



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação Final de Mestrado

**Avanços no Conhecimento da Fisiopatogenia e Tratamento de Metrite em Vacas de Aptidão
Leiteira**

Pedro Alexandre de Almeida Balseiro

Coimbra, julho de 2024



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Dissertação Final de Mestrado

**Avanços no Conhecimento da Fisiopatogenia e Tratamento de Metrite em Vacas de Aptidão
Leiteira**

Coimbra, julho de 2024

Pedro Alexandre de Almeida Balseiro

Presidente do Júri

Prof. Doutor Hugo Corte-Real Vilhena

Arguente

Prof^ª. Doutora Rosa Maria Lino Neto Pereira

Orientador

Prof^ª. Doutora Elisabete Martins

Orientador Interno

Prof^ª. Doutora Elisabete Martins

Coorientador Interno

Prof^ª. Doutora Diana Valente



Dissertação de Mestrado do Ciclo de Estudos Conducente ao
Grau de Mestre em Medicina Veterinária na EUVG



Índice Geral

Resumo.....	2
Abstract	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. DEFINIÇÃO	5
3. FISIOPATOGENIA.....	6
3.1. ALTERAÇÃO DO ESTADO METABÓLICO E IMUNITÁRIO	6
3.2. RELAÇÃO ENTRE STRESS OXIDATIVO E METRITE.....	8
3.3. FATORES DE RISCO RELACIONADOS COM O PARTO	9
3.4. RESILIÊNCIA À INFEÇÃO UTERINA	10
3.5 ALTERAÇÃO DO MICROBIOMA UTERINO	11
3.5.1. <i>Escherichia coli</i>	14
3.5.2. <i>Fusobacterium spp.</i>	15
3.5.3. <i>Bacteroides spp.</i>	16
3.5.4. <i>Porphyromonas spp.</i>	16
3.5.5. <i>Helcococcus spp.</i>	16
4. IMPACTO NA PERFORMANCE PRODUTIVA E REPRODUTIVA	17
4.1. IMPACTO NA PRODUÇÃO LEITEIRA.....	17
4.2. IMPACTO NA FERTILIDADE	18
4.2.1. Relação entre desregulação hormonal e infertilidade	18
4.2.2. Afeção ovárica e efeitos sobre folículos e oócitos em animais com doença uterina	19
4.2.2.1. Folículos pré-antrais.....	19
4.2.2.2. Folículos antrais	20
4.2.3 Efeitos da doença uterina na implantação e desenvolvimento da gestação	21
5. TRATAMENTO DE METRITE	22
6. CONCLUSÃO	24
7. BIBLIOGRAFIA	26

Índice de figuras

Figura 1. Distribuição dos cinco géneros mais abundantes em vacas saudáveis e com metrite nos dias 0, 2 e 6 ± 2 pós-parto	14
Figura 2. Representação esquemática do impacto da infeção uterina no trato reprodutivo	21

Lista de siglas, símbolos e abreviaturas

AGNE - Ácidos Gordos Não Esterificados

BEN - Balanço Energético Negativo

BHB - Beta-hidroxibutirato

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

FV - Fatores de Virulência

FFMP - Fração de Flavonóides Micronizada e Purificada

LPS - Lipopolissacarídeo

MS - Matéria Seca

RP - Retenção Placentária

SCC - Score de Condição Corporal

SDV - Score de Descarga Vaginal

SV - Secreção Vaginal



Avanços no Conhecimento da Fisiopatogenia e Tratamento de Metrite em Vacas de Aptidão Leiteira

Pedro Balseiro ^a, Diana Valente ^a, Elisabete Martins ^a

^a Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (pedroaab@hotmail.com; diana.valente@euvg.pt; elisabete.martins@euvg.pt)

Resumo

A metrite enquanto doença aguda comum do pós-parto, desafia o bem-estar e a produtividade animal de vacas leiteiras. Embora a antibioterapia seja rotineiramente utilizada no tratamento desta enfermidade, existe uma crescente pressão para a redução desta prática, exercida pelo aumento das resistências bacterianas aos antibióticos. A antibioterapia nem sempre resulta na melhoria dos parâmetros produtivos e reprodutivos dos quais depende a rentabilidade das explorações. Melhorar o conhecimento sobre as alterações do estado metabólico, inflamatório, oxidativo e do microbioma uterino, a par com as implicações destas na saúde do animal, contribui para o estabelecimento de novas estratégias de prevenção e tratamento da doença. Os objetivos deste estudo foram, portanto, rever a literatura mais recente sobre a fisiopatogenia, o impacto na *performance*, prevenção e tratamento de metrite, incluindo a eficácia de novas terapêuticas e abordagens preventivas. Os artigos relevantes foram retirados do motor de busca *PubMed* e a pesquisa foi limitada ao período 1991-2024. O stress metabólico e oxidativo no período de transição, tem demonstrado ser um importante promotor do desenvolvimento de metrite através da perturbação da imunidade inata do animal e aumento do risco de problemas no parto. Quando a capacidade de resposta dos mecanismos de defesa do animal é ultrapassada ou disfuncional, a infeção uterina instala-se. Estudos recentes demonstram que o útero gravídico não é um meio estéril e que a população microbiana presente no útero após o parto sofre uma perda de heterogeneidade, em casos de metrite, caracterizada pelo sobre crescimento de *Bacteroides* e *Fusobacterium*. Estas bactérias apresentam fatores de virulência que perturbam substancialmente a fertilidade do animal, desde a reserva de folículos primordiais ao desenvolvimento de blastocistos. Novas terapias e estratégias de prevenção têm sido desenvolvidas como a administração intrauterina de flavonoides glicosídeos e a prevenção de metrite através de vacinação e utilização de citoquinas recombinantes.

Palavras-chave: Metrite, Microbioma, Produtividade, Fertilidade, Prevenção, Tratamento

Abstract

Metritis, a common acute postpartum disease challenges the welfare and productivity of dairy cows. Although antibiotic therapy is routinely used as a treatment of this condition, there is growing pressure to reduce this practice, due to increased bacterial resistance to antibiotics. Antibiotic therapy does not always result in improved productive and reproductive parameters, which are essential for the profitability of dairy farms. Increasing our understanding of changes in metabolic, inflammatory, oxidative status, and uterine microbiome, along with their implications for animal health, contributes to the establishment of new strategies for disease prevention and therapy. Therefore, the objectives of this study were to review the most recent literature on the pathophysiology, impact on performance, prevention, and treatment of metritis, including the efficacy of new therapies and preventive approaches. Relevant articles were retrieved from the PubMed search engine and the search was limited to the period 1991-2024. Metabolic and oxidative stress during the transition period have been shown to be important promoters of metritis development by disrupting the animal's innate immunity and increasing the risk of calving problems. When the responsiveness of the animal's defense mechanisms is overwhelmed or dysfunctional, uterine infection sets in. Recent studies demonstrate that the gravid uterus is not a sterile environment, and that the present microbial population undergoes a loss of heterogeneity in cases of metritis, characterized by the overgrowth of *Bacteroides* and *Fusobacterium*. These bacteria have virulence factors that substantially disrupt the fertility of the animal from the reserve of primordial follicles to the development of the blastocysts. New therapies and preventive strategies have been developed, such as the intrauterine administration of flavonoid glycosides, and prevention of metritis through vaccination and use of recombinant cytokines.

Key words: Metritis, Microbiome, Productivity, Fertility, Prevention, Treatment

1. INTRODUÇÃO

A metrite é uma doença do pós-parto com elevada prevalência, especialmente em vacas leiteiras de alta produção e cuja incidência pode variar entre os 10 e 30% (Bicalho *et al.*, 2017). Algumas explorações podem apresentar incidências superiores, possivelmente pela inconsistência na própria definição de metrite (Garzon *et al.*, 2022). Além da elevada prevalência, a metrite é uma das doenças mais importantes da indústria de vacas leiteiras pelas perdas económicas que gera na exploração, resultantes da quebra da produção leiteira, redução da performance reprodutiva e aumento da taxa de refugo (Pérez-Báez *et al.*, 2021). A doença ocorre maioritariamente nos primeiros dez dias de lactação e consiste na inflamação de todas as camadas uterinas e presença de descarga uterina aquosa, fétida e de coloração vermelho-acastanhada podendo ou não apresentar sintomatologia sistémica como febre, inapetência e quebra na produção (Sheldon *et al.*, 2006). A etiologia multifatorial da metrite dificulta a sua prevenção e tratamento. Os objetivos deste estudo foram rever e analisar a literatura relevante acerca dos progressos no conhecimento da fisiopatogenia, prevenção e tratamento de metrites em bovinos de leite, perceber o impacto da doença na saúde e produção animal e caracterizar a eficácia de novas terapêuticas de acordo com a mais recente produção científica. O principal fator de risco para o desenvolvimento de metrite é a retenção placentária, contudo, qualquer outra condição que comprometa a ingestão voluntária de alimento (expresso em matéria seca – MS) e o correto funcionamento do sistema imunitário, aumenta o risco de metrite (LeBlanc, 2008). Estes animais entram em stress metabólico porque são incapazes de consumir a MS suficiente para suprir as necessidades energéticas necessárias para a lactação (Sheldon, Cronin e Bromfield, 2019). Ao comprometer a imunidade inata do animal, o stress metabólico aumenta o risco de metrite. A diminuição da ingestão de MS no pré-parto está associada a níveis séricos superiores de ácidos gordos não esterificados (AGNE) e beta-hidroxibutirato (BHB), que por sua vez, estão associados a uma menor atividade dos neutrófilos e maior risco de metrite (Hammon *et al.*, 2006). O stress metabólico e oxidativo também promove a ocorrência de complicações relacionadas com o parto, como a retenção placentária, que aumenta a contaminação do útero (Kimura *et al.*, 2002). A entrada de bactérias ambientais no útero durante o parto é considerada inevitável e considera-se que passado 20 minutos do parto fica definido o microbioma uterino. Até ao dia do diagnóstico, a comunidade bacteriana do útero de animais com metrite torna-se menos rica em diversidade filogenética com o predomínio do crescimento de *Bacteroidetes* e *Fusobacteria* (Jeon *et al.*, 2015). Doenças uterinas como a metrite diminuem a performance reprodutiva do animal favorecendo situações de anovulação, lesando os oócitos limitando a fertilização e prejudicando a função uterina no reconhecimento e manutenção da gestação. Estes efeitos advêm não só de produtos bacterianos como também dos consequentes

mediadores de inflamação e stress oxidativo (Gilbert, 2019). Dada a etiologia predominantemente bacteriana da doença, o uso de antibióticos é geralmente considerado benéfico no tratamento de metrites, no entanto, em resposta ao aumento das resistências bacterianas aos antibióticos é necessário continuar a estudar o uso de terapias alternativas para o tratamento e prevenção de metrite como a administração intrauterina de flavonoides glicosídeos (Gutiérrez-Reinoso *et al.*, 2022) e de bactérias produtoras de ácido láctico (Genís *et al.*, 2018), respetivamente.

2. DEFINIÇÃO

Embora a metrite seja uma das doenças puerperais mais comuns em bovinos de leite, nem sempre os critérios utilizados para o seu diagnóstico são semelhantes na produção científica, não existindo ainda um consenso em relação à sua definição (Garzon *et al.*, 2022). Frequentemente, a definição de metrite e endometrite pode ser difícil quando o diagnóstico é realizado apenas por palpação transretal do útero aumentado. A inflamação uterina devido à presença de bactérias patogénicas é comum a ambas as patologias sendo que na endometrite é limitada ao endométrio, e na metrite, todas as camadas da parede uterina são afetadas (Sheldon *et al.*, 2006). Garzon *et al.* (2022) reviu sistematicamente os sinais clínicos descritos para o diagnóstico de metrite puerperal, concluindo que a definição de metrite mais citada foi proposta por Sheldon *et al.*, (2006) que definiu um caso de metrite puerperal como um quadro que ocorre nos primeiros 21 dias pós-parto, em que o útero se apresenta atipicamente aumentado, com conteúdo uterino fétido e aquoso, de coloração vermelho-acastanhada, associado a sinais sistémicos como diminuição da produção leiteira, apatia, temperatura corporal superior a 39,5 °C e sinais de toxemia. Animais que neste período não apresentam sinais clínicos sistémicos, mas apresentam o útero de tamanho aumentado e conteúdo purulento, podem ser considerados casos de metrite clínica. É também possível classificar a metrite em três graus de acordo com a severidade do quadro clínico (Sheldon *et al.*, 2009): grau 1, que apresenta aumento do útero com conteúdo uterino purulento, sem sinais de doença sistémica; grau 2, quando os animais apresentam as características descritas no grau 1 com sintomatologia sistémica adicional como a diminuição da produção de leite, prostração e febre (> 39.5 °C); grau 3, o grau mais severo, que acresce aos anteriores a presença de sinais de toxemia como inapetência, extremidades frias, depressão e/ou colapso. A endometrite clínica é definida pela presença de exsudado uterino purulento na vagina, 21 dias após o parto, ou mucopurulento, após 26 dias do parto, na ausência de outros sinais clínicos. A endometrite subclínica é definida pela inflamação do endométrio, na ausência de secreção vaginal, caracterizada por uma percentagem de neutrófilos superior a 10% do total das células presente numa amostra citológica ou *flushing* uterino (Sheldon *et al.*, 2006).

