvimento oocitário (ASAF et al., 2014). As vacas com mastite causada por G- apresentaram baixa qualidade oocitária devido

menores taxas de maturação nuclear e citoplasmática. Por outro lado, as vacas com mastite induzida por G+ não apresentaram alteração na maturação nuclear e citoplasmática. No entanto, a taxa de clivagem de oócitos foi reduzida. Tais achados sugerem que as endotoxinas possuem diferentes mecanismos de ação, o que resultou em efeitos distintos sobre a maturação oocitária (ASAF et al., 2014).

Alguns autores verificaram após inoculação intramamária de patógenos causadores da mastite, aumento da concentração sanguínea de *PGF2 $\alpha$*  que promoveu luteólise e morte embrionária (HOCKETT et al., 2005). A administração intramamária e intravenosa de LPS de *E. coli* promoveram atraso e redução no pico pré-ovulatório de LH, diminuição na concentração plasmática de estradiol e atraso ou falha na ovulação (LAVON et al., 2008). Além disso, verificaram que a mastite crônica interfere na esteroidogênese das vacas acometidas (LAVON et al., 2011a).

## **2.5 Dinâmica folicular**

O processo contínuo de crescimento e regressão folicular é conhecido como dinâmica folicular (BORGES et al., 2004). O crescimento folicular em bovinos ocorre na forma de ondas durante o ciclo estral (PIERSON & GINTHER, 1984). Cada onda tem duração de aproximadamente 10 dias, variando de seis a 10 dias (LUCY et al., 1992). As vacas podem apresentar uma, duas, três ou quatro ondas foliculares, sendo que a dieta, a raça, o ambiente, a ordem de parto e o estágio de lactação influenciam no número de ondas (GINTHER et al., 1996). O crescimento do folículo primordial, uma vez que iniciado, persiste até que ocorra a ovulação ou atresia, com duração média de 90 dias (WEBB et al., 2004).

O desenvolvimento folicular se divide em três fases: recrutamento, seleção e dominância. No início da onda, um grupo de folículos é recrutado e cresce de forma simultânea, caracterizando a fase de recrutamento (GINTHER et al., 2003). Na fase de seleção, o folículo dominante (FD) cresce de maneira contínua e os outros folículos, subordinados, apresentam

menor taxa de crescimento. Na fase de dominância, apenas o FD se desenvolve e os subordinados entram em atresia (GINTHER et al., 1996).

A dinâmica folicular depende da ação coordenada de diferentes hormônios da reprodução (GINTHER et al., 1996). O GnRH é secretado pelo hipotálamo para o sistema porta-hipotalâmico-hipofisário e alcança a hipófise estimulando a liberação de gonadotrofinas, LH e FSH. Pela circulação sanguínea, o FSH atinge os ovários estimulando o desenvolvimento folicular (MORAES et al., 2001). Segundo Fortune et al. (2004), o recrutamento de cada onda é iniciado por pequeno aumento de FSH circulante.

O FSH estimula a produção de estrogênio, fazendo com que as células da granulosa dos folículos convertam andrógenos, produzidos pelas células da teca sob influência do LH, em estrógenos (STABENFELDT & EDQVIST, 1996; FORTUNE et al., 2004). Além disso, o FSH induz expressão de receptores para FSH e LH. No entanto, o LH reduz o número de receptores para FSH nas células da granulosa (STABENFELDT & EDQVIST, 1996).

À medida que os folículos vão se desenvolvendo, aumentam as concentrações de E2 e inibina. Tais hormônios promovem *feedback* negativo na hipófise, reduzindo o FSH a concentrações basais (FORTUNE et al., 2004). Nessas concentrações de FSH, ocorre desvio nas taxas de crescimento entre os folículos subordinados e o folículo dominante, sendo que o FD passa a ser dependente de LH e os demais folículos entram em atresia, por serem dependentes de FSH para o crescimento (GINTHER et al., 1996). Além disso, o FD possui maior atividade das enzimas IGFBPase, que inativam a ação das proteínas IGFBPs (proteínas ligadoras ao fator de crescimento semelhante a insulina), liberando IGFs (fator de crescimento semelhante à insulina). Esses hormônios potencializam a ação das gonadotrofinas ao estimular o crescimento e a diferenciação folicular (RIVERA & FORTUNE, 2001; MORAES et al., 2001). Após a divergência folicular, o FD continua seu crescimento por estímulo do LH até atingir o

diâmetro pré ovulatório (FORTUNE et al., 2004). Nesse momento para que ocorra a ovulação é necessário que a concentração de progesterona esteja abaixo de 1ng/mL, pois esse esteróide bloqueia o pico de liberação de LH e a ovulação (STABENFELDT & EDQVIST, 1996).

## **2.6 Importância dos exossomos na reprodução e na mastite**

A comunicação entre células pode ser feita por contato direto, transferência de moléculas bioativas e por meio de vesículas extracelulares (RAPOSO & STOORVOGEL, 2013). Tais vesículas se dividem em exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (GYÖRGY et al., 2011). Os exossomos são nanovesículas de aproximadamente 30 a 150 nm de diâmetro secretados por vários tipos de células (THÉRY et al., 2006; MATHIVANAN et al., 2010; RAPOSO & STOORVOGEL, 2013). Os exossomos são formados a partir dos endossomos, que resultam em progressivo acúmulo de vesículas intraluminais (ILV) no interior de corpos multivesiculares (MVC). Os MVCs movem-se até a periferia celular, fundem-se à membrana plasmática e liberam os exossomos no espaço extracelular (MATHIVANAN et al., 2010; RECORD, 2014). Essas nanovesículas são secretadas via fluídos biológicos, tais como: leite, fluído folicular, sangue e sêmen (ADMYRE et al., 2003; RAIMONDO et al., 2011) e, podem atuar em células vizinhas ou percorrer longas distâncias modulando funções celulares em locais alvos (NG et al., 2013). Os exossomos carregam lipídeos, proteínas e transferem material bioativo, como RNA mensageiro - RNAm e micro RNA - miRNA (MATHIVANAN et al. 2010).

Os exossomos desempenham importante papel na reprodução, pois são responsáveis pela comunicação celular dentro dos folículos, entre células somáticas (células da teca e da granulosa) e oócitos. Tal comunicação é de suma importância para o desenvolvimento da competência oocitária (DA SILVEIRA et al. 2012; SOHEL et al., 2013), definida como o potencial de um oócito em maturar, ser fecundado, desenvolver-se até blastocisto e conseqüentemente manter a gestação (SIRARD et al., 2006).

Os exossomos também podem conter miRNAs específicos indicativos de condições patológicas, que funcionam como biomarcadores de determinadas doenças (WEBER et al., 2010). Segundo Sun et al. (2015), os exossomos do leite são uma rica fonte de miRNAs, sendo indicativos da saúde da glândula mamária de vacas em lactação. Esses pesquisadores, avaliaram perfis de expressão de miRNAs em exossomos do leite de quatro vacas holandesas em lactação antes e depois da infecção da glândula mamária por *S. aureus*. Os miRNAs *bta-miR-142-5p* e o *-223* apresentaram maiores níveis nos exossomos após a infecção, funcionando como biomarcadores para detecção precoce de mastite subclínica (SUN et al. 2015).

Funções imunológicas também são reguladas pelos exossomos (CHAPUT & THERY, 2010; MARTHIVANAN et al., 2010; BOBRIE et al., 2011), que possuem a capacidade de empacotar antígenos e estimular a resposta pró-inflamatória (BHATNAGAR et al., 2007; GIRI et al., 2010). As citocinas não são liberadas de forma livre na circulação sanguínea, mas associadas aos exossomos (KONADU et al. 2015). Estudos indicam que a associação das citocinas aos exossomos implicaria no aumento do tempo de meia vida e na distribuição mais específica até as células alvos distantes (KONADU et al. 2015).

Existe heterogenicidade dentre os exossomos, apesar de todos apresentarem morfologia típica de forma de taça. As células liberam pelo menos duas subpopulações de exossomos com distintos tamanhos (pequenos e grandes) e também com diferentes composições moleculares (RNA e proteínas). Além disso, podem apresentar diferentes propriedades biológicas, componentes celulares e efeitos sobre as células receptoras. Exossomos de menor tamanho carregam menores concentrações de proteína, lipídeos, RNA e miRNA (WILLMS et al., 2016).

### **2.7 Qualidade do fluido folicular e oócitos**

Os folículos são compostos por oócitos circundados por células da granulosa (PAULINI & MELO, 2011). As células da granulosa são

distribuídas na parede dos folículos (células da granulosa murais) cuja função é secreção hormonal e em contato com o oócito (células do cumulus) que trocam sinais biológicos com o oócito pelas junções do tipo *gap* (GILCHRIST et al., 2004; CANIPARI et al., 2000). Em bovinos, fatores extra ovarianos e locais atuam durante todo o crescimento do folículo (WEBB et al., 2004). Os fatores locais, tais como as IGFs, são responsáveis pelo desenvolvimento inicial do folículo (ARMSTRONG et al., 2003), enquanto as gonadotrofinas (FSH e LH) são importantes no crescimento final do folículo (WEBB et al., 2004).

Os oócitos se desenvolvem e adquirem competência em concordância com o desenvolvimento folicular (LONERGAN & FAIR, 2008). O desenvolvimento dos oócitos é afetado pelo tamanho do folículo, fase do crescimento folicular, ciclo estral e qualidade das células do cumulus que rodeiam o oócito (HAGEMANN et al., 1999; HENDRIKSEN et al., 2000). As expressões de genes em células do cumulus também refletem o potencial de desenvolvimento do oócito (CILO et al., 2007; ANDERSON et al., 2009). Oócitos isolados de pequenos folículos são considerados de baixa competência em relação à oócitos de grandes folículos (HAGEMANN et al., 1999; MACHATKOVA et al., 2004). Segundo Pavlok et al. (1992), oócitos originados de médios (2 a 4 mm) e grandes (4 a 8 mm) folículos possuem maior habilidade de desenvolvimento do que oócitos isolados de pequenos folículos (1 a 2 mm).

## **2.8 Qualidade oocitária**

### **2.8.1 Expressão de genes de qualidade oocitária**

A capacidade de desenvolvimento oocitário pode estar relacionada com a presença ou quantidade de genes específicos expressos durante o desenvolvimento inicial do oócito (BILODEAU-GOESEELS, 2003). Assim, a qualidade do oócito pode correlacionar-se com a prevalência ou não de genes transcritos (SCHULTZ, 1993).

Fatores secretados por oócitos (OSFs), tais como o *BMP15* (*Bone Morphogenetic 15*) e o *GDF9* (*Growth Differentiation Factor 9*), são

membros da superfamília do fator crescimento e transformação beta, TGF- $\beta$  (AALTONEN et al., 1999; OTSUKA et al., 2000). Tais fatores de crescimento desempenham importante papel no desenvolvimento folicular desde o recrutamento do folículo primordial até a formação do CL (PAULIN & MELO, 2011; KEDEM et al., 2011). Níveis elevados de *GDF9* e *BMP15* no fluido folicular estão associados à boa maturação do oócito e à qualidade do embrião (MCNATTY et al., 2007; WU et al., 2007). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que esses genes podem estimular o fator de promoção de mitose (MPF) e a atividade da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) em oócitos (SUDIMAN et al., 2014; LIN et al., 2014). Ainda, a elevada expressão de *GDF9* e *BMP15* nas células do cumulus correlaciona-se positivamente com a maturação oocitária, taxa de clivagem e taxa de fertilização (LI et al., 2014). Entretanto, baixos níveis de *GDF9* e *BMP15* resultaram em redução na taxa de ovulação e infertilidade (LAITINEN et al., 1998; GALLOWAY et al., 2000).

Além da superfamília do TGF- $\beta$ , os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs) interferem no desenvolvimento folicular por regularem o crescimento folicular e potencializarem a ação das gonadotrofinas nos ovários (WEBB & ARMSTRONG, 1998). A alta concentração de *IGF2* no FF no momento em que os oócitos são recuperados por OPU, está associada à melhor maturação oocitária e ao desenvolvimento embrionário (WANG et al., 2006). Oócitos imaturos e maturados possuem receptores para *IGF1* e *IGF2*. Portanto, a expressão de receptores para esses fatores de crescimento (*IGF1R* e *IGF2R*) é importante para adequada maturação oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário (WANG et al., 2009). Em contrapartida, menores níveis de *IGF2R* em oócitos maturados resultam em desenvolvimento embrionário precoce. Além disso, oócitos incompetentes apresentavam menor quantidade de *IGF2R* transcrito e tal fato foi associado à alteração no perfil de metilação da região diferencialmente metilada (DMR) do gene (BIASE et al., 2014).

