

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM PLASMA RICO EM
PLAQUETAS EM ÉGUAS RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS À
ENDOMETRITE PERSISTENTE APÓS INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL**

MARIA FERNANDA SVIZZERO REGHINI

**BOTUCATU – SP
2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM PLASMA RICO EM
PLAQUETAS EM ÉGUAS RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS À
ENDOMETRITE PERSISTENTE APÓS INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL**

MARIA FERNANDA SVIZZERO REGHINI

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre em Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga

**BOTUCATU – SP
2013**

Nome da autora: Maria Fernanda Svizzero Reghini

Título: EFEITO DO TRATAMENTO COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS EM ÉGUA RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS À ENDOMETRITE PERSISTENTE APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor Dr. Marco Antônio Alvarenga

Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Professora Dr.^a Regina Kiomi Takahira

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – BOTUCATU

Doutor Marcio Teoro do Carmo

Médico Veterinário Autônomo

Botucatu, 24 de janeiro de 2013.

À Deus, pela oportunidade de mais uma importante etapa cumprida. Aos meus pais, Terezinha e Léo, pelo amor, carinho, apoio, companheirismo e exemplo. Aos meus irmãos, Juliano e Hebert, pelo carinho, amizade e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Marco Antônio Alvarenga, pela orientação, exemplo, apoio e pela oportunidade de realizar este experimento. Obrigada pelo incentivo e por todos os ensinamentos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos professores Frederico Ozanam Papa, Regina Kiomi Takahira, Fernanda Landim, Alexandre Borges e Maria Clara Caldas Bussiere, por todo apoio e ajuda e por disponibilizarem todos os recursos necessários para a realização deste experimento.

Ao professor da Clínica de Grandes Animais, José Paes Filho, por todo o apoio, ajuda e ensinamentos.

Aos professores Maria Denise Lopes e Sony Bicudo, pelos ensinamentos e pela atenção.

Aos colegas Renata Uliani, Helene Resende, Marcel Farrás e Carlos Ramires Neto pelo companheirismo, amizade e ajuda nos momentos difíceis.

Ao pós graduando Eduardo Fioratti, pelo apoio sempre presente, pela atenção e ajuda durante todo o experimento.

Aos pós graduandos: Heloisa Canesin, Rafael Mide, Fernanda Saules, Luis Fernando Novaes, pela ajuda e companheirismo no posto de monta.

Aos médicos veterinários Marcio Teoro do Carmo, Ian Martin e Cely Marini, pelos ensinamentos e apoio em todos os momentos.

Aos pós graduandos Felipe Hartwig, Fernando Lisboa e Gabriel Monteiro, pela ajuda e atenção.

Ao pós graduando Leandro Maia, por todo o ensinamento acerca do plasma rico em plaquetas.

Aos funcionários do departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária e do posto de monta.

Aos estagiários do posto de monta: Bárbara, Cinthia, Roberta, Rafaela, Laíza, Jaqueline, Luis Fernando, Alexandre “Baiano”, Camila, Daniel, Daniel “Cabelinho”, Bruno e Marina.

Aos funcionários da pós graduação, por estarem sempre dispostos a ajudar e pela atenção dada aos pós graduandos.

Aos residentes do Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ Claudia, Thiago, Kathiane e Carol pela ajuda e disponibilidade.

Às amigas: Claudia, Larissa, Renata, Dayanne, Loni, Daniele, Beatriz, Débora e Rafaela por estarem sempre presentes, mesmo à distância, me apoiando em todos os momentos importantes.

Aos meus tios e primos que sempre me apoiaram e se fizeram presentes.

Aos animais, pois sem eles este trabalho não seria realizado.

A Deus, por me proporcionar a oportunidade de realizar este trabalho, e por colocar pessoas tão especiais em minha vida.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Moléculas bioativas encontradas nos α -grânulos das plaquetas .. 36

TABELA 2: Médias e desvio padrão do número de células polimorfonucleares no fluido uterino (PMNs; n resistentes=7; n susceptíveis =12); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT; n resistentes=8; n susceptíveis =15), quantidade de fluido uterino (FLU; n resistentes=8; n susceptíveis =15) e concentração de ON no fluido uterino (ON; n resistentes=7; n susceptíveis =12) entre éguas susceptíveis e resistentes 24 horas antes da inseminação artificial 52

TABELA 3: Médias e desvio padrão do número de células polimorfonucleares no fluido uterino (PMNs n resistentes=7; n susceptíveis =12); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT n resistentes=8; n susceptíveis =15), quantidade de fluido uterino (FLU; resistentes=8; n susceptíveis =15) e concentração de ON no fluido uterino (ON; n resistentes=7; n susceptíveis =12) entre éguas susceptíveis e resistentes 24 horas após inseminação artificial .. 52

TABELA 4: Médias e desvio padrão das células polimorfonucleares no fluido uterino (PMN`s n=7); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT; n=8), quantidade de fluido uterino (FLU; n=8) e concentração de ON no fluido uterino (ON; n resistentes=7) nas éguas resistentes 24 horas antes e 24 horas após a inseminação artificial 53

TABELA 5: Médias e desvio padrão das células polimorfonucleares no fluido uterino (PMN`s n=12); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT n=15), quantidade de fluido uterino (FLU n=15) e concentração de ON (n=12) nas éguas susceptíveis 24 horas antes e 24 horas após a inseminação artificial..... 53

TABELA 6: Médias e desvio padrão da concentração das células polimorfonucleares no fluido uterino (PMN`s; n=4); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT; n=8), quantidade de fluido uterino (FLU, n=8) e concentração de óxido nítrico (ON; n=4) nas éguas resistentes 24 horas antes (Tratamento pré) e 24 horas após a inseminação artificial e tratamento com plasma rico em plaquetas (Tratamento pós) 56

TABELA 7: Médias e desvio padrão das células polimorfonucleares no fluido uterino (PMN`s; n=11); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT; n=15), quantidade de fluido uterino (FLU; n=15) e concentração de óxido nítrico (ON; n=11) nas éguas susceptíveis 24 horas antes (Tratamento pré IA) e 24 horas após a inseminação artificial e tratamento com plasma rico em plaquetas (Tratamento pós IA)..... 56