Em 174 estudos analisados por Garzon et al. (2022), 21,2% dos artigos descreveram o odor da secreção vaginal (SV) na metrite, como pútrido, repulsivo ou outro sinónimo, e 7,5% dos artigos não apresentou o odor da SV como critério de diagnóstico. A cor da SV foi descrita como castanha, cor-de-rosa, vermelha, cor chocolate, branca, amarela ou cinzenta em 26,4% dos artigos e 24,1% não utilizou a cor da SV como critério. A viscosidade da SV de animais considerados doentes em 17,8% dos artigos analisados foi caracterizada como mucopurulenta, fina, serosa ou anormal e 11,5% dos estudos não utilizou o tipo de viscosidade como critério de diagnóstico. Adicionalmente, apenas 56,8% dos artigos incluiu a temperatura retal superior a 39,5 °C como critério de diagnóstico e 71,2% dos artigos não incluiu nenhum sinal de doença sistémica como critério necessário à identificação de casos de metrite puerperal. Estes resultados mostram que existe uma grande discrepância entre explorações em relação aos critérios utilizados para definir, diagnosticar e consequentemente, indicar animais com metrite para tratamento. Numa altura de crescente ameaça à saúde pública, devido ao desenvolvimento de resistências aos antimicrobianos, futuros estudos nesta área são necessários de forma a padronizar os critérios utilizados para diagnóstico e tratamento de metrites e impedir o uso indevido de antibióticos (Espadamala *et al.*, 2018).

3. FISIOPATOGENIA

3.1. ALTERAÇÃO DO ESTADO METABÓLICO E IMUNITÁRIO

As vacas de leite entram em stress metabólico porque são incapazes de consumir a quantidade de MS necessária para suprir as necessidades da energia metabólica exigida no início da lactação (Sheldon, Cronin & Bromfield, 2019). Uma vaca que produza 40 litros de leite por dia precisa de três vezes mais energia do que a necessária para o metabolismo de manutenção (Sheldon, Cronin & Bromfield, 2019). Consequentemente, estes animais são obrigados a mobilizar energia dos tecidos corporais para satisfazer o inevitável balanço energético negativo (Esposito *et al.*, 2014) passando por uma série de alterações metabólicas relacionadas com o aporte de energia e cálcio para a lactogénese, que compromete a sua imunidade inata (Leblanc, 2020). Huzzey et al. (2007) mostraram que animais com metrite puerperal ingeriram menor quantidade de MS nas duas últimas semanas pré-parto, seguindo-se animais com metrite clínica e animais saudáveis, por ordem crescente de ingestão. Por cada kg de MS não consumido durante a última semana de gestação, o risco de desenvolver metrite severa aumentou 2,87 vezes (Huzzey *et al.*, 2007). Em concordância com estes resultados, Pérez-Báez et al. (2019) reportaram que vacas que desenvolveram metrite, tiveram menor ingestão de MS nos 21 dias pré-parto (expressa como percentagem do peso corporal) comparativamente a vacas que permaneceram saudáveis. Adicionalmente, os autores calcularam o balanço energético dos animais

em estudo nos últimos 21 dias de gestação e constataram que vacas com metrite tiveram um balanço energético no pré-parto inferior às das vacas que não desenvolveram metrite. A diminuição da ingestão de MS no pré-parto resulta num estado de balanço energético negativo (BEN) caracterizado pela mobilização lipídica e aumento das concentrações séricas de ácidos gordos não esterificados (AGNE) livres e beta-hidroxibutirato (BHB), que corresponde à forma de corpos cetónicos predominantemente disponível para uso metabólico (Rico & Barrientos-Blanco, 2024). Hammon et al. (2006) demonstraram que a diminuição de ingestão de MS e aumento dos níveis de AGNE estavam associados ao aumento da incidência de metrites e à diminuição da atividade da mieloperoxidase (enzima cuja concentração é utilizada para medir a capacidade de fagocitose) das células polimorfonucleares, desde a última semana de gestação à quarta semana pós-parto. Adicionalmente, Hammon et al. (2006) constataram que vacas com metrite tinham níveis de atividade da mieloperoxidase inferiores a vacas saudáveis. Estes resultados sugerem que a diminuição da capacidade de eliminação bacteriana pelos neutrófilos é um dos mecanismos envolvidos no comprometimento da imunidade inata de animais em BEN, durante o período de transição, tornando-os mais suscetíveis a doenças infecciosas, como a metrite. Estes resultados vão de encontro a pesquisas de outros autores que indicam a cetose como fator de risco para o desenvolvimento de metrite (Suthar *et al.*, 2013). Além da diminuição da capacidade de destruição das bactérias pelos neutrófilos, também a fagocitose, quimiotaxia e diapedese está diminuída em vacas com BEN no início da lactação, comparativamente a vacas a meio da lactação (Stevens *et al.*, 2011). Apesar das vacas que desenvolveram metrite terem maior contagem de monócitos relativamente a animais sem doença, no estudo de Casaro et al. (2023) sobre o impacto da metrite nos diferentes tipos de leucócitos em animais com metrite, os monócitos de vacas com metrite no dia zero e três após o parto demonstraram menor expressão de CD62L e CD11b comparativamente aos de vacas sem metrite, o que significa que se encontravam menos ativos. Quando ocorre reconhecimento bacteriano por parte das células do endométrio ou por macrófagos residentes, estas células libertam citocinas pro-inflamatórias, como a interleucina-6 e interleucina-8, com o intuito de recrutar neutrófilos e monócitos para o local de inflamação. Este recrutamento faz-se através da ligação destas citocinas a moléculas de adesão celular presentes na superfície dos leucócitos como a CD62L e CD11b. A redução da expressão de moléculas de adesão resulta num menor recrutamento de monócitos. A imunidade adquirida também pode ser afetada pela menor capacidade de apresentação de antígenos dos monócitos pós-parto em vacas que desenvolveram metrite (Casaro *et al.*, 2023).

Além da cetose e doença do fígado gordo consequentes ao BEN durante o período de transição, também a hipocalcémia é um fator de risco para o desenvolvimento de metrite (Martinez *et al.*, 2012) e pode contribuir para o seu desenvolvimento de várias formas. A hipocalcémia resulta na redução da

contratibilidade da musculatura lisa, da taxa de ruminação e ingestão de MS, que por sua vez, levam à mobilização de ácidos gordos do tecido adiposo (Goff, 2008) com aumento dos AGNE e BHB. O aumento destes componentes ocorre em casos de cetose, o que vai de encontro aos resultados de Rodríguez et al. (2017), nos quais animais com hipocalcémia subclínica (cálcio sérico $\leq 8,56$ mg/dL sem sintomatologia clínica) tiveram um risco 5,5 vezes maior de desenvolver cetose. Desta forma, a hipocalcémia leva a uma incapacitação dos neutrófilos e consequentemente da capacidade de resposta da imunidade inata do animal, indiretamente através do aumento de AGNE e corpos cetónicos e, de forma direta, pela redução do cálcio citosólico, que suprime a fagocitose e a capacidade de destruição de bactérias (Martinez *et al.*, 2014). Rodríguez et al. (2017) também mostrou que vacas multíparas com hipocalcémia subclínica apresentaram 3,57 vezes maior probabilidade de desenvolver retenção placentária quando comparadas com vacas multíparas normocalcémicas, a qual, por sua vez, é o principal fator de risco de metrites (LeBlanc, 2008). Embora alguns autores tenham verificado uma relação entre hipocalcémia e metrite clínica (Neves et al. 2018; Barragan et al., 2018), existem publicações científicas que não demonstram níveis significativamente inferiores de cálcio em vacas com metrite comparativamente a vacas sem metrite (Mikulková *et al.*, 2020). Tal pode dever-se ao facto dos efeitos prejudiciais da hipocalcémia subclínica variarem em função da sua duração e do dia pós-parto em que foi avaliada a calcémia do animal. No estudo de Neves et al. (2018), a concentração de cálcio plasmático medido no primeiro dia pós-parto não estava associada ao risco de desenvolver metrite. Animais com concentração de cálcio $\leq 2,15$ mmol/L neste dia até apresentaram maior produção de leite nas primeiras 15 semanas de lactação comparativamente a animais com concentração de cálcio superior. Quando avaliada no dia dois, três e quatro pós-parto, a concentração de cálcio estava associada ao desenvolvimento de metrite. Adicionalmente, o número e tipo de bactérias envolvidas, o estado do sistema imunitário, a capacidade de regeneração do endométrio e fatores endócrinos também influenciam o desenvolvimento de metrite (Rodríguez, Arís & Bach, 2017).

3.2. RELAÇÃO ENTRE STRESS OXIDATIVO E METRITE

A conversão de nutrientes em energia disponível para o funcionamento dos processos fisiológicos de manutenção de um determinado organismo vivo, ocorre através de um conjunto de reações metabólicas que constituem o processo de respiração celular (Sordillo, 2013). Para que este processo resulte numa produção eficiente de energia, as moléculas de oxigénio são necessárias como recetoras de eletrões. Da ligação entre moléculas de oxigénio e eletrões, formam-se espécies reativas de oxigénio (ROS), que pertencem a uma classe de radicais livres provenientes do metabolismo celular de qualquer organismo aeróbio (Sordillo & Aitken, 2009). O aumento considerável da necessidade de oxigénio durante o período de transição, caracterizado pelo acréscimo das exigências metabólicas, resulta no

aumento da produção de ROS. Assim, gera-se um desequilíbrio entre a produção de ROS e a disponibilidade de mecanismos antioxidantes, resultando na acumulação de ERO. Como resultado da acumulação excessiva de ROS pode ocorrer dano celular e tecidual com o desenvolvimento de uma condição denominada de stress oxidativo (Sordillo, Contreras & Aitken, 2009). Existem vários estudos que demonstram uma relação positiva entre stress oxidativo e desenvolvimento de metrite. Num estudo de Mikulková et al. (2020) que incluiu um grupo de vacas com metrite e um grupo sem doença, a média dos níveis de malondialdeído, que é um produto intermediário da peroxidação lipídica, foi significativamente maior no grupo das metrites comparativamente ao grupo controlo. Relativamente à presença de produtos antioxidantes dos animais, o grupo das metrites apresentou concentrações de vitamina A e E (antioxidantes exógenos), inferiores ao grupo controlo. Estes resultados concordam em parte com estudos de outros autores como Akar & Yuksel (2010), que também observaram níveis superiores de malondialdeído e inferiores de vitamina A e E no grupo de animais com metrite. Contrariamente a Mikulková et al. (2020) que não obtiveram diminuição significativa de outros agentes antioxidantes além dos listados anteriormente, Akar & Yuksel (2010) também reportaram níveis reduzidos da atividade de enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase e catalase, e da concentração de beta-carotenos nas vacas com metrite, relativamente ao grupo controlo. Um dos principais alvos das ROS são os lípidos e por isso, através da peroxidação lipídica, podem causar dano celular, em especial a células do sistema imunitário, que são particularmente sensíveis ao stress oxidativo. Não só as suas membranas fosfolipídicas são extremamente ricas em ácidos gordos polinsaturados, o que as torna bastante suscetíveis à peroxidação, como este tipo células, principalmente os neutrófilos, produzem grandes quantidades de ROS quando estimulados (Spears & Weiss, 2008). A vitamina E atua de forma sinérgica com o selénio para proteger as células de peroxidação lipídica e aumenta a eficiência dos neutrófilos protegendo-os da lesão oxidativa consequente do processo de eliminação das bactérias fagocitadas (Xiao *et al.*, 2021). A suplementação destes dois antioxidantes ajuda a compensar o excesso de radicais livres, melhoram a atividade dos neutrófilos, as contrações uterinas, involução uterina e reduzem a incidência de retenção placentária (Khatti *et al.*, 2017).

3.3. FATORES DE RISCO RELACIONADOS COM O PARTO

Além das doenças metabólicas, existem condições relacionadas com o parto que por lesão e aumento da contaminação microbiológica do trato genital feminino, também se revelaram fatores de risco para o desenvolvimento de metrite, tais como: retenção planetária (RP), distocia, parto gemelar, aborto, gestação de curta duração, primiparidade e crias grandes de sexo masculino (Hossein-Zadeh & Ardalán, 2011). Hossein-Zadeh & Ardalán (2011) desenvolveram um estudo numa amostra de 57301 vacas de

leite, com o objetivo de avaliar a associação entre fatores de risco relacionados com o parto e o risco de desenvolver metrite. Concluíram que o risco de vacas Holstein desenvolverem metrite era 27,74, 6,57, 6,26, 4,32, 2,45, 2,41 e 1,86 vezes superior quando associado a RP, parto gemelar, aborto, distocia, cria do sexo masculino, parto no inverno ou primiparidade, respetivamente, a vacas com parto eutócico e sem estes fatores de risco. Dentro deste conjunto de complicações, a retenção placentária é o principal fator de risco de metrite (LeBlanc, 2008), pois favorece a contaminação bacteriana do útero por atraso na sua involução, na expulsão dos lóquios e na regeneração do endométrio (Sheldon *et al.*, 2008). A retenção placentária é definida como a falha da expulsão das membranas fetais nas 12-24 horas posteriores ao parto (Amin & Hussein, 2022) e partilha várias causas com a metrite. A etiologia e patogénese da RP é um processo complexo e pouco claro que não se enquadra nos objetivos desta revisão, no entanto, tal como a metrite, o stress metabólico gera uma disfunção no sistema imunitário que é necessário neste caso, no processo de reconhecimento da placenta como corpo estranho e da sua separação do útero, através da diminuição de citoquinas como a interleucina-8 e atividade da mieloperoxidase dos neutrófilos (Kimura *et al.*, 2002). As complicações relacionadas com o parto como a distocia, parto gemelar e aborto também são predisponentes a RP (Mahani *et al.*, 2021). Além destes fatores, também a existência de stress inflamatório, stress oxidativo e disfunção hormonal na altura do parto demonstram estar associados à falha na expulsão das membranas fetais (Mcnaughton & Murray, 2005).

3.4. RESILIÊNCIA À INFEÇÃO UTERINA

Resiliência é a capacidade de o animal permanecer saudável ou responder de forma ligeira e recuperar rapidamente em resposta a determinado desafio. Estes desafios podem ter origem intrínseca como o stress metabólico no período de transição, ou extrínseca como a infeção uterina por agentes patogénicos (van Dixhoorn *et al.*, 2023). Ambos os desafios estão presentes na metrite. Esta por sua vez, depende da tolerância e resistência do animal. Tolerância é a habilidade de limitar a severidade da doença derivada de uma determinada carga bacteriana e depende de vários mecanismos de defesa: produção de muco e péptidos antimicrobianos pelo endométrio e presença de *tight-junctions* que separam a superfície apical e basal das células do endométrio. Resistência é a habilidade de limitar a multiplicação da carga bacteriana infetante e depende da imunidade do animal (Sheldon, Cronin & Bromfield, 2019). Embora se considere inevitável a entrada de bactérias ambientais no útero após o parto, a higiene do local do parto não é um fator principal para o desenvolvimento de doença uterina (Potter *et al.*, 2010). Em vez da presença de agentes patogénicos, o desenvolvimento e progressão de metrite pode dever-se principalmente a fatores de risco que afetam a tolerância, como as condições relacionadas com o parto que lesam o endométrio e permitem a infeção das camadas subjacentes, e

a resistência aos agentes bacterianos, como o stress metabólico que enfraquece o sistema imunitário. No caso de as bactérias superarem estes mecanismos de defesa, a inflamação consequente delinea a progressão e resolução da doença uterina (Sheldon, Cronin & Bromfield, 2019). Contudo, algumas bactérias têm evoluído no sentido de desenvolver estratégias que permitem escapar às defesas do hospedeiro, através de fatores de virulência abordados nos capítulos seguintes, e dessa forma causar doença em animais aparentemente saudáveis. Silva et al. (2023) conseguiram aumentar o risco de desenvolvimento de metrite em animais saudáveis, administrando, experimentalmente, uma solução intrauterina constituída por 10^6 unidades formadoras de colónias de *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum* entre as quatro e 22 horas pós-parto, sugerindo que é possível um animal saudável contrair metrite devido à contaminação bacteriana do útero pelas bactérias referidas.

3.5 ALTERAÇÃO DO MICROBIOMA UTERINO

A existência de uma interação simbiótica entre o animal e as comunidades microbianas residentes é essencial para a manutenção do estado geral do mesmo, incluindo uma boa saúde reprodutiva e fertilidade (Comizzoli *et al.*, 2021). Como tal, diversas comunidades microbianas têm sido estudadas pelos diferentes planos anatómicos desde o rúmen (Seshadri *et al.*, 2018), glândula mamária (Porcellato *et al.*, 2020), aparelho locomotor (Espírito *et al.*, 2020), sistema respiratório (Lima et al., 2019) e trato reprodutor (Jeon & Galvão, 2018). A caracterização do microbioma uterino pode fornecer informação importante sobre a ecologia dos microrganismos associados à doença reprodutiva e desta forma, oferecer oportunidades para o desenvolvimento de terapias que não incluam antibióticos (Pascottini & LeBlanc, 2020). Após o parto, a contaminação do útero por uma grande diversidade de bactérias ambientais é considerada inevitável e o órgão passa por um processo repetitivo de contaminação, eliminação e nova contaminação (Drillich & Wagener, 2018). Durante várias décadas foi consensual o facto de as bactérias uterinas serem eliminadas completamente antes da gestação seguinte e que o útero gravídico era um meio estéril, no entanto, atualmente sabe-se que este não é o caso e que o útero da vaca prenha pode até conter algumas bactérias potencialmente patogénicas (Karstrup *et al.*, 2017). Até 2010, o conhecimento adquirido em relação ao microbioma uterino pós-parto foi quase exclusivamente recolhido através de estudos dependentes de cultura bacteriana (Galvão, Bicalho & Jeon, 2019) e, embora estes estudos tenham constituído a base do conhecimento da ecologia uterina atual, é possível que tenham subestimado a complexidade microbiana do meio intrauterino, dado que menos de 1% dos microrganismos colhidos estarão aptos para cultura nas condições laboratoriais normais (Jeon *et al.*, 2015). Sheldon et al. (2002) classificou as bactérias de

acordo com a patogenicidade expectável e considerou a *T. pyogenes*, *E. coli*, *Prevotella melaninogenica* e *F. necrophorum* como os principais agentes patogénicos, embora os resultados da restante comunidade científica não tenham sido sempre concordantes com a associação destes agentes à doença uterina, especialmente em relação a *E. coli* e *P. melaninogenica* (Galvão, Bicalho & Jeon, 2019). Um estudo dependente de cultura bacteriana, indicou uma prevalência significativamente superior de *T. pyogenes*, *E. coli* e *Bacteroides* em amostras uterinas de animais com metrite comparativamente a animais saudáveis, no décimo dia em lactação. Observou-se uma correlação positiva entre a presença destas duas bactérias, sugerindo que na presença simultânea possam atuar de forma sinérgica. Ao vigésimo dia pós-parto deixou de se observar diferença significativa na prevalência de *E. coli* entre grupos, sugerindo que o principal papel desta bactéria pode ser o favorecimento do crescimento de outros agentes patogénicos (Huszeniczal *et al.*, 1999). Estudos baseados em cultura bacteriana indicaram que o género *Streptococcus* é isolado com menos frequência à medida que a secreção uterina piora (Dohmen *et al.*, 1995) e apresenta uma correlação negativa com a presença de *T. pyogenes* (Bonnett *et al.*, 1991), o que sugere uma ação promotora de saúde uterina por parte destas bactérias. Em 2010 começaram a ser usadas em clínica de bovinos, técnicas independentes de cultura bacteriana, baseadas em sequenciação genómica, como PCR e sequenciação metagenómica (Galvão, Bicalho & Jeon, 2019), que permitiram a sequenciação do genoma contido numa amostra ambiental, e conseqüente identificação da constituição da comunidade bacteriana presente (Thomas, Gilbert & Meyer, 2012). A caracterização pode ser feita por sequenciação do genoma completo ou apenas do gene procaríota 16S de rRNA, que representa uma subunidade ribossomal comum a todas as bactérias, composta por 1500 pares de bases e 9 regiões variáveis que permitem a classificação filogenética dos géneros ou espécies envolventes numa determinada população microbiana (Weisburg *et al.*, 1991). A piro-sequenciação e criação de bibliotecas de clones de DNA foram outras tecnologias utilizadas recentemente para diferenciar o microbioma uterino de vacas com e sem metrite (Santos & Bicalho, 2012; Santos *et al.*, 2011). O desenvolvimento destas tecnologias contribuiu para a expansão do conhecimento acerca do microbioma do útero associado a doença uterina (Galvão, Bicalho & Jeon, 2019). Jeon *et al.* (2015) colheram 60 amostras uterinas por zaragatoa e avaliaram a progressão do microbiota uterino desde o parto até ao estabelecimento de metrite. Adicionalmente, estudou a correlação de diferentes bactérias entre elas e com o score de descarga vaginal (SDV), utilizando a seguinte categorização: 1, secreção viscosa clara, vermelha ou castanha; 2, secreção mucosa turva com flocos de pus; 3, secreção mucopurulenta com < 50% de pus; 4, semelhante ao grau 3 com ≥ 50% de pus; 5, secreção aquosa fétida vermelho-acastanhada. Através da sequenciação do gene 16S rRNA, identificaram no total, 28 famílias e 824 géneros de bactérias. Oito das famílias e 30 dos géneros

constituíam 99,7% e 91,1% da comunidade bacteriana, respetivamente. Inicialmente, constataram que passados 20 minutos do parto, todas as vacas tinham um microbioma uterino estabelecido e semelhante entre vacas que permaneceram saudáveis e aquelas que desenvolveram metrite e assim se manteve até ao segundo dia pós-parto. Foi entre o segundo e sexto dia pós-parto que a abundância relativa de famílias se alterou nas vacas que adquiriram metrite, com o aumento relativo de *Bacteroidetes* e *Fusobacteria*. Em relação aos géneros, nenhum em específico se mostrou discriminativo entre animais doentes e saudáveis. Assim, é provável que a abundância relativa e as interações entre bactérias sejam fatores mais importantes para o desenvolvimento de metrite do que diferenças bacterianas específicas entre comunidades. Os autores testaram esta hipótese avaliando a evolução dos cinco géneros mais abundantes ($\geq 5\%$ de abundância) desde o parto até ao sexto dia pós-parto e reportaram um aumento da abundância relativa de *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Porphyromonas* e diminuição de *Coxiella* e *Ureaplasma* (Figura 1), este último apenas entre o segundo e sexto dia. Adicionalmente, não só o género *Bacteroides* demonstrou uma correlação positiva com o SDV como também com a abundância relativa de *Fusobacterium*, o que sugere uma ação sinérgica entre os dois. Também a proporção de *Bacteroides* e *Fusobacterium* estiveram positivamente correlacionadas com *Filifactor* e *Helcococcus*, respetivamente. Os resultados deste estudo indicam uma alteração rápida do microbioma uterino pós-parto favorecendo a multiplicação de bactérias anaeróbias como as *Fusobacteria* e *Bacteroidetes*, provavelmente devido ao término da circulação sanguínea na placenta com conseqüente diminuição de oxigénio, o que, juntamente com os restos de fluidos fetais, forma o meio ideal para o crescimento de anaeróbios (Sheldon *et al.*, 2008). Além disso, os autores também obtiveram resultados que suportam a hipótese de o desenvolvimento de metrite se dever principalmente a uma disbiose do microbioma uterino e não à infeção por agentes específicos, uma vez que o grupo de vacas com metrite, apresentou um número médio de espécies diferentes inferior ao grupo de controlo, indicando que a comunidade microbiana é mais homogénea em animais doentes. Assim, as alterações do microbioma uterino reportadas por Jeon *et al.* (2015) coincidem com os três tipos de disbiose sugeridos por Petersen & Round (2014): perda de micro-organismos benéficos; sobre crescimento de micro-organismos potencialmente patogénicos e perda de diversidade microbiológica. Outros estudos reportaram igualmente um declínio da diversidade bacteriana no útero pós-parto de vacas que desenvolveram metrite em relação a vacas que permaneceram saudáveis (Chen *et al.*, 2020), com alterações características da abundância dentro da comunidade microbiana dos filós como o aumento de *Bacteroidetes* e *Fusobacteria* (Santos, Gilbert & Bicalho, 2011), diminuição de *Firmicutes* e *Proteobacteria* (Bicalho *et al.*, 2017) e dos géneros, incluindo o aumento de *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Porphyromonas* (Sicsic *et al.*, 2018). Ao nível das espécies associadas a metrite, ao

contrário de estudos baseados em cultura bacteriana (Huszeniczal *et al.*, 1999), vários estudos recentes baseados em metagenômica não mostraram diferença na prevalência de *E. coli* e *T. pyogenes* entre animais com metrite e animais saudáveis (Cunha *et al.*, 2018). Ainda assim, a baixa abundância relativa de um agente patogénico não invalida a sua importância na patogenia de infeções uterinas. Os fatores de virulência de algumas destas bactérias menos representadas promovem o crescimento de agentes patogénicos oportunistas e/ou facilitam o seu processo de invasão no endométrio (Çömlekcioğlu *et al.*, 2024). De seguida discutimos o conhecimento atual sobre os mecanismos de patogenicidade das principais bactérias envolvidas na metrite.