Outro gene relacionado à qualidade oocitária é o *NPM2* (*nucleoplasmin 2*), podendo ser utilizado como marcador de competência de desenvolvimento do oócito (LINGENFELTER et al., 2011). A *NPM2* apresenta importante papel na descondensação do DNA do espermatozóide após penetração no oócito (PHILPOTT & LENO, 1992; BURNS et al., 2003).

### **2.8.2 Expressão de genes ligados à expansão das células do cumulus**

A qualidade oocitária também pode ser avaliada pela relação entre o oócito e as células do cumulus. O cumulus é um grupo de células da granulosa que mantém íntimo contato com o oócito por meio das junções do tipo *gap* (GILCHRIST et al., 2004; CANIPARI et al., 2000). Sob estímulo da onda pré-ovulatória de LH, *in vivo*, e pela suplementação de FSH ao meio de maturação, *in vitro*, o oócito reinicia a meiose e as células do cumulus secretam uma matriz extracelular rica em ácido hialurônico, a qual promove aumento de volume do complexo cumulus-oócito (CCO) caracterizando o processo de expansão do cumulus (ISOBE et al., 1998; TANGHE et al., 2002). A expansão das células do cumulus relaciona-se positivamente com a maturação oocitária e fertilização (TANGHE et al., 2002) e a expressão de genes específicos (*HAS2*, *PTX3* e *TNFAIP6*) determinam a capacidade de expansão dessas células (FULOP et al., 1997; VARANDI et al., 2002; PANGAS et al., 2004; SHIMADA et al., 2006; GEBHARDT et al., 2011).

O gene *HAS2* (*hyaluronan synthase 2*) é responsável pela síntese de ácido hialurônico pelas células do cumulus que promove a expansão da matriz extracelular (SCHOENFELDER & EINSPANIER, 2003; IRVING-RODGERS & RODGERS, 2005). Os níveis de *HAS2* também interferem na competência do oócito (DUNNING et al., 2007). A estrutura e estabilidade da matriz extracelular são mantidas pelo *PTX3* (*pentraxin*). Na ausência dessa proteína, não ocorre expansão dos cumulus e os oócitos se tornam inférteis. Além disso, o *PTX3* exerce atividade antiproteolítica, protegendo o oócito e a matriz extracelular da ação de proteases sintetizadas pelo próprio oócito e pelas células do cumulus algumas horas após a ovulação

(SALUSTRI et al., 2004). O *PTX3* não interage diretamente com o ácido hialurônico, mas se liga à proteína *TNFAIP6* (*tumor necrosis factor inducible gene 6 protein*), formando um complexo multimolecular que pode se ligar ao ácido hialurônico (SALUSTRI et al., 2004). O gene *TNFAIP6* é essencial para expansão do cumulus, pois garante a estabilidade e formação do complexo multimolecular (FULOP et al., 1997; VARANI et al., 2002).

### **2.8.3 Expressão de genes ligados à apoptose das células do cumulus**

Apoptose é a morte celular programada controlada pela transcrição de genes e por proteases intracelulares que realizam a autodigestão controlada dos constituintes celulares (MATWEE et al., 2000; BETTS & KING, 2001; PAROLIN & REASON 2001). Os CCOs são controlados por vários mecanismos apoptóticos (TILLY, 1996). As células apoptóticas do cumulus podem influenciar negativamente na maturação nuclear, citoplasmática e no desenvolvimento durante a pré-implantação do embrião (YANG & RAJAMAHENDRAN, 2000). Algumas citocinas pró-inflamatórias aumentadas em animais acometidos pela mastite, como o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  estão envolvidas na síntese exacerbada de NO, que associado ao oxigênio, forma o peroxinitrito oxidante. Esse composto induz a apoptose prejudicando a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário (PEREZ et al., 1998; ATHANASSAKIS et al., 2000).

A família do gene *BLC2* (*B cell leukemia/lymphoma 2*) é uma das reguladoras centrais da apoptose. Essa família pode ser composta por proteínas pró-apoptótica, como a *BAX* (*BCL2 associated X protein*) e anti-apoptóticas, como a *BCL2* (GROSS et al., 1999). A relação *BAX/BCL2* determina a susceptibilidade da célula a apoptose (OLTVAL et al., 1993). Oócitos em grau I e blastocistos possuem maior expressão de *BCL2* do que de *BAX*. Entretanto, a proteína *BAX* possui maior expressão em oócitos grau III e em embriões degenerados (YANG & RAJAMAHENDRAN, 2000).

Os processos de ativação folicular e desenvolvimento oocitário são regulados pela via de sinalização *PI3K/AKT* - *phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B* (LIU et al., 2007; REDDY et al., 2008). O gene

*PI3K* é anti apoptótico e está envolvido na ativação do folículo primordial e regulação da proliferação, sobrevivência, migração e metabolismo oocitário (CANTLEY, 2002; JOHN et al., 2009). Já o *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) é uma fosfatase lipídica específica do oócito que funciona como regulador negativo do *PI3K*. Na ausência do *PTEN*, os oócitos de toda reserva de folículos primordiais de camundongos fêmeas sofreram ativação, demonstrando a atuação do *PTEN* como supressor da ativação folicular (CASTRILLON et al., 2003). O *FOXO3* é membro da subfamília *FOXO* de fatores de transcrição cujos membros são reguladores negativos do padrão *PI3K/AKT/PTEN* (TRAN et al., 2003). Além disso, o *FOXO3*, substrato da *AKT*, é um fator transcricional que leva à apoptose e parada do ciclo celular. Estudos conduzidos em camundongos fêmeas e em ratas demonstraram que enquanto o *AKT* estimula o desenvolvimento do oócito, o *FOXO3* inibe essa ação (ACCILI & ARDEN, 2004; REDDY et al., 2005).

#### REFERÊNCIAS

AALTONEN, J.; LAITINEN, M.P.; VUOJOLAINEN, K.; JAATINEN, R.; HORELLI-KUITUNEN, N.; SEPPA, L.; LOUHIO, H.; TOURI, T.; SJOBERG, J.; BUTZOW, R.; HOVATA, O.; DALE, L.; RITVOS, O. Human growth differentiation factor 9 (GDF9) and its novel homolog GDF9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.84, p.2744-2750, 1999.

ACCILI, D. & ARDEN, K.C. FoxOa at the crossroads of cellular metabolism, differentiation and transformation. **Cell**, v.117, p.421-426, 2004.

ADMYRE, C.; GRUNEWALD, J.; THYBERG, J.; GRIPENBACK, S.; TOMLING, G.; EKLUND, A.; SCHEYNIUS, A.; GABRIELSSON, S. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. **The European Respiratory Journal**, v.22, p.578-583, 2003.

ALMEIDA, L. A. B. Avaliação do tratamento alopatóico e homeopático de mastite bovina em animais inoculados com *Staphylococcus aureus*. 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ALPIZAR, E. & SPICER, L.J. Effects of Interleukin-6 on Proliferation and Follicle Stimulating Hormone-Induced Estradiol Production by Bovine Granulosa-Cells in vitro- Dependence on Size of Follicle. **Biology Reproduction**, v.50, p.38-43,1994.

ANDERSON, R.A.; SCIORIO, R.; KINNELL, H.; BAYNE, R.A.; THONG, K.J.; SOUSA, P.A.; PICKERING, S. Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilization, embryo development and competence to establish a pregnancy. **Reproduction**, v.138, p.629-637, 2009.

ARMSTRONG, D.G.; GONG, J.G.; WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular, and molecular mechanisms. **Reproduction Domestic Ruminants**, v.61, p.403-414, 2003.

ASADULLAH, K.; SABAT, R.; FRIEDRICH, M. Interleukin IL-10: an important immunoregulatory cytokine with major impact on psoriasis. **Current Drug Targets – Inflammatory & Allergy**, v.3, p.185-192, 2011.

ASAF, S.; LEITHER, G.; FURMAN, O.; LAVON, Y.; KALO, D.; WOLFENSON, D.; ROTH Z. Effects of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. **Reproduction**, v.147, p.33-43, 2014.

ATHANASSAKIS, I.; AIFANTIS, I.; BARITAKIS, S.; FARMAKIOTIS, C.; KOUMANTAKIS, E.; VASSILIADIS, S. Nitric oxide production by pre-implantation embryos in response to embryotoxic factors. **Cell Physiol Biochem**, v.10, p.169-176, 2000.

BARKER, A.R.; SCHRICK, F.N.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1285-1290, 1998.

BATTAGLIA, D.F.; BOWEN, J.M.; KRASA, H.K.; THRUN, L.A.; VIGUIE, C.; KARSCH, F.J. Endotoxin inhibits the reproductive neuroendocrine axis while stimulating adrenal steroids: a simultaneous view from hypophyseal portal and peripheral blood. **Endocrinology**, v.138, p.4273-4281, 1997.

BETTS, D.H. & KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v.55, p.171-191, 2001.

BHATNAGAR, S.; SHINAGAWA, K.; CASTELLINO, F.J.; SCHOREY, J.S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. **Blood**, v.110, p.3234-3244, 2007.

BIASE, F.H.; EVERTS, R.E.; OLIVEIRA, R.; SANTOS-BIASE, K.F.; MERIGHE, G.K.F.; SMITH, L.C.S.; MARTELLI, L.; LEWIN, H.; MEIRELLES, F.V. Messenger RNAs in metaphase II oocytes correlate with successful embryo development to the blastocyst stage. **Zygote**, v.22, p.69-79, 2014.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effect of oocyte quality on the relative abundance of specific gene transcripts in bovine mature oocytes and 16-cell embryos. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.67, p.151-156, 2003.

BOBRIE, A.; COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THERY, C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. **Traffic**, v.12, p.1959-1668, 2011.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA JUNIOR, V.R.; RUAS, J.R.M.; GIOSO, M.M.; FONSECA, J.F.; CARVALHO, G.R.; MAFFILI, V.V. Follicular dynamic and ovulation time of non-lactating Gir and Nelore cows during two seasons of the year. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.80, p.346-354, 2004.

BRADDOCK, M. & QUINN, A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. London, England. **Nature**, v.3, p.330-340, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. Diário

Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 31 dez. 2011. Seção 1, p.6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento prorrogou a Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011, que entraria em vigor em 1º de julho de 2016 para 1º de julho de 2018. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 03 maio, 2016.

BURNS, K.H.; VIVEIROS, M.M.; REN, Y.; WANG, P.; DEMAYO, F.J.; FRAIL, D.E.; EPPING, J.J.; MATZUK, M.M. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. **Science**, v.300, p.633-636, 2003.

CANIPARI, R. Oocyte-granulosa cell interactions. **Human Reproduction**, v.6, p.279-289, 2000.

CANTLEY, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v.296, p.1655, 2002.

CASTRILLON, D.H.; MIAO, L.; KOLLIPARA, R.; HORNER, J.W.; DEPINHO, R.A. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. **Science**, v.301, p.215-218, 2003.

CHAPUT, N.; THERY, C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. **Seminars in Immunopathology**, v.33, p.419-440, 2010.

CHEBEL, R. Mastitis Effects on Reproduction, in Proceedings. **NMC Regional Meeting**, p.43-48, 2007.

CILO, F.; BREVINI, T.A.; ANTONINI, S.; RAFFONI, A.; RAGNI, G.; GANDOLFI, F. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. **Reproduction**, v.134, p.645-650, 2007.

COTICCHIO, G.; SERENI, E.; SERRAO, L.; MAZZONE, S.; IADAROLA, I.; BORINI, A. What criteria for the definition of oocyte quality? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1034, p.132-144, 2004.

CURFS, J.H.; MEIS, J.F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinics Microbiology Reviews**, v.10, p.742-780, 1997.

DA SILVEIRA, J.C.; VEERAMACHANENI, D.N.R.; WINGER, Q.A.; CARNEVALE, E.M.; BOUMA, G.J. Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle. **Biology of Reproduction**, v.86, p.71-81, 2012.

DAVIDSON, J.A.; TIEMANN U.; BETT, J.G.; HANSEN, P.J. DNA synthesis and prostaglandin secretion by bovine endometrial cells as regulated by interleukin-1. **Reproduction Fertility and Development**, v.56, p.1037-1043, 1995.

DEMETRIO, D.G.B. & VASCONCELOS, J.L.M. Manejo reprodutivo de vacas sob estresse térmico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.378-383, 2011.

DIAMOND, G.; KAISER, V.; RHODES, J.; RUSSELL, J.P.; BEVINS, C.L. Transcriptional regulation of  $\beta$ -defensin gene expression in tracheal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.68, p.113–119, 2000.

DISKIN, M.G. & MORRIS, D.G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43(Suppl. 2), p.260–267, 2008.