TABELA 8: Médias e desvio padrão das células polimorfonucleares no fluido uterino (PMN`s, n=7); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT, n=8), quantidade de fluido uterino (FLU, n=8) e concentração de óxido nítrico (ON; n=7) nas éguas resistentes no grupo controle 24 horas após

inseminação artificial (Controle pós IA) e no grupo inseminado e tratado com plasma rico em plaquetas (Tratamento pós IA)..... 59

TABELA 9: Médias e desvio padrão das células polimorfonucleares no fluido uterino (PMN`s); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT), quantidade de liquido uterino (FLU) e concentração de óxido nítrico (ON) nas éguas susceptíveis (n=15) no grupo controle 24 horas após inseminação artificial (Controle pós IA) e no grupo inseminado e tratado com plasma rico em plaquetas (Tratamento pós IA)..... 59

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Médias e desvio padrão da concentração ($\times 10^3/\text{mL}$) de células polimorfonucleares no fluido uterino (PMN`s) nos momentos 24 horas pré (PRE) e 24 horas após (POS) inseminação artificial, nas éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à endometrite persistente 54
- FIGURA 2: Médias e desvio padrão da porcentagem (%) de células polimorfonucleares na citologia uterina nos momentos 24 horas pré (PRÉ) e 24 horas após (PÓS) inseminação artificial, nas éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à endometrite persistente 54
- FIGURA 3: Médias e desvio padrão da quantidade de fluido uterino avaliada na ultrassonografia (mm), nos momentos 24 horas pré (PRÉ) e 24 horas após (PÓS) inseminação artificial, nas éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à endometrite persistente 55
- FIGURA 4: Médias e desvio padrão da concentração de óxido nítrico (μM) mensurado no fluido uterino nos momentos 24 horas pré (PRÉ) e 24 horas após (PÓS) inseminação artificial, nas éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à endometrite persistente 55
- FIGURA 5: Médias e desvio padrão da concentração ($\times 10^3/\text{mL}$) de células PMNs recuperadas do fluido uterino das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, no grupo tratado, 24 horas antes (TT PRÉ) e 24 horas após (TT PÓS) a inseminação artificial e tratamento com plasma rico em plaquetas 57
- FIGURA 6: Médias e desvio padrão da porcentagem (%) de células PMNs na citologia exfoliativa uterina das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, no grupo tratado, 24 horas antes (TT PRÉ) e 24 horas após (TT PÓS) a inseminação artificial e tratamento com plasma rico em plaquetas 57
- FIGURA 7: Médias e desvio padrão da quantidade de fluido uterino mensurado ao ultrassom (mm) das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, no grupo tratado, 24 horas antes (TT PRÉ) e 24 horas após (TT PÓS) a inseminação artificial e tratamento com plasma rico em plaquetas 58
- FIGURA 8: Médias e desvio padrão concentração de óxido nítrico (μM) no fluido uterino das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, no grupo tratado, 24 horas antes (TT PRÉ) e 24 horas após (TT PÓS) a inseminação artificial e tratamento com plasma rico em plaquetas 58
- FIGURA 9: Médias e desvio padrão da concentração ($\times 10^3/\text{mL}$) de células PMNs recuperadas do fluido uterino das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, comparando-se os grupos controle (CON) e tratado (TT) 24 horas após a inseminação artificial 60

FIGURA 10: Médias e desvio padrão da porcentagem (%) de células PMNs na citologia exfoliativa uterina das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, comparando-se os grupos controle (CON) e tratado (TT) 24 horas após a inseminação artificial 60

FIGURA 11: Médias e desvio padrão da quantidade de fluido uterino mensurado ao ultrassom (mm) das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, comparando-se os grupos controle (CON) e tratado (TT) 24 horas após a inseminação artificial 61

FIGURA 12: Médias e desvio padrão concentração de óxido nítrico (μM) no fluido uterino das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, comparando-se os grupos controle (CON) e tratado (TT) 24 horas após a inseminação artificial 61

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

°C= graus centígrados
μL= microlitro
μm= micrometro
μM= micromolar
12-HETE= ácido 12-hidroxi-eicosatetraenoico
CL= corpo lúteo
eNOS= óxido nítrico sintetase endotelial
EPPC= endometrite persistente pós cobertura
FCR= força de centrifugação relativa
IA= inseminação artificial
IL= interleucina
iNOS= óxido nítrico sintetase indutora
IV= intravenoso
Kg= quilogramas
LXA4= lipoxina A4
M= molar
mg= miligramas
mL= mililitros
mm = milímetros
mm= milímetros
mRNA = ácido ribonucleico mensageiro
nm= nanômetro
nNOS= óxido nítrico sintetase neuronal
NO₂⁻=nitrito
NO₃⁻=nitrato
NOS= óxido nítrico sintetase
ON = óxido nítrico
PBS= phosphate buffered saline
pg = picograma
PG= prostaglandina
PGE1= Prostaglandina E1
PGE2= Prostaglandina E2

PGF 2α = prostaglandina F2 alfa

PMNs= neutrófilos polimorfonucleares

PRP= plasma rico em plaquetas

RANTES= regulated on activation normal T cells expressed and secreted

TNF- α = fator de necrose tumoral alfa

UI = unidades internacionais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Etiopatogenia da endometrite persistente pós-cobertura	22
2.2 Trânsito espermático no trato genital feminino e a resposta inflamatória ..	24
2.3 Mecanismos de defesa uterina	25
2.3.1 Barreiras físicas uterinas	25
2.3.2 Imunoglobulinas	25
2.3.3 Inflamação Local	26
2.3.3.1 Óxido Nítrico	27
2.3.4 Contrações uterinas	28
2.4 Terapia aplicada à endometrite persistente pós-cobertura	29
2.4.1 Lavagem uterina	30
2.4.2 Drogas ecbólicas	30
2.4.3 Promoção da Drenagem Cervical	32
2.4.4 Antiinflamatórios não esteróides sistêmicos	32
2.4.5 Imunomoduladores	32
2.5 Plaquetas e fatores de crescimento	35
2.5.1 Plasma Rico em Plaquetas	37
3 OBJETIVOS	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Experimento 1	43
4.1.1 Seleção dos animais e local da pesquisa	43

4.1.2 Colheita de sêmen e preparo das doses inseminantes.....	43
4.1.3 Inseminações artificiais	44
4.1.4 Colheita e processamento do material uterino	44
4.1.5 Dosagem de Óxido Nítrico	45
4.2 Experimento 2	46
4.2.1 Seleção dos animais	46
4.2.2 Colheita de sêmen e preparo das doses inseminantes.....	46
4.2.3 Inseminações artificiais	46
4.2.4 Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e infusão no útero	46
4.2.5 Colheita e processamento do material uterino	47
4.2.6 Dosagem de Óxido Nítrico	48
4.3 Análise Estatística	48
5 RESULTADOS.....	50
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÕES	71
8 BIBLIOGRAFIA	73
9 TRABALHO CIENTÍFICO.....	86

REGHINI, MARIA FERNANDA SVIZZERO. **Efeito do tratamento com plasma rico em plaquetas em éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente após inseminação artificial.** Botucatu, 2013. 104 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

RESUMO

A endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) é uma das principais causas da redução de fertilidade em éguas. Recentes estudos têm demonstrado a importância da imunomodulação da inflamação após a cobertura. O objetivo deste trabalho foi verificar o estímulo do sêmen na resposta inflamatória uterina de éguas resistentes e susceptíveis à endometrite após a inseminação artificial (IA) e propor um novo tratamento a fim de debelar a resposta inflamatória uterina exacerbada, com o uso do plasma rico em plaquetas (PRP), que vem sendo muito utilizado devido à sua ação anti-inflamatória. Foram selecionadas 15 éguas resistentes e 8 susceptíveis à EPPC com base nos seus índices reprodutivos e exames ultrassonográficos e citológicos. A concentração de neutrófilos e de óxido nítrico (ON) no fluido uterino, a citologia exfoliativa uterina e o acúmulo de fluido uterino verificado no exame ultrassonográfico foram analisados nos dois grupos de animais (1) 24 horas antes da IA e (2) 24 horas após a IA com sêmen fresco. No primeiro experimento não houve intervenção medicamentosa, e no segundo as éguas foram tratadas com 20 mL de PRP infundido no útero 4 horas após a IA. As dosagens de ON foram realizadas por reação colorimétrica de Griess em espectrofotômetro, os neutrófilos na secreção uterina foram quantificados com o uso da câmara de Neubauer e a leitura das amostras de citologia foi feita por microscopia óptica utilizando imersão, considerando a porcentagem de neutrófilos/100 células de forma aleatória. Os resultados demonstraram que o sêmen estimula uma resposta inflamatória exacerbada no ambiente uterino das éguas susceptíveis, e que o tratamento local com PRP foi clinicamente efetivo na redução da inflamação uterina nas éguas susceptíveis à endometrite após a IA, observado por meio da redução da quantidade de fluido uterino verificado no exame ultrassonográfico, redução do percentual de neutrófilos observados na citologia exfoliativa endometrial uterina e redução da concentração de ON no fluido uterino. Os resultados mostram que as propriedades anti-inflamatórias do PRP

podem ser promissoras na modulação da resposta uterina exacerbada ao sêmen.

Palavras-chave: Éguas; Endometrite; Plasma Rico em Plaquetas; Sêmen.

REGHINI, MARIA FERNANDA SVIZZERO. **Effect of treatment with platelet rich plasma on resistant and susceptible post-breeding endometritis mares.** Botucatu, 2013. 104 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Post breeding endometritis (PBE) is one of the major causes of fertility reduction in mares. Recent reports have been demonstrating the importance of immunomodulation of inflammation after mating. The aim of this study was to verify semen's stimulus on inflammatory response in mares resistant and susceptible to PBE, and to propose a new treatment to quell the exacerbated uterine inflammatory response against semen, using platelet rich plasma (PRP), which has been widely used due to its anti-inflammatory properties. 15 mares susceptible to PBE and 8 mares resistant to PBE were selected based on their reproductive index, ultrasonographic and cytological examination. The concentration of neutrophils and nitric oxide (NO) in the uterine fluid, exfoliative cytology of the uterus and uterine fluid accumulation observed by ultrasonography were analyzed in both group of animals (1) 24 hours before artificial insemination (AI) and (2) 24 hours after AI with fresh semen. In the first cycle, there was no drug intervention, and in the second cycle mares were treated with 20 mL of platelet rich plasma, infused in uterus 4 hours after AI. NO dosage were performed by colorimetric reaction of Griess with spectrophotometer, neutrophils in uterine fluid were quantified by the use of Neubauer chamber and the lecture of endometrial cytology samples were analyzed by optical microscopy using immersion, considering the percentage of neutrophils/100 cells in an alleatory form. The results showed that semen can stimulate a major inflammatory response inside the uterine environment in susceptible mares, and that the local treatment with PRP was clinically effective in reduction of inflammation on mares susceptible to PBE, by the reduction of uterine fluid examined by ultrasonography, decrease in percentual of neutrophils on endometrial exfoliative cytology, and reduction of NO concentration in uterine fluid. These results showed that the anti-inflammatory properties of PRP can be promising to modulate exacerbated uterine response against semen.

Key-words: Endometritis; Mares; Semen; Platelet Rich Plasma.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Com a expansão da equinocultura nas últimas décadas, na qual o Brasil se destaca por estar entre os 3 países com maior número de animais puros de raça, os criadores procuram otimizar a eficiência reprodutiva dos reprodutores, buscando incrementar a produção através de um grande número de embriões coletados por égua doadora. Porém, a excessiva manipulação do trato reprodutivo tem levado ao aumento das desordens uterinas, com conseqüente comprometimento da fertilidade da fêmea equina.