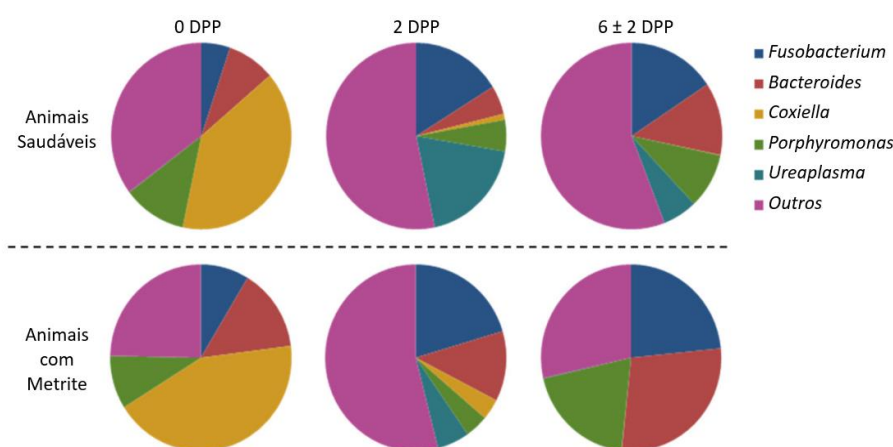


Figura 1. Distribuição dos cinco géneros mais abundantes em vacas saudáveis e com metrite nos dias 0, 2 e 6 ± 2 pós-parto (Adaptado de Jeon *et al.*, 2015).

3.5.1. *Escherichia coli*

O papel da *E. coli* na patogénese de metrite tem sido controverso. Por um lado, existem estudos como o de Jeon *et al.* (2015) cujos resultados não só identificaram uma correlação negativa do género *Escherichia* com o SDV e com a abundância de *Bacteroides* e *Fusobacterium*, como também demonstraram uma associação da bactéria com saúde uterina; ou os de Cunha *et al.* (2018) que obtiveram, através da utilização de *primers* específicos de *E. coli* na região 16S rRNA, um número de cópias de genes semelhante entre o grupo de animais saudáveis, com metrite e com metrite e febre. Por outro lado, existem estudos que descrevem a presença de fatores de virulência (FV) de *E. coli* intrauterina nos primeiros dias pós-parto, como importantes fatores de risco para o desenvolvimento de metrite: vacas positivas a *E.coli* portadora de fimH (adesina proteica localizada no término das fímbrias, que favorece a adesão da bactéria aos tecidos do hospedeiro) demonstraram um risco 4,7 vezes maior de desenvolver metrite, comparativamente a vacas negativas a este FV (Bicalho *et al.*,

2012). Ainda no estudo realizado pelo mesmo autor, vacas positivas a fimH nos primeiros três dias pós-parto tiveram um risco 16,2 vezes maior de apresentar infecção uterina por *F. necrophorum* entre o oitavo e décimo dia de lactação, comparativamente a vacas negativas a este FV. Estes resultados suportam a hipótese da *E.coli* ter uma ação potenciadora do estabelecimento e persistência de infecção uterina por outros agentes (Bicalho *et al.*, 2012). Kassé et al. (2016) estudaram a associação de 32 FV de *E.coli* com metrite e concluíram que vacas com hra1 ou kpsMTII no seu útero, eram respetivamente 5,9 e 6,2 mais prováveis de contrair a doença do que se não tivessem apresentado estes FV no conteúdo uterino. O primeiro destes FV permite auto agregação bacteriana e o segundo codifica uma proteína capsular, que são ambos mecanismos de bloqueio da fagocitose. Os resultados conflituosos podem dever-se à diversidade de estirpes e consequentemente dos FV expressos pela bactéria (Jeon & Galvão, 2018).

3.5.2. *Fusobacterium spp.*

Num estudo de análise metagenómica da diversidade microbiana do meio intrauterino de vacas saudáveis e com metrite, a principal evidência recolhida por Santos et al. (2011) foi o facto do filo *Fusobacteria* ser o mais abundante em animais com metrite e nem sequer ter sido identificado nos animais sem doença. A grande maioria ($\geq 99\%$) das sequências identificadas deste filo apresentaram elevada identidade com *F. necrophorum* e *F. necrophorum ssp. funduliforme*. Adicionalmente, no estudo de sequenciação genómica de Jeon et al. (2015), a presença do género *Fusobacterium* apresentou uma correlação positiva com o SDV e a abundância de *Bacteroides* o que sugere a sua associação com metrite. O principal FV de *F. necrophorum* é uma leucotoxina codificada pelo gene iktA. Este foi o mais prevalente de cinco FV (piolisina, proteína de ligação ao colágeno e fimA – específicos de *T. pyogenes*; fimH – específico de *E.coli*; iktA) pesquisados por PCR na secreção uterina de 111 vacas, nos dias 1-3, 8-10 e 34-36 pós parto (Bicalho *et al.*, 2012). Esta leucotoxina é uma proteína particularmente citotóxica para os neutrófilos e macrófagos de ruminantes que induz a sua apoptose (Nagaraja *et al.*, 2005). Entre o oitavo e décimo dia em lactação o gene iktA foi o único cuja presença apresentou forte associação com a metrite. As vacas positivas a iktA apresentaram uma prevalência de metrite de 54.1%, enquanto as vacas negativas a este gene, apresentaram uma prevalência de doença de 24% (Bicalho *et al.*, 2012). Jeon et al. (2021) também detetaram uma associação interessante entre a concentração de BHB e *F. necrophorum* na medida em que esta bactéria metabolizava preferencialmente este metabolito, em relação a outras bactérias do microbioma, o que pode servir para justificar em parte o seu sobre crescimento nas primeiras semanas pós-parto e eventual declínio ao longo do tempo.

3.5.3. *Bacteroides spp.*

As espécies do género *Bacteroides* são as mais abundantes no útero de vacas com metrite e apresentam correlação positiva com o SDV (Jeon *et al.*, 2015). *B. heparinolyticus* e *B. pyogenes* foram a primeira e segunda bactérias mais abundantes do género em questão, respetivamente, sendo que a última foi recentemente associada ao desenvolvimento de febre aquando da presença de doença uterina (Jeon *et al.*, 2016). As *Bacteroides* apresentam vários fatores de virulência que atuam em três áreas: adesão aos tecidos, proteção frente ao sistema imunitário do hospedeiro e lesão tecidual. Estas bactérias apresentam uma cápsula polissacarídea com fímbrias e aglutininas que favorecem a sua fixação aos tecidos, têm a capacidade de reduzir o potencial oxidativo de macrófagos e de sobreviver em ambientes de stress oxidativo (aerotolerância). Apresentam ainda capacidade de alterar a arquitetura da superfície polissacarídea e desta forma fugir ao sistema imunitário do hospedeiro. Além disso, produzem enzimas como a hialuronidase, hemolisinas e proteases que lesionam os tecidos (Wexler, 2007).

3.5.4. *Porphyromonas spp.*

Jeon *et al.* (2015) detetaram um aumento significativo da abundância relativa de *Porphyromonas* desde o dia do parto até ao dia de diagnóstico de metrite e uma associação positiva deste género com a presença de metrite no sexto dia pós-parto. Posteriormente, Cunha *et al.* (2018) mostraram que vacas com metrite apresentavam um número de cópias genéticas específicas de *Porphyromonas levii* no útero significativamente superior a vacas saudáveis, consolidando deste modo, o seu papel como patógeno emergente na metrite. Esta bactéria produz proteases capazes de clivar a imunoglobulina-G2, que é um anticorpo mediador de fagocitose e citotoxicidade por parte neutrófilos, necessária para a destruição intracelular de bactérias, após fagocitose. A incapacidade de fagocitar estas bactérias pode comprometer o animal e promover a progressão da doença (Lobb *et al.*, 1999).

3.5.5. *Helcococcus spp.*

O género *Helcococcus* começou por ser relacionado com o desenvolvimento de metrite após o isolamento das bactérias anaeróbias facultativas e gram-positivas, *Helcococcus ovis* e *kunzii*, em estudos baseados em cultura bacteriana, no entanto, o seu envolvimento na patogénese da doença não ficou elucidado, na medida em que, também não existiu comparação com microbiomas uterinos de animais saudáveis (Locatelli *et al.*, 2013). Mais tarde, utilizando técnicas metagenómicas, este género apresentou não só uma correlação positiva com a abundância relativa de *F. necrophorum*, o que sugere uma possível sinergia entre ambos os géneros, como também com o SDV (Jeon *et al.*, 2015).

Ainda num estudo de quantificação de agentes patogénicos uterinos, Cunha et al. (2018) relataram uma diferença significativa do número de sequências genéticas indicativas de *H. ovis* entre animais com metrite e animais saudáveis. Dado estes resultados, o autor anteriormente referido sugere este agente como um dos patógenos emergentes envolvidos no desenvolvimento de metrite, contudo são necessários novos estudos para conhecer os fatores de virulência destas bactérias.

4. IMPACTO NA PERFORMANCE PRODUTIVA E REPRODUTIVA

4.1. IMPACTO NA PRODUÇÃO LEITEIRA

Num estudo relativo ao impacto económico da metrite em explorações de vacas leiteiras dos Estados Unidos, o custo médio de um caso de metrite foi de 507 euros, sendo que 59% deste valor é referente às perdas de produção leiteira (Pérez-Báez *et al.*, 2021). Atualmente existe uma significativa quantidade de evidência científica que demonstra quebra de produção em animais com metrite (Dubuc et al., 2011; Wittrock et al., 2011; Mikulková et al., 2020; Dervishi et al., 2016). Dubuc et al. (2011) estudaram o impacto produtivo de metrite numa amostra de 2178 vacas, atendendo à paridade. Constataram que apenas existiu uma quebra de produção em vacas múltiparas doentes comparativamente a vacas saudáveis da mesma paridade. Baseando-se numa projeção de 305 dias em lactação, além de terem reportado uma diminuição de 259 kg de leite por lactação em vacas que desenvolveram metrite, também vacas com retenção placentária apresentaram uma quebra de 753 kg por lactação. Quando desenvolvidas ambas as condições na mesma lactação, os efeitos acumularam-se. Estes resultados vão de encontro aos obtidos por Wittrock et al. (2011) em termos de quebra de produtividade e relação com paridade. No entanto, são discordantes no efeito da doença na probabilidade de refugo uma vez que Dubuc et al. (2011) não detetaram uma diferença significativa no risco de refugo entre animais com e sem metrite. Wittrock et al. (2011) além de estudarem os efeitos a longo prazo da metrite na produção leiteira e risco de refugo, também abordaram os efeitos da doença a curto prazo na ingestão de MS. As vacas múltiparas com metrite envolvidas neste estudo apresentaram, aproximadamente, uma quebra de 1251 kg de leite ao longo da lactação (projeção a 305 dias), ingeriram menor quantidade de MS nas primeiras três semanas pós-parto ($12,2 \pm 1,2$ kg/d vs. $14,0 \pm 0,8$ kg/d) e apresentaram um maior risco de refugo (50% vs. 20,9%), comparativamente a vacas múltiparas saudáveis. Embora os mecanismos que levam à diminuição da produção de leite em animais com metrite não sejam totalmente conhecidos (Dervishi *et al.*, 2016), estes resultados sugerem que a doença pode afetar indiretamente a produção de leite através da diminuição de ingestão de MS no pós-parto. Ainda no estudo Wittrock et al. (2011), a quebra da produção foi a principal causa do aumento da taxa de refugo em vacas com metrite, uma vez que a decisão de refugo foi tomada antes

de qualquer indicação de problemas reprodutivos. Outro fator que pode contribuir para esta quebra é o aumento das concentrações do fator de necrose tumoral, resultante da infecção uterina por gram-negativos, que inibe a produção de prolactina e dessa forma promove a redução da produção de leite (Dervishi *et al.*, 2016).

4.2. IMPACTO NA FERTILIDADE

Várias doenças do pós-parto, infecciosas e metabólicas, tem a capacidade de afetar a performance reprodutiva do animal favorecendo anestros prolongados, reduzidas taxas de concepção e aumento das perdas de gestação, independentemente se decorrem antes, depois ou durante a época de reprodução (Gilbert, 2019). Os mecanismos de infertilidade decorrentes de infecções uterinas, como a metrite, podem-se agrupar em três áreas: desregulação hormonal, efeitos negativos sobre a capacidade de o útero suportar uma gestação e desregulação ovárica com consequente redução da qualidade dos oócitos (Bromfield *et al.*, 2015).

4.2.1. Relação entre desregulação hormonal e infertilidade

Como já referido anteriormente, as bactérias gram-negativas constituem a maior classe de microorganismos causadores de metrite e todas elas com FV bem caracterizados, em especial a produção de endotoxina (lipopolissacarídeo, LPS). A exposição uterina a este FV leva à diminuição de secreção da GnRH no hipotálamo e consequente redução da frequência de picos de LH, o que pode resultar num atraso de ovulação (Bromfield *et al.*, 2015). Esta sugestão é apoiada pelo estudo de Lavon *et al.* (2008), que através da administração experimental por via endovenosa de LPS num grupo de 13 vacas em estro, obteve um atraso na ovulação de um terço das vacas. Adicionalmente, ovários expostos a LPS apresentam uma redução da atividade da aromatase, enzima esta que produz estradiol nas células da granulosa, resultando numa redução deste estrogénio, que é extensamente necessário para um correto desenvolvimento folicular, ovulação e formação de um bom corpo lúteo (Herath *et al.*, 2007). É a secreção de estradiol pelo folículo dominante no final do ciclo ovárico que estimula a ocorrência do pico de LH, que culmina com a ovulação (Sébert *et al.*, 2010). Paralelamente, vacas que ovulam folículos pequenos com baixa concentração de estradiol, geram corpos lúteos igualmente pequenos com baixa produção de progesterona que é essencial para o reconhecimento, implantação e manutenção da gestação. Assim, a concentração reduzida de estradiol e progesterona resulta na desregulação da ciclicidade ovárica por atraso da ovulação, atraso no desenvolvimento folicular, aumento do risco de anovulação e falha na concepção (Herath *et al.*, 2007). A anovulação até ao fim do período de espera voluntário (60 a 65 dias pós-parto) está associada a uma redução da taxa de concepção e aumento do risco de morte embrionária em relação a vacas que ovularam durante este

período (Gilbert, 2019). Walsh et al. (2007) também reportaram um aumento do intervalo entre o parto e a primeira inseminação e número de dias em aberto em vacas anovulatórias quando comparadas com vacas que ovularam até aos 60 dias pós-parto. A presença de LPS no conteúdo uterino também está associada a uma extensão da fase lútea uma vez que induz a alteração da produção pelo endométrio, de prostaglandina F2 α luteolítica para prostaglandina E2 que é luteotrófica (Herath *et al.*, 2009).

4.2.2. Afeção ovárica e efeitos sobre folículos e oócitos em animais com doença uterina

Existe um conjunto de evidência científica que demonstra os efeitos da infeção e/ou inflamação uterina nos folículos e conseqüentemente nos oócitos, que podem persistir até quatro meses após o início da doença uterina, mesmo que esta já esteja resolvida (LeBlanc, 2023). O impacto da doença uterina no funcionamento dos ovários é possivelmente superior ao impacto direto que apresenta sobre o ambiente uterino no que diz respeito à capacidade de gerar e suportar uma gestação (Gilbert, 2019). Dado que a inflamação uterina pós-parto pode afetar os folículos em diversas fases da sua vida, desde a reserva de folículos primordiais até ao momento da ovulação (Figura 2 – Anexos). Os mecanismos associados à infertilidade a seguir enunciados, serão divididos por fases do desenvolvimento folicular.

4.2.2.1. Folículos pré-antrais

Durante um processo inflamatório estimulado pela exposição uterina de endotoxina, os LPS ligam-se a recetores do tipo *Toll* das células do endométrio de forma a estimular a produção de mediadores pro-inflamatórios com eventual recrutamento de leucócitos (Casaro *et al.*, 2023). Embora não ocorra recrutamento de células do sistema imunitário para o folículo, as células da granulosa também apresentam recetores desta família e respondem da mesma forma à ligação com LPS. Um dos mecanismos de produção de citocinas como a interleucina-6, após ligação entre LPS e recetores do tipo *Toll*, tem por base a ativação da proteína kinase B. Este mecanismo é o mesmo que ocorre, fisiologicamente, na ativação de folículos primordiais para que estes continuem o seu desenvolvimento folicular (Bromfield & Sheldon, 2013). Posto isto, Bromfield & Sheldon (2013) colocaram a hipótese de que os processos inflamatórios podem esgotar a reserva de folículos primordiais, uma vez que, assim que são ativados, o seu desenvolvimento só termina com atresia ou ovulação (Gilbert, 2019). Para testar esta hipótese, Bromfield & Sheldon (2013) cultivaram córtex ovárico de bovino em meios com concentrações crescentes de LPS e constataram que o meio com maior concentração de LPS apresentou a maior taxa de ativação de folículos primordiais em primários e secundários. O stress oxidativo também pode contribuir para a lesão dos folículos desde a sua fase primordial até o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório uma vez que provoca uma disfunção do processo de

segregação cromossômica, especialmente na prófase da primeira meiose, que é exatamente a fase da oogénese em que os oócitos permanecem desde o nascimento, até a fase pré-ovulatória (Gilbert, 2019).

4.2.2.2. Folículos antrais

A evolução de um folículo pré-antral para um folículo antral consiste como o nome indica, na formação de um antro que é acompanhado pela diferenciação das células da granulosa em dois fenótipos celulares que passam a constituir duas camadas: *cumulus oophorus* (junto ao oócito) e células murais (camada exterior). Esta transição é acompanhada por um aumento significativo da frequência de atresia sugerindo que é fisiologicamente desafiante manter uma forte ligação entre o oócito e a granulosa aquando da formação do antro, especialmente com as células *cumulus* das quais o oócito depende para a sua maturação e desenvolvimento (Scaramuzzi *et al.*, 2011). Nos estadios mais tardios do crescimento do folículo antral, o oócito inicia a sua maturação retomando a meiose e o seu desenvolvimento constitucional de forma a tornar-se competente, isto é, com capacidade de clivagem após fertilização, formação do blastocisto e desenvolvimento correto do feto até ao término da gestação (Sirard *et al.*, 2006). Existem vários estudos que demonstram o efeito prejudicial dos LPS nestes processos de desenvolvimento folicular e conseqüentemente, na competência dos oócitos (Magata, 2020). Magata & Shimizu (2017) cultivaram complexos oócito-*cumulus* em concentrações crescentes de LPS seguindo da sua fertilização *in vitro* de forma a avaliar o efeito da endotoxina na competência dos oócitos. Verificaram, em primeiro lugar, que a rapidez de progressão meiótica dos oócitos foi inversamente proporcional à concentração de LPS do meio envolvente, traduzindo um efeito deletério na maturação nuclear do oócito. Em segundo lugar, a exposição a LPS inibiu a redistribuição mitocondrial no citoplasma do oócito e diminuiu o potencial de membrana das mitocôndrias, sugerindo que também apresenta efeitos nefastos na maturação citoplasmática. Após a fertilização, a proporção de oócitos que sofreram clivagem e correta fertilização não foi afetada pelo tratamento com LPS, no entanto, a proporção de embriões clivados que chegaram ao estadio de blastocisto foi mais baixa quanto maior a concentração de LPS a que foram cultivados os respetivos oócitos. Por fim, o rácio entre a massa celular interna e as células da trofotoderme do blastocisto também se mostrou alterado pela presença de LPS, com o número destas células significativamente mais baixo, em blastocistos de dia oito, provenientes de meios de cultura com LPS (Magata & Shimizu, 2017).

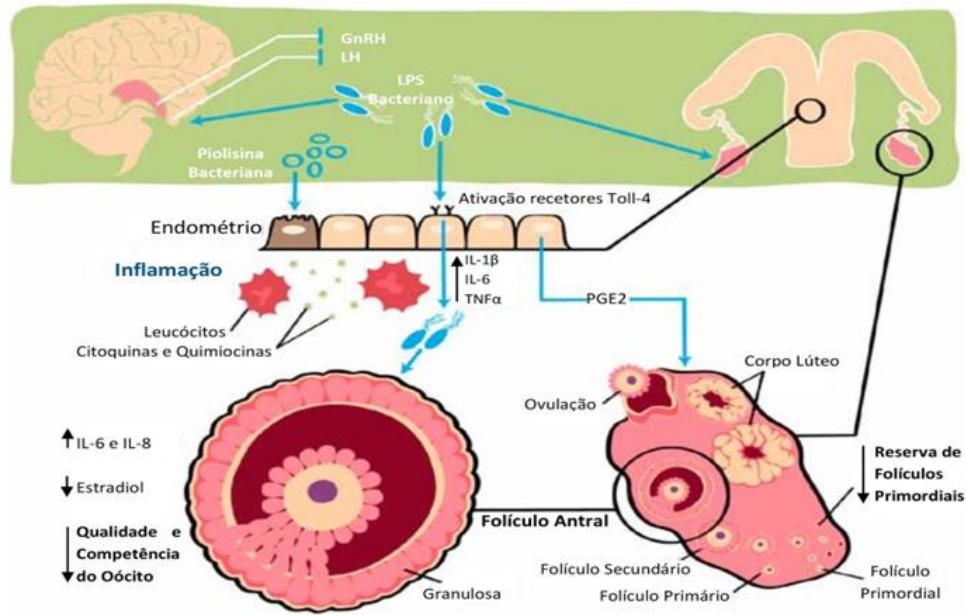


Figura 2. Representação esquemática do impacto da infecção uterina no trato reprodutivo (Adaptado de Bromfield et al., 2015).

4.2.3 Efeitos da doença uterina na implantação e desenvolvimento da gestação

Embora grande parte dos fatores da doença uterina que afetam a fertilidade do animal estejam relacionados com a disfunção ovárica e desenvolvimento de competência dos oócitos, é evidente que alguns destes fatores decorrem ao nível do útero (Gilbert, 2019). O facto de animais com doença uterina prévia, que são utilizados como recetores de embriões, apresentarem menor taxa de diagnóstico de gestação positivo e maior taxa de perdas de gestação, comparativamente a vacas que permaneceram saudáveis todo o período pós-parto até receberem o embrião, sugere que a inflamação uterina antes do início da gestação provoca efeitos negativos que perduram para lá do término do processo inflamatório (Ribeiro *et al.*, 2016). Juntamente com a inflamação, o stress oxidativo pode também contribuir para infertilidade ao nível do útero. Em mulheres sujeitas a transferência de embriões, a concentração de marcadores de stress oxidativo presentes no fluido aspirado do útero pré transferência, está correlacionada com a taxa de gestação (Rahiminejad *et al.*, 2016). Tal como referido na secção anterior, a redução do número de células da trofotoderme pode também resultar numa falha de reconhecimento da gestação, uma vez que, é esta camada que produz a molécula sinalizadora da gestação, o interferão- τ (Magata & Shimizu, 2017).

5. TRATAMENTO DE METRITE

Independentemente dos fatores que contribuem para o desenvolvimento de metrite, a etiologia da doença é infecciosa e como tal, os antibióticos tem sido a terapia mais eficaz no seu tratamento. Os principais antibióticos utilizados para o tratamento desta enfermidade são as cefalosporinas de terceira geração, ampicilina, oxitetraciclina e penicilina, sendo que podem ser administrados por via sistêmica, intrauterina ou ambas (Haimerl & Heuwieser, 2014). O ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração, é o princípio ativo mais utilizado no tratamento da metrite, principalmente por apresentar um intervalo de segurança para o leite de zero dias, mas também porque apresenta boa eficácia na resolução da doença (McLaughlin *et al.*, 2012). Contudo, pertence ao grupo B (uso restrito) da categorização de antibióticos para uso animal. Isto significa que apenas deve ser usado na inexistência de antibióticos eficazes do grupo C e D, e baseado em testes de sensibilidade antimicrobiana uma vez que os antibióticos deste grupo são de crítica importância na medicina humana (EMA, 2019). Quando comparadas as perdas económicas entre animais doentes tratados ou não tratados, o tratamento com ceftiofur, apesar de ser menos rentável até aos 60 dias em lactação, reduziu as perdas económicas projetadas até ao fim da lactação, se não se tivessem tratado animais, melhorando a fertilidade e reduzindo a taxa de refugo, os custos de reposição e a perda de produção leiteira (Silva *et al.*, 2021). A associação de antibiótico com anti-inflamatórios não esteroides como o cetoprofeno (Lora *et al.*, 2021) ou flunixin meglumina e prostaglandina F2 α também são terapias comuns, no entanto o uso destas substâncias nem sempre apresenta vantagens significativas em termos de rapidez de resolução de sinais clínicos e/ou fertilidade do animal (Jeremejeva *et al.*, 2012). O uso de qualquer antibiótico está associado à pressão seletiva e conseqüente risco de desenvolvimento de bactérias resistentes. Assim, é necessário um uso prudente destes fármacos, desde a sua correta utilização (escolha indicada de acordo com a sensibilidade do agente infeccioso presente, dosagem e duração do tratamento) (Haimerl & Heuwieser, 2014); o tratamento seletivo dos animais afetados e o desenvolvimento de terapias não antimicrobianas (Lima, 2020). A resistência aos antibióticos é atualmente uma emergência de saúde pública global. Sem a implementação de medidas preventivas, estima-se que pode tornar-se a principal causa de morte até 2050 (Tang, Millar & Moore, 2023). Atendendo a que mais de metade dos animais com metrite recuperam espontaneamente (McLaughlin *et al.*, 2012), a implementação de uma terapia seletiva baseada em fatores relativos ao animal e aferidos no momento do diagnóstico, com valor preditivo da probabilidade de cura, pode levar a uma redução da utilização de antibióticos (Machado *et al.*, 2020). Machado *et al.* (2020), observaram que a concentração de haptoglobina e o dia do diagnóstico de metrite, estavam associados com a probabilidade de cura; vacas tratadas com ceftiofur com concentração de haptoglobina $\leq 0,78$ mg/mL no momento do diagnóstico, demonstraram 8,5

vezes maior probabilidade de cura comparativamente a vacas tratadas com maior concentração de haptoglobina. Contudo, a precisão destas variáveis na previsão de recuperação do animal foi apenas moderada, sendo necessários mais estudos de forma a identificar melhores fatores preditivos de cura espontânea de metrite e de falha do tratamento. Têm-se realizado esforços na investigação de novas formas de tratamento de metrite, como a infusão intrauterina de micropartículas de quitosano, que têm uma atividade antimicrobiana de largo espectro, mas não se observou melhor taxa de cura (Oliveira et al., 2020). Foi também investigada a infusão intrauterina de uma fração de flavonoides micronizada e purificada (FFMP), que demonstrou resultados promissores (Gutiérrez-Reinoso *et al.*, 2022). A FFMP é um composto de flavonoides glicosídeos com propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória e protetora vascular que contribuiu para a involução uterina e cervical, para o controlo bacteriológico e imunológico e para a melhoria da fertilidade de animais com metrite positiva a *E.coli*. No entanto, este tratamento não foi comparado com a utilização de antibióticos. Apesar dos esforços realizados no desenvolvimento de novos tratamentos de metrite, o uso de antibióticos continua a ser o mais eficaz. Apesar disso, vários estudos relataram que o uso destas substâncias não alterou a performance produtiva e reprodutiva do animal (Haimerl & Heuwieser, 2014), tendo servido apenas para eliminar a sintomatologia clínica. Assim, os principais avanços científicos têm sido no âmbito da prevenção da doença e na conseqüente redução dos seus efeitos sobre a rentabilidade da exploração. Recentemente, Genís et al. (2018) relataram que a administração intravaginal de um conjunto de bactérias produtoras de ácido láctico, duas vezes por semana durante as últimas três semanas de gestação, reduziu a incidência de metrite de 31 para 13%. Outros estudos focaram-se na modelação da imunidade uterina através da administração de interleucina-8 recombinante, que é a principal citocina quimiotática de neutrófilos e que tem a capacidade de melhorar a fagocitose e subsequente destruição bacteriana por parte destes leucócitos (Zinicola *et al.*, 2019). A administração intrauterina de 1,125 µg de interleucina-8 recombinante nas primeiras 12 horas pós-parto não só reduziu a incidência de metrite de 34,3% para 6,35%, como também aumentou a produção de leite em relação a animais que não foram tratados. Também a administração de pegbovigrastim, que é composto por um fator de crescimento hematopoiético (fator estimulante das colónias de granulócitos) estimulante da produção e diferenciação de neutrófilos tem sido investigada na prevenção de metrites (Zinicola *et al.*, 2018). A eficácia do pegbovigrastim na redução da incidência de metrite tem apresentado resultados discordantes. Freick et al. (2018) reportou uma diminuição relativa de 48,3% na incidência de metrite puerperal em novilhas tratadas com duas doses de pegbovigrastim, comparativamente a novilhas não tratadas. Zinicola et al. (2018) reportaram um aumento numérico da incidência de metrite em animais tratados comparativamente a animais não tratados com pegbovigrastim, sem que a diferença fosse

significativa, possivelmente, devido ao tamanho insuficiente da amostra. Ruiz et al. (2017) reportaram um aumento de 17% da incidência de metrite em animais tratados com pegbovigastrim relativamente a animais não tratados. Todos os estudos referidos utilizaram o mesmo fármaco (Imrestor™; Elanco Animal Health, Bad Homburg, Alemanha) e protocolo de tratamento, que foi composto por duas doses subcutâneas de 15 mg de pegbovigastrim. A primeira administrada sete dias antes da data prevista de parto e a segunda administrada nas primeiras 24 horas após o parto. A diferença entre os resultados de Freick et al. (2018), Zinicola et al. (2018) e Ruiz et al. (2017) pode ser devida à baixa incidência de metrite que os últimos dois estudos apresentavam em relação ao primeiro e o facto de Freick et al. (2018) usar a temperatura retal superior a 39,5 °C como fator de diagnóstico de metrite. Deste modo, é sugerido que o pegbovigastrim apresenta melhores resultados em explorações com elevada incidência e grau de severidade clínica de metrites. O desenvolvimento e utilização da vacinação contra os principais agentes de metrite também tem evoluído. Meira et al. (2020) estudaram o efeito de três vacinas: uma constituída pelas bactérias *E.coli*, *F.necrophorum* e *T.pyogenes* inativadas, uma segunda composta pelas proteínas recombinantes fimH, leucotoxina e piolisina e a terceira constituída pela junção das duas primeiras. O protocolo de vacinação foi idêntico entre as diferentes vacinas e consistiu na administração de duas doses vacinais, a primeira aos 240 e a segunda aos 270 dias de gestação. Todas as vacinas demonstraram redução da incidência de metrite e melhoria da performance reprodutiva dos animais vacinados comparativamente aos animais não vacinados, tendo os resultados, com a segunda vacina, sido mais positivos. Com base nestes resultados, estas vacinas poderão, no futuro, tornar-se uma ferramenta indispensável para produtores e veterinários, na prevenção de metrite, contribuindo para a redução do uso de antibióticos (Lima, 2020).

6. CONCLUSÃO

O período de transição é caracterizado por uma elevada exigência metabólica, especialmente em animais de alta produção. Consequentemente, estes animais entram em stress metabólico e oxidativo. Ambas as condições debilitam a imunidade inata do animal e juntamente com a existência de complicações associadas ao parto, resultam num aumento da incidência de metrites. Avanços na área da metagenómica possibilitaram a expansão do conhecimento acerca da diversidade do microbioma uterino pós-parto e da sua relação com a patogénese da metrite. Estudos recentes mostram os efeitos negativos que a doença causa na performance produtiva e reprodutiva do animal, com especial ênfase nos efeitos da endotoxina sobre a competência dos oócitos. O uso de antibióticos continua a representar a estratégia terapêutica mais utilizada para o tratamento da infeção uterina, apesar do seu efeito nas subseqüentes perdas produtivas ser discutível. Não se tem conseguido desenvolver novas terapias com resultados satisfatórios, mas são atualmente recomendadas estratégias de prevenção

designadamente o controlo do balanço energético do animal, a imunomodulação através da administração de interleucinas recombinantes e pegbovigastim, e vacinação. São necessários futuros estudos com o objetivo de desenvolver melhores estratégias de sinalização, prevenção e aumento da resiliência de animais em risco de metrite.

7. BIBLIOGRAFIA

Akar, Y & Yuksel, M 2010, "Oxidative stress in cows with acute puerperal metritis", *Revue Méd. Vét.*, vol. 161, no. 7, pp. 353-357. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/287635222>.

Amin, YA & Hussein, HA 2022, "Latest update on predictive indicators, risk factors and "Omic" technologies research of retained placenta in dairy cattle – A review", *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 57, no. 7, pp. 687–700. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/rda.14115>.

Barragan, AA, Piñeiro JM, Schuenemann GM, Rajala-Schultz PJ, Seers DE, Lakritz J & Bas S 2018, "Assessment of daily activity patterns and biomarkers of pain, inflammation, and stress in lactating dairy cows diagnosed with clinical metritis", *Journal of Dairy Science*, vol. 101, no. 9, pp. 8248–8258. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14510>.

Bicalho, MLS, Machado, VS, Higgins, CH, Lima, FS & Bicalho, RC 2017, "Genetic and functional analysis of the bovine uterine microbiota. Part I: Metritis versus healthy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 100, no. 5, pp. 3850–3862. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12058>.

Bicalho, MLS, Machado, VS, Oikonomou, G, Gilbert, RO & Bicalho, RC 2012, "Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows", *Veterinary Microbiology*, vol. 157, no. 1–2, pp. 125–131. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.034>.

Bonnett, BN, Martin, SW, Gannon, VP, Miller, RB & Etherington, WG 1991, "Endometrial Biopsy in Holstein-Friesian Dairy Cows III. Bacteriological Analysis and Correlations with Histological Findings", *Can. J. Vet. Res.*, vol. 55, no. 2, pp. 168-173. Disponível em: PMID: PMC1263438

Bromfield, JJ, Santos, JEP, Block, J, Williams, RS & Sheldon, IM 2015, "PHYSIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY SYMPOSIUM: Uterine infection: Linking infection and innate immunity with infertility in the high-producing dairy cow", *J. Anim. Sci.*, vol. 93, no. 5, pp. 2021–2033. Disponível em: <https://doi.org/doi:10.2527/jas2014-8496>.

Bromfield, JJ & Sheldon, IM 2013, "Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex ex vivo and in the murine ovary in vivo", *Biology of Reproduction*, vol. 88, no. 4. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106914>.

Casaro, S, Prim, JG, Gonzalez, TD, Bisinotto, RS, Chebel, RC, Marrero, MG, Silva, ACM, Santos, JEP, Nelson, CD, Laporta, J, Jeon, SJ, Bicalho, RC, Driver, JP & Galvão, KN 2023, "Unraveling the immune and metabolic changes associated with metritis in dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 106, no. 12, pp. 9244–9259. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23289>.

Chen, H, Fu, K, Pang, B, Wang, J, Li, H, Jiang, Z, Feng, Y, Tian, W, & Cao, R 2020, "Determination of uterine bacterial community in postpartum dairy cows with metritis based on 16S rDNA sequencing", *Veterinary and Animal Science*, vol. 10, 100102. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vas.2020.100102>.

Comizzoli, P, Power, ML, Bornbusch, SL & Muletz-Wolz, CR 2021, “Interactions between reproductive biology and microbiomes in wild animal species”. *Animal microbiome*, vol. 3, no. 1, p. 87. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00156-7>

Çömlekçioğlu, U, Jezierska, S, Opsomer, G & Pascottini, OB 2024, “Uterine microbial ecology and disease in cattle: A review”, *Theriogenology*, vol. 213, pp. 66–78. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.09.016>.

Cunha, F, Jeon, SJ, Daetz, R, Vieira-Neto, A, Laporta, J, Jeong, KC, Barbet, AF, Risco, CA & Galvão, KN 2018, “Quantifying known and emerging uterine pathogens, and evaluating their association with metritis and fever in dairy cows”, *Theriogenology*, vol. 114, pp. 25–33. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.03.016>.

Dervishi, E, Zhang, G, Hailemariam, D, Goldansaz, SA, Deng, Q, Dunn, SM, Ametaj, BN 2016, “Alterations in innate immunity reactants and carbohydrate and lipid metabolism precede occurrence of metritis in transition dairy cows”, *Research in Veterinary Science*, vol.104, pp. 30–39. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.11.004>.

Dixhoorn, IDE, de Mol, RM, Schnabel, SK, van der Werf, JTN, van Mourik, S, Bolhuis, JE, Rebel, JMJ & van Reenen, CG 2023, “Behavioral patterns as indicators of resilience after parturition in dairy cows”, *Journal of dairy science*, vol. 106, no. 9, pp. 6444–6463. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22891>

Dohmen, MJW, Lohuis, JACM, Huszenicza G, Nagy, P & Gacs, M 1995, “THE RELATIONSHIP BETWEEN BACTERIOLOGICAL AND CLINICAL FINDINGS IN COWS WITH SUBACUTE/CHRONIC ENDOMETRITIS”, *Theriogenology*, vol. 43, no. 8, 1379–1388. Disponível em: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00123-P](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00123-P)

Drillich, M & Wagener, K 2018, “Pathogenesis of uterine diseases in dairy cattle and implications for fertility”, *Animal Reproduction*, vol. 15, pp. 879–885. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0023>.

Dubuc, J, Duffield, TF, Leslie, KE, Walton, JS & Leblanc, S, (2011) “Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows”, *Journal of Dairy Science*, vol. 94, no. 3, pp. 1339–1346. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3758>.

EMA 2019, “Categorisation of antibiotics in the European Union”. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific-advice-impact-public-health-e-animal-health-use-antibiotics-animals_en.pdf.

Espadamala, A, Pereira, R, Pallarés, P, Lago, A & Silva-Del-Río, N 2018, “Metritis diagnosis and treatment practices in 45 dairy farms in California”, *Journal of Dairy Science*, vol. 101, no. 10, pp. 9608–9616. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14296>.

Espiritu, HM, Mamuad, LL, Kim, SH, Jin, SJ, Lee, SS, Kwon, SW & Cho, YI 2020, “Microbiome shift, diversity, and overabundance of opportunistic pathogens in bovine digital dermatitis revealed by 16s

rRNA amplicon sequencing”, *Animals*, vol. 10, no. 10, pp. 1–9. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10101798>.

Esposito, G, Irons, PC, Webb, EC & Chapwanya, A 2014, “Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows”, *Animal Reproduction Science*, vol. 144, no. 3-4, pp. 60–71. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.007>.

Freick, M, Zenker, M, Passarge, O & Weber, J 2018, “Reducing the incidence of acute puerperal metritis in primiparous cows by application of pegbovigrastim in a Holstein dairy herd”, *Veterinarni Medicina*, vol. 63, no. 4, pp. 151–160. Disponível em: <https://doi.org/10.17221/2/2018-VETMED>.

Galvão, KN, Bicalho, RC & Jeon, SJ 2019, “Symposium review: The uterine microbiome associated with the development of uterine disease in dairy cows”, *Journal of Dairy Science*, vol. 102, no. 12, pp. 11786–11797. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17106>.

Garzon, A, Habing, G, Lima, F, Silva-Del-Rio, N, Samah, F & Pereira, R 2022, “Defining clinical diagnosis and treatment of puerperal metritis in dairy cows: A scoping review”, *Journal of Dairy Science*, vol. 105, no. 4, pp. 3440–3452. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21203>.

Genís, S, Cerri, RLA, Bach, À, Silper, BF, Baylão, M, Denis-Robichaud, J & Arís, A 2018, “Pre-calving intravaginal administration of lactic acid bacteria reduces metritis prevalence and regulates blood neutrophil gene expression after calving in dairy cattle”, *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 5, p. 135. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00135>.

Gilbert, RO 2019, “Symposium review: Mechanisms of disruption of fertility by infectious diseases of the reproductive tract”, *Journal of Dairy Science*, vol. 102, no. 4, pp. 3754–3765. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15602>.

Goff, JP 2008, “The monitoring, prevention, and treatment of milk fever e subclinical hypocalcemia in dairy cows”, *Veterinary Journal*, vol. 176, no. 1, pp. 50–57. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.020>.

Gutiérrez-Reinoso, MA, Uquilla, JB, Barona, FA, Guano, ME, Chicaiza, GN & García-Herreros, M 2022, “Effects of Intrauterine Infusion of Micronised Purified Flavonoid Fraction (MPFF) in Metritis-Diagnosed Dairy Cows Naturally Infected by *E. coli* during the Early Postpartum”, *Veterinary Sciences*, vol. 9, no. 7, p. 362. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci9070362>.

Haimerl, P & Heuwieser, W 2014, “Invited review: Antibiotic treatment of metritis in dairy cows: A systematic approach”, *Journal of Dairy Science*, vol. 97, no. 11, pp. 6649–6661. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8462>.

Hammon, DS, Evjen, IM, Dhiman, TR, Goff, JP, Walters, JL 2006, “Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders”, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 113, no. 1–2, pp. 21–29. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.022>.

Herath, S, Lilly, ST, Fischer, DP, Williams, EJ, Dobson, H, Bryant, CE & Sheldon, IM 2009, “Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F_{2α} to prostaglandin e₂ in bovine endometrium”, *Endocrinology*, vol. 150, no. 4, pp. 1912–1920. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2008-1379>.

Herath, S, Williams, EJ, Lilly, ST, Gilbert, RO, Dobson, H, Bryant, CE, Sheldon & IM 2007, “Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function”, *Reproduction*, vol. 134, no. 5, pp. 683–693. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-07-0229>.

Hosseini-Zadeh, NG & Ardalani, M 2011, “Cow-specific risk factors for retained placenta, metritis and clinical mastitis in Holstein cows”, *Veterinary Research Communications*, vol. 35, no. 6, pp. 345–354. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11259-011-9479-5>.

Huszeniczal, G, Fodor, M, Gacs, M, Kulcsar, M, Dohmen, MJW, Vamos, M, Porkolab, L, Kegl, T, Bartyk, J, Lohuis, JACM, Janosi, S & Szita, G 1999, “Uterine Bacteriology, Resumption of Cyclic Ovarian Activity and Fertility in Postpartum Cows kept in Large-Scale Dairy Herds”, *Reprod. Domest. Anim.*, vol. 34, no. 3-4, pp. 237–245. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1999.tb01246.x>

Huzzey, JM, Veira, DM, Weary, DM & von Keyserlingk, MA 2007, “Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis”, *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no. 7, pp. 3220–3233. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2006-807>.

Jeon, SJ, Cunha, F, Daetz, R, Bicalho, RC, Lima, S, & Galvão, KN 2021, “Ceftiofur reduced Fusobacterium leading to uterine microbiota alteration in dairy cows with metritis”, *Animal Microbiome*, vol. 3, no. 1, p. 15. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00077-5>.

Jeon, SJ, Cunha, F, Ma, X, Martinez, N, Vieira-Neto, A, Daetz, R, Bicalho, RC, Lima, S, Santos, JE, Jeong, KC, & Galvão, KN 2016, “Uterine microbiota and immune parameters associated with fever in dairy cows with metritis”, *PLoS ONE*, vol. 11, no. 11. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165740>.

Jeon, SJ & Galvão, KN 2018, “An Advanced Understanding of Uterine Microbial Ecology Associated with Metritis in Dairy Cows”, *Genomics & Informatics*, vol. 16, no. 4, p. e21. Disponível em: <https://doi.org/10.5808/gi.2018.16.4.e21>.

Jeon, SJ, Vieira-Neto, A, Gobikrushanth, M, Daetz, R, Mingoti, RD, Parize, AC, de Freitas, SL, da Costa, AN, Bicalho, RC, Lima, S, Jeong, KC & Galvão, KN 2015, “Uterine microbiota progression from calving until establishment of metritis in dairy cows”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 81, no. 18, pp. 6324–6332. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01753-15>.

Jeremejeva, J, Orro, T, Waldmann, A & Kask, K 2012, “Treatment of dairy cows with PGF_{2α} or NSAID, in combination with antibiotics, in cases of postpartum uterine inflammation.”, *Acta veterinaria Scandinavica*, vol. 54, no. 1, p. 45. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-45>.

Karstrup, CC, Klitgaard, K, Jensen, TK, Agerholm, JS, Pedersen, HG 2017, “Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows”, *Theriogenology*, vol. 99, pp. 41–47. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.05.013>.

Kassé, FN, Fairbrother, JM & Dubuc, J 2016, “Relationship between Escherichia coli virulence factors e postpartum metritis in dairy cows”, *Journal of Dairy Science*, vol. 99, no. 6, pp. 4656–4667. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10094>.

Khatti, A, Mehrotra, S, Patel, PK, Singh, G, Maurya, VP, Mahla, A, Chaudhari, RK, Das, GK, Singh, M, Sarkar, M, Kumar, H & Krishnaswamy, N 2017, “Supplementation of vitamin E, selenium and increased energy allowance mitigates the transition stress and improves postpartum reproductive performance in the crossbred cow”, *Theriogenology*, vol. 104, pp. 142–148. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.014>.

Kimura, K, Goff, JP, Kehrl, ME, Jr & Reinhardt, TA 2002, “Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle”, *Journal of Dairy Science*, vol. 85, no. 3, pp. 544–550. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74107-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74107-6).

Lavon, Y, Leitner, G, Goshen, T, Braw-Tal, R, Jacoby, S & Wolfenson, D 2008, “Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows”, *Theriogenology*, vol. 70, no. 6, pp. 956–967. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.058>.

LeBlanc, SJ 2008, “Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review”, *Veterinary Journal*, vol. 176, no. 1, pp. 102–114. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.019>.

Leblanc, SJ 2020, “Review: Relationships between metabolism and neutrophil function in dairy cows in the peripartum period”, *Animal*, vol. 14, no. S1, pp. S44–S54. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731119003227>.

LeBlanc, SJ 2023, “Review: Postpartum reproductive disease and fertility in dairy cows”, *Animal*, vol. 17, no. S1. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100781>.

Lima, FS 2020, “Recent advances and future directions for uterine diseases diagnosis, pathogenesis, and management in dairy cows”, *Animal Reproduction*, vol. 17, no. 3. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0063>.

Lima, SF, Bicalho, MLS & Bicalho, RC 2019, “The Bos taurus maternal microbiome: Role in determining the progeny early-life upper respiratory tract microbiome and health”, *PLoS ONE*, vol. 14, no. 3. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208014>.

Lobb, DA, Loeman, HJ, Sparrow, DG, Morck, DW 1999, Bovine Polymorphonuclear Neutrophil-Mediated Phagocytosis and an Immunoglobulin G2 Protease Produced by Porphyromonas levii, *Can. J. Vet. Res.*, vol. 63, no. 2, pp. 113-118. Disponível em: PMC1189529

Locatelli, C, Scaccabarozzi, L, Pisoni, G, Bronzo, V, Casula, A, Testa, F, Allodi, S, Pollera, C, Toni, F & Moroni, P 2013, “Short Communication: Helcococcus kunzii e Helcococcus ovis isolated in dairy cows with puerperal metritis”, *The Journal of general and applied microbiology*, vol. 59, no. 5, pp. 371–374. Disponível em: <https://doi.org/10.2323/jgam.59.371>

Lora, I, Massignani, M, Stefani, A & Gottardo, F 2021, “Potential benefits to dairy cow welfare of using a ceftiofur–ketoprofen combination drug for the treatment of inflammatory disease associated with pyrexia: A field clinical trial on acute puerperal metritis”, *Animals*, vol. 11, no. 6, p. 1597. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani11061597>.

Machado, VS, Celestino, ML, Oliveira, EB, Lima, FS, Ballou, MA & Galvão, KN 2020, “The association of cow-related factors assessed at metritis diagnosis with metritis cure risk, reproductive performance, milk yield, and culling for untreated and ceftiofur-treated dairy cows”, *Journal of Dairy Science*, vol. 103, no. 10, pp. 9261–9276. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18643>.

Magata, F 2020, “Lipopolysaccharide-induced mechanisms of ovarian dysfunction in cows with uterine inflammatory diseases”, *J. Reprod. Dev.*, vol. 66, no. 4, pp. 311–317. Disponível em: <https://doi.org/10.1262/jrd.2020-021>

Magata, F & Shimizu, T 2017, “Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes”, *Reproductive Toxicology*, vol. 71, pp. 1–7. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.04.001>.

Mahnani, A, Sadeghi-Sefidmazgi, A, Ansari-Mahyari, S, Ghorbani, GR & Keshavarzi, H 2021, “Farm and cow factors and their interactions on the incidence of retained placenta in holstein dairy cows”, *Theriogenology*, vol. 159, pp. 87–97. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.007>.

Martinez, N, Risco, CA, Lima, FS, Bisinotto, RS, Greco, LF, Ribeiro, ES, Maunsell, F, Galvão, K & Santos, JE 2012, “Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease”, *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no. 12, pp. 7158–7172. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5812>.

Martinez, N, Sinedino, LD, Bisinotto, RS, Ribeiro, ES, Gomes, GC, Lima, FS, Greco, LF, Risco, CA, Galvão, KN, Taylor-Rodriguez, D, Driver, JP, Thatcher, WW & Santos, JE 2014, “Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows”, *Journal of Dairy Science*, vol. 97, no. 2, pp. 874–887. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7408>.

McLaughlin, CL, Stanisiewski, E, Lucas, MJ, Cornell, CP, Watkins, J, Bryson, L, Tena, JK, Hallberg, J & Chenault, JR 2012, “Evaluation of two doses of ceftiofur crystalline free acid sterile suspension for treatment of metritis in lactating dairy cows”, *Journal of Dairy Science*, vol. 95, no. 8, pp. 4363–4371. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5111>.

Mcnaughton, AP & Murray, RD 2009, “Structure and function of the bovine fetomaternal unit in relation to the causes of retained fetal membranes”, *The Veterinary record*, vol. 165, no. 21, pp. 615–622. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/vr.165.21.615>

Meira, EBS, Jr, Ellington-Lawrence, RD, Silva, JCC, Higgins, CH, Linwood, R, Rodrigues, MX, Bringhamti, L, Korzec, H, Yang, Y, Zinicola, M & Bicalho, RC 2020, “Recombinant protein subunit vaccine reduces puerperal metritis incidence and modulates the genital tract microbiome”, *Journal of Dairy Science*, vol. 103, no. 8, pp. 7364–7376. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17006>.

Mikulková, K, Kadek, R, Filípek, J & Illek, J 2020, “Evaluation of oxidant/antioxidant status, metabolic profile and milk production in cows with metritis”, *Irish Veterinary Journal*, vol. 73, no. 1, p. 8. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13620-020-00161-3>.

Nagaraja, TG, Narayanan, SK, Stewart, GC & Chengappa, MM 2005, “Fusobacterium necrophorum infections in animals: Pathogenesis and pathogenic mechanisms”, *Anaerobe*, vol. 11, no. 4, pp. 239–246. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.01.007>.

Neves, RC, Leno, BM, Bach, KD & McArt, JAA 2018, “Epidemiology of subclinical hypocalcemia in early-lactation Holstein dairy cows: The temporal associations of plasma calcium concentration in the first 4 days in milk with disease and milk production”, *Journal of Dairy Science*, vol. 101, np. 10, pp. 9321–9331. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14587>.

Oliveira, EB, Cunha, F, Daetz, R, Figueiredo, CC, Chebel, RC, Santos, JE, Risco, CA, Jeong, KC, Machado, VS & Galvão, KN 2020, “Using chitosan microparticles to treat metritis in lactating dairy cows”, *Journal of Dairy Science*, vol. 103, no. 8, pp. 7377–7391. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-18028>.

Pascottini, OB & LeBlanc, SJ 2020, “Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum”, *Theriogenology*, vol. 150, pp. 193–200. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.042>.

Pérez-Báez, J, Risco, CA, Chebel, RC, Gomes, C, Greco, LF, Tao, S, Thompson, IM, do Amaral, BC, Zenobi, MG, Martinez, N, Staples, CR, Dahl, GE, Hernández, JA, Santos, JEP & Galvão, KN 2019, “Association of dry matter intake and energy balance prepartum and postpartum with health disorders postpartum: Part I. Calving disorders and metritis”, *Journal of Dairy Science*, vol. 102, no. 10, pp. 9138–9150. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15878>.

Pérez-Báez, J, Silva, TV, Risco, CA, Chebel, RC, Cunha, F, De Vries, A, Santos, JEP, Lima, FS, Pinedo, P, Schuenemann, GM, Bicalho, RC, Gilbert, RO, Rodriges-Zas, S, Seabury, M., Rosa, G, Thatcher, WW & Galvão, KN 2021, “The economic cost of metritis in dairy herds”, *Journal of Dairy Science*, vol. 104, no. 3, pp. 3158–3168. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19125>.

Petersen, C & Round, JL 2014, “Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease”, *Cellular Microbiology*, vol. 16, no. 7, pp. 1024–1033. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cmi.12308>.

Porcellato, D, Meisal, R, Bombelli, A & Narvhus, JA 2020, “A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis”, *Scientific Reports*, vol. 10, no. 1, 21608. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77054-6>.

Potter, TJ, Guitian, J, Fishwick, J, Gordon, PJ, & Sheldon, IM 2010, “Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle”, *Theriogenology*, vol. 74, no. 1, pp. 127–134. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.023>.

Rahiminejad, ME, Moaddab, A, Ganji, M, Eskandari, N, Yopez, M, Rabiee, S, Wise, M, Ruano, R & Ranjbar, A (2016) “Oxidative stress biomarkers in endometrial secretions: A comparison between

successful and unsuccessful in vitro fertilization cycles”, *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 116, pp. 70–75. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.05.003>.

Ribeiro, ES, Gomes, G, Greco, LF, Cerri, RLA, Vieira-Neto, A, Monteiro, PLJ, Jr, Lima, FS, Bisinotto, RS, Thatcher, WW & Santos, EP 2016 “Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows”, *Journal of Dairy Science*, vol. 99, no. 3, pp. 2201–2220. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10337>.

Rico, JE & Barrientos-Blanco, MA 2024, “INVITED REVIEW: Ketone biology: the shifting paradigm of ketones and ketosis in the dairy cow.”, *Journal of Dairy Science*, S0022-0302(24)00020-1, Advance online publication. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23904>.

Rodríguez, EM, Arís, A & Bach, A 2017, “Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows”, *Journal of Dairy Science*, vol. 100, no. 9, pp. 7427–7434. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12210>.

Ruiz, R, Tedeschi, LO & Sepúlveda, A 2017 “Investigation of the effect of pegbovigrastim on some periparturient immune disorders and performance in Mexican dairy herds”, *Journal of Dairy Science*, vol 100, no. 4, pp. 3305–3317. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12003>.

Santos, TMA & Bicalho, RC 2012, “Diversity e Succession of Bacterial Communities in the Uterine Fluid of Postpartum Metritic, Endometritic and Healthy Dairy Cows”, *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053048>.

Santos, TMA, Gilbert, R & Bicalho, RC 2011, “Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows”, *Journal of Dairy Science*, vol. 94, no. 1, pp. 291–302. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3668>.

Scaramuzzi, RJ, Baird, DT, Campbell, BK, Driancourt, MA, Dupont, J, Fortune, JE, Gilchrist, RB, Martin, GB, McNatty, KP, McNeilly, AS, Monget, P, Monniaux, D, Viñoles, C & Webb, R 2011, “Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants”, *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 23, no. 3, pp. 444–467. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD09161>.

Sébert, ME, Lomet, D, Saïd, SB, Monget, P, Briant, C, Scaramuzzi, RJ, & Caraty, A 2010, “Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: Potential role of estradiol”, *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 38, no. 4, pp. 289–298. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.01.001>.

Seshadri, R, Leahy, SC, Attwood, GT, Teh, KH, Lambie, SC, Cookson, AL, Eloie-Fadrosch, EA, Pavlopoulos, GA, Hadjithomas, M, Varghese, NJ, Paez-Espino, D, Hungate1000 project collaborators, Perry, R, Henderson, G, Creevey, CJ, Terrapon, N, Lapebie, P, Drula, E, Lombard, V, Rubin, E & Kelly, WJ 2018, “Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection”, *Nature Biotechnology*, vol. 36, no. 4, pp. 359–367. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.4110>.

Sheldon, IM, Cronin, JG & Bromfield, JJ 2019, “Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis in Dairy Cattle”, *Annual Review of*

Animal Biosciences, vol. 7, pp. 361–384. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-020518-115227>.

Sheldon, IM, Cronin, J, Goetze, L, Donofrio, G & Schuberth, HJ 2009, “Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle”, *Biology of Reproduction*, vol. 81, no. 6, pp. 1025–1032. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077370>.

Sheldon, IM, Lewis, GS, LeBlanc, S & Gilbert, RO 2006, “Defining postpartum uterine disease in cattle”, *Theriogenology*, vol. 65, no. 8, pp. 1516–1530. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.021>.

Sheldon, IM, Noakes, DE, Rycroft, AN, Pfeiffer, DU & Dobson, H 2002, “Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle”, *Reproduction*, vol. 123, no. 6, pp. 837–845. PMID: 12052238

Sheldon, IM, Williams, EJ, Miller, AN, Nash, DM & Herath, S 2008, “Uterine diseases in cattle after parturition”, *Veterinary Journal*, vol. 176, no. 1, pp. 115–121. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.031>.

Sicsic, R, Goshen, T, Dutta, R, Kedem-Vaanunu, N, Kaplan-Shabtai, V, Pasternak, Z, Gottlieb, Y, Shpigel, NY, & Raz, T 2018, “Microbial communities and inflammatory response in the endometrium differ between normal and metritic dairy cows at 5-10 days post-partum”, *Veterinary Research*, vol. 49, no. 1, pp. 77. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0570-6>.

Silva, JCC, Siqueira, LC, Rodrigues, MX, Zinicola, M, Wolkmer, P, Pomeroy, B & Bicalho, R 2023, “Intrauterine infusion of a pathogenic bacterial cocktail is associated with the development of clinical metritis in postpartum multiparous Holstein cows”, *Journal of Dairy Science*, vol. 106, no. 1, pp. 607–623. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21954>.

Silva, TV, de Oliveira, EB, Pérez-Báez, J, Risco, CA, Chebel, RC, Cunha, F, Daetz, R, Santos, JEP, Lima, FS, Jeong, KC & Galvão, KN 2021, “Economic comparison between ceftiofur-treated and nontreated dairy cows with metritis”, *Journal of Dairy Science*, vol. 104, no. 8, pp. 8918–8930. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19430>.

Sirard, MA, Richard, F, Blondin, P, Robert, C 2006, “Contribution of the oocyte to embryo quality”, *Theriogenology*, vol. 65, no. 1, pp. 126–136. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>.

Sordillo, LM 2013, “Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle”, *Veterinary Medicine International*, 154045. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/154045>.

Sordillo, LM & Aitken, SL 2009, “Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle”, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 128, no. 1–3, pp. 104–109. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.305>.

Sordillo, LM, Contreras, GA & Aitken, SL 2009, "Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows.", *Animal health research reviews*, vol. 10, no. 1, pp. 53–63. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1466252309990016>.

Spears, JW & Weiss, WP 2008, "Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows", *Veterinary Journal*, vol. 176, no. 1, pp. 70–76. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.015>.

Stevens, MGH, Peelman, LJ, De Spiegeleer, B, Pezeshki, A, Van De Walle, GR, Duchateau, L, Burvenich, C 2011, "Differential gene expression of the toll-like receptor-4 cascade and neutrophil function in early- and mid-lactating dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 94, no. 3, pp. 1277–1288. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3563>.

Suthar, VS, Canelas-Raposo, J, Deniz, A & Heuwieser, W 2013, "Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 96, no. 5, pp. 2925–2938. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6035>.

Tang, KWK, Millar, BC & Moore, JE 2023, "Antimicrobial Resistance (AMR)", *British Journal of Biomedical Science*, 80, 11387. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>.

Thomas, T, Gilbert, J & Meyer, F 2012, "Metagenomics - a guide from sampling to data analysis", *Microbial Informatics and Experimentation*, vol. 2, no. 1, p. 3. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>.

Walsh, RB, Kelton, DF, Duffield, TF, Leslie, KE, Walton, JS & LeBlanc, SJ 2007, "Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows", *Journal of Dairy Science*, vol. 90, no. 1, pp. 315–324. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72632-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72632-2).

Weisburg, WG, Barns, SM, Pelletier, DA, & Lane, DJ 1991, "6S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study", *Journal of bacteriology*, vol. 173, no. 2, pp. 697–703. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

Wexler, HM 2007, "Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty", *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 20, no. 4, pp. 593–621. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>.

Wittrock, JM, Proudfoot, KL, Weary, DM & von Keyserlingk, MA 2011, "Short communication: Metritis affects milk production and cull rate of Holstein multiparous and primiparous dairy cows differently", *Journal of Dairy Science*, vol. 94, no. 5, pp. 2408–2412. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3697>.

Xiao, J, Khan, MZ, Ma, Y, Alugongo, GM, Ma, J, Chen, T, Khan, A & Cao, Z 2021 "The antioxidant properties of selenium and vitamin and; Their role in periparturient dairy cattle health regulation", *Antioxidants*, vol. 10, no. 10, 1555. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox10101555>.

Zinicola, M, Korzec, H, Teixeira, AGV, Ganda, EK, Bringhenti, L, Tomazi, ACCH, Gilbert, RO & Bicalho, RC 2018, "Effects of pegbovigrastim administration on periparturient diseases, milk production, and

reproductive performance of Holstein cows”, *Journal of Dairy Science*, vol. 101, no. 12, pp. 11199–11217. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14869>.

Zinicola, M, Bicalho, MLS, Santin, T, Marques, EC, Bisinotto, RS & Bicalho, RC 2019, “Effects of recombinant bovine interleukin-8 (rbIL-8) treatment on health, metabolism, and lactation performance in Holstein cattle II: Postpartum uterine health, ketosis, and milk production”, *Journal of Dairy Science*, vol. 102, no. 11, pp. 10316–10328. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16335>.