DUNNING, K.R.; LANE, M.; BROWN, H.M.; YEO, C.; ROBKER, R.L.; RUSSEL, D.L. Altered composition of the *cumulus*-oocyte complex matrix during *in vitro* maturation of oocyte. **Human Reproduction**, v.22, p.2842-2850, 2007.

DUTT, R.H. Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. **Journal Animal Science**, v.22, p.713-719, 1963.

EDWARDS, R.G. Follicular fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.37, p.189–219, 1974.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.109-126, 2004.

FULOP, C.; KAMATH, R.V.; LI, Y.; OTTO, J.M.; SALUSTRI, A.; OLSEN, B.R.; GLANT, T.J.; HASCALL, V.C. Coding sequence, exon-intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding *cumulus* cell-oocyte complex. **Gene**, v.202, p.95-102, 1997.

GALLOWAY, S.M.; MCNATTY, K.P.; CAMBRIDGE, L.M.; LAITINEN, M.P.; JUENGEL, J.L.; JOKIRANTA, T.S.; MCLAREN, R.J.; LUIRO, K.; DODDS, K.G.; MONTGOMERY, G.W.; BEATTIE, A.E.; DAVIS, G.H.; RITVOS, O. Mutation in an oocytes-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v.25, p.279-283, 2000.

GEBHARDT, K.M.; FEIL, D.K.; DUNNING, K.R.; LANE, M.; RUSSEL, D.L. Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v.96, p.42-52, 2011.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction**, v.82-83, p.431-446, 2004.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; KOT, K.; MEIRA, C.; BERGFELT, D.R. Associate and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.68, p.524-529, 2003.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the Dominant Follicle in Cattle. **Biology of reproduction**, v.55, p.1187-1194, 1996.

GIRI, P.K.; KRUIH, N.A.; DOBOS, K.M.; SCHOREY, J.S. Proteomic analysis identifies highly antigenic in exosomes from *M. tuberculosis* infected and culture filtrate proteintreated macrophages. **Proteomics**, v.10, p.3190-3202, 2010.

GOLDAMMER, T.; ZERBE, H.; MOLENAAR, A.; SCHUBERTH, H.J.; BRUNNER, R.M.; KATA, S.R.; SEYFERT, H.M. Mastitis increases mammary mRNA abundance of beta-defensin 5, toll-like-receptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, p.174–185, 2004.

GROSS, A.; MCDONNELL, J.M.; KORSMEYER, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes and Development**, v.13, p.1899-1911, 1999.

GYÖRGY, B.; SZABÓ, T.G.; PÁSZTÓI, M.; PÁL, Z.; MISJÁK, P.; ARADI, B.; LÁSZLO, V.; PÁLLINGER, E.; PAP, E.; KITTEL, A.; NAGY, G.; FALUS, A.; BUZÁS, E.I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Science**, v.68, p.2667-2688, 2011.

HAGEMANN, L.T.; BEAUMONT, S.E.; BERG, M.; DONNISON, M.J.; LEDGARD, A.; PETERSON, A.J. Development during single IVP of bovine oocyte from dissected follicles interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.451-458, 1999.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; OSTERAS, O.; HOGVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. **Veterinary Quarterly**, v.29, p.18–31, 2007.

HANSEN, P.J.; SOTO, P.; NATZKE, R.P. Mastitis and fertility in cattle – possible involvement of inflammation or immune activation in pregnancy mortality. **American Journal Reproductive Immunology**, v.51, p.294 –301, 2004.

HARMAN, J.L.; GROHN, Y.T.; ERB, H.N.; CASELLA, G. Event-time analysis of the effect of season of parturition, parity, and concurrent disease on parturition to conception interval in dairy cows. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, p.640–645, 1996.

HENDRIKSEN, P.J.; VOS, P.L.; STEENWEG, W.N.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effects on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.11-20, 2000.

HERATH, S.; LILLY, S.T.; FISCHER, D.P.; WILLIAMS, E.J.; DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2 $\alpha$  to prostaglandin E2 in bovine endometrium. **Endocrinology**, v.150, p.1912–1920, 2009.

HERATH, S.; WILLIAMS, E.J.; LILLY, S.T.; GILBERT, R.O.; DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. **Reproduction**, v.134, p.683–693, 2007.

HERTL, J.A.; GROHN, Y.T.; LEACH, J.D.G.; BAR, D.; BENNETT, G.J.; GONZALEZ, R.N.; RAUCH, B.J.; WELCOME, F.L.; TAUER, L.W.; SCHUKKEN, Y.H. Effects of clinical mastitis caused by grampositive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.1551–1560, 2010.

HOCKETT, M.E.; ALMEIDA, R.A.; ROHRBACH, N.R.; OLIVER, S.P.; DOWLEN, H.H.; SCHRICK, F.N. Effects of induced clinical mastitis during preovulation on endocrine and follicular function. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.2422–2431, 2005.

HOCKETT, M.E.; HOPKISN, F.M.; LEWIS, M.J.; SAXTON, A.M.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P.; SCHIRICK, F.N. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.241-251, 2000.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária. Rio de Janeiro, v.30, p.46-50, 2014.

IRVING-RODGERS, H.F. & RODGERS, R.J. Extracellular matrix in ovarian follicular development and disease. **Cell and Tissue Research**, v.69, p.89-98, 2005.

ISOBE, N.; KUBOTA, H.; YAMASAKI, A.; YOSHIMURA, Y. Lactoperoxidase activity in milk is correlated with somatic cell count in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.3868–3874, 2011.

ISOBE, N.; MAEDA, T.; TERADA, T. Involvement of meiotic resumption in the disruption of gap junctions between *cumulus* cell attached to pig oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.113, p.167-172, 1998.

ISOBE, N.; MORIMOTO, K.; NAKAMURA, J.; YAMASAKI, A.; YOSHIMURA, Y. Intramammary challenge of lipopolysaccharide stimulates secretion of lingual antimicrobial peptide into milk of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.6046–6051, 2009.

JANEWAY, C.A. & MEDZHITOV, R. Innate immunity recognition. **Annual Review of Immunology**, v.20, p.197-216, 2002.

JOHN, G.B.; SHIDLER, M.J.; BESMER, P.; CASTRILLON, D.H. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. **Developmental Biology**, v.331, p.292-299, 2009.

KAJKAWA, S.; KAGA, N.; FUTAMURA, Y.; KAKINUMA, C.; SHIBUTANI, Y. Lipoteichoic acid induces preterm delivery in mice. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.39, p.147–154, 1998.

KEDEM, A.; FISCH, B.; GAROR, R.; BEN-ZAKEN, A.; GIZUNTERMAN, T.; FELZ, C.; BEN-HAROUSH, A.; KRAVARUSIC, D.; ABIR, R. Growth differentiating factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) both activate development of human primordial follicles in vitro, with seemingly more beneficial effects of GDF9. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.96, p.1246-1254, 2011.

KEHRLI, JR.M.E. & SHUSTER, D.E. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.619-627, 1994.

KONADU, K.A.; CHU, J.; HUANG, M.B.; AMANCHA, P.K.; AMSTRONG, W.; POWWELL, M.D.; VILLINGER, F.; BLOND, V.C. Association of cytokines with exosomes in plasma of HIV-1- Seropositive individuals. **The Journal of Infectious Diseases**, v.211, p.1712-1716, 2015.

KUJJO, L.L.; BOSU, W.T.; PEREZ, G.I. Opioid peptides involvement in endotoxin-induced suppression of LH secretion in ovariectomized Holstein heifers. **Reproductive Toxicology**, v.9, p.169–174, 1995.

LAITINEM, M.; VUOJOLAINEN, K.; JAATINEN, R.; KETOLA, L.; AALTONEN, J.; LEHTONEN, E.; HEIKINHEIMO, M.; RITVOS, O.A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. **Mechanisms of Development**, v.78, p.135-140, 1998.

LAVON, Y.; EZRA, E.; LEITNER, G.; WOLFENSON, D. Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 4538– 4545, 2011a.

LAVON, Y.; LEITHER, G.; GOSHEN, T.; BRAW-TAL, R.; JACOBY, S.; WOLFENSON, D. Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. **Theriogenology**, v.70, p.956-967, 2008.

LEHTOLAINEN, T.; RØNTVED, C.; PYÖRÄLÄ, S. Serum amyloid A and TNF  $\alpha$  in serum and milk during experimental endotoxin mastitis. **Veterinary Research**, v.35, p.651–659, 2004.

LEROY, J.L.M.R.; OPSOMER, G.; VAN S.A.; GOOVAERTS, I.G.F.; BOLS, P.E.J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction Domestic Animals**, v.43, p.612–622, 2008.

LI, Y.; RUI-QI, L.; SONG-BANG, O.; NING-FENG, Z.; LING, R.; LI-NA, W.; QING-XUE, Z.; DONG-ZI, Y. Increased GDF9 and BMP15 mRNA levels in cumulus granulosa cells correlate with oocyte maturation, fertilization, and embryo quality in humans. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.12, p.81-90, 2014.

LIN, E.; CALVANO, S.E.; LOWRY, S.F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v.127, p.117-126, 2000.

LIN, Z.L.; LI, Y.H.; XU, Y.N.; WANG, Q.L.; NAMGOONG, S.; CUI, X.S.; KIM, N.H. Effects of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on the in vitro maturation of porcine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.219-277, 2014.

LINGENFELTER, B.M.; TRIPURANI, S.K.; TEJOMURTULA, J.; SIMITH, G.W.; YAO, J. Molecular cloning and expression of bovine nucleoplasmin 2 (NPM2): a maternal effect gene regulated by miR-181a. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.9, p.40-49, 2011.

LIU, C.L.; XIE, L.X.; DURAIRAJAN, S.S.K.; GOTO, S.; HUANG, J.D. Salvianolic acid B inhibits hydrogen peroxide-induced endothelial cell apoptosis through regulating PI3K/AKT signaling. **PLoS ONE**, v.12, p.1321-3129, 2007.

LOEFFLER, S.H.; DE VRIES, M.J.; SCHUKKEN, Y.H. The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2589-2604, 1999.

LONERGAN, P. & FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.

LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3615-3626, 1992.

LUKAS, J.M.; HAWKINS, D.M.; KINSEL, M.L. Bulk tank somatic cell counts analyzed by statistical process control tools to identify and monitor subclinical mastitis incidence. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.3944-3952, 2005.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v.61, p.329-335, 2004.

MAIZON, D.O.; OLTENACU, P.A.; GRÖHN, Y.T.; STRAWDERMAN, R.L.; EMANUELSON, U. Effects of diseases on reproductive performance

in Swedish Red and White dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.66, p.113–126, 2004.

MAJEWSKA, M.; WOCLAWEK-POTOCKA, I.; BAH, M.M.; HAPUNIK J.; PIOTROWSKA, K.K.; TASAKI, Y.; ACOSTA, T.J.; OKUDA, K.; SKARZYNSKI, D.J. Is interleukin-1alpha a luteotropic or luteolytic agent in cattle? **Reproduction**, v.139, p.665–72, 2010.

MARQUES, D.C. Criação de Bovinos. **Revista atual e ampliada**, CVP Consultoria Veterinária e publicações. Belo Horizonte, 7ªed, p.435-450, 2006.

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R.J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v.73, p.1907-1920, 2010.

MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote**, v.8, p.57-68, 2000.

MCDUGALL, S.; RHODES, F.M.; VERKERK, G.A. Pregnancy loss in dairy cattle in the Waikato region of New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v.53, p.279, 2005.

MCNATTY, K.P.; HUDSON, N.L.; WHITING, L.; READER, K.L.; LUN, S.; WESTERN, A.; HEATH, D.A.; SMITH, P.; MOORE, L.H.; JUENGEL, J.L. The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. **Biology of Reproduction**, v.76, p.552-560, 2007.

MEDZHITOV, R. & JANEWAY C.JR. Innate immunity. **New England Journal Medicine**, v.343, p.338-44, 2000.

MOORE, D.A.; CULLOR, J.S.; BONDURANT, R.H.; SISCHO, M. Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with altered interestrus intervals in dairy cattle. **Theriogenology**, v.36, p.257-265, 1991.

MOORE, D.A. & O'CONNOR, M.L. Coliform mastitis: its possible effects on reproduction in dairy cattle. **Proceeding National Mastitis Council**, MO Natl Mastitis Counc, Kansas City, Arlington; p.162-166, 1993.

MOORE, D.A.; OVERTON, M.W.; CHEBEL, R.C.; TRUSCOTT, M.L.; BONDURANT, R.H. Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.226, p.1112-1118, 2005.

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; GONSALVES, P.B.D. Controle do Estro e da Ovulação em Bovinos e Ovinos. In: Gonsalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, São Paulo: Livraria Varela, cap.3, p.25-55, 2001.

MÜLLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Anais do II Sul- Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. Maringá: UEM/CCA/DZO – NUPEL, p.206-217, 2002.

NAKAJIMA, Y.; MIKAMI, O.; YOSHIOKA, M.; MOTOI, Y.; ITO, T.; ISHIKAWA, Y.; FUSE, M.; NAKANO, K.; YASUKAWA, K. Elevated levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) activities in the sera and milk of cows with naturally occurring coliform mastitis. **Research in Veterinary Science**, v.62, p.297-298, 1997.

NG, Y.H.; ROME, S.; JALABERT, A.; FORTERRE, A.; SINGH, H.; HINCKS, C.L.; SALAMONSEN, L.A. Endometrial exosomes/microvesicles in the uterine microenvironment: A new paradigm for embryo-endometrial cross talk at implantation. **PLoS ONE**, v.8, p.1-14, 2013.

NISHIMURA, R.; BOWOLAKSONO, A.; ACOSTA, T.J.; MURAKAMI, S.; PIOTROWSKA, K.K.; SKARZYNSKI, D.J.; OKUDA, K. Possible role of interleukin-1 in the regulation of bovine corpus luteum throughout the luteal phase. **Biology Reproduction**, v.71, p.1688-93, 2004.

NMC Newsletter "Udder Topics", August, 2000, Excerpted from the Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs "Animal Health News. v.7, n.4, December 1999.

NMC Publication "Current Concepts of Bovine Mastitis", p.1, 1996.

NMC Regional Meeting Proceedings, from the National Mastitis Council Newsletter "Udder Topics", p.40, August 1998.

NORMAN, H.D.; COOPER, T.A.; ROSS, F.A. Somatic cell counts of milk from Dairy Herd Improvement herds during 2012. **Council on Dairy Cattle Breeding**, 2014.

OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R.C. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, p.255-265, 2011.

OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.H.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.39523-39528, 2000.

OTVAL, Z.N.; MILLIMAN, C.L.; KORMEYER, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v.74, p.609-619, 1993.

PAMPFER, S.; WUU, Y.D.; VANDERHEYDEN, I.; DE HERTOOGH, R. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) receptors and selective effect of TNF- $\alpha$  on the inner cell mass in mouse blastocyst. **Endocrinology**, v.134, p.206–212, 1994.

PANGAS, S.A.; JORGEZ, C.J.; MATZUK, M.M.; Growth differentiation factor nine regulates expression of the morphogenic protein antagonist gremlin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.32281-32286, 2004.

PAROLIN, M.B. & REASON, I.J. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases. **Archives of Gastroenterology**, v.38, p.38-44, 2001.

PAULINI, F. & MELO, E.O. The role of oocyte factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p. 354-361, 2011.

PAVLOK, A.; LUCASHAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of *Bovine oocyte* derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 63-67, 1992.

PEREZ, M.S.; FRANCHI, A.M.; VIGGIANO, J.M.; HERRERO, M.B.; GIMENO, M. Effect of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) on oviductal nitric oxide synthase (NOS) activity: possible role of endogenous NO on PGF<sub>2</sub> $\alpha$ -induced contractions in rat oviduct. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v.56, p.155-166, 1998.

PERSSON, W.K.; COLDITZ, I.G.; LUN, S.; ÖSTENSSON, K. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v.74, p.31-36, 2003.

PETER, A.T.; BOSU, W.T.; LIPTRAP, R.M.; CUMMINGS, E. Temporal changes in serum prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and oxytocin in dairy cows with short luteal phases after the first postpartum ovulation. **Theriogenology**, v.32, p.277-284, 1989.

PHILPOTT, A. & LENO, G.H. Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in *Xenopus* egg extracts. **Cell**, v.69, p.759-767, 1992.

PICCININI, M.; SCHALETTI, C.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S. Role of hormone-controlled Th1- and Th2- type cytokines in successful pregnancy. **Journal of Neuroimmunology**, v.109, p.30-33, 2000.

PIERSON, R.A. & GINTHER, O. J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, v.21, p.495-504, 1984.

RADOSTITS, O.M.; BLOOD D.C.; GAY, C.C. Clínica Veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 9<sup>a</sup> ed, 1735p., 2002.

RAEBURN, C.D.; SHEPPARD, F.; BARSNESS, K.A. Cytokines for surgeons. **American Journal Surgery**, v.183, p.268-273, 2002.

RAHMAN, M.M.; MAZZILLI, M.; PENNAROSSA, G.; BREVINI, T.A.L.; ZECCONI, A.; GANDOLFI, F. Chronic mastitis is associated with altered

ovarian follicle development in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.1885-1893, 2012.

RAIMONDO, F.; MOROSI, L.; CHINELLO, C.; MAGNI, F.; PITTO, M. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. **Proteomics**, v.11, p.709-720, 2011.

RAPOSO, G. & STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v.200, p.373-383, 2013.

RECORD, M. Intercellular communication by exosomes in placenta: A possible role in cell fusion? **Placenta**, v.35, p.297-302, 2014.

REDDY, P.; LIU, L.; ADHIKARI, D.; JAGARLAMUDI, L.; RAJAREDDY, S.; SHEN, Y.; DU, C.; TANG, W.; HAMALAINEN, T.; PENG, S.L.; LAN, Z.J.; COONEY, A.J.; HUHTANIEMI, I.; LIU, K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v.319, p.611-613, 2008.

REDDY, P.; SHEN, L.; REN, C.; BOMAN, K.; LUDIN, E.; OTTANDER, U.; LINDGREN, P.; LIU, Y.S.; LIU, K. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHLI in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. **Development Biology**, v.281, p.160-170, 2005.

RISCO, C.A.; DONOVAN, G.A.; HERNANDEZ, J. Clinical mastitis associated with abortion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.1684-1689, 1999.

RIVERA, G.M. & FORTUNE, J.E. Development of codominant follicles in cattle is associated with an FSH-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) protease. **Biology Reproduction**, v.65, p.112-118, 2001.

SALUSTRI, A.; GARLANDA, C.; HISSCH, E.; DE ACETIS, M.; MACCAGNO, A.; BOTTAZZI, B.; DONI, A.; BASTONE, A.; MANTOVANI, G.; BECK, P.P.; SALVATORI, G.; MAHONEY, D.J.; DAY, A.J.; SIRACUSA, G.; ROMANI, L.; MANTOVANI, A. PTX3 plays

a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in vivo fertilization. **Development**, v.131, p.1577-1586, 2004.

SANTOS, J.E.P.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C.; CERRI, R.L.A.; GALVÃO, K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrous synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v.83, p.513–535, 2004.

SANTOS, M.V. & FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole, 2007.

SARGEANT, J.M.; SCHUKKEN, Y.H.; LESLIE, K.E. Ontario bulk milk somatic cell count reduction program: progress and outlook. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1545–1554, 1998.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.; WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal Dairy Science**, v.85, p.2813-2822, 2002.

SCHEPERS, A.J.; LAM, T.J.; SCHUKKEN, Y.H.; WILMINK, J.B.; HANEKAMP, W.J. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1833–1840, 1997.

SCHOENFELDER, M & EINSPANIER, R. Expression of hialuronan synthases and corresponding hyaluroan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.69, p.269-277, 2003.

SCHRICK, F.N.; HOCKETT, M.E.; SAXTON, A.M.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1407–1412, 2001.

SCHULTZ, R.M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. **BioEssay**, v.15, p.531-538, 1993.

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

SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALES, I.; GONZALEZ-ROBAYANA, I.; RICHARDS, J.S. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. **Endocrinology**, v.20, p.1352-1363, 2006.

SIPCER, L.J. & ALPIZAR, E. Effects of cytokines on FSH-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: Dependence on size of follicle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.11, p.25-34, 1994.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, O.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-136, 2006.

SKARZYNSKI, D.J.; MIYAMOTO, Y.; OKUDA, K. Production of prostaglandin f (2alpha) by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor alpha: cell type specificity and intracellular mechanisms. **Biology Reproduction**, v.62, p.1116–1120, 2000.

SOHEL, M.M.H.; HOELKER, M.; NOFERESTI, S.S.; SALILEW-WONDIM, D.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; RINGS, F.; UDDIN, M.J.; SPENCER, T.E.; SCELLANDER, K.; TESFAYE, D. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular miRNAs in follicular fluid: Implications for bovine oocyte developmental competence. **PLoS ONE**, v.8, p.1-16, 2013.

SOMMER, C. & WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain. in: Beaulieu, P.; Lussier, D.; Porreca, F.; Dickenfon, A. (Ed.) **Pharmacology of pain**. Part II. Specific pharmacological pain targets. IASP: Seattle, p.279-302, 2010.

SOTO, P.; NATZKE, R.P.; HANSEN, P.J. Actions of tumor necrosis factor- $\alpha$  on oocyte maturation and embryonic development in cattle. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.50, p.380–388, 2003b.

SOTO, P.; NATZKE, R.P.; HANSEN, P.J. Identification of possible mediators of embryonic mortality caused by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F2a, and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.50, p.263–272, 2003a.

STABENFELDT, G.H. & EDQVIST, L.E. Processos Reprodutivos da Fêmea. In: Swenson, M.J.; Reece, W. **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.36, p.615-644, 1996.

SUDIMAN, J.; RITTER, L.J.; FEIL, D.K.; WANG, X.; CHAN, K.; MOTTERSHEAD, D.G.; ROBERTSON, D.M.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Effects of differing oocyte-secreted factors during mouse in vitro maturation on subsequent embryo and fetal development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.31, p.295-306, 2014.

SUN, J.; ASWATH, K.; SCHOROEDER, S.G.; LIPPOLIS, J.D.; REINHARDT, T.A.; SONSTEGARD, T.S. MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response *Staphylococcus aureus* infection. **BMC Genomics**, v.16, p.806-810, 2015.

SUTTERWALA, F.S.; OGURA, Y.; SZCZEPANIK, M.; LARA-TEJERO, M.; LICHTEN-BERGER, G.S.; GRANT, E.P.; BERTIN, J.; COYLE, A.J.; GALÁN, J.E.; ASKE-NASE, P.W.; FLAVELL, R.A. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and 503 adaptive immunity through its regulation of caspase-1. Connecticut, EUA. **Immunity**, p.504, 2006.

TAGHE, S.; SOOM, A.V.; NAUWYNCH, H.; CORYN, M.; DEKRUIF, A. Minireview: Function of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.414-424, 2002.

TAPPING, R.I.; AKASHI, S.; MIYAKE, K.; GODOWSKI, P.J.; TOBIAS, P.S. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides. **Journal Immunology**, v.165, p.5780–5787, 2000.

THÉRY, C.; AMIGORENA, S.; RAPOSO, G.; CLATTON, A. Isolations and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Current Protocols Cell Biology**, v.22, n.3, p.1-29, 2006.

TILLY, J.L. Apoptosis an ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v.1, p.162-172, 1996.

TOWNSON, D.H. & PATE, J.L. Regulation of prostaglandin synthesis by interleukin-1b in cultured bovine luteal cells. **Biology Reproduction**, v.51, p.480-485, 1994.

TRAN, H.; BRUNET, A.; GRIFFITH, E.C.; GREENBERG, M.E. The may forks in FOXO's road. **Science the Signal Transduction Knowledge Environment**, n.172, RE5, 2003.

VARANI, S.; ELVIN, J.A.; YAN, C.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F.J.; HORTON, H.F.; BYRNE, M.C.; MATZUK, M.M. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. **Mol Endocrinol**, v.16, p.1154-1167, 2002.

VARELLA, P.P.V. & FORTE, W.C.N. Citocinas: revisão. São Paulo, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, 2001.

VASCONCELOS, J.L.M.; COOKE, R.F.; JARDINA, D.T.G.; ARAGON, F.L.; VERAS, M.B.; SORIANO, S.; SOBREIRA, N.; SCARPA, A.B. Associations among milk production and rectal temperature on pregnancy maintenance in lactating recipient dairy cows. **Animal Reproduction Science**, 2011.

VASCONCELOS, J.L.M.; SILCOX, R.W.; ROSA, G.J.M.; PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.52, p.1067-1078, 1999.

WANG, L.M.; FENG, H.L.; MA, Y.Z.A.; CANG, M.; LI, H.J.; YAN, Z.H.; ZHOU, P.; WEN, J.X.; SHORGA BOU; LIU, D.J. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.99-108, 2009.

WANG, T.H.; CHANG, C.L.; WU, H.M.; CHIU, Y.M.; CHEN, C.K.; WANG, H.S. Insulin like growth factor-II (IGF-II), IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), and IGFBP-4 in follicular fluid are associated with oocyte maturation and embryo development. **Fertility and Sterility**, v.86, P.1392-1401, 2006.