Desta maneira, tais desordens podem acarretar grande prejuízo econômico para os produtores, devido à possível queda na taxa de concepção dos animais, aumento do número de serviço por concepção e sobrevivência embrionária prejudicada.

Segundo a literatura, a inflamação uterina induzida pela cobertura/inseminação artificial é uma resposta ao sêmen depositado no útero, sendo um processo transitório, pelo qual os espermatozoides são eliminados do trato genital feminino. A reação é necessária para a sobrevivência e desenvolvimento do embrião. Porém, quando exacerbada, apresenta uma intensa migração de células polimorfonucleares para o interior do útero originada pela presença dos espermatozoides, resultando em perda embrionária ou interferindo na sobrevivência do embrião.

A detecção de animais considerados susceptíveis à EPPC pode ser realizada quando há presença de mais de 2 centímetros de fluido uterino durante o estro (BUCCA et al., 2008). O fluido uterino pode estar livre no lúmen uterino ou então envolto por um tecido cicatricial fibrótico. Estes locais de acúmulo de líquido tornam o útero mais vulnerável às infecções e prejudicam a implantação embrionária (LEFRANC & ALLEN, 2008).

Tratamentos de éguas susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) comumente visam auxiliar o útero na limpeza de produtos inflamatórios e contaminantes após a cobertura, sendo apenas uma medida paliativa, que mantém a condição uterina, não atuando diretamente na causa da inflamação.

Estudos recentes têm demonstrado que a imunomodulação da resposta inflamatória após a cobertura é capaz de melhorar a taxa de gestação de

éguas susceptíveis à endometrite, já que há atuação diretamente nos mediadores inflamatórios, impedindo uma resposta exacerbada e persistente. Para isso, foram desenvolvidos tratamentos que parecem modular ou até mesmo suprimir a resposta imune visando reduzir a inflamação uterina pós-cobertura. Há evidências de que o uso criterioso de anti-inflamatórios esteróides ou imunomoduladores pode aumentar os índices de prenhez em éguas com acúmulo de fluido ou inflamação uterina (FUMUSO et al., 2003; DELL'AQUA JR., 2004; BUCCA et al., 2008; PAPA et al., 2008).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta inflamatória uterina após inseminação artificial em éguas resistentes e susceptíveis à endometrite e verificar se o tratamento com PRP foi eficiente em debelar a inflamação que se instala imediatamente e persiste em determinadas éguas após a IA.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiopatogenia da endometrite persistente pós-cobertura

A endometrite é um processo que ocorre para remover do útero o excesso de espermatozóides, plasma seminal, debris e outros contaminantes (TROEDSSON, 1994) que podem adentrar o trato genital feminino através da cobertura, parto e exames ginecológicos realizados pelo médico veterinário.

Segundo a revisão realizada por Troedsson (1999), a endometrite persistente pós-cobertura é a principal causa da redução de fertilidade em éguas, e é considerada a terceira afecção clínica mais comum depois da cólica e das afecções do trato respiratório. Uma inflamação persistente frequentemente resulta em luteólise prematura, pois o endométrio lesado induz à produção de PGF2 α , que lisa o corpo lúteo, levando conseqüentemente à perda embrionária. Além disso, a irritação local torna o útero um ambiente desfavorável, interferindo assim na sobrevivência do embrião (ENGLAND, 2005).

A monta natural e a inseminação artificial são consideradas as principais causas de endometrite, pois com a deposição do sêmen dentro do útero da égua, bactérias da flora vaginal são carreadas para o interior do útero no momento da cópula (HINRICHS et al., 1988). Atualmente, a utilização da IA com baixa dose vem sendo muito difundida e, sendo assim, menor quantidade de espermatozóides é depositada no ambiente uterino. Aliado a este fator, os diluentes para o sêmen são adicionados de antibiótico, resultando em redução do número de éguas contaminadas. Porém, após a IA, considerável número de leucócitos ainda é observado, pois a célula espermática é o principal fator para que ocorra uma resposta inflamatória local (DELL'AQUA JR., 2004).

A EPPC caracteriza-se por uma rápida infiltração de neutrófilos uma hora após a inseminação artificial (CARD, 2005; TROEDSSON, 1999). A mucosa do sistema reprodutivo feminino apresenta um sistema imune que retira os contaminantes através de uma combinação entre os fatores celulares, humorais e mecânicos de contração e drenagem linfática que permitem a depuração uterina e a eliminação desse processo fisiológico em até 72 horas. A endometrite se instala de forma exacerbada quando há uma falha

em algum desses mecanismos naturais de defesa (LEBLANC, 2003). Éguas que apresentam inflamação persistente tipicamente apresentam vários fatores predisponentes, como uma conformação perineal alterada, idade avançada, localização uterina fora dos padrões anatômicos ou uma falha no *clearance* uterino devido a uma contração miometrial deficiente (CARD, 2005).

Acredita-se que as contrações uterinas retiram o fluido acumulado e os produtos inflamatórios nocivos do útero, bem como são responsáveis pela eliminação de espermatozóides do útero através da cérvix rapidamente após a cobertura (TROEDSSON, 2006). Normalmente, a maioria das éguas consegue efetivamente eliminar o excesso de espermatozóides e produtos resultantes do processo inflamatório em menos de dois dias, sendo estas consideradas resistentes, ao passo que uma população de animais falha em fazê-lo espontaneamente em um período maior do que quatro dias, sendo então consideradas éguas susceptíveis. (ALGHAMDI et al., 2005).

A EPPC também pode ser causada por alterações degenerativas que ocorrem continuamente no útero de éguas devido à idade e ao número de partos. O trato reprodutivo se altera devido ao estiramento dos ligamentos largos que ocorre após prenhez repetidas, resultando no deslocamento crânio-ventral do útero para o abdômen, dificultando a drenagem do fluido existente no lúmen uterino em direção à cérvix. Sendo assim, os animais afetados são, geralmente, fêmeas multíparas com mais de 14 anos de idade (LEBLANC, 2003).

A drenagem linfática do útero também pode falhar caso a pressão intraluminal esteja diminuída, permitindo ao fluido entrar no lúmen ao invés de ascender para os vasos linfáticos (CAUSEY, 2006). Se a inflamação persistir, pode haver um grande influxo de linfócitos no endométrio, possivelmente contribuindo para mudanças crônicas degenerativas e conseqüentemente falha na função endometrial (CAUSEY et al., 2008).

Troedsson (2006) relata que durante a realização do exame ginecológico pode ser difícil identificar éguas susceptíveis antes da cobertura. Alguns animais apresentam líquido livre no lúmen uterino antes da cobertura, mas a maioria destes não o apresenta até que sejam cobertos. Se há suspeita de EPPC, a égua deve ser monitorada por ultrassonografia transretal de 6 até 48 horas após cobertura.

Assim, os animais acometidos pela EPPC podem apresentar alta contagem de leucócitos, aumento do fluxo sanguíneo uterino, edema uterino com acúmulo de fluido, útero distendido e flácido, ciclo estral com menor duração (devido à regressão precoce do CL) (MOREL, 2003), histórico de repetição de cio e cultura endometrial positiva (BUCCA et al., 2008).

2.2 Trânsito espermático no trato genital feminino e a resposta inflamatória

Após a deposição do sêmen no útero da fêmea, os espermatozóides devem ser transportados até o local da fertilização. Para isso, a motilidade espermática, as contrações miometriais e uma inflamação fisiológica do útero após a cobertura são necessárias, possibilitando assim o transporte e a sobrevivência das células espermáticas no trato genital da égua (TROEDSSON et al., 1998).

Brinsko et al. (1990, 1991) relataram que lavados uterinos com 1 litro de solução que continha uma substância imobilizadora de espermatozóides realizados entre 30 minutos e duas horas após a cobertura diminuíram significativamente os índices de prenhez em éguas reprodutivamente normais, enquanto que as lavagens feitas aproximadamente quatro horas após a cobertura não reduziram este índice. Os autores concluíram então que aproximadamente 4 horas são necessárias para que um número suficiente de espermatozóides funcionais atinja o oviduto para assegurar a fertilização.

O ambiente uterino inflamado também mostrou ser prejudicial às características de motilidade espermática *in vitro*. A motilidade diminuiu substancialmente quando o sêmen foi incubado com secreções uterinas de éguas com inflamação ativa do endométrio após a cobertura. Além disso, muitos espermatozóides se ligaram aos PMNs da secreção, o que induziu à redução da motilidade destes e impediu que um grande número de células espermáticas fosse transportado para o oviduto, conseqüentemente reduzindo as chances de fertilização, além de diminuir o número de espermatozóides férteis disponíveis da segunda inseminação (ALGHAMDI et al., 2001).

2.3 Mecanismos de defesa uterina

O ambiente uterino sadio oferece as condições ideais para que ocorra primeiramente o transporte espermático até o local da fecundação e também o desenvolvimento embrionário. A composição do fluido uterino se dá por hormônios, prostaglandinas, enzimas, substratos energéticos, íons, vitaminas, aminoácidos, peptídeos, proteínas séricas e uterinas (FISCHER & BEIER, 1986). O sangue e o fluido uterino se comunicam através dos vasos sanguíneos, possibilitando assim a troca de substâncias entre eles (McRAE, 1988).

2.3.1 Barreiras físicas uterinas

A revisão feita por Troedsson (1999) mostra que, em éguas sadias, o útero é bem protegido das contaminações externas através de barreiras físicas, as quais consistem na vulva, no vestíbulo, vagina e a cérvix. Qualquer comprometimento destas barreiras pode predispor a égua a uma infecção uterina crônica.

2.3.2 Imunoglobulinas

Diferentes imunoglobulinas foram detectadas no lúmen uterino de éguas, com o predomínio de imunoglobulina G e imunoglobulina A, que são produzidas localmente pelo trato genital (TROEDSSON, 1999).

Segundo Troedsson (1999), embora o mecanismo de defesa realizado por anticorpos seja importante para a efetiva eliminação de bactérias contaminantes no útero de éguas susceptíveis, as concentrações de imunoglobulinas na secreção uterina são semelhantes ou até mesmo elevadas quando comparadas com éguas resistentes à endometrite. Esses achados sugerem que a susceptibilidade à endometrite persistente é causada por outros fatores além dos mecanismos humorais.

2.3.3 Inflamação Local

Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a chegarem ao local inflamado, e Katila (1995) observou estas células no lúmen uterino no período de 30 minutos após a inseminação. Estas células, que constituem a primeira linha de defesa do organismo, atuam na eliminação de antígenos por meio de fagocitose (ASBURY, 1986; GALINDO et al., 2003). Assim, após o contato do sêmen com o útero, ocorre uma forte reação inflamatória entre 4 e 24 horas (CARD, 2005). O pico da reação ocorre entre 6 e 12 horas, e esta decresce entre 24 e 48 horas (TROEDSSON, 1994).

Já a segunda linha de defesa são os macrófagos, células que são capazes de realizar atividade fagocítica repetidas vezes, controlar a inflamação, secretar moléculas que intensificam a resposta imune e contribuir diretamente para o reparo tecidual através da remoção do tecido danificado (TIZARD, 1998).

A população de leucócitos não é somente um modo de defesa do trato reprodutivo ou uma maneira de remodelar tecido, mas também é responsável pela produção de polipeptídeos como citocinas e mediadores quimiotáticos, que agem como “hormônios” na resposta imune contra espermatozóides ou mudanças endócrinas durante o ciclo estral (FUMUSO et al., 2007). As citocinas são proteínas que agem como sinalizadoras entre as células, e são liberadas por células de defesa, células endometriais, dentre outras. A interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), conhecidos como citocinas pró-inflamatórias, modulam a resposta da fase aguda (BARAÑAO, 1997; FUMUSO et al., 2007).

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que quando o espermatozóide equino entra em contato com o ambiente uterino, há ativação do sistema complemento na secreção uterina (WATSON et al., 1987). A clivagem do fator C5 em C5a e C5b provoca um sinal quimiotático para os PMNs, resultando num influxo destes para o lúmen uterino (KOTILAINEN et al., 1994; TROEDSSON, 1999). O sistema complemento é mediador de reações inflamatórias, atuando no aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, opsonização pré-fagocitose, ativação de lipases de membrana e lise do organismo contaminante (TROEDSSON et al., 2008). Os PMNs ativados

se ligam aos espermatozóides na presença do fator C3b e de mecanismos complemento- independentes; após a ligação, os espermatozóides são fagocitados pelos PMNs.

O processo inflamatório crônico ocorre muito tempo após os neutrófilos atingirem o foco da inflamação. Enquanto os macrófagos eliminam o tecido danificado, os neutrófilos e o fibrinogênio liberam collagenases e elastases que atuam sobre o tecido conjuntivo. A interleucina I, atraída pelos macrófagos, ativa a síntese dos fibroblastos que produzem colágeno, que vai atuar no tecido lesado, resultando assim, em tecido cicatricial (COLLINS et al., 1999).

2.3.3.1 Óxido Nítrico

O papel do óxido nítrico (ON) na inflamação representa um dos assuntos mais controversos já estudados em fisiologia. Vários estudos demonstraram que o ON apresenta potente propriedade anti-inflamatória, enquanto que outros sugerem que tal composto pode promover inflamação e consequente disfunção tecidual (GRISHAM et al. 1999).

O óxido nítrico é um potente vasodilatador e mediador da formação de novos vasos sanguíneos e está envolvido na manutenção da função, tônus e integridade vascular (ALBRECHT et al., 2003). Além disso, é considerado mediador de vários outros processos fisiológicos, como a resposta imune mediada por células, alteração de secreção de íons e polipeptídeos e remodelamento de tecidos (SOORANNA & DAS, 1995). Como o endométrio é regularmente submetido a tais processos durante o ciclo estral e no início da gestação, as enzimas responsáveis pela produção do ON agem e são encontradas neste local (WELTER et al, 2004). As 3 enzimas da família NOS catalisam a oxidação da L-arginina em L-citrulina (Palmer et al. 1988). A enzima eNOS é expressa principalmente pelas células endoteliais, bem como pelas glândulas endometriais e fibroblastos (ROBERTO DA COSTA et al., 2007) sendo importante no controle da função vascular (JANSSENS et al., 1992). A iNOS é expressa principalmente pelas células imunocompetentes após a inflamação (MONCADA & PALMER, 1991). O terceiro subtipo, nNOS, é

conhecido como um importante neurotransmissor e neuromodulador no sistema nervoso central e periférico (McCANN et al., 1996).

Sendo assim, o ON está envolvido na regulação das células endometriais e nas interações parácrinas entre as células. Vários estudos moleculares e funcionais têm demonstrado que a eNOS e a iNOS possuem um papel importante nas funções endometriais como remodelamento, receptividade e implantação (PURCELL et al., 1999). Ambas as enzimas têm sido identificadas no endométrio de várias espécies de fêmeas mamíferas prenhes e ciclantes, como humanos (TSENG et al., 1996) e ratas (PURCELL et al., 1999).

2.3.4 Contrações uterinas

A contratilidade do miométrio é reconhecida pela sua significativa função de retirar os debrís endometriais e produtos da inflamação. Acredita-se que defeitos de contratilidade do miométrio aumentam a susceptibilidade de éguas à EPPC. (NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 1999; TROEDSSON, 1999). Troedsson et al. (1993) mostraram que a atividade elétrica miometrial, mensurada 20 horas após o contato com bactérias, aumentou em éguas resistentes e susceptíveis, porém em éguas resistentes houve um maior aumento na frequência, intensidade e duração da atividade elétrica comparada com as susceptíveis.

Campbell & England (2006) relataram que quando o sêmen entra em contato com o útero, contrações miometriais do corpo e cornos uterinos o transportam para o oviduto. Em aproximadamente quatro horas, parte dos espermatozoides chegam ao oviduto, enquanto que a maioria deles será eliminada do ambiente uterino. Porém, em éguas susceptíveis, as quais apresentam uma diminuição da contratilidade uterina, há um maior acúmulo de líquido no útero proporcionando assim um meio de cultura para agentes oportunistas, agravando assim seu quadro patológico (LEBLANC, 2003). Essas éguas apresentam um retardo de aproximadamente duas horas para iniciar a resposta contrátil à presença de espermatozoides e bactérias em relação ao observado em éguas saudias.

Estudos *in vitro* indicaram que a direção das contrações das fibras musculares difere entre as duas categorias de éguas. Nas éguas saudias, a

contração ocorre a partir da ponta do corno uterino em direção à cérvix, enquanto que nos animais susceptíveis a contração não apresenta padrão rítmico e o útero tende a se contrair em direção à ponta do corno uterino, ou seja, no sentido oposto da eliminação do conteúdo pelo órgão (REITZENSTEIN et al., 2002). Assim, a atividade mioelétrica é alterada nestas éguas, o que pode ser a causa primária da EPPC nestes animais (TROEDSSON, 1999).

A revisão de Maischberger et al. (2008), mostra que a falha no *clearance* de bactérias, fluido e debris pós-cobertura pode ser causada por diferentes fatores, que são: diminuição da frequência, intensidade e duração da atividade miometrial devido possivelmente a mudanças na liberação, sistêmica ou local, de prostaglandina e ocitocina (RIGBY et al., 2001), mudanças vasculares do endométrio, alterações de respostas hormonais e alteração na produção de muco. Outros fatores em éguas múltiparas incluem alterações degenerativas que ocorrem no útero de éguas devido à idade e número de partos, como interações neuromusculares alteradas, ou falha na drenagem linfática devido a uma dilatação parcial do útero ou deslocamento caudo-ventral deste (LEBLANC, 2003).

Alghamdi et al. (2005) investigaram a produção de óxido nítrico, responsável pela lise de bactérias no interior do neutrófilo (MACKAY, 2000). Neste experimento, as éguas susceptíveis apresentaram um elevado acúmulo de óxido nítrico no lúmen uterino 13 horas após IA (ALGHAMDI et al., 2005). Esta substância está relacionada ao relaxamento do músculo liso, e os autores propuseram este efeito como uma possível explicação para a baixa atividade miometrial que as éguas susceptíveis apresentam no período da inflamação.

2.4 Terapia aplicada à endometrite persistente pós-cobertura

O tratamento da endometrite na égua é focado primariamente em minimizar os fatores predisponentes do processo inflamatório, reduzindo o número de espermatozoides totais que adentrarão o trato reprodutivo da fêmea, bem como diminuir o número de inseminações por ciclo, reduzindo assim a resposta inflamatória. Também é fundamentado em estudos prévios

que investigaram a resposta inflamatória pós cobertura e a contratilidade uterina (BRINSKO et al., 1990; KATILA, 1995).

2.4.1 Lavagem uterina

Tendo em vista que o transporte espermático para o oviduto se completa no período de 4 horas após a introdução do sêmen no corpo do útero, o lavado uterino pode ser realizado após este período, evitando assim a interferência com o transporte espermático e consequente queda na taxa de fertilidade.

A lavagem uterina pode ser realizada com ringer lactato ou solução salina aquecidos. Este procedimento é comumente realizado em éguas repetidoras de cio e naquelas que apresentam mais de 2 centímetros de fluido intrauterino após a cobertura (BRINSKO et al., 2003).

Se o fluido acumulado é hipoecóico e menor do que 2 centímetros quando examinado no exame ultrassonográfico, ou se há pouco ou nenhum edema após a ovulação, um tratamento apenas com ocitocina ou cloprostenol, um análogo da prostaglandina, pode ser realizado. Éguas com fluido uterino antes da cobertura podem ser lavadas com solução de ringer com lactato 1 hora antes da inseminação sem causar qualquer subsequente decréscimo nas taxas de prenhez. A remoção do fluido é desejável porque esta secreção intrauterina pode conter debris inflamatórios, especialmente se a égua requer repetidas inseminações com sêmen refrigerado ou congelado. O fluido afeta negativamente a motilidade espermática e a fertilidade (VANDERWALL & WOODS, 2003). Alguns veterinários recomendam repetir a lavagem uterina (mais de 3 litros) até o fluido recuperado aparecer claro. A ocitocina ou cloprostenol podem ser administrados imediatamente após a última lavagem uterina para ajudar na remoção de toda a quantidade de líquido.

2.4.2 Drogas ecbólicas

As drogas ecbólicas estimulam a contração uterina e ajudam a promover uma drenagem no útero em animais que apresentam dificuldade de realizar o *clearance* uterino. A ocitocina se mostrou uma droga eficaz

em promover tais efeitos em éguas que apresentam esta deficiência (ALLEN, 1991). Esta droga induz contrações uterinas de grande amplitude por aproximadamente 30 minutos durante o estro e no período de 48 horas após a ovulação (LEBLANC et al., 1994). Os receptores de ocitocina no miométrio e no oviduto das éguas, ovelhas e vacas estão presentes em maior número durante o fim do diestro e no estro (RIGBY et al., 1999) e, portanto, o seu efeito diminui após a ovulação, pois seu número de receptores varia conforme a fase do ciclo estral, sendo maior na fase estrogênica e menor na fase pós ovulatória. A droga atua no útero da égua para estimular a contração uterina, agindo diretamente em tais receptores e liberando a $PGF2\alpha$ do endométrio (CADARIO et al., 1999).

A maioria das éguas responde rapidamente, expelindo o fluido quase imediatamente. As doses recomendadas variam entre 10 e 25 UI, administradas via intramuscular ou intravenosa (KNUTTI et al., 2000). No período pós ovulatório a maior dose (25 UI) deve ser administrada. (VERONESI, 2006).

A completa limpeza uterina ocorre em 24 horas após o tratamento com ocitocina, o que confirma a eficácia dos hormônios ecbólicos exógenos no útero. (CADARIO et al., 1999).

Porém, esta droga parece não ser efetiva em todas as éguas que acumulam fluido uterino. Alguns fatores que podem afetar a resposta uterina são: número inadequado de receptores endometriais, um útero penduloso, cérvix fechada, dose excessiva que resulta em contrações inapropriadas, propagação anormal das contrações uterinas ou inflamação prolongada (VON REITZENSTEIN et al., 2002).

Se o clínico suspeita que a ocitocina não estimulou a drenagem apropriadamente, pode ser útil a utilização do cloprostenol, mas não há investigações detalhadas dos padrões de propagação uterina após a sua administração. O efeito da PG na contratilidade uterina tem sido investigado porque a ocitocina estimula a liberação de PG, e as contrações uterinas associadas à administração de ocitocina têm uma meia-vida relativamente curta. Dos três análogos da PG avaliados ($PGF2\alpha$, cloprostenol e fenprostalene), o cloprostenol produziu a resposta uterina mais consistente (COMBS et al., 1996). A contração uterina é mais fraca, mas

significativamente mais prolongada após administração de cloprostenol do que de ocitocina (4 horas vs. 30 minutos). Por esta razão, seu uso tem sido defendido para éguas com estase linfática, já que a drenagem linfática conta com a ajuda da contração uterina (TROEDSSON et al., 2001).

Quando esta droga é utilizada antes da ovulação, não se observa efeito sobre a formação do corpo lúteo ou na produção de progesterona. Porém, se administrada após a ovulação, a PGF2 α é capaz de interferir na formação luteal, levando, conseqüentemente, à redução na produção de progesterona e conseqüente redução da taxa de prenhez (LEBLANC, 2003).

2.4.3 Promoção da Drenagem Cervical

Em éguas que apresentam uma cérvix que falha ao se dilatar, as drogas ecbólicas podem ser ineficazes na expulsão do fluido uterino. Portanto, a cérvix pode ser manualmente dilatada para auxiliar na expulsão do fluido. Também o Misoprostol, um análogo sintético da Prostaglandina E1 (PGE1), pode causar o seu relaxamento quando aplicado topicamente no epitélio cervical 2 a 4 horas antes da cobertura (LEBLANC & CAUSEY, 2009).

2.4.4 Anti-inflamatórios não esteróides sistêmicos

Os anti-inflamatórios não esteróides mostraram-se menos eficazes na minimização da reação inflamatória uterina após a IA. No estudo realizado por LeBlanc (1997), no qual foi utilizada a fenilbutazona no tratamento da EPPC, foi notado um atraso na limpeza uterina dos animais tratados, pois esta classe de drogas atua inibindo a ação da enzima ciclooxigenase, bloqueando a síntese de prostaglandinas (principalmente PGF2 α), a qual, por sua vez, auxilia no processo de depuração uterina das éguas.

2.4.5 Imunomoduladores

Recentemente foram desenvolvidos tratamentos que parecem modular ou até mesmo suprimir a resposta imune como um meio de reduzir a

inflamação uterina pós-cobertura (LEBLANC & CAUSEY, 2009).

Há evidências de que o uso criterioso de anti-inflamatórios esteróides ou imunomoduladores pode aumentar os índices de prenhez em éguas com acúmulo de fluido ou inflamação uterina (FUMUSO et al., 2003; BUCCA et al., 2008; PAPA et al., 2008).

Dell'aqua Jr. et al. (2006) obtiveram taxas de prenhez satisfatórias com o uso de corticóides no período peri-ovulatório. Éguas resistentes e susceptíveis, baseando-se no histórico de acúmulo de fluido uterino, foram submetidas a tratamentos com acetato de prednisolona a cada 12 horas, iniciando 2 dias antes e continuou-se 1 dia após ovulação. Os dois grupos foram inseminados com sêmen congelado em dois ciclos, o primeiro sem tratamento e o segundo com o uso de corticóide. Nas éguas sadias não se observou diferenças na taxa de prenhez de éguas tratadas e não tratadas, enquanto que nas éguas susceptíveis taxa de prenhez superior foi obtida nas éguas tratadas (67%) comparadas as controle (5%). Além disso, no grupo tratado, houve redução no volume do fluido uterino e notou-se um aspecto mais límpido deste. A melhora da taxa de prenhez e do aspecto da secreção uterina pode ser explicada pela modulação de várias citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-3, IL-5 e IL-8 causada pelos corticóides, o que leva à redução da inflamação (MALSCHITZKY et al., 2007).

Fioratti (2010) mensurou o efeito da dexametasona sobre a fertilidade de éguas resistentes e susceptíveis à EPPC e obteve resultados positivos para éguas susceptíveis, pois o tratamento com dexametasona local aumentou em 40% a taxa de recuperação embrionária, e o tratamento sistêmico duplicou o número de embriões recuperados por ciclo em comparação ao grupo controle.

Uma única aplicação de dexametasona administrada no momento da cobertura (50 miligramas intravenoso) combinado com terapias rotineiras realizadas após a cobertura (lavagem uterina, drogas ecbólicas, e em alguns casos, antibióticos intrauterinos) resultou em aumento das taxas de prenhez em éguas com histórico de acúmulo de fluido após ovulação e em éguas com incompetência cervical (BUCCA et al., 2008). Porém, os animais submetidos a tratamentos com corticóides devem ser escolhidos

cuidadosamente, pois o uso equivocado destes medicamentos em éguas com endometrite bacteriana pode exacerbar a infecção (LEBLANC e CAUSEY, 2009).

Estudos recentes têm demonstrado que outros imunomoduladores podem melhorar os índices de prenhez, embora os mecanismos de ação ainda estejam um pouco obscuros. A imunomodulação pode ajudar a restabelecer a homeostase dos mecanismos inflamatórios locais reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, consequentemente auxiliando na profilaxia da EPPC ou endometrite crônica infecciosa em éguas velhas (LEBLANC e CAUSEY, 2009).

Fumuso et al. (2003) avaliaram a expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias em éguas resistentes à EPPC, susceptíveis e tratadas com imunomodulador feito através do extrato de parede de micobactéria e foram observadas mudanças nos perfis de expressão da transcrição do mRNA. As éguas tratadas apresentaram reversão nos padrões de expressão do mRNA a níveis basais. Foi notado também que nas éguas que receberam o tratamento após IA houve modulação da inflamação pela significativa redução na expressão da IL-1 β .

Em outra análise, Fumuso et al. (2007) também avaliaram a expressão de mRNA das citocinas IL-8, IL-10, entre outras. No ciclo controle, durante o estro, foi notado que houve menor expressão de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, em éguas susceptíveis do que em resistentes, o que pode ter contribuído para a manutenção do estado inflamatório. No segundo ciclo, durante o estro, no qual houve o estímulo do sêmen sobre a resposta inflamatória, notou-se que os animais susceptíveis apresentaram maiores níveis de IL-8 e menores de IL-10 do que as resistentes. No diestro notaram-se, nos animais susceptíveis, altos níveis de todos os parâmetros inflamatórios que continuaram elevados até 7-8 dias após ovulação. No grupo tratado com imunomodulador, a expressão endometrial de IL-8 24 horas após IA foi reduzida em éguas susceptíveis a níveis similares àqueles encontrados em éguas resistentes.

Os autores concluíram que o tratamento de éguas susceptíveis com imunomoduladores pode auxiliar no restabelecimento da homeostase dos

mecanismos imunes uterinos, por meio da regulação das citocinas pró e anti-inflamatórias.

2.5 Plaquetas e fatores de crescimento

As plaquetas são corpúsculos anucleados, em forma de disco, e apresentam aproximadamente 2 a 4 μm de diâmetro. Os megacariócitos, células gigantes e poliplóides da medula óssea, são seus precursores e estão localizados abaixo dos capilares sinusóides da medula e emitem prolongamentos citoplasmáticos, os quais ficam em contato com o sangue. Tais prolongamentos são seccionados e as plaquetas são então liberadas para a corrente sanguínea (HARTWIG & ITALIANO, 2003). Estas apresentam importante função no processo de coagulação do sangue (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A estrutura das plaquetas consiste em microtúbulos, microfilamentos de actina e miosina, