

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

LUÍS FELIPE PEIXOTO LINHARES

**RELAÇÃO ENTRE O PERCENTUAL DE NEUTRÓFILOS E A CONCENTRAÇÃO
DE ÓXIDO NÍTRICO NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS RECEPTORAS DE EMBRIÃO
NO PERÍODO PRÉ OVULATÓRIO**

Campos dos Goytacazes

2013

LUÍS FELIPE PEIXOTO LINHARES

**RELAÇÃO ENTRE O PERCENTUAL DE NEUTRÓFILOS E A CONCENTRAÇÃO
DE ÓXIDO NÍTRICO NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS RECEPTORAS DE EMBRIÃO
NO PERÍODO PRÉ OVULATÓRIO**

**Dissertação apresentada ao
Centro de Ciências e Tecnologia
Agropecuária da Universidade
Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como requisito para
a obtenção de grau de Mestre em
Ciência Animal, na área de
Concentração de Reprodução e
Melhoramento Genético Animal**

ORIENTADORA: Prof^a. Maria Clara Caldas Bussiere

CO-ORIENTADOR: Prof. José Frederico Stragiott Silva

Campos dos Goytacazes

2013

LUÍS FELIPE PEIXOTO LINHARES

RELAÇÃO ENTRE O PERCENTUAL DE NEUTRÓFILOS E A CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS RECEPTORAS DE EMBRIÃO NO PERÍODO PRÉ OVULATÓRIO

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para a obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal, na área de Concentração de Reprodução e Melhoramento Genético Animal

Aprovada em 10 de setembro de 2013.

Banca Examinadora:

Prof. Bruno Fagundes (DSc Produção Animal) – UNIG

Prof. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho (DSc Patologia Animal) - UENF

Prof. José Frederico Straggiotti Silva (DSc Produção Animal) – UENF (Co-orientador)

Prof^a. Maria Clara Caldas Bussiere (DSc Produção Animal) – UENF (Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por iluminar meus caminhos e nele colocar pessoas maravilhosas durante esta trajetória.

Aos meus pais, Marcus e Symone, pelas palavras certas ditas nos momentos exatos, apoio e incentivo.

À minha noiva, Osana, pelo carinho, dedicação e apoio nos momentos difíceis.

À minha orientadora Maria Clara Caldas Bussiere, pela oportunidade que me foi dada, pelo conhecimento adquirido e pela enorme contribuição para minha formação profissional.

Ao meu co-orientador, José Frederico Straggiott Silva, pelos ensinamentos, confiança, compreensão e amizade.

A José Renato Costa Caiado, pelo imenso aprendizado, amizade e ajuda nos momentos difíceis.

A Renato Caiado, pelo grande apoio, amizade e confiança.

À Carla e à Bruna, pelo grande apoio no desenvolvimento do trabalho, disposição e eficiência.

A Raphael Medina, pela disposição, aprendizado na leitura das lâminas e amizade.

Ao professor Eduardo Shimoda, pela disposição e importante contribuição na análise estatística dos resultados.

Ao haras Gramont, por disponibilizar os animais, sem os quais a realização deste trabalho não seria possível.

A Vanderlei, Ney, Anísio e Carlinhos, pela grande ajuda e amizade.

Aos meus amigos de república Tiago, Edison, Diogo, Alex e Anderson pelo apoio, amizade, companheirismo e confiança.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo determinar o quadro de endometrite em éguas receptoras de embrião da raça Mangalarga Marchador (n=34) por meio da correlação entre o percentual de neutrófilos polimorfonucleares com a concentração de óxido nítrico no fluido endometrial durante o estágio de estro. Foram utilizados os índices de ocorrência de $\geq 1\%$, de neutrófilos no lúmen uterino para considerar uma égua com exame citológico positivo, ou seja, com algum grau de inflamação que pudesse ocasionar transtornos na fertilidade equina, correspondente a um quadro de endometrite. As amostras para realização da citologia e fluido endometrial foram coletadas por meio de uma pinça citológica, com auxílio da escova ginecológica e tampão de algodão, respectivamente. A lâmina do esfregaço citológico foi corada por Panótico Rápido e analisada por microscopia óptica. Posteriormente, foram formados três grupos de acordo com o percentual de neutrófilos encontrado. Grupo 1: animais sem neutrófilos (considerados negativos, n=22), Grupo 2: animais com percentual de neutrófilos variando de $\geq 1\%$ a $< 15\%$ (endometrite leve, n=7) e Grupo 3: animais com percentual de neutrófilos $\geq 15\%$ (endometrite severa, n=3). A amostra do fluido foi realizada pela mensuração de nitrato/nitrito ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) pelo método de Griess. Não foi observada diferença na concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ entre os grupos de éguas avaliados (1, 2 e 3) de acordo com exame citológico ($P > 0.05$). Quando se comparou a concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ no período pré-ovulatório (D -6 a -1) no momento da coleta das amostras não foi observada diferença ($P > 0.05$). Não foi observada correlação entre o percentual de neutrófilos e a concentração de nitrato/nitrito no fluido endometrial com a metodologia utilizada em éguas receptoras de embriões no período pré-ovulatório.

Palavras-chave: óxido nítrico, neutrófilos, éguas, receptoras de embriões, citologia endometrial.

ABSTRACT

This study aimed to determine the status of endometritis in recipient mares for embryo of the breed Mangalarga Marchador (n = 34) by the correlation between neutrophils polymorphonuclear percentage with the nitric oxide concentration in endometrial fluid during the estrus stage. Rate of occurrence $\geq 1\%$ of neutrophils in uterine lumen was used to regard the mares with a cytological positive examination, or with some degree of inflammation that could cause fertility disorders in equine compatible with a endometriti status. The samples for smear cytology and endometrial fluid were collected by double-guarded, with a gynecological brush, and cotton tampon, respectively. The slide of the cytological smear was stained by Panótico Rápido® and analyzed by optical microscopy. Afterward, three groups were formed according to the percentage of neutrophils found. Group 1: animals without neutrophils (negative n = 22) Group 2: animals with neutrophils percentage between $\geq 1\%$ to $< 15\%$ (mild endometritis , n = 7) Group 3 : animals with neutrophils percentage $\geq 15\%$ (severe endometritis , n = 3). The analysis of the fluid was performed by measuring nitrate / nitrite ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) by Griess methodology. There was no difference in the concentration of $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ between groups of mares evaluated (G1, G2 and G3) according to cytological examination ($P > 0:05$). When comparing the concentration $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ in the pre – ovulatory period (D -6 to -1) at the time of sampling there was no difference ($P > 0:05$) . No relation was observed between the percentage of neutrophils and the concentration of nitrate/nitrite in the endometrial fluid with the methodology used in recipient mares for embryo in the pre – ovulatory period.

Keywords : nitric oxide , neutrophils , mares , recipients embryo , endometrial cytology .

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Reações para a formação de óxido nítrico, nitrito e nitrato (DIXIT e PARVIZI, 2001) 14
- Figura 2. Agrupado de células epiteliais de revestimento luminal uterino de éguas no estro, 100X. 22
- Figura 3. Escassos neutrófilos, linfócitos e macrófagos, do epitélio de revestimento luminal uterino de éguas, 400X. 23
- Figura 4. Concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (μM) no lúmen uterino em éguas receptoras de embriões classificadas em grupos de acordo com a percentagem de neutrófilos observada no endométrio. Grupo 1: éguas que apresentavam percentual de neutrófilos $< 1\%$ ($n=24$); Grupo 2: éguas com percentual de neutrófilos $\geq 1\%$ e $< 6\%$ ($n=7$); e grupo 3: éguas com percentual de neutrófilos $\geq 15\%$ e $< 45\%$ ($n=3$) ($P>0,05$). 24
- Figura 5. Comparação dos grupos de éguas com idade menor e maior e igual a 15 anos com a concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ μM ($P>0,05$). 25
- Figura 6. Média de concentração de nitrato/nitrito em relação aos dias do ciclo estral (dias antes da ovulação) de éguas receptoras de embrião ($P>0,05$). 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação positiva de endometrite de diversos autores	17
Tabela 2. Correlação entre as concentrações de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ e os dias do ciclo estral das éguas receptoras de embrião.	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cGMP: monofosfato cíclico de guanosina

DST: doença sexualmente transmissível

EPPC: endometrite persistente pós cobertura

MM: Mangalarga Marchador

NO: óxido nítrico

NO₂: nitrito

NO₃: nitrato

NOS: óxido nítrico sintase

cNOS: óxido nítrico sintase constitutiva

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

TE: transferência de embrião

TEE: transferência de embrião eqüinos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES	14
3.2. AVALIAÇÃO DE RECEPTORAS	15
3.3. CITOLOGIA UTERINA	17
3.4. ENDOMETRITE EQUINA	19
3.5. ÓXIDO NÍTRICO	20
3.5.1 Ações do óxido nítrico no útero e no desenvolvimento embrionário	22
3.5.2 Óxido nítrico relacionado a inflamação uterina em éguas	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO E ANIMAIS	25
4.2. MANEJO DAS RECEPTORAS	25
4.3. COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS PARA CITOLOGIA	26
4.4. COLETA DE AMOSTRAS PARA MENSURAÇÃO DE NO	26
4.5. AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS CITOLÓGICAS	27
4.6 DOSAGEM DE NITRITO E NITRATO COMO DOSADORES DA PRESENÇA DE NO	27
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5. RESULTADOS	29

6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões eqüina (TEE) é uma técnica de suma importância no melhoramento genético desta espécie e vem sofrendo diversas modificações no intuito de maximizar seu aproveitamento, tanto em relação à otimização do aproveitamento das éguas doadoras, como das receptoras.

Atualmente, a TEE é uma técnica bem difundida mundialmente e quase todas as raças equinas permitem seu uso, porém, algumas dessas raças fazem restrições quanto ao uso de receptoras, como ocorre na raça Mangalarga Marchador (MM), onde éguas sem registro na associação dessa raça pagam, além de uma taxa para se cadastrar, encargos a cada parto da receptora - o que encarece o uso das mesmas. Essa restrição, junto com a grande difusão da técnica na raça MM, que é a raça que mais produz potros nascidos de TEE no Brasil (Alvarenga, 2010), acarreta em um aumento dos custos dentro do programa, bem como em uma redução do número de receptoras e, conseqüentemente, no aumento do preço das mesmas, tornando-as um ponto crítico no programa de TEE, já que são responsáveis por boa parte dos gastos do programa. Devido a estas razões, sua eficiência deve ser maximizada, o que irá ajudar na eficiência do programa e na conseqüente redução de gastos.

O aumento do uso da técnica de TEE e, conseqüentemente, do número de manipulações do trato reprodutivo das receptoras, faz com que as mesmas se tornem mais susceptíveis à ocorrência de endometrites. Muitas vezes, éguas acometidas pela endometrite não apresentam acúmulo de fluido intrauterino no período que se estende da fase de estro ao momento da inovulação, nem a presença de descarga vaginal, pois estes são os principais sinais clínicos observados (pela ultrassonografia e a olho nu) desta patologia. Nestes casos, são observados a infertilidade e/ou a perda de prenhez precoce, o que acaba gerando prejuízos dentro do programa de TEE.

A técnica de citologia endometrial tem se mostrado uma ferramenta útil, dotada de praticidade e facilidade para o auxílio no diagnóstico de endometrite subclínica. Com o auxílio desta técnica pode-se realizar uma triagem mais eficiente no

momento da seleção das receptoras consideradas aptas à participarem do programa de TEE. O exame de citologia endometrial se baseia na proporção encontrada entre células endometriais e neutrófilos, ou na quantidade de neutrófilos por campo, ou ainda na quantidade total de neutrófilos de uma amostra (RIDDLE et al., 2007). No entanto, por ser uma técnica dependente da observação de um técnico treinado, o resultado do exame citológico pode apresentar certo subjetivismo, devido ao fato de muitas vezes não se coletar uma amostra representativa do estado clínico do útero em casos de endometrites subclínicas.

Um dos principais fatores que levam ao acometimento de endometrite é a redução da contratilidade miometrial. O óxido nítrico (NO) é um mediador inflamatório que, entre outros efeitos, causa o relaxamento do músculo liso e é sintetizado por diferentes células, como os macrófagos, os neutrófilos, e as células epiteliais endoteliais (ALGHAMDI e TROEDSSON, 2002). O NO é uma molécula produzida fisiologicamente pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) em vários tecidos, sob três isoformas: a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS). O NO auxilia em muitas funções no trato reprodutivo, dentre elas a capacitação de espermatozoides (LEAL et al., 2009), na maturação oocitária (VIANA et al., 2007; MATTA et al., 2009) e no desenvolvimento embrionário (CHEN et al., 2001). Contudo, seu excesso pode ser embriotóxico (ORSI, 2006), além de causar efeitos deletérios no útero, como a redução da contratilidade miometrial, o que acarreta no atraso da limpeza do ambiente uterino e no possível acúmulo de fluido intrauterino. Recentes trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de se avaliar as ações do NO no ambiente uterino de éguas (ALGHANDI E TROEDSSON, 2002; ALGHAMDI et. al, 2005; FIORATTI et al., 2011).

Visando contribuir para o aumento da precisão na seleção de receptoras de embrião equino durante o estro, este trabalho teve como objetivo relacionar o percentual de neutrófilos (indicativo de endometrite) com a concentração de óxido nítrico endometrial em éguas receptoras de embrião da raça Mangalarga Marchador.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Aumentar a precisão da seleção de receptoras durante o estro, relacionando o percentual de neutrófilos (indicativo de endometrite) à concentração de óxido nítrico endometrial em éguas receptoras de embrião.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Oguri e Tsutsumi (1972) foram os primeiros pesquisadores que reportaram a transferência de embriões em equinos pela técnica não-cirúrgica. A TE em equinos foi descrita primeiramente no Brasil em 1987 por Fleury e colaboradores. Segundo o mesmo autor (2001), a vantagem da transferência não-cirúrgica se dá pelo fato de que pode ser realizada em campo e com baixo custo.

Pode-se considerar que, para se obter sucesso em um programa de TE, os técnicos dependem de diversos fatores relacionados à égua doadora, ao ganhão, à manipulação e manutenção dos embriões, à técnica de transferência, à receptora, às condições climáticas, à habilidade técnica do operador, à sincronia de ovulação entre doadora e receptora e à qualidade e idade do embrião no momento da transferência entre outros. Todavia, o fator mais importante pode estar relacionado à égua receptora, já que esta irá reconhecer o embrião e terá que fornecer as condições necessárias ao seu desenvolvimento (FLEURY, 2001; CAIADO et al., 2007).

De acordo com Rodrigues (2009), vários pesquisadores têm utilizado a recuperação não cirúrgica de embriões feita por meio de lavagens uterinas em um sistema fechado, utilizando um tipo especial de sonda (BIVONA^R Inc. Gary. Indiana. USA), apropriada para utilização em éguas, adaptada a uma extensão de silicone unida a um filtro (75 micras) para coleta de embrião (ALVARENGA et al., 1993; RIERA e MCDONOUGH, 1993; ALLEN, 1994; FLEURY, 1998; CAIADO et al., 2005).

Squires et al. (1998) afirmaram que os melhores índices de recuperação embrionária ocorrem quando as lavagens são feitas no sétimo ou oitavo dia após a ovulação da doadora, mas aconselham lavagem no sexto dia após a ovulação quando se pretende congelamento do embrião. Para Squires et al. (2003), quase todos os embriões recuperados em programas de transferência em equinos, são transferidos por meio de técnica não cirúrgica, utilizando um inovulador apropriado

ou pipeta de inseminação equina envolvida por proteção plástica. Por esta técnica, o embrião é depositado no corpo ou corno uterino através da cérvix.

3.2. AVALIAÇÃO DE RECEPTORAS

A taxa de prenhez após TE é afetada basicamente por três fatores: a receptora, o embrião e a doadora pela qual o embrião foi gerado. Diversos estudos acerca de cada um destes fatores têm sido realizados, havendo consenso em relação ao papel primordial desempenhado pela receptora na TE. A receptora de embrião consiste no ponto crítico do programa de TE, já que sua correta seleção e manejo determinarão, em grande parte, o sucesso da técnica.

Existem dois momentos pelos quais a escolha se faz importante. O primeiro é aquele em que o animal será incorporado ao plantel de receptoras. Nele, a idade, estado reprodutivo, condição corporal, conformação externa da genitália, útero e ovários são avaliados. O segundo, e mais importante, que terá relação direta com a taxa de gestação, é a seleção da receptora no momento da transferência do embrião. Normalmente, esta avaliação é feita de forma empírica e subjetiva, pois cada profissional leva em consideração parâmetros próprios. Poucos são os trabalhos que correlacionam às características uterinas da receptora no dia da TE com as taxas de prenhez e com concentrações plasmáticas de progesterona (ALONSO, 2007).

A minúcia do exame reprodutivo depende mais das circunstâncias particulares da compra deste (preço, disponibilidade de amostras, autorização do proprietário, habilidade do médico veterinário, etc) do que da indicação médica, sendo que, quanto maior a profundidade do exame, menor o erro e maior o preço da receptora (LOSINNO & ALVARENGA, 2006).

De acordo com os autores acima, está absolutamente justificado que este exame seja mais pormenorizado, uma vez que há uma grande proporção de éguas aceitas e que não estão aptas reprodutivamente. O ideal seria que as éguas candidatas à receptora de embrião tivessem exame de biópsia endometrial além do exame ultrassonográfico, e apresentassem integridade dos genitais externos e competência cervical.

No Brasil, os veterinários utilizam quase que exclusivamente a ultrasonografia para compra ou descarte de receptoras. É importante salientar que nem sempre uma égua sem fluido uterino não poderá sofrer um processo inflamatório instalado no útero. Em função disto, é aconselhável que pelo menos o exame citológico seja incluído na seleção de receptoras (LOSINNO & ALVARENGA, 2006).

Segundo Fleury et al.(2006), a escolha da égua receptora através da avaliação ginecológica realizada no momento da transferência de embrião é de grande importância, tendo influência direta sobre a taxa de prenhez. Entretanto, esta escolha é, muitas vezes, feita de forma subjetiva pelo fato de cada veterinário possuir um método próprio de avaliação. Além disso, poucos estudos foram realizados com o intuito de verificar a influência dos diferentes parâmetros de seleção das receptoras na taxa de gestação. Por isso em seu estudo verificou que éguas apresentando maior tônus uterino e melhores características de imagem uterina visualizada ao ultrassom (imagem homogênea e maior ecogenicidade) obtiveram melhor taxa de prenhez, aspecto que leva à conclusão de que estes parâmetros devem ser levados em consideração no momento da escolha da receptora de embrião.

Em seu experimento, Rozales (2005) avaliou as receptoras por meio da palpação retal com o auxílio da ultrasonografia, onde pode se avaliar a presença de edema uterino, de líquido no lúmen uterino, de folículos ovarianos e a presença do corpo lúteo, de forma que se possa avaliar sua forma, tamanho e consistência. Foi dada grande importância ao histórico reprodutivo da receptora e às condições da última ovulação. Sendo preferidas as receptoras que tinham um bom histórico de fertilidade e habilidade materna, apresentaram cio evidente com forte formação de edema endometrial, folículo com crescimento e ovulação normais, e que no momento da ovulação apresentaram corpo lúteo de bom tamanho, com bastante tecido ecogênico, além de forte tônus uterino, cérvix fechada e ausência de edema endometrial ou líquido uterino. Do mesmo modo, Rodrigues (2009) utilizou o tônus e ecogenicidade uterina como parâmetros de características uterinas, tanto no período de estro, quanto no momento da ovulação (diestro), para realizar a escolha das receptoras a receberem embrião.

Devido à falta de um procedimento padrão na escolha de receptoras aptas a receberem embrião, Alonso (2007) afirma que a determinação de um método que seja objetivo e confiável, visando a escolha da receptora de embrião mais adequada

e com maiores chances de ter diagnóstico positivo de prenhez, seria de grande importância para os profissionais envolvidos com TE em equinos.

3.3. CITOLOGIA UTERINA

Desde o início da década de 1960, o uso da citologia endometrial foi relatado como sendo um proveitoso procedimento clínico veterinário (KNUDSEN e SOLLEN, 1961). Segundo Cowel e Tyler (2002), a metodologia empregada faz uma pequena diferença clínica, contanto que o procedimento não prejudique o endométrio ou introduza patógenos no ambiente uterino, e a coleta de amostras contenha um número suficiente de células endometriais e outras células que possam permitir um exame citológico confiável. Para o veterinário a nível de campo, o procedimento escolhido deve ser relativamente rápido e fácil de realizar com materiais comumente disponíveis na clínica ou a campo.

Liu e Troedsson (2008) alertam para uma importante e possível complicação ocasionada pela técnica da citologia, que é a ocorrência de diagnósticos falso-positivos e falso-negativos. Porém, Aguilar et al. (2006) concluíram que a realização da citologia endometrial com o auxílio da técnica do “duplo guardado” (que nada mais é que a pinça citológica envolta pela camisa sanitária) promove a coleta de amostras mais fidedignas do tecido endometrial, reduzindo a probabilidade de se ocorrer diagnóstico falso-positivo ou falso-negativo.

Devido à ausência de padronização, tanto do método de coleta quanto da avaliação do esfregaço citológico, Riddle et al. (2007) citam que a inflamação endometrial tem sido quantificada pela contagem do número de neutrófilos por campo de microscopia de alta resolução, pelo número de neutrófilos por lâmina ou determinando a proporção entre neutrófilos e células endometriais. Além disso, os resultados têm sido classificados em positivos ou negativos para inflamação, ou a inflamação graduada como leve, moderada ou severa. Segundo o mesmo autor, é mais relevante o grau de inflamação que a presença ou ausência de neutrófilos somente; ou seja, apenas a partir de certa quantidade de neutrófilos identificada é que a égua deve ser considerada como acometida pela endometrite. Esta circunstância ilustraria a classificação apresentada por Brook (1993), onde éguas

com menos de 5% de PMN são identificadas com um endométrio não inflamado, de 5 a 15% de PMN com indicação de uma inflamação média, de 15 a 30% de PMN com a identificação de uma inflamação moderada, e, acima de 30%, indicando uma inflamação severa.

A tabela abaixo é uma modificação de Card (2005) quanto à classificação de citologia positiva realizada por alguns autores:

Tabela 1: Classificação positiva de endometrite de diversos autores.

Classificação	Autor
> 1 neutrófilo por 5 campos (240 X)	Knudsen (1964)
Proporção de células endometriais e neutrófilos > 10:1	Asbury (1982)
> 5 neutrófilos por campos	Brook (1985)
<15 células endometriais para 1 neutrófilo	Ley (1986)
≥ 3-10% das células são neutrófilos	Crickman and Pugh (1986)
≥ 2% das células são neutrófilos	Ball et al.(1988)
≥ 1 neutrófilo por campo (400X)	Purswell (1989)
> 0,5% neutrófilos	Ricketts e Mackintosh (1989)
> 0,5% de neutrófilos	Nielsen (2005)
> 2% de neutrófilos	Aguilar et al. (2006)
> 2 neutrófilos em 10 campos (1000X)	Riddle et al. (2007)
≥ 1 neutrófilo por campo, em 10 campos (1000X)	LeBlanc et al.(2007)
>2 neutrófilos por campo (400X)	Burleson et al. (2010)
> 2% de Polimorfonucleares (1000X)	Overbeck et al. (2011)
> 2 neutrófilos por campos e > 0,5% de neutrófilos (1000X)	Cocchia et al. (2012)

Fonte: Card (2005) modificado

Segundo Overbeck et al. (2011), vários estudos têm demonstrado que a porcentagem de éguas diagnosticadas com endometrite foi maior quando se utilizou como método de diagnóstico a citologia uterina em relação à cultura de microrganismos (BALL et al.1988; NIELSEN 2005; RIDDLE et al. 2007).

Esfregaços examinados de citologia endometrial têm sido preparados com materiais coletado com dedo enluvado, swab de algodão ou swab de cultura duplamente protegido, biópsia uterina ou lavagem uterina com fluido (RIDDLE et al., 2007). Porém, Overbeck et al. (2011) relatam que a técnica de citologia endometrial realizada com a escova citológica é rápida, segura e pode ser realizada nas

condições a campo, melhorando o diagnóstico de endometrite quando comparado à técnica em que se utiliza o swab uterino de algodão. Por outro lado, Cocchia et al. (2012) afirmam que tanto o lavado com baixo volume quanto a escova citológica geram amostras superiores às obtidas pelo swab de algodão, sendo que a escova citológica é um método de coleta mais fácil, mais consistente e mais rápido que o lavado com baixo volume, podendo ser utilizado nas éguas a campo. Todavia, necessita de equipamento especializado, além de cuidado e suavidade no momento da coleta para que não ocorra sangramento nem rompimento das células sobre a lâmina no momento de ser feito o esfregaço.

3.4 ENDOMETRITE EQUINA

O útero da égua é mantido livre de contaminantes por meio de mecanismos físicos, imunológicos e de um sistema linfático funcional. As barreiras físicas que impedem o acesso de microorganismos ao útero são a vulva (CASLICK,1937; PASCOE, 1979), a prega vestibulo-vaginal (HINRICHS et al., 1988) e a cérvice (LEBLANC et al., 1995).

A endometrite é a causa mais comum de subfertilidade e o terceiro problema médico mais comum em éguas (TRAUB-DARGATZ et al., 1991). Segundo Troedsson (1999), a endometrite persistente pode ser dividida em: doenças sexualmente transmissíveis (DST), endometrite infecciosa crônica, endometrite persistente induzida por cobertura (EPPC), ou endometrite crônica degenerativa.

Um importante mecanismo para a eliminação rápida do agente agressor e dos componentes e subprodutos inflamatórios é a contratilidade miometrial, que é imprescindível para a limpeza física da luz uterina (EVANS et al., 1987; TROEDSSON et al., 1993; LEBLANC et al., 1994). Durante o estro, ocorrem períodos de atividade contrátil de aproximadamente 5 minutos, alternados com períodos equivalentes de repouso (JONES et al., 1991). O desempenho deste mecanismo requer o funcionamento da cérvice (LEBLANC et al., 1989). A limpeza física do útero tem um papel central na patogenia da endometrite persistente pós-cobertura (TROEDSSON, 1997).

Um relaxamento de cérvix foi observado no diestro de éguas jovens dentro de 12 horas após a indução da infecção uterina (Hughes e Loy, 1969). O relaxamento de cervice foi associado com descarga vaginal, e quatro dias após a inoculação da bactéria, o tônus cervical havia retornado ao estado fisiológico normal. Os autores concluíram que a drenagem uterina através da cervix relaxada pode ser um importante fator na habilidade uterina de combater a infecção bacteriana.

Durante o cio, com o favorecimento dos mecanismos de defesa pelo efeito estrogênico, o processo inflamatório está completamente resolvido em 36 a 48 horas após a cobertura. As éguas nas quais isso ocorre são classificadas como sadias ou resistentes à endometrite persistente pós-cobertura. Porém, se ocorrer uma falha dos mecanismos de defesa, há condições para que as bactérias possam se aderir à mucosa uterina, levando à perda da integridade da mucosa e à instalação de uma infecção bacteriana. Nestes casos, a inflamação passa a ser patológica e este quadro é denominado de endometrite persistente pós-cobertura (EPPC). A falha reprodutiva decorre de um efeito direto do ambiente uterino incompatível com a sobrevivência do embrião, ou da liberação constante de PGF2 alfa, devido à inflamação, levando à diminuição da progesterona circulante pela lise do corpo lúteo (LEBLANC, 2003).

3.5. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) possui um importante papel funcional em uma variedade de sistemas fisiológicos e diferentes mecanismos. O NO é derivado da L-arginina por ação da óxido nítrico sintase (NOS), uma enzima existente em três isoformas: uma neuronal (nNOS) e outra endotelial (eNOS), que são responsáveis pela liberação basal contínua, requerendo Ca^{2+} Calmodulina (e são classificadas como isoformas constitutiva [cNOS]), além de uma terceira isoforma que é uma forma induzível (iNOS), expressa em resposta a citocinas e lipopolissacarídeos, além de ser cálcio independente.

A geração basal de NO pela cNOS exerce um importante papel na fisiologia de diversos organismos; no sistema vascular o NO induz a vasodilatação, inibe a agregação plaquetária, previne a adesão de plaquetas/neutrófilos às células

endoteliais, inibe a migração e proliferação de células da musculatura lisa e mantém a barreira celular endotelial funcional. No sistema nervoso o NO age como um neurotransmissor, enquanto o aumento da expressão de iNOS exerce um ponto chave em diversas condições patológicas (MONCADA et al., 1991).

Como um radical livre com um elétron desemparelhado o NO reage com uma variedade de alvos, incluindo proteínas como a guanilato ciclase e enzimas do citocromo P-450. O NO tem uma meia vida curta *in vivo*. A oxidação leva a formação de nitrato via nitrito (Figura 1). O NO também pode ser oxidado para uma molécula nitrozilada, contendo componente sulfidríla resultando em derivados biologicamente ativos mais estáveis que o próprio NO (STANLER et al., 1992).

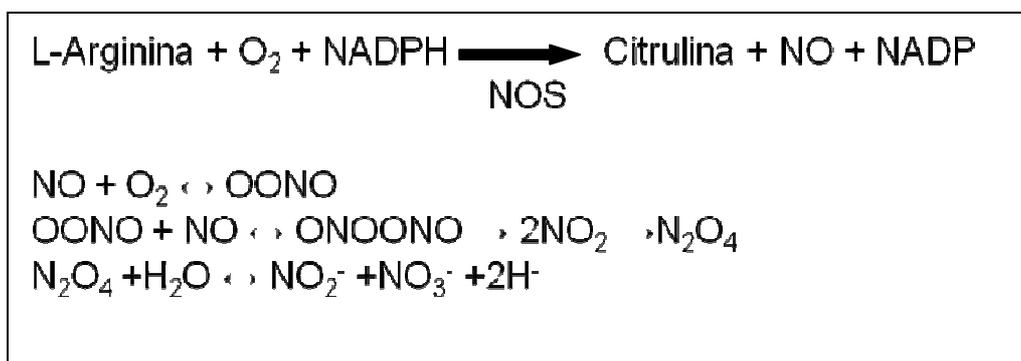


Figura 1: Reações para a formação de óxido nítrico, nitrito e nitrato (DIXIT e PARVIZI, 2001)

A biologia química do NO pode dividir suas reações potenciais em duas categorias: direta e indireta, onde os efeitos diretos são aqueles em que as reações ocorrem muito rápido e diretamente com a molécula alvo, geralmente, esses efeitos ocorrem sobre baixa concentração de NO. Já os efeitos indiretos requerem que o NO reaja com oxigênio ou superóxido para gerar espécies reativas de nitrogênio, que, posteriormente, agem na molécula alvo; esses efeitos normalmente ocorrem sobre altas concentrações de NO (WINK et al., 1996).

Diversos efeitos de citotoxicidade celular podem ser causados pelo NO, mas seu efeito é mais complexo em relação à apoptose. O óxido nítrico pode tanto proteger quanto mediar esse tipo de morte celular, dependendo do tipo de célula e de sua concentração (VIANA, 2007), Onde em altas concentrações, como aquelas características de resposta inflamatória, poderá causar morte celular por apoptose enquanto níveis moderados exercem um papel protetor, além de ser um importante

regulador sobre os efeitos de liberação adicional de citocinas pró-inflamatórias (BOSCA et al., 2005).

3.5.1 Ações do óxido nítrico no útero e no desenvolvimento embrionário

Visto que a inervação, o sistema vascular e células do sistema imune são uma parte integral dos órgãos reprodutivos, torna-se óbvio a participação do NO como um importante regulador da biologia e fisiologia do sistema reprodutivo. É possível que o NO aumente os efeitos vasodilatadores no leito vascular uterino de forma parácrina, funcionando como uma alternativa à inibição da agregação plaquetária endometrial (pela atividade do cGMP, via ativação da guanilato ciclase). Além disso, a síntese local de NO dentro do útero pode ser relevante para a regulação da atividade miométrial, ou seja, contração e relaxamento espontâneos do útero (ROSSELLI, 1997).

A inflamação local e sistêmica é caracterizada pela superprodução de NO, e na maioria das vezes a fonte deste NO é a isoforma induzível de NOS. A expressão da iNOS, que tem sido demonstrada em macrófagos ativados e em uma variedade de outros tipos de células inflamatórias, serve para combater microorganismos invasores. Sabe-se que macrófagos e neutrófilos são capazes de destruir uma variedade de microorganismos via mecanismos mediados por NO, ou via mecanismos que envolvem uma combinação de radicais livres derivados de nitrogênio e oxigênio e oxidantes. Na inflamação, citocinas pró-inflamatórias e mediadores lipídicos exercem um papel chave para o início da expressão de iNOS (Ignarro, 2000).

Bollwein et al. (2002) relataram em seu experimento encontrar maior quantidade de mRNA de eNOS em éguas nos dias 5 (diestro) e 21 (estágio de estro) do ciclo estral, e pontuaram uma correlação positiva entre a velocidade do fluxo sanguíneo uterino e a expressão de mRNA de eNOS. O mesmo foi notado por Honnens et al. (2011), que observaram, ainda, um aumento nas concentrações de progesterona no dia 5 do diestro e de estradiol durante o período de estro, acreditando que ambos os hormônios podem causar relaxamento e aumento do fluxo sanguíneo uterino, mediado primariamente pelo NO.

Em experimento *in vitro*, utilizando oócitos bovinos e um doador de NO, Nitroprussiato de sódio (SNP), concentrações de NO consideradas elevadas pelo autor (10^{-3} M SNP) foram deletérias aos oócitos, levando-os a morte por apoptose; porém, em concentrações consideradas intermediárias pelo autor (10^{-5} M SNP), houve melhora na maturação citoplasmática e consequente melhora na taxa de blastocistos (VIANA et al., 2007)

Em relação ao desenvolvimento embrionário, Orsi (2006) relatou que concentrações acima de 10 μ M SNP apresentaram efeito deletério sobre desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro*, por deprimir os mecanismos de geração de energia e alterar o metabolismo de aminoácidos e proteínas.

Chen et al. (2001) observaram que, utilizando-se um inibidor da NOS (L-NAME), houve inibição do desenvolvimento de embriões de camundongos, assim como houve apoptose quando se utilizou altas concentrações de SNP (10 μ M); porém, notaram que ocorreu uma melhora na taxa de desenvolvimento quando se utilizou concentrações moderadas (0,1 μ M) de SNP, mostrando que não só o excesso mas também a ausência de NO é prejudicial ao desenvolvimento embrionário.

3.5.2. Óxido nítrico relacionado a inflamação uterina em éguas

Alghamdi e Troedsson (2002) encontraram maior volume de secreção intrauterina em éguas susceptíveis à endometrite persistente pós cobertura (EPPC), quando comparada a éguas resistentes, assim como também encontraram maior concentração de NO em éguas susceptíveis quando comparada a éguas resistentes.

Alghamdi et al. (2005) constataram aumento numérico, mas não estatístico, de volume de fluido intrauterino acumulado em éguas susceptíveis em relação a éguas resistentes à endometrite persistente pós-cobertura (EPPC); além de níveis significativamente maiores de NO e da expressão de iNOS em éguas susceptíveis em relação às resistentes a EPPC. Contudo, os mesmos não encontraram nenhum neutrófilo nas amostras de biópsia endometrial, pesquisados por meio de histologia, através da metodologia utilizada. Do mesmo modo Woodward et al. (2013), em seu experimento, encontraram aumento significativo na concentração de NO no fluido

uterino de éguas susceptíveis, quando comparadas às éguas resistentes. No entanto, não encontraram diferença na expressão de mRNA de iNOS entre éguas resistentes e susceptíveis. Ao fim de ambos os estudos os autores não conseguiram esclarecer se os níveis elevados de NO são responsáveis (se influenciam) ou apenas são consequência do acúmulo de fluido nas éguas susceptíveis.

Segundo Fioratti (2011), a concentração de neutrófilos (realizada por meio de citologia) é maior em éguas susceptíveis quando comparada a éguas resistentes à EPPC, assim como o acúmulo de fluido intra uterino e a concentração de NO 8 horas após a inseminação artificial. Porém, foi encontrado aumento na concentração de óxido nítrico no fluido uterino de éguas resistentes 24h após a inseminação artificial - momento em que houve redução na concentração de neutrófilos no lúmen uterino, podendo este, ser explicado por auxílio na função de preparação do endométrio para receber o embrião e manter a gestação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO E ANIMAIS

O experimento foi realizado em um haras no município de Campos dos Goytacazes (Latitude 21° 45' e Longitude 41° 19'). Trinta e quatro (34) éguas, receptoras de embrião, da raça Mangalarga Marchador com idade entre três (3) e dezoito anos (18) anos foram utilizadas. O trabalho de amostragem (coleta de amostra citológica e para avaliação de NO) foi realizado durante a estação de monta entre os meses de novembro de 2011 e maio de 2012.

4.2. MANEJO DAS RECEPTORAS

As éguas receptoras foram mantidas em regime de campo com gramíneas (*Panicum maximum*, *Brachiaria humidicula*, *Brachiaria purpurascens*), água e sal mineral *ad libidum*.

As éguas foram submetidas ao exame do trato reprodutivo em dias alternados até o surgimento de um ou mais folículos de tamanho igual ou superior a 28 milímetros, quando passaram a ser acompanhadas diariamente até o dia da ovulação por meio de palpação transretal e com auxílio de um ultrassom (Mindray DP2200, China) acoplado a transdutor retal linear de 7,5 MHz. Durante o exame de palpação transretal, foi avaliado o tônus uterino e cervical, a presença e tamanho de folículos ovarianos, a presença ou ausência de edema uterino, a presença ou ausência de líquido intra uterino e a qualidade da imagem (morfoecogenicidade).

A classificação do edema uterino foi realizada, de acordo com Pelehach et al. (2002), com algumas modificações:

- Grau 0: apresenta imagem com uma superfície homogênea sem áreas anecoicas e sem definição de dobras endometriais;

- Grau 1: apresenta imagem com heterogeneidade, mas ainda sem definição de dobras endometriais;
- Grau 2: aumento na anecoogenicidade com início do aparecimento das dobras endometriais;
- Grau 3: reflete imagem extremamente heterogênea marcada por lacunas de fluido representada por grandes áreas anecóicas.

4.3. COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS PARA CITOLOGIA ENDOMETRIAL

Apenas as éguas que apresentaram edema de grau três (3) foram submetidas à coleta de amostra para citologia endometrial com o auxílio de pinça citológica (modelo Botucatu) e escova ginecológica protegidas por uma camisa sanitária. A pinça foi introduzida no útero através da vagina; ao entrar pela cervix a camisa sanitária foi rompida e no interior do útero a escova ginecológica foi exposta e rolada sobre o endométrio. A amostra coletada foi “rolada” sobre uma lâmina de microscopia que foi seca ao ar e posteriormente fixada e corada por Panótico Rápido.

4.4. COLETA DE AMOSTRAS PARA MENSURAÇÃO DE NO

O procedimento para a coleta de amostra para a mensuração do óxido nítrico foi realizado como descrita por Alghandi et al. (2005) e Fioratti (2010) com algumas alterações. Foi realizada a introdução de um absorvente feminino mini da marca OB[®] (Johnson e Johnson) no útero das éguas que apresentarem edema de grau três (3), utilizando-se a mão enluvada. O absorvente permaneceu no útero por 10 minutos enquanto este foi massageado, via retal, para facilitar a absorção de fluido. Para facilitar sua remoção o absorvente teve acrescido ao seu puxador um fio de algodão grosso e estéril até a altura de aproximadamente 5 centímetros da comissura ventral da vulva, sendo a manipulação deste material e a realização deste procedimento executada com o máximo de assepsia e antissepsia. A retirada do absorvente foi

realizada através da introdução da mão enluvada via vaginal e da tração do fio de algodão, mantendo-o protegido do contato com o canal vaginal da égua. Imediatamente após a retirada do tampão do interior do , ele foi colocado em seringa estéril e pressionado até liberar o líquido absorvido em um microtubo, onde as amostras foram centrifugadas (1000 G por 10 minutos) e congeladas a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento da dosagem dos metabólitos do NO (nitrito e nitrito) pelo método de Griess.

4.5. AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS CITOLÓGICAS

As lâminas coradas foram examinadas por microscopia óptica em aumento de 400 vezes para a avaliação dos tipos de células nesta amostra. Estas lâminas foram feitas em duplicata. Durante a avaliação, foi quantificada a proporção de neutrófilos e células endometriais mediante a contagem de 200 células em um mínimo de 5 campos, a fim de que se pudesse obter a porcentagem de neutrófilos em cada lâmina. Logo após, os animais foram separados em três (3) grupos de acordo com seu percentual de neutrófilos, onde o grupo 1 (G1; n=22) foi formado por éguas que não apresentaram neutrófilos na amostra citológica - sendo esse representado por animais com citológico negativo; o grupo 2 (G2; n=7) foi formado por éguas com percentual de neutrófilos $\geq 1\%$ e $< 15\%$, representando o grupo positivo (endometrite leve); e o grupo 3 (G3; n=3) foi formado por éguas com percentual de neutrófilos $\geq 15\%$, representando o grupo positivo (endometrite severa).

4.6. DOSAGEM DE NITRITO E NITRATO COMO INDICADORES DA PRESENÇA DE NO.

A concentração de nitrito/nitrato ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) no fluido endometrial foi determinada pelo método baseado na reação colorimétrica de Griess. O reagente de Griess é composto de uma solução de sulfanilamida 2% e *N*-(1-naftil), etilene diamine 0,2%, dissolvida em água ultrapura. O primeiro reage com o NO_2^- presente

no meio de cultivo das amostras para formar sal de diazônio que, por sua vez, reage com o segundo reagente para formar um produto de coloração roxa, com um pico de absorvância a 540 nm. Para transformar NO_3^- a NO_2^- , as amostras foram incubadas em placas de 96 poços com a solução de redução [10 UI da enzima NO_3^- redutase diluída em água deionizada + 900 μL de água ultrapura, 1000 μL do cofator NADPH (5 mg/mL), diluído em água deionizada, 1000 de solução tampão de fosfato de potássio (0.5 M)] a 37°C por 16 horas. A curva padrão de NaNO_3 foi diluída em PBS (0,5M), variando de 0.5 a 400 μM . A leitura foi feita em espectrofotômetro (leitor de ELISA, Boitek®, Winooski, EUA), a 540 nm. Foi realizado um gráfico de dispersão com os valores da absorvância. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M/L}$.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foram obtidas as médias e erros-padrão das concentrações de nitrato/nitrito entre os grupos de animais. Estas médias, considerando-se os 3 grupos de percentual de neutrófilos, foram comparadas através do teste t de Student.

As médias de concentração de nitrato/nitrito e percentagem de neutrófilos entre os grupos de éguas com menos do que 15 anos e as que tiveram 15 anos ou mais, também foram comparadas pelo teste t.

De igual modo, foram obtidos os coeficientes de correlação de Pearson entre a variável “dias do ciclo” com as concentrações de nitrito/nitrato. Foi utilizada a análise da variância para avaliar se a concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ variava de acordo com os dias do período pré-ovulatório (D -6 a D-1).

As análises estatísticas foram realizadas no aplicativo Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1), adotando-se o nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS

Das trinta e quatro (34) éguas presentes no experimento, a maioria apresentou citológico negativo, sendo que somente 20,6% (n=7) apresentou percentual de neutrófilos $\geq 1\%$ e $< 15\%$ (G2; endometrite leve) e 8,8% (n=3) apresentou percentual de neutrófilos $\geq 15\%$ (G3, endometrite severa). (Figura 2 e 3).

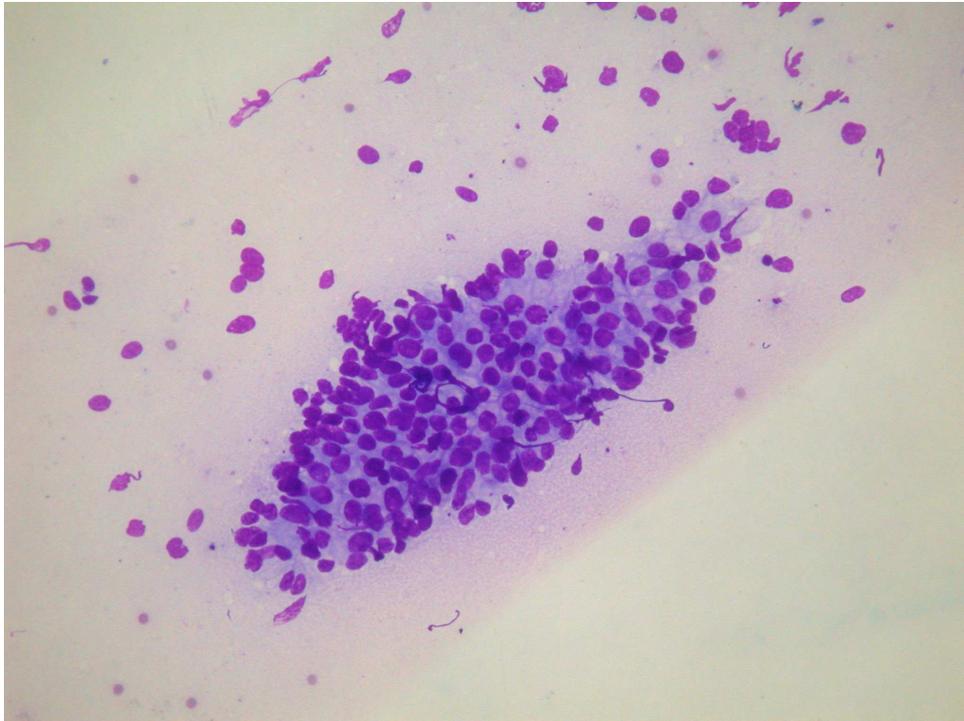


Figura 2. Agrupado de células epiteliais de revestimento luminal uterino de éguas no estro, 100X, coloração por Panótico Rápido.

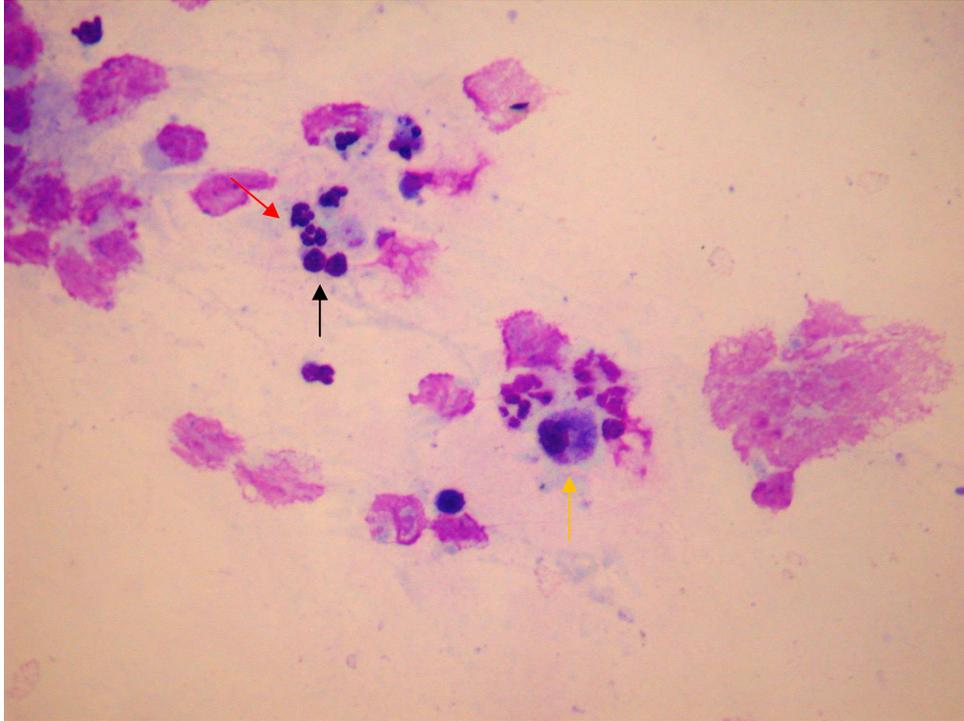


Figura 3. Escassos neutrófilos (seta vermelha), linfócitos (seta preta) e macrófagos (seta amarela), do epitélio de revestimento luminal uterino de éguas, 400X, coloração por Panótico Rápido.

Foi encontrado, no presente estudo, uma concentração média de nitrato/nitrito de $211,35 \pm 48,13 \mu\text{M}$ com intervalo de confiança ($P=95\%$). Não houve diferença quando se comparou os três grupos de éguas (G1, G2 e G3) com diferentes percentuais de ocorrência de neutrófilos no fluido endometrial com a concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ($P>0,05$ - Fig. 4).

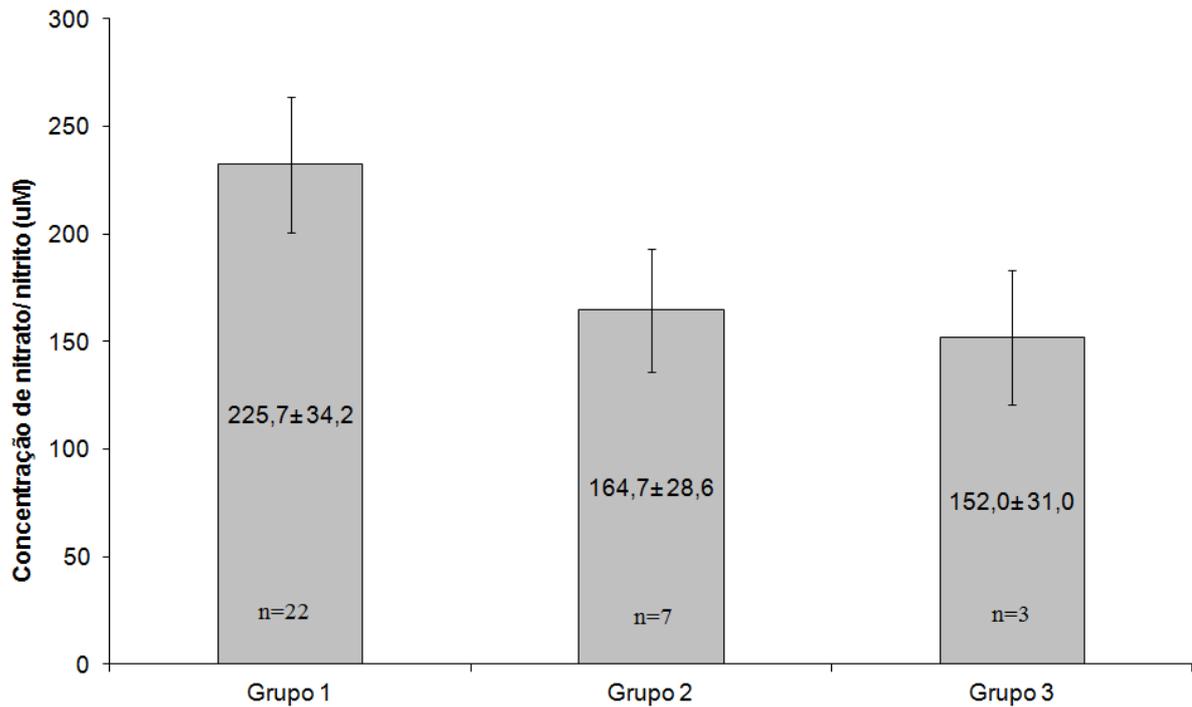


Figura 4. Concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (μM) no lúmen uterino em éguas receptoras de embriões classificadas em grupos de acordo com a percentagem de neutrófilos observada no endométrio. Grupo 1: éguas que não continham neutrófilos no esfregaço citológico ($n=22$); Grupo 2: éguas com percentual de neutrófilos $\geq 1\%$ e $< 15\%$ ($n=7$); e grupo 3: éguas com percentual de neutrófilos ≥ 15 ($n=3$) ($P>0,05$).

Também não houve diferença significativa quando se comparou a concentração de NO entre grupos de éguas com até quinze (15) anos de idade e éguas com idade igual ou superior a quinze (15) anos (figura 5).

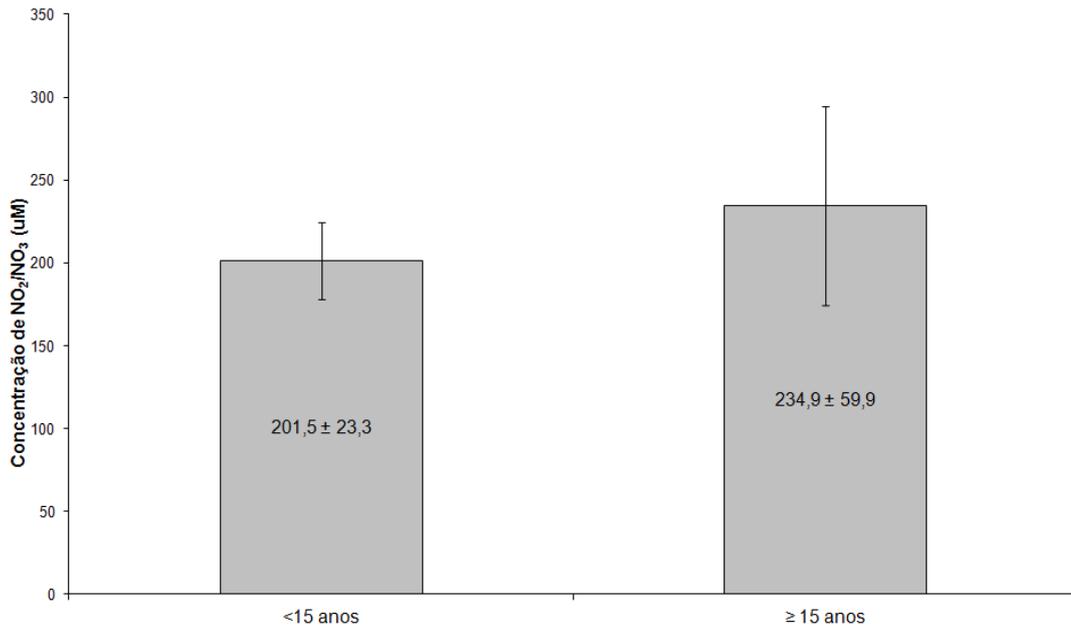


Figura 5. Comparação dos grupos de éguas com idade menor e maior e igual a quinze (15) anos com a concentração de NO₃⁻/NO₂⁻ µM (P>0,05).

Não houve diferença estatística quando se comparou os grupos de éguas de acordo com o dia do ciclo (dias antes da ovulação) no momento da coleta com a concentração de nitrito/nitrato (figura 6).

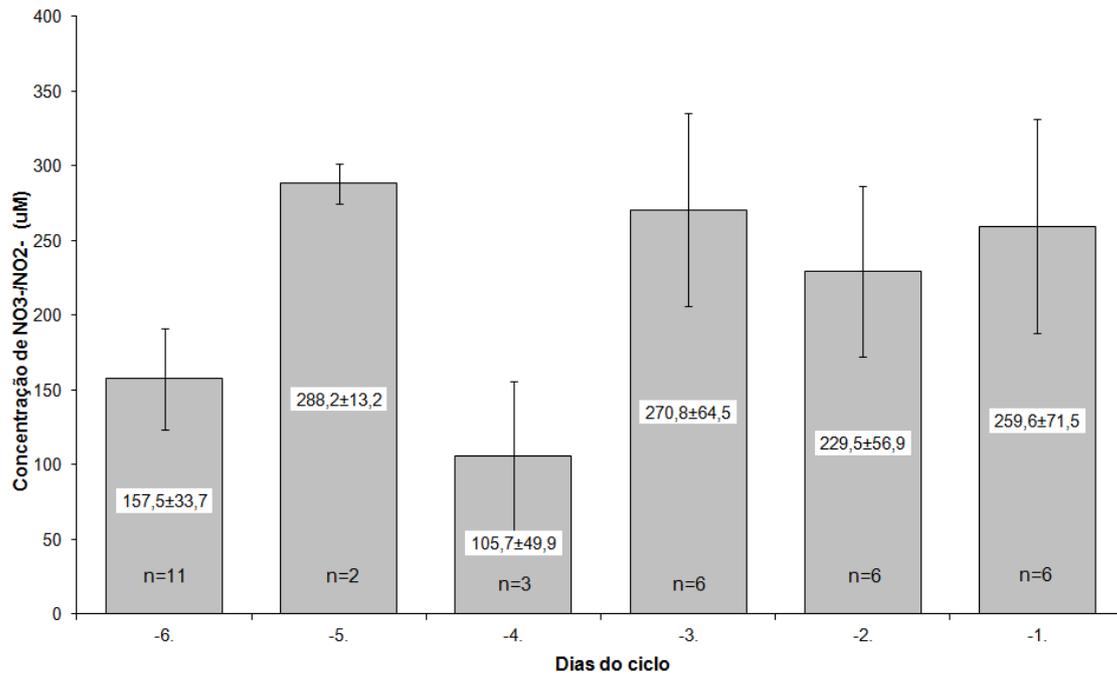


Figura 6. Média de concentração de nitrato/nitrito em relação aos dias do ciclo estral (dias antes da ovulação) de éguas receptoras de embrião (P>0,05).

Não houve significância estatística quando se correlacionou o dia do ciclo com a concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (Tabela 2).

Tabela 2- Correlação entre as concentrações de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ e os dias do ciclo estral das éguas receptoras de embrião.

Variável	Variável	Observ.	Correlação	T	Significância
$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	Dias do ciclo	34	0,2777	1,6354	0,0559

6. DISCUSSÃO

Conforme se pode perceber, não houve diferença ($P>0,05$) na relação entre os grupos de percentual de neutrófilos (G1, G2 e G3) com a média de concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$. Isso pode ter ocorrido devido ao baixo número de éguas nos grupos considerados com algum grau de endometrite (G2 e G3). A concentração média de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ encontrada nesses grupos de animais foi semelhante à encontrada por Alghandi et al. (2005) em éguas susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura, que tiveram amostras coletadas 13h após a inseminação artificial. Porém, em trabalho realizado em útero de vacas, Moreira *et al.* (2008) encontraram concentração de nitrito no útero de vacas sadias semelhantes aos valores encontrados nas éguas com algum grau de endometrite no presente estudo (G2 e G3).

A metodologia utilizada para coleta de amostras para citologia endometrial foi a citologia esfoliativa, com auxílio de uma pinça citológica e de uma escova citológica ginecológica, por ser um método ambulatorial seguro e de fácil realização a nível de campo, além de bastante eficaz como mostrado em recentes trabalhos (OVERBECK et al., 2011; COCCHIA et al., 2012).

Um ponto que merece destaque no presente estudo em comparação a outros anteriores, (ALGHAMDI e TROEDSSON, 2002; ALGHANDI et al, 2005, FIORATTI et al., 2010; WOODWARD et al., 2013) é que neste foram utilizadas éguas selecionadas para serem receptoras de embrião em um programa comercial de TE. Ou seja, estas éguas não foram cobertas e não havia histórico reprodutivo das mesmas, ao contrário dos estudos anteriores onde as éguas utilizadas eram inseminadas e o fluido endometrial coletado para as posteriores análises era resultado, em parte, da reação inflamatória desencadeada pelo endométrio após a inseminação das respectivas éguas.

Neste estudo não houve relação entre o percentual de neutrófilos observados no esfregaço das células do endométrio e a concentração de NO no fluido uterino. Ao contrário do estudo de Fioratti (2010), onde éguas susceptíveis a endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) apresentaram maior percentual de neutrófilos na

citologia uterina antes e após a inseminação artificial, assim como maior concentração de NO no fluido uterino as 8h após inseminação. Após 24h houve aumento na concentração de NO no útero de éguas resistentes a EPPC, não havendo, neste momento, diferença na concentração de NO entre os grupos de égua resistentes e susceptíveis no respectivo trabalho. Esse aumento de NO nas éguas resistentes coincidiu com o momento em que houve redução na concentração de neutrófilos no útero das mesmas. Esse elevado valor de NO encontrado por Fioratti (2010), provavelmente se deu devido ao aumento na expressão de iNOS, gerada, principalmente, por células inflamatórias (IGNARRO, 2000).

A maior produção numérica, mas não significativa ($P > 0,05$) de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ das éguas do grupo negativo (G1) no presente estudo, quando comparados os três grupos de éguas de acordo com a citologia, pode ser explicada pela expressão de outras isoformas de NOS, e não só a iNOS isoladamente, como mostrado em trabalhos anteriores, onde a presença de outras isoformas, principalmente a eNOS foi constatada (BOLLWEIN et al., 2002; ALGHAMDI et al., 2005; HONNENS et al., 2011).

O útero possui integralmente inervações, sistema vascular e células do sistema imune, havendo a possibilidade de o mesmo produzir as três isoformas de NOS (ROSSELI, 1997), além de poder haver alterações patológicas que possam influenciar na expressão das enzimas da NOS no útero de éguas, como as encontradas por Moreira *et al.* (2008) no útero de vacas: distrofia angiomatosa, fibrose periglandular e adenomiose profunda.

Nos estudos realizados por Alghamdi et al. (2005) e Woodward et al. (2013), as éguas foram separadas em grupos: resistentes e susceptíveis a endometrite persistente pós-cobertura. Essa separação ocorreu de acordo com o histórico reprodutivo dos animais, grau de classificação da biópsia endometrial, idade e posição anatômica do útero na cavidade abdominal onde os mesmos foram acompanhados em um ciclo estral anterior, seguido por acasalamento, além de todos os animais utilizados apresentarem, previamente, exame citológico negativo, enquanto que as éguas deste experimento, por serem receptoras de embrião, não foram cobertas em ciclos anteriores.

Contudo, mesmo quando se separou as éguas por grupos de idade, até quinze (15) anos e maiores que quinze (15) anos, (pois as éguas dos grupos resistentes e susceptíveis nesses trabalhos, na maioria das vezes, apresentavam idades neste

intervalo - resistentes ≤ 15 susceptíveis > 15 anos), não houve diferença estatística entre os grupos quanto a concentração de nitrato/nitrito.

No estudo realizado por Fang *et al.* (1999) só houve aumento de NO no corno uterino de ratas infectadas experimentalmente, sendo que somente nesse corno houve aumento da expressão de RNAm de iNOS, enquanto que a expressão de RNAm de eNOS em ambos os cornos uterinos se manteve constante, mostrando que este tipo de reação ocorre de maneira localizada no foco da inflamação, não afetando locais não agredidos no útero.

No presente trabalho não houve diferença significativa na concentração de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ das éguas receptoras de embrião quanto ao dia do ciclo estral. Isto ocorreu, possivelmente, devido às éguas estarem no mesmo período do ciclo estral (período pré-ovulatório), e apresentarem edema de grau 3, que ocorre quando há aumento na concentração de estradiol na corrente sanguínea (PELEHACH *et al.*, 2002), levando ao aumento da expressão de mRNA de receptores de estradiol e de mRNA de eNOS no endométrio, assim como aumento no fluxo sanguíneo uterino, como mostrado por Bollwein *et al.* (2002) e Honnens *et al.* (2011) em éguas no estro. Contudo, estes autores também constataram um aumento da expressão de mRNA de eNOS em éguas no início do diestro (D5), onde o hormônio predominante na corrente sanguínea é a progesterona, mostrando a importância do NO nas alterações circulatórias uterinas durante o ciclo estral.

Kelley *et al.* (2013) mostraram, por meio de experimento, que éguas suplementadas com L-arginina (aminoácido precursor do NO) apresentaram melhores características uterinas no período pós-parto, relacionadas a uma melhor taxa de circulação do fluxo sanguíneo uterino, redução do acúmulo de fluido e melhor taxa de involução uterina neste período. Tal resultado revela ações benéficas causadas pelo NO a nível uterino, mostrando que o mesmo em concentrações adequadas, em determinados períodos do ciclo estral, pode apresentar mais ações benéficas que deletérias.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que, por meio da metodologia utilizada, não foi observada uma relação entre o percentual de neutrófilos e a concentração de nitrato/nitrito encontrado no endométrio de éguas receptoras de embrião no período pré-ovulatório, não sendo indicada a mensuração de NO como um parâmetro auxiliar na seleção de receptoras.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, J.; HANKS, M.; SHAWA, D. J.; ELSE, R.; WATSON, E. Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares. **Theriogenology**, v. 66, p. 423–430. 2006.

ALGHAMDI, A.S.; TROEDSSON, M.H.T. Concentration of nitric oxide in uterine secretion from mares susceptible and resistant to chronic post-breeding endometritis. **Theriogenology**, v. 58, p. 445-448. 2002.

ALGHAMDI, A.S.; FOSTER, D.N.; CARLSON, C.S.; TROEDSSON, M.H.T. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. **Am. J. Reprod. immunology**, v.53, p.230-237. 2005.

ALLEN, W. R. Equine embryo transfer: A brief up date on techniques and progress. **Ars Veterinária**, v.10, p. 67-74, 1994

ALONSO, M.A. **Efeito das características uterinas e do dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas a receptoras de embrião**. 2007. 72 p. Tese (Mestrado em reprodução animal) Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu-SP, 2007.

ALVARENGA, M. A.; LANDIN-ALVARENGA, F. C.; MEIRA, C. Modification in the technique used to recovery equine embryos. **Equine Vet. J.** v. 15 p. 111- 112. 1993.

ALVARENGA, M. A. ; FERREIRA, J. P. C.; MEIRA, C. ; LUNA, S. P. L. e BURNS, P. J. Induction of luteolysis in mares utilizing a micro- dose of prostaglandin F2 alfa in sacral lumbar space. **J. Equine Vet. Sc.** v.18, n. 3, p. 167-169, 1998.

ALVARENGA, M.A. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**. V.38(supl2):p 319-333. 2010.

- ASBURY, A.C. Endometritis diagnosis in mares. **Equine Vet Data**. V. 5, p.166.1984
- BALL BA, SHIN SJ, PATTEN VH, LEIN DH, WOODS GL. Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mares endometrium. **c**.
- BOLLWEIN, H.; STOLLA, R.; ROHR, S.; WELTER, H.; WEBER, F.; EINSPAINER, R.; Relationships between uterine blood flow, estrogens and nitric oxide in cycling mares. **Theriogenology**. V. 58, p. 575–578. 2002.
- BOSCÁ, L.; ZEINI, M.; TRAVÉS, P.G.; HORTELANO, S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for in macrophage function na fate. **Toxicology**. V. 208, p. 249–258. 2005
- BROOK, D. Uterine cytology. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p. 246–53.
- BURLESON, M.D.; LeBLANC, M.M.; RIDDLE, W.T.; HENDRICKS, K.E.M. Endometrial microbial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in Thoroughbred mares. **Anim. Reprod. Scie.**, v. 121, p.103. 2010.
- CAIADO, J. R. C.; FONSECA, F. A.; SILVA, J. F. S.; CAIADO, J. C. C.; FONTES, R. S. Aplicação do flunixin meglumine antes da transferência não-cirúrgica de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador. **Rev. Bras. Ciências Vet.**, v.12, p.11-15. 2005.
- CAIADO J. R. C., FONSECA F. A., SILVA J. F. S., FONTES R. S. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação. **R. Bras. Zootec.**, v.36, p. 360-368. 2007.
- CARD, C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. **Theriogenology**: v. 64, p.580–588. 2005.
- CARVALHO, H. F.; SILVA, D. F.; ANDRADE, A. F. C.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; LEMES, K. M.; FLOREZ-RODRIGUES, S. A.; Arruda, R.P. Effect of different L-arginine concentrations on motility patterns and hyperactivation in cryopreserved equine sperm. In: 6th International Symposium on Stallion Reproduction (ISSR), 2012, Vienna. **J. Equine Vet. Scie.**, v. 32. p. 480-481, 2012.

CASLICK, E. A. The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the Thoroughbred mare. **Cornell Vet**, v.27, p.178-187, 1937.

CHEN, H. W.; JIANG, W. S.; TZENG, C. R.; Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development an apoptosis. **Fertility and sterility**, v. 75, p. 1163-1171, 2001.

COCCHIA, N.; PACIELO, O.; AULETTA, L.; UCCELLO, V.; SILVESTRO, L.; MALLARDO, K.; PARAGGIO, G.; PASOLINI, M.P. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**. v. 77, p 89-98. 2012.

COWELL, R.L.; TYLER, R.D. **Diagnostic cytology and hematology of the horse**. 2^a edition. Missouri. Ed. Mosby.260 p.

CRICKMAN, J.A. e PUGH, D.G. Equine endometrial cytology: a review of techniques and interpretations. **Vet Med**. V. 81, p. 650-656. 1986.

DIXIT, V. D.; PARVIZI,N; Nitric oxide and the controlo f reproduction. **Animal Reproduction science**. v. 65, p.1-16. 2001.

EVANS, M. J.; HAMER, J. M.; GASON, L. M.; IRVINE, A. C. Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 35, p. 327-342, 1987.

FANG, L.; NOWICKI, B. J.; DONG, Y. L.; YALLAMPALLI, C. Localized increase in nitric oxide production and expression of nitric oxide synthase isoforms in rat uterus with experimental intrauterine infection. **Am. J. Obstet. Gynecol**. v. 181, p.601-609. 1999.

FIORATTI, E. G. LEAL, A. C. M. S., CALDAS-BUSSIÈRE, M. C.; ALVARENGA, M.A. . Nitric oxide concentration in free uterine fluid after dexamethasone treatment of mares resistant and susceptible to endometritis. In: Tenth International Symposium on Equine Reproduction, 2010, Lexington, KY. **Animal Reproduction Science**, 2010. v. 121S. p. S113-S114.

FIORATTI, E.G. **Efeito dos anti-inflamatório esteroides na reação inflamatória e na fertilidade de éguas normais e susceptíveis a endometrite persistente após inseminação artificial**. 2010. 118 p. Tese (Mestrado em reprodução animal)

Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu-SP, 2010.

FLEURY, J. J. O dia da colheita na taxa de recuperação embrionária em equinos em uma central de transferência de embriões comercial. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Supl.. Porto Alegre, v. 26, p. 268. 1998.

FLEURY, J. J.; PINTA A. J.; MARQUES, A.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 38, p. 26-38. 2001.

FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.;BALIEIRO, J.C.C. Avaliação da receptora: efeito de características uterinas e tempo de ovulação. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, Araxá. **Acta Sci. Vet.**, v.34 (supl. 1), p.502, 2006.

HINRICHS, K.; CUMMINGS, M. R.; SERTICH, P. L.; KENNEY, R. M. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. **J Am Vet Med Assoc**, v.193, p.72-75, 1988.

HONNENS, A.; WEISSER, S.; WELTER, H.; EINSPANIER, R.; BOLLWEIN, H. Relationships between uterine blood flow, peripheral sex steroids, expression of endometrial estrogens receptors and nitric oxide synthases during the estrous cycle in mares. **J. Rprod. Dev.** v.57, p. 43-48. 2011.

HUGHES, J.P.; LOY, R.G.; Investigations on the effect on intrauterine inoculation of *Streptococcus zooepidemicus* in the mares. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.** v. 15, p. 289-292. 1969.

Ignarro L. J. **Nitric oxide, biology and pathobiology**. San Diego, Estados Unidos: Academic press. 2000

JONES, D. M.; FIELDEN, E. D.; CARR, D. H. Some physiological and pharmacological factors affecting uterine motility as measured by electromyography in the mare. **J Reprod. Fertil Suppl**, v.44, p.357-358,1991.

KELLEY, D. E.; WARREN, L. K.; MORTENSEN, C. J. Oral L-arginine supplementation impacts several reproductive parameters during the postpartum period mares. **Animal Reproduction Science**. v. 138, p. 233-240. 2013.

KNUDSEN, O.; SOLLEN: Methods for Taking samples from the uterus of mares and cows. **Nordisk Vet Med**. v. 13, p.449-456. 1961.

KNUDSEN, O. Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. **Cornell Vet**, v. 54, p. 415-422, 1964.

LeBLANC, M. M.; ASBURY, A. C.; LYLE, S. K. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. **Am J Vet Res**, v.50, p.864-867. 1989.

LeBLANC, M. M.; NEUWIRTH, L.; ASBURY, A. C.; TRAN, T.; MAURAGIS, D.; KLAPSTEIN, E. Scintigraphic measurements of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Vet J**, v.26, p.109-113, 1994.

LeBLANC, M. M.; JOHNSON, R. D.; CALDERWOOD, M. B.; VALDERRAMA, C. Lymphatic clearance of india ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. **Biol Reprod Mono**, n.1, p.501-506, 1995.

LeBLANC, M.M.; MAGSIG, J.; STROMBERG, A.J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, v. 68, p. 403-412. 2007.

LEY, W.B. Additional tips for endometrial cytology in mares. **Vet Med**. v.10, p.894. 1986.

LIU, I. K. M e TROEDSSON, M. H. T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. **Theriogenology**, 70: 415–420, 2008.

LOSINNO L. e ALVARENGA, M. A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. **Acta Sci. Vet.**, v.34, p. 39-49, 2006.

MALOUFI, F.; PIERSON, R.; OTTO, S.; BALL, C.; CARD, C.E. Mares susceptible or resistant to endometritis have similar endometrial echographic and inflammatory cell reactions at 96 hours after infusion with frozen semen and extender. In: Proceedings of the 48th Annual Conv American Association Equine Practitioners; p. 51–7. 2002.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol**, v. 43, p. 109-142. 1991.

MOREIRA, L.; CARVALHO, E. C. Q.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C.; Concentração de nitrito endometrial e a ocorrência de patologias uterinas em vacas. **Braz. J. vet. Res. Anim.** v.45, p. 206-210. 2008.

NIELSEN, J.M. Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology**; v 64. p 510–518, 2005.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical recovery of equine eggs, and attempt at non-surgical egg transfer in horses. **J. Reprod. Fertil.**, v. 31, p. 187-195, 1972.

ORSI, N.M. Embryotoxicity of the nitric oxide donor sodium nitroprusside in preimplantation bovine embryos in vitro. **Anim. Reprod. Sci.** v.91, p. 225-236. 2006.

OVERBECK, W.; WITTE, T.S.; HEUWIESER, W. Comparison of the three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. **Theriogenology**; v 75.p 1311–1318. 2011.

PASCOE, D. R. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. **J Reprod Fertil Suppl**, v.27, p.299-305, 1979.

PELEHACH, L. M.; GREAVES, H. E.; PORTER, M. B.; DESVOUSGES, A.; SHARP, D. C. The role of estrogen and progesterone in the induction and dissipation of uterine edema in mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 441-444, 2002.

PURSWELL, B.J.; LEY, W.B.; SRIRANGANATHAN, N.; BOWEN, J.M. Aerobic and anaerobic bacterial flora in postpartum mare. **Equine Vet Sci**; v. 9, p. 141-144. 1989.

RICKETTS, S.W. e MACKINTOSH, M.E. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. **J Reprod Fertil Suppl**; v. 35, p. 343-352. 1987.

RIDDLE, W.T.; LEBLANC, M.M.; STROMBERG, A.J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**; v. 68: p 395– 402. 2007

RIERA, F. L.; MCDONOUGH, J. Commercial embryo transfer in póló ponies in Argentina. **Equine Vet. J. Suppl.**, v. 15, p. 116-118, 1993.

RODRIGUES, T. G. **Uso de progesterona de longa duração e inovulação de éguas no segundo dia após a ovulação.** 2009. 55 p. Tese (Mestrado em ciência animal). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, 2009.

ROSSELLI, M. Nitric oxide and reproduction. **Molecular Hum. Reprod.** v. 3, p. 639-641. 1997.

ROZALES, D. P. **Transferência de embriões em eqüinos** : descrição e análise da técnica. 2005. 28 p. Monografia. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, 2005.

STAMLER, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell** v. 78, p. 931-936. 1994

SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Progestins** eds. Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993, p. 311–318.

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current of status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 51, p. 91-104, 1998.

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technology in the horse. **Theriogenology**, v. 59, p. 151-170, 2003.

TRAUB-DARGATZ, J.L.; SALMAN, M.D.; VOSS, J.L. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. **J. Am. Vet. Med.** V. 198, p. 1745-1747. 1991.

TROEDSSON M. H. T.; LIU I. K. M.; ING M.; PASCOE J.; THURMOND M. J. Multiple site electromyographic recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **J Reprod Fertil**, v.99, p.307-313, 1993.

TROEDSSON, M. H. T. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. **Pferdeheilkunde**, v.13, p.516 – 520, 1997.

TROEDSSON, M.H.T.; Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, p. 461-471,1999.

VIANA, K. S.; CALDAS-BUSSIÈRE, **M. C**; MATTA, S. G. C.; FAES, M. R.; CARVALHO, C. S., Paes de Carvalho; QUIRINO, C. R. Effect o sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Anim. Reprod. Scie.** v. 102, p. 217-227, 2007

WOODWARD, E. M.; CHRISTOFFERSEN, M.; CAMPOS, J.; HOROHOV, D. W.; SCOGGIN, K. E.; SQUIRES, E.; TROEDSSON, M.H.T. A investigation of uterine nitric oxide production in mares susceptible an resistant to persistent breeding-induced endometritis and the effects of immunomodulation. **Reprod. Dom. Anim.** v.48, 554-561. 2013