WATSON, C.J; OLIVER, C.H.; KHALED, W.T. Cytokine signaling in mammary gland development. **Journal of Reproductive Immunology**, v.88, p.124-129, 2011.

WEBB, R.S. & ARMSTRONG, D.G. Control of ovarian function: effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Livestock Production Science**, v.53, p.95-112, 1998.

WEBB, R.S; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v.82, p.63-74, 2004.

WEBER, J.A.; BAXTER, D.H.; ZHNG, S.; HUANG, D.Y.; HUANG, K.H., LEE, M.J.; GALAS, D.J.; WANG, K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. **Clinical Chemistry**, v.56, p.1733-1741, 2010.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; RANDEL, R.D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **Veterinary Journal**, v.171, p.206–228, 2006.

WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.; GABLER, C.; KILLIAN, G.; MIYAMOTO, A. Tumor necrosis factor alpha in the bovine oviduct during the estrous cycle: messenger RNA expression and effect on secretion of prostaglandins, endothelin-1, and angiotensin II. **Biology Reproduction**, v.69, p.1341–1346, 2003.

WILLIAMS, E.J.; SIBLEY, K.; MILLER, A.N.; LANE, E.A.; FISHWICK, J.; NASH, D.M.; HERATH, S.; ENGLAND, G.C.; DOBSON, H.; SHELDON, I.M. The effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. **American Journal Reproductive Immunology**, v.60, p.462–473, 2008.

WILLMS, E.; JOHANSSON, H.J.; MÄGER, I.; LEE, Y.; BLOMBERG, E.M.; SADIK, M.; ALAARG, A.; SMITH, E.; LEHTIO, J.; EL ANDALOUSSI, S.; WOOD, M.J.A.; VANDER, P. Cells releases subpipulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. **Scientific Reports**, v.6, p.22519-22531, 2016.

WUU, Y.D.; PAMPFER, S.; BECQUET, P.; VANDERHEYDEN, I.; LEE, K.H.; DE HERTOOGH, R. Tumor necrosis factor a decreases the viability of mouse blastocyst in vitro and in vivo. **Biology of Reproduction**, v.60, p.479–483, 1999.

WU, Y.T; TANG, L.; CAI, J.; LU, X.E.; XU, J.; ZHU, X.M.; LUO, Q.; HUANG, H.F. High bonemorphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. **Human Reproduction**, v.22, p.1526-1531, 2007.

YANG, M.Y. & RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.63, p.1313-1321, 2001.

ZHANG, G.W.; LAI, S.J.; YOSHIMURA, Y.; ISOBE, N. Expression of cathelicidins mRNA in the goat mammary gland and effect of the intramammary infusion of lipopolysaccharide on milk cathelicidin-2 concentration. **Veterinary Microbiology**, v.170, p.125–134, 2014.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ARTIGO 1 – MASTITE SUBCLÍNICA REDUZ A OVULAÇÃO E A  
QUALIDADE DE OÓCITOS EM VACAS PRODUTORAS DE LEITE**

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

Artigo formatado segundo as normas da *Theriogenology*

## Resumo

Avaliou-se a relação entre a mastite pela contagem de células somáticas (CCS) e a dinâmica folicular, ovulação, qualidade dos oócitos e das células do cumulus, concentração e tamanho de exossomos em vacas produtoras de leite. Vacas cruzadas (*Bos taurus* – Holandesa x *Bos indicus* – Gir) foram distribuídas em grupo controle (CCS<200.000 células/mL de leite) e o grupo mastite (CCS>400.000 células/mL de leite). No experimento 1 (Dinâmica folicular), as vacas (n=57) foram submetidas à avaliações ultrassonográficas a cada 24 horas, a partir da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (D8) até 48 horas depois (D10). A partir do D10, as avaliações foram realizadas a cada 12 horas, até a ovulação ou até 96 horas após a retirada do dispositivo de progesterona, visando o acompanhamento do crescimento final do folículo dominante e da ovulação. No experimento 2 (Avaliação dos oócitos, das células do cumulus e do fluído folicular), as vacas (n=23) foram submetidas às aspirações foliculares, precedidas pela sincronização da emergência da onda de crescimento folicular. Os níveis de genes alvo em células do cumulus (*BCL2*, *BAX*, *PI3K*, *PTEN*, *FOXO3*) foram avaliados pelo ensaio de *Real Time Polymerase Chain Reaction*. No fluído folicular foram isolados exossomos para avaliação da concentração e tamanho das partículas. A taxa de ovulação (P=0,09) e de oócitos viáveis (P=0,01), foram maiores em animais do grupo controle, [controle 77,42% (24/31) e mastite 57,69% (15/26)] e [controle 59,1% (130/220) e mastite 41,9% (125/298)], respectivamente. A dinâmica de crescimento folicular não diferiu entre os grupos. Verificou-se maior número de oócitos degenerados (P=0,001) em animais do grupo mastite. Na avaliação da expressão gênica em células do cumulus, observou-se maior abundância de transcritos para *BAX* (P=0,003) em vacas do grupo mastite. Ainda, vacas com mastite apresentaram diâmetro de exossomos com menor média (P=0,03) e menor moda (P=0,02). Em conclusão, houve efeito da mastite sobre a ovulação, qualidade oocitária e diâmetro dos exossomos do fluído folicular.

Palavras-chave: mastite, bovino, células somáticas, oócitos, cumulus, exossomos.

## Abstract

The aim was to evaluate the association between of mastitis by somatic cell count (SCC) on follicular dynamics, ovulation, quality of oocytes and cumulus cells, concentration and size of exosomes in milk producing cows submitted to synchronization of ovulation. Cross cows (*Bos taurus* – Holstein x *Bos indicus* – Gir) were distributed in a control group (SCC<200.000 cells/mL milk) and the mastitis group (SCC>400.000 cells/mL milk). In the experiment 1 (follicular dynamics), the cows (n=57) were submitted to ultrasonographic evaluations every 24 hours, after the removal of the progesterone intravaginal device (D8) up to 48 hours later (D10). From the D10, evaluations were performed every 12 hours until ovulation, or up to 96 hours after withdrawal of the progesterone device, aiming at monitoring the final growth of the dominant follicle and the ovulation. In experiment 2 (Evaluation of oocytes, cumulus cells and follicular fluid), cows (n=23) were submitted to follicular aspiration, preceded by synchronization of the emergence of follicular growth wave. The levels of target genes in cumulus cells (*BCL2*, *BAX*, *PI3K*, *PTEN*, *FOXO3*) were evaluated by the Real Time Polymerase Chain Reaction assay. In the follicular fluid, exosomes were isolated to evaluate the concentration and size of the particles. The ovulation rate (P =0,09) and viable oocytes rate (P=0,01) were higher in control animals, [control 77,42% (24/31) and mastitis 57,69% (15/26)] and [control 59,1% (130/220) and mastitis 41,9% (125/298)], respectively. The follicular growth dynamics did not differ between the groups. There was a higher number of degenerate oocytes (P=0,001) were observed in animals from the mastitis group. In the evaluation of gene expression in cumulus cells, the greater abundance of *BAX* transcripts (P=0,003) was observed in cows in the mastitis group. Also, cows with mastitis had exosomes diameter with lower mean (P=0,03) and lower mode (P=0,02). In conclusion, there was effect of mastitis on ovulation, oocyte quality and diameter of exosomes of follicular fluid.

Keywords: mastitis, bovine, somatic cells, oocyte, cumulus, exosomes.

## 1. Introdução

Ao longo dos anos a produtividade das vacas de leite vem crescendo significativamente em função do melhoramento genético, melhora no manejo e na nutrição e pela utilização de novas biotecnologias. Porém, a intensa seleção genética e o manejo nutricional das vacas direcionaram o consumo de energia para produção de leite, prejudicando outras funções fisiológicas, principalmente a reprodução [1]. Esses fatores também favoreceram a ocorrência de distúrbios metabólicos e infecciosos, dentre os quais se destaca a mastite [2].

Mastite é a inflamação da glândula mamária, usualmente causada por bactérias, classificada em clínica ou subclínica de acordo com os sinais apresentados pelo animal. O parâmetro indicador mais utilizado para detecção de mastite subclínica é a contagem de células somáticas (CCS) no leite, que agem em defesa do organismo contra o agente causador da infecção [3]. A CCS é composta por células epiteliais de descamação da glândula mamária e por leucócitos [4]. Vacas com valores de CCS superiores a 200.000 células/mL de leite, mesmo sem sinais clínicos adicionais, são consideradas como portadoras de mastite subclínica [5,6]. Estudos têm demonstrado efeitos negativos da mastite na reprodução [7-11].

No primeiro estudo em que a ocorrência de mastite foi relacionada à redução na fertilidade, observou-se que vacas com mastite clínica causada por bactérias gram negativas tiveram maior intervalo de estros e menor duração da fase luteínica [7]. Estudos posteriores confirmaram correlação negativa entre mastite e fertilidade de vacas [8-11]. Vacas com mastite atrasaram o retorno ao estro e à primeira inseminação artificial após o parto, e tiveram maior número de serviços por concepção [12,13]. Além disso, as taxas de concepção [10,14] e de prenhez [15] foram menores em vacas com infecção mamária, indicando possível efeito no desenvolvimento oocitário e embrionário.

Durante a infecção da glândula mamária ocorre aumento na quantidade de leucócitos na corrente sanguínea, que produzem citocinas pró-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias podem afetar a composição do fluído folicular (FF), o desenvolvimento oocitário e a expressão de genes específicos no oócito e nas células do cumulus [16,17]. Tais efeitos das citocinas pró-inflamatórias podem interferir de forma negativa na competência de desenvolvimento dos oócitos durante o desenvolvimento folicular [17,18], pois o crescimento e a maturação dos oócitos são dependentes da ação hormonal, da presença e quantidade de genes transcritos e de substâncias presentes no líquido folicular [16,19]. As citocinas não são liberadas de forma livre na circulação sanguínea, mas associadas à exossomos, que são vesículas extracelulares responsáveis pela comunicação entre células [20].

Diante das referidas implicações da mastite sobre a reprodução e devido à escassez de pesquisas relacionadas ao tema. Surge a necessidade da realização de estudos que correlacionem a mastite pela CCS e a dinâmica folicular, ovulação, qualidade de oócitos e de células do cumulus, concentração e diâmetro dos exossomos do fluído folicular. O objetivo desse estudo foi avaliar a relação entre mastite e dinâmica folicular, ovulação, qualidade dos oócitos e das células do cumulus, concentração e tamanho de exossomos do fluído folicular de vacas produtoras de leite.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Experimento 1: Dinâmica folicular**

#### **2.1.1 Local e animais do experimento**

O estudo foi conduzido de novembro de 2016 à janeiro de 2017 em fazenda comercial localizada no sudeste do Brasil. Foram utilizadas 57 vacas cruzadas (*Bos taurus* – Holandesa x *Bos indicus* – Gir) em lactação, não gestantes, com escore de condição corporal de  $2,9 \pm 0,1$ , escala de 1 a 5 [21],

155,9 ± 13,3 dias em lactação e 3,4 ± 0,3 partos. As vacas foram ordenhadas duas vezes por dia e mantidas em piquetes de *Brachiaria brizantha*, sendo suplementas duas vezes ao dia, com silagem de milho, concentrados protéicos e energéticos. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e suplementação mineral.

### **2.1.2 Delineamento experimental**

As vacas foram divididas em dois grupos de acordo com a contagem de células somáticas realizada em duas avaliações, com intervalo de 15 dias, sendo o grupo controle (n=31) formado por vacas com CCS<200.000 células/mL de leite e o grupo mastite (n=26) formado por vacas com CCS>400.000 células/mL de leite.

### **2.1.3 Protocolo de sincronização da ovulação**

As vacas foram submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação, em dia aleatório do ciclo estral. Foi colocado um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; Sincrogest<sup>®</sup>, Ouro Fino, Brasil) e aplicado, via intra-muscular (IM), 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Sincrodiol<sup>®</sup>, Ouro Fino, Brasil) no D0. Oito dias depois (D8), foram aplicados (IM) 500 mg de cloprostenol (Sincrocio<sup>®</sup>, Ouro Fino, Brasil), 1 mg de cipionato de estradiol (CE; SincroCP<sup>®</sup>, Ouro Fino, Brasil), 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, SicroeCG<sup>®</sup>, Ouro Fino, Brasil) e o dispositivo de P4 foi removido.

### **2.1.4 Exame ultrassonográfico**

As avaliações ultrassonográficas (US, Mindray 4900, probe linear de 5 MHz) foram realizadas a cada 24 horas, a partir da retirada do dispositivo de progesterona (D8) até 48 horas (D10). A partir desse dia (D10), a ultrassonografia foi realizada a cada 12 horas até a ovulação ou até 96 horas após a retirada do dispositivo de P4, visando o acompanhamento do

crescimento final do folículo dominante (FD) e da ovulação. O crescimento folicular final foi determinado pela diferença entre o diâmetro do FD na retirada do dispositivo de P4 e no dia anterior a ovulação. A ovulação foi definida como o desaparecimento do FD previamente identificado por exame ultrassonográfico. As variáveis avaliadas foram o diâmetro máximo do FD, diâmetro do folículo ovulatório, momento da ovulação, taxa de ovulação, crescimento folicular entre D8 e D10 e entre D8 e ovulação.

## **2.2 Experimento 2: Avaliação dos oócitos, das células do cumulus e do fluído folicular**

### **2.2.1 Local e animais do experimento**

O estudo foi conduzido de fevereiro à março de 2017 na Fazenda Experimental Santa Rita (CESR – EPAMIG), localizada no sudeste do Brasil. Foram utilizadas 26 vacas cruzadas (*Bos taurus* – Holandesa x *Bos indicus* – Gir) em lactação, não gestantes, com escore de condição corporal de  $2,3 \pm 0,1$ , escala de 1 a 5 [21],  $118,1 \pm 10,8$  dias em lactação,  $9,6 \pm 0,5$  L de leite/dia e  $5,1 \pm 0,6$  partos. As vacas foram ordenhadas duas vezes por dia e mantidas em piquetes de *Brachiaria brizantha*, sendo suplementadas duas vezes ao dia, com silagem de milho, concentrados protéicos e energéticos. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água e suplementação mineral.

### **2.2.2 Delineamento experimental**

As vacas foram divididas em dois grupos de acordo com a contagem de células somáticas realizada em duas avaliações, com intervalo de 15 dias, sendo o grupo controle (n=13) formado por vacas com  $CCS < 200.000$  células/mL de leite e o grupo mastite (n=13) formado por vacas com  $CCS > 400.000$  células/mL de leite.

### **2.2.3 Sincronização da emergência de onda folicular e aspiração folicular guiada por ultrassonografia**

Os animais do experimento foram submetidos às aspirações foliculares (OPU), que foram precedidas pela sincronização da emergência da onda de crescimento folicular, a qual consistiu em aplicar (IM) 2 mg de BE (Sincrodio<sup>®</sup>, Ouro Fino, Brasil) e um implante intravaginal de P4 (Sincrogest<sup>®</sup>, Ouro Fino, Brasil). Cinco dias (D5) após o tratamento hormonal, foi realizada a OPU para obtenção dos oócitos. Após esse procedimento, as vacas permaneceram com os dispositivos intravaginais por mais seis dias (D11), para a colheita do fluido folicular do folículo dominante.

A OPU foi realizada com transdutor de 7,5 MHz (Aloka SSD, 500, Japão). Previamente às aspirações, os ovários foram examinados por US para contagem dos folículos. O sistema de aspiração foi submetido à pressão negativa entre 10 a 15 mL de meio/minuto (60 a 70 mmHg), através de uma bomba de vácuo (WTA, Cravinhos, SP, Brasil). Todos os folículos visíveis (>3mm) foram puncionados e o fluido folicular foi direcionado a tubos plásticos e estéreis de 50 mL (TPP, Trasadingen, Suíça) que continham previamente 10 mL de meio *Dulbecco's Modified Phosphate Buffered Saline* (DMPBS<sup>®</sup>, Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brasil), sem cálcio (Ca<sup>+2</sup>) e sem magnésio (Mg<sup>+2</sup>), 1g de álcool polivinílico (PVA) e 25 UI de heparina sódica/mL (Liquemine<sup>®</sup>, Roche, São Paulo, SP, Brasil) a temperatura entre 35 e 36°C.

O conteúdo aspirado foi despejado em filtro para coleta de oócitos com malha de 80 µm (WTA, Cravinhos, SP, Brasil). Em seguida, o conteúdo presente no filtro foi transferido para placas de cultivo celular de 100 x 20 mm (TPP) com DMPBS para busca, avaliação e seleção dos complexos cumulus-oócitos (CCOs), sob estereomicroscópico (Olympus, SZ40, Washington, EUA).

#### **2.2.4 Avaliação da qualidade das células do cumulus**

Os CCOs foram avaliados quanto à cor, homogeneidade e integridade do citoplasma, bem como quanto a presença, número e grau de compactação das células do cumulus [22].

Os oócitos viáveis selecionados foram mantidos em meio tampão fosfato-salina (PBS) e desnudados por pipetagem manual para separação das células do cumulus. Em seguida, as células do cumulus foram acondicionadas em tubos livre da enzima RNase (Tubos Eppendorf RNase free 3810x Standad<sup>®</sup>, Eppendorf, Alemanha) contendo 5µL de PBS-PVA e permaneceram imersos em nitrogênio líquido até a realização da *Real Time Polymerase Chain Reaction*. A análise foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de São Paulo (USP, Pirassununga, SP, Brasil).

##### **2.2.4.1 Extração de RNA e síntese de DNA complementar**

O RNA das células do cumulus foi extraído utilizando o kit Direct-zol<sup>®</sup> RNA MicroPrep (Zymo Research, Irvine, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria empregando o equipamento NanoDrop<sup>®</sup> (Thermo Scientific, Carlsbras, EUA) pela absorvância 260 nm e pelas razões 260/280 e 260/230. As amostras foram armazenadas a -80°C.

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase para evitar uma eventual contaminação com DNA genômico. Conforme as instruções do protocolo DNase I<sup>®</sup> (Zymo Research, Irvine, CA, EUA), foram adicionados 5 µL de DNase e 35 µL de DNA Digestion Buffer<sup>®</sup> (Zymo Research). Essa mistura foi vertida diretamente na coluna e incubada à temperatura ambiente (20-30°C) durante 15 minutos. Após o tratamento com DNase, iniciou-se o protocolo de transcrição reversa (RT) utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription<sup>®</sup> (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A reação foi conduzida utilizando o termociclador ProFlex<sup>®</sup>

3X32 Well System (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA), as amostras foram mantidas a 25°C por 10 min, 37°C por 2 horas e 85°C durante 5 min. Ao final da reação de transcrição reversa, os cDNAs produzidos foram armazenados em freezer a -20°C até a realização da PCR.

#### **2.2.4.2 Expressão gênica por PCR em tempo real**

As avaliações dos genes alvos foram realizadas por ensaio de PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção Power SybrGreen® (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA) no equipamento ABI QuantStudio® (Applied Biosystem, Foster city, CA, EUA). Os primers utilizados: *BAX* (*BCL2 Associated X Protein*), *BCL2* (*B Cell Leucemia/Lymphoma 2*), *FOXO3* (*Forkhead Box 03*), *PTEN* (*Phosphatase and Tensin Homolog*) e *PI3K* (*Pentraxin 3*) foram delineados a partir da sequência disponível no banco de dados do GenBank ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). As sequências dos primers, tamanho do produto e número de acesso no GenBank para cada par de primers utilizados no experimento estão apresentados na tabela 1. A PCR foi otimizada a fim de obter máxima eficiência de amplificação para cada gene.

A amplificação foi realizada com desnaturação inicial à 95°C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de desnaturação à 95°C por 15 segundos e anelamento à 60°C por 1 minuto. Para otimizar o ensaio de PCR em tempo real, várias diluições de cDNA com fator de diluição 2 foram usadas afim de gerar uma curva padrão. Reações com coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) maior que 0,98 e eficiência entre 85-110% foram utilizadas. Os resultados das amostras de células do cumulus tiveram expressão relativa ao *ACTB* (*beta actin*), *PPIA* (*peptidylprolyl isomerase A*) e *RPL15* (*ribossomal protein L15*).

### 2.2.5 Isolamento dos exossomos no fluido folicular

As amostras de fluido folicular foram obtidas por aspiração do FD, 11 dias após o início da sincronização (ou seis dias após a OPU). Para isolamento dos exossomos no FF foram realizadas centrifugações em série, utilizando a centrifuga Gyrozen 1730R (CYROGEN<sup>®</sup>, Coréia). O fluido folicular foi centrifugado a 300 x g por 10 minutos, 2000 x g durante 10 minutos e a 10000 x g por 30 minutos, com objetivo de eliminar as células residuais, debris celulares e microvesículas que possuem de 200 a 1000 nm de diâmetro [23]. Após a centrifugação, o FF foi acondicionado em tubos esterilizados (Tubos Eppendorf 3810x Standad<sup>®</sup>, Eppendorf, Alemanha) com identificação, e em seguida, armazenados em freezer a -80°C até o dia da análise.

No dia da análise, as amostras foram filtradas com filtros de poros com 0,22 µm, para remover partículas maiores que 200 nm, como vesículas apoptóticas e microvesículas [24]. Com objetivo de sedimentar os exossomos, o FF foi submetido a duas ultracentrifugações a 100000 x g durante 70 minutos, utilizando o rotor TYPE 70 Ti (Beckman coulter<sup>®</sup>, Brea, CA, EUA). O pellet formado foi ressuscitado em 50 µL de DMPBS (pH 7,4). Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C.

Para determinar o tamanho das partículas e a concentração no FF foi utilizado o equipamento NanoSight LM 10<sup>®</sup> (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) acoplado ao NanoSight NTA software v3.1. Antes da análise, as preparações foliculares foram diluídas 1:250 em DMPBS. Foram recolhidos cinco vídeos individuais à temperatura de 37°C utilizando grânulos de calibração de 50 nm, 100 nm e 150 nm (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) para verificar a precisão do tamanho. As amostras foram analisadas por gravação, cada vídeo de partículas em movimento teve duração de 30 segundos (s), com velocidade do obturador de 30 ms, ganho da câmara de 680, nível da câmara igual a 15 e limiar de detecção de três. O

tamanho das partículas foi definido pela moda e média determinada a partir dos vídeos.

### **2.3 Contagem de células somáticas**

As amostras de leite para análise de CCS foram colhidas de forma asséptica por meio de tubos coletores de leite, acoplados ao equipamento de ordenha, durante a ordenha da manhã. Duas coletas de leite foram realizadas por animal com intervalo de 15 dias, com objetivo de comparar a CCS entre os grupos assegurando que os valores foram diferentes.

As coletas para as análises de CCS foram realizadas após o teste de detecção de mastite clínica (teste da caneca), pré-desinfecção dos tetos (*pré-dipping*) com solução de iodo glicerinado 0,25% e secagem individual dos tetos com papel toalha. Vacas com mastite clínica não foram utilizadas no experimento.

As amostras de leite foram acondicionadas em frascos plásticos estéreis, com capacidade de 40 mL e com conservante Bronopol® (D&F Control Systems, Dublin, EUA).

A análise de CCS foi realizada pela Clínica do Leite (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil), utilizando o equipamento automatizado *Count cell counter* (Z1 Model, Coulter Electronic Limited, Luton, Reino Unido), por citometria de fluxo, de acordo com a *International Dairy Federation* - IDF.

### **2.4 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software Statistical Analysis System for Windows SAS*® (SAS, 2000). No experimento 1, as variáveis avaliadas foram diâmetro máximo do folículo dominante, diâmetro do folículo ovulatório, tempo desde a remoção do dispositivo de P4 até a ovulação, taxa de ovulação e crescimento folicular. As variáveis contínuas foram submetidas à análise de diferentes distribuições de dados e

foram utilizadas para verificar diferença entre os tratamentos, as análises que apresentavam o menor *Akaike's an information criterion* (AIC). A taxa de ovulação foi avaliada por distribuição binomial. O procedimento GLIMMIX foi utilizado.

No experimento 2, as variáveis relacionadas a qualidade oocitária foram avaliadas quanto à normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE e submetidas ao teste de Bartlett para análise da homogeneidade das variâncias. Após essa avaliação, o procedimento GLIMMIX foi utilizado para análise de variância e para determinar a diferença de médias entre os tratamentos. As variáveis dependentes contínuas foram expressas em média e erro padrão da média (média  $\pm$  EPM) e as binomiais em porcentagem. A análise dos dados sobre diferenças de expressão gênica e diferenças entre concentração, moda e média de diâmetro dos exossomos foi realizada pelo teste t Student. Foi considerado como diferença significativa entre as variáveis testadas o  $P=0,1$ .

### **3 Resultados**

#### **3.1 Experimento 1: Dinâmica folicular**

As CCS médias das vacas do grupo controle e do grupo mastite foram  $81,0 \pm 9,5 \times 10^3$  células/mL de leite e  $1756,1 \pm 278,7 \times 10^3$  células/mL de leite, respectivamente. Não houve efeito de grupo (controle e mastite) no diâmetro máximo do FD ( $P=0,75$ ), no diâmetro do folículo ovulatório ( $P=0,18$ ), no momento da ovulação ( $P=0,34$ ), no crescimento entre D8 e D10 ( $P=0,21$ ) e entre D8 e ovulação ( $P=0,46$ ). No entanto, verificou-se redução na taxa de ovulação das vacas do grupo mastite [grupo controle – 77,42% (24/31) e grupo mastite – 57,69% (15/26);  $P=0,09$ ; tabela 2].

### 3.2 Experimento 2: Avaliação dos oócitos, das células do cumulus e do fluido folicular

As CCS médias das vacas do grupo controle e do grupo mastite foram  $110,0 \pm 32,4 \times 10^3$  células/mL de leite e  $1849,0 \pm 410,3 \times 10^3$  células/mL de leite, respectivamente. Não houve efeito de grupo (controle e mastite) no total de folículos visualizados ( $P=0,45$ ), no número de oócitos viáveis ( $P=0,99$ ), no número de oócitos grau I ( $P=0,13$ ), grau II ( $P=0,26$ ) e grau III ( $P=0,68$ ). No entanto, o número de oócitos recuperados ( $P=0,02$ ) e o número de oócitos degenerados ( $P=0,001$ ) foram maiores em vacas do grupo mastite. Porém, a taxa de oócitos viáveis foi maior no grupo de vacas sadias (controle) [grupo controle – 59,1% (130/220) e grupo mastite – 41,9% (125/298);  $P=0,01$ ; tabela 3].

A expressão dos genes marcadores de apoptose *BCL2*, *PI3K*, *PTEN* e *FOXO3* foi semelhante entre os grupos. Verificou-se maior abundância de transcritos para *BAX* ( $P=0,003$ ) nas células do cumulus de vacas do grupo mastite (Figura 1). Porém, a relação *BAX/BCL2* não diferiu entre os grupos ( $P=0,65$ ).

As vesículas extracelulares isoladas do fluido folicular foram analisadas pelo equipamento NanoSight LM 10<sup>®</sup>, o qual detectou partículas com médias de 142,2 nm de diâmetro e moda de 106,5 nm, variando entre 77,3 e 141,4 nm. Tais diâmetros são característicos de exossomos. Observou-se no fluido folicular de vacas do grupo mastite exossomos com menor média ( $P=0,03$ ) e menor moda ( $P=0,02$ ) de diâmetro (Figura 2). Entretanto, a concentração de partículas por mL de fluido folicular não diferiu entre os grupos ( $P=0,57$ ).

## 4 Discussão

No presente estudo as taxas de ovulação e de oócitos viáveis foram menores em vacas do grupo mastite. Observou-se também alterações na expressão de genes ligados a apoptose em células do cumulus e menor

tamanho de exossomos presentes no fluído folicular de vacas com CCS>400.000 células/mL de leite. Para nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que relata os efeitos da mastite na expressão de genes em células do cumulus e no tamanho dos exossomos presentes no líquido folicular.

A hipótese inicial de que vacas com mastite possuem comprometimento no crescimento folicular e ovulação foi parcialmente rejeitada, pois não foram observadas diferenças significativas entre os grupos mastite e controle nas taxas de crescimento e diâmetro do folículo dominante e ovulatório. Entretanto, a taxa de ovulação foi maior em vacas com mastite. Em estudos anteriores foi verificado que ocorreu interrupção do crescimento folicular em vacas com mastite [25,26]. A interrupção no crescimento folicular pode estar relacionada ao bloqueio da secreção pulsátil de LH, visto que a infusão intra-mamária de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* reduziu a pulsatilidade de LH, alterando o crescimento do folículo pré-ovulatório [27,28]. Infusões contínuas da toxina de *Staphylococcus aureus* por três semanas também levaram à redução do crescimento de folículos médios [29]. No entanto, vacas naturalmente acometidas pela mastite apresentaram aumento no crescimento de folículos de tamanho médio, provavelmente devido à redução da dominância folicular em função da menor concentração de esteróides no fluído folicular [30]. Além disso, as alterações induzidas pela mastite nos folículos pré-ovulatórios podem afetar a ovulação e as funções do corpo lúteo formado subsequentemente [31].

Em alguns trabalhos foi constatado que infecções intra-mamárias promoveram atraso ou falha na ovulação [9, 32-34]. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, no qual foi menor a taxa de ovulação em vacas com CCS>400.000 células/mL de leite. Entretanto, existem evidências de que a utilização de protocolos hormonais para sincronização da ovulação pode melhorar a fertilidade de vacas com mastite subclínica [35,36], pois aumentam a taxa de ovulação e de concepção [31]. Vacas com

mastite subclínica apresentaram maior taxa de concepção e menor incidência de ovulação atrasada, quando foram submetidas ao protocolo *Ovsynch* [36]. Provavelmente, não houve alterações no crescimento e desenvolvimento folicular das vacas do grupo mastite devido à utilização do protocolo de sincronização da ovulação. Apesar de não serem completamente conhecidos os mecanismos pelos quais a mastite interfere no desempenho reprodutivo, sabe-se que a infecção da glândula mamária desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias [9], que interferem na secreção de GnRH, LH e estradiol [32,37]. A baixa concentração desses hormônios prejudica a manifestação do estro, o desenvolvimento folicular e a ovulação [38,39]. Além disso, a infecção causada pelo LPS da *E. coli* promove a ativação do sistema adrenal, que pode induzir a supressão da secreção pulsátil de LH e, conseqüentemente, reduzir a concentração de estradiol e promover ovulação atrasada [27,33, 40].

Na avaliação de qualidade oocitária verificou-se em vacas do grupo mastite menor taxa de oócitos viáveis e maior número de oócitos degenerados, demonstrando efeito direto da mastite sobre a qualidade oocitária. Os oócitos se desenvolvem e adquirem competência em concordância com o desenvolvimento folicular [41], sendo que o tamanho do folículo e qualidade das células do cumulus são fatores que afetam o desenvolvimento e a qualidade oocitária [42,43]. Oócitos maturados em fluído folicular de vacas com mastite apresentam comprometimento em seu desenvolvimento [17,44]. Além disso, vacas com mastite causada por *E.coli* apresentaram baixa qualidade oocitária devido a falhas na maturação nuclear e citoplasmática e vacas com mastite causada por *S. aureus* apresentaram menores taxas de clivagem após a fecundação [17].

A menor qualidade oocitária em vacas com mastite pode estar associada à alterações na expressão gênica [16,45]. Em alguns estudos recentes foi relatado que a mastite promoveu alterações na quantidade de transcritos em folículos, oócitos e embriões pré-implantados [31,46,47]. Alguns autores observaram que, vacas com mastite subclínica possuíam

menor expressão do gene *GDF9* em folículos primordiais, primários, secundários e, conseqüentemente, menores taxas de maturação oocitária, fertilização e clivagem [46]. Além disso, verificou-se que a maturação oocitária em fluido folicular de vacas com mastite promoveu menor expressão do gene *GDF9* em oócitos em metáfase II e embriões de quatro células [47].

Além dos efeitos negativos nos oócitos, a mastite também interfere nas células do cumulus prejudicando a qualidade oocitária [16,17]. No presente estudo não houve diferença entre os grupos na maioria dos genes marcadores de apoptose (*BCL2*, *PI3K*, *PTEN* e *FOXO3*) e na relação *BAX/BCL2*. No entanto, a quantidade de transcritos para *BAX* foi maior em células do cumulus do grupo mastite, demonstrando o efeito direto da mastite sobre a qualidade oocitária. Sabe-se que a proteína *BAX* estimula a apoptose de células do cumulus prejudicando a maturação nuclear, citoplasmática e o desenvolvimento oocitário [48]. Em pesquisas anteriores foi constatado que oócitos grau III e embriões degenerados possuem maior expressão de *BAX* [48]. Dessa forma, o comprometimento nas células do cumulus verificado pela maior quantidade de transcritos para *BAX* pode ter sido responsável pelo maior número de oócitos degenerados e menor taxa de oócitos viáveis nas vacas com CCS>400.000 células/mL de leite.

Os exossomos do fluido folicular de vacas do grupo mastite foram menores. As vesículas extracelulares são reconhecidas por desempenharem papel fundamental na comunicação entre as células [49]. Exossomos de menor diâmetro carregam menores quantidades de proteínas, lipídeos, RNA e miRNA [50], o que pode ter prejudicado a comunicação entre as células do cumulus e resultar em maior expressão de gene pró-apoptótico (*BAX*) em vacas com mastite. Essas alterações podem estar associadas à menor taxa de oócitos viáveis e ao maior número de oócitos degenerados em vacas do grupo mastite. Desta forma, conclui-se que apesar de vacas com CCS>400.000 células/mL de leite não apresentarem alterações no crescimento folicular final, observou-se menores taxas de ovulação e de

oócitos viáveis e maior número de oócitos degenerados associados à alterações na expressão gênica em células do cumulus (maior abundância de transcritos para *BAX*) e ao menor diâmetro dos exossomos presentes no fluído folicular.

## REFERÊNCIAS

- [1] Leroy JLMR, Opsomer G, Van SA, Goovaerts IGF, Bols PEJ. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2008; 43:612–22.
- [2] Halasa T, Huijps K, Osteras O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Vet Quart* 2007; 29:18–31.
- [3] Kehrl JRM & Shuster DE. Factores affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci* 1994; 77:619-27.
- [4] Santos MV & Fonseca LFL. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole, 2007.
- [5] Luka, JM, Hawkins DM, Kinsel ML. Bulk tank somatic cell counts analyzed by statistical process control tools to identify and monitor subclinical mastitis incidence. *J Dairy Sci* 2005; 88:3944-52.
- [6] Chebel R. Mastitis Effects on Reproduction, in Proceedings. NMC Regional Meeting 2007; 43-48.
- [7] Moore DA, Cullor JS, Bondurant RH, Sischo M. Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with altered interestrus intervals in dairy cattle. *Theriogenology* 1991; 36:257-65.
- [8] Schrick FN, Hockett ME, Saxton AM, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver SP. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J Dairy Sci* 2001; 84:1407–12.
- [9] Hansen PJ, Soto P, Natzke RP. Mastitis and fertility in cattle – possible involvement of inflammation or immune activation in pregnancy mortality. *Am J Reprod Immunol* 2004; 51:294 –301.

- [10] Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvão KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrous synchronization programs. *Anim Reprod Sci* 2004; 83:513–35.
- [11] Moore DA, Overton MW, Chebel RC, Truscott ML, Bondurant RH. Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226:1112–18.
- [12] Maizon DO, Oltenacu PA, Gröhn YT, Strawderman RL, Emanuelson U. Effects of diseases on reproductive performance in Swedish Red and White dairy cattle. *Prev Vet Med* 2004; 66:113–26.
- [13] Lavon Y, Ezra E, Leitner G, Wolfenson D. Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. *J Dairy Sci* 2011a; 94:4538–45.
- [14] Loeffler SH, De Vries MJ, Schukken YH. The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 1999; 82:2589–2604.
- [15] Harman JL, Grohn YT, Erb HN, Casella G. Event-time analysis of the effect of season of parturition, parity, and concurrent disease on parturition to conception interval in dairy cows. *Ame J Vet Res* 1996; 57:640–45.
- [16] Bilodeau-Goeseels S. Effect of oocyte quality on the relative abundance of specific gene transcripts in bovine mature oocytes and 16-cell embryos. *Can J Vet Res* 2003; 67:151-56.
- [17] Asaf S, Leither G, Furman O, Lavon Y, Kalo D, Wolfenson D, Roth Z. Effects of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* induced mastitis in lactating cows on oocyte developmental competence. *Reprod* 2014; 147:33-43.
- [18] Coticchio G, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Iadarola I, Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality? *Ann N Y Acad Sci*, 2004; 1034:132–44.
- [19] Edwards RG. Follicular fluid. *J Reprod Fert*, 1974; 37:189–219.
- [20] Konadu KA, Chu J, Huang MB, Amancha PK, Amstrong W, Powell MD, Villinger F, Blond VC. Association of cytokines with exosomes in plasma of HIV-1- Seropositive individuals. *J Infect Dis* 2015; 211:1712-16.

- [21] Wildman EE, Jones GM, Wagner PE, Boman RL, Troutt JrHF, Lesch TN. Adairy cow body condition scoring system and its relationship to select production characteristics. *J Dairy Sci* 1982; 65:495-501.
- [22] Leibfried L & First NL. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J Anim Sci* 1979; 48:76-86.
- [23] Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clatton A. Isolations and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006; 22:1-29.
- [24] Sohel, MMH, Hoelker M, Noferesti SS, Salilew-Wondim D, Tholen E, Looft C, Rings F, Uddin MJ, Spencer TE, Scellander K, Tesfaye D. Exosomal and non-exosomal transport of extra-cellular miRNAs in follicular fluid: Implications for bovine oocyte developmental competence. *PLoS ONE* 2013; 8:1-16.
- [25] Herath S, Williams EJ, Lilly ST, Gilbert RO, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reprod* 2007; 134:683–93.
- [26] Lavon Y, Leither G, Moallem U, Klipper E, Voet H, Jacoby S, Glick G, Meidan R, Wolfenson D. Immediate and carryover effects of Gram-negative and Gram positive toxin-induced mastitis on follicular function in dairy cows. *Theriogenology* 2011b; 76:942–53.
- [27] Suzuki C, Yoshioka K, Iwamura S, Hirose H. Endotoxin induces delayed ovulation following endocrine aberration during the proestrous phase in Holstein heifers. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 20:267-78.
- [28] Breen KM & Karsch FJ. Does cortisol inhibit pulsatile luteinizing hormone secretion at the hypothalamic or pituitary level? *Endocrinol* 2004; 145:692-98.
- [29] Furman O, Leither G, Roth Z, Lavon Y, Jacoby S, Wolfenson D. Experimental model of toxin-induced subclinical mastitis and this effect on disruption of follicular function in cows. *Theriogenology* 2014; 82:1165-72.
- [30] Lavon Y, Leither G, Voet H, Wolfenson D. Naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation, steroid and gonadotrophic hormone concentrations, and follicular and luteal growth in cows. *J Dairy Sci* 2010; 93:218-27.
- [31] Roth Z & Wolfenson D. Comparing the effects of heat stress and mastitis on ovarian function in lactating cows: basic and applied aspects. *Domest Anim Endocrinol* 2016; 56:.218-27.

- [32] Hockett ME, Almeida RA, Rohrbach NR, Oliver SP, Dowlen HH, Schrick FN. Effects of induced clinical mastitis during preovulation on endocrine and follicular function. *J Dairy Sci* 2005; 88:2422–31.
- [33] Lavon Y, Leither G, Goshen T, Braw-Tal R, Jacoby S, Wolfenson D. Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. *Theriogenology* 2008; 70: 956-67.
- [34] Williams EJ, Sibley K, Miller AN, Lane EA, Fishwick J, Nash DM, Herath S, England GC, Dobson H, Sheldon IM. The effect of *Escherichia coli* lipopolysaccharide and tumour necrosis factor alpha on ovarian function. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60:462–73.
- [35] Hansen PJ. Cellular and molecular basis of therapies to ameliorate effects of heat stress on embryonic development in cattle. *Anim Reprod* 2013; 10:322-33.
- [36] Lavon Y, Kaim M, Leither G, Biran D, Ezra E, Wolfenson D. Two approaches to improve fertility of subclinical mastitic dairy cows. *J Dairy Sci* 2016; 99:2268-75.
- [37] Battaglia DF, Bowen JM, Krasa HK, Thrun LA, Viguie C, Karsch FJ. Endotoxin inhibits the reproductive neuroendocrine axis while stimulating adrenal steroids: a simultaneous view from hypophyseal portal and peripheral blood. *Endocrinology* 1997; 138:4273–81.
- [38] Hockett ME, Hopkiss FM, Lewis MJ, Saxton AM, Dowlen HH, Oliver SP, Schirick FN. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Anim Reprod Sci* 2000; 58:241-51.
- [39] Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  to prostaglandin E<sub>2</sub> in bovine endometrium. *Endocrinology* 2009; 150:1912–1920.
- [40] Battaglia DF, Krasa HB, Padmanabhan V, Viguie C, Karsch FJ. Endocrine alterations that underlie endotoxin-induced disruption of the follicular phase in ewes. *Biol Reprod* 2000; 62:45-53.
- [41] Lonergan P & Fair T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 2008; 69:17-22.
- [42] Hagemann LT, Beaumont SE, Berg M, Donnison MJ, Ledgard A, Peterson AJ. Development during single IVP of bovine oocyte from dissected follicles interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol Reprod Develop* 1999; 53:451-58.

- [43] Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ. Bovine follicular development and its effects on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology* 2000; 53:11-20.
- [44] Roth Z, Asaf S, Furman O, Lavon Y, Kalo D, Wolfwanson D, Leitner G. Subclinical mastitis disrupts oocyte cytoplasmic maturation in association with reduced developmental competence and impaired gene expression in preimplantation bovine embryos. *Reprod Ferti Develop*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1071/RD14431>.
- [45] Schultz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssay* 1993; 15:531-38.
- [46] Rahman MM, Mazzilli M, Pennarossa G, Brevini TAL, Zeconi A, Gandolfi F. Chronic mastitis is associated with altered ovarian follicle development in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2012; 95:1885-93.
- [47] Roth Z, Asaf S, Furman O, Lavon Y, Kalo D, Wolfwanson D, Leitner G. Subclinical mastitis disrupts oocyte cytoplasmic maturation in association with reduced developmental competence and impaired gene expression in preimplantation bovine embryos. *Reprod Ferti Develop*, 2015. <http://dx.doi.org/10.1071/RD14431>.
- [48] Yang MY & Rajamahendran R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 2001; 63:1313-21.
- [49] György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cel Mol Life Sci* 2011; 68:2667-88.
- [50] Willms E, Johansson HJ, Mäger I, Lee Y, Blomberg EM, Sadik M, Alaarg A, Smith E, Lehtio J, El Andaloussi S, Wood MJA, Vander P. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep* 2016; 6:22519-31.

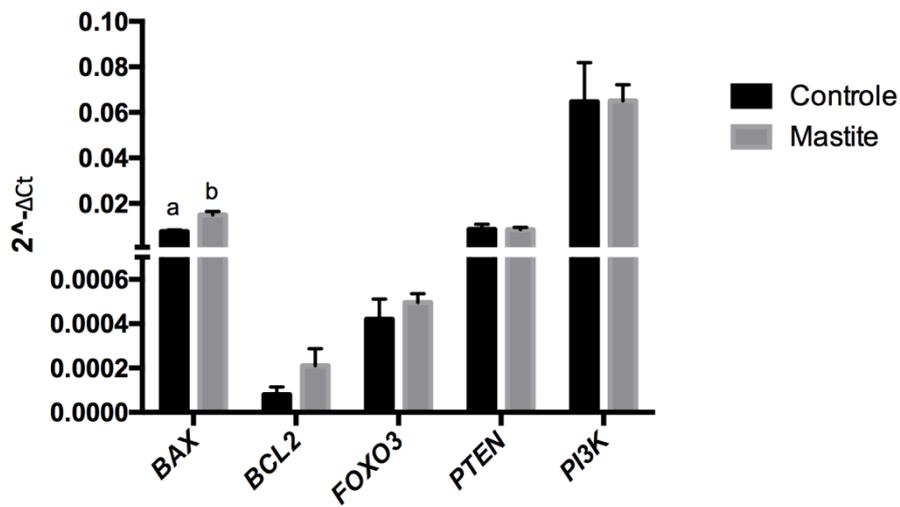


Figura 1- Abundância dos genes marcadores de apoptose ( $\pm$ EPM) relacionada aos animais com  $CCS < 200.000$  células/mL de leite (grupo controle) e  $CCS > 400.000$  células/mL de leite (grupo mastite), obtidas após amplificação por PCR em tempo real,  $2^{-\Delta Ct}$  – método comparativo de expressão gênica relativa.

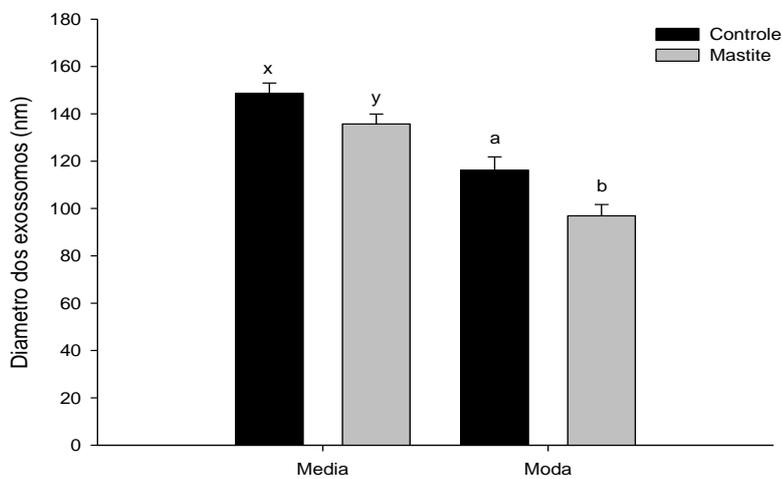


Figura 2- Média ( $\pm$ EPM) e moda ( $\pm$ EPM) de diâmetro dos exossomos isolados do fluido folicular de vacas com  $CCS < 200.000$  células/mL de leite (grupo controle) e  $CCS > 400.000$  células/mL de leite (grupo mastite),  $a \neq b$  ( $P=0,02$ ) e  $x \neq y$  ( $P=0,03$ ).

Tabela 1- Sequência dos primers específicos, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no GenBank ou referências.

Produto	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho produto (pb)	Nº de acesso no GenBank/Referências
<i>BAX</i>	F 5'-CCCGAGTTGATCAGGACCAT-3' R 5'-CACTCCAGCCACAAAGATGG-3'	153	NM_173894.1
<i>BCL2</i>	F 5'-CTTTGTGGAGCTGTATGGC-3' R 5'-CCAGATAGGCACCCAGGG-3'	119	NM_001166486.1
<i>FOXO3</i>	F 5'-CGAAGTGGAGCTAGACCCGG-3' R 5'-CGGGGATCATGGAGTCAGCA-3'	134	NM_001206083.1
<i>PTEN</i>	F 5'-GCCACAAAGTGCCTCGTTTACC-3' R 5'-AGAAGGCAACTCTGCCAAACAC-3'	120	XM_613125.6
<i>PI3K</i>	F 5'-ACACAGCTGACGGGACCTTT-3' R 5'-CCATATTTCCCATCTCGGTGA-3'	127	NM_174575.1
<i>ACTB</i>	F 5'-GACATCCGCAAGGACCTCTA-3' R 5'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'	205	Sangalli et al. (2014)
<i>RPL15</i>	F 5'-CAAACGCCAGTTCCTAAGG -3' R 5'-TCGAGCAAACCTTGAGCTGGT -3'	76	NM_178320.2
<i>PPIA</i>	F 5'-GGTCCTGGCATCTTGTTCCA-3' R 5'-TGCCATCCAACCACTCAGTCT-3'	94	NM_001077866.1

Tabela 2- Efeito da mastite na dinâmica folicular em vacas cruzadas (*Bos taurus* – Holandesa x *Bos indicus* – Gir) submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação.

	Controle	Mastite	P
Número de animais	31	26	
Diâmetro (mm):			
- máximo do FD	17,4 ± 0,6	17,5 ± 0,8	0,75
- folículo ovulatório	17,1 ± 0,6	18,9 ± 0,7	0,18
Crescimento folicular (mm/dia):			
- D8 ao D10	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	0,21
- D8 à ovulação	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2	0,46
Intervalo retirada da P4/ovulação (h)	67,6 ± 3,1	70,8 ± 3,7	0,34
Taxa de ovulação (%)	77,4 (24/31)	57,7 (15/26)	0,09

Abreviações: FD – folículo dominante, D8 – dia 8, D10 – dia 10. P4 - Progesterona

Tabela 3- Efeito da mastite sobre a quantidade e qualidade oocitária de vacas cruzadas (*Bos taurus* – Holandesa x *Bos indicus* – Gir) submetidas à aspiração folicular.

	Grupo Controle	Grupo Mastite	P
Número de animais	13	13	
Total de folículos visualizados	25,8 ± 2,9	25,1 ± 3,9	0,45
Total de oócitos recuperados	16,9 ± 2,3	22,9 ± 7,1	0,02
Oócitos viáveis	10,0 ± 1,5	9,6 ± 2,5	0,99
Taxa de oócitos viáveis (%)	59,1 (130/220)	41,4 (125/298)	0,01
Número de oócitos (qualidade):			
- Grau I	2,5 ± 0,5	3,3 ± 0,7	0,13
- Grau II	3,0 ± 0,8	1,9 ± 0,8	0,26
- Grau III	4,5 ± 0,7	4,4 ± 1,3	0,68
- Degenerados	6,7 ± 1,2	13,3 ± 5,5	0,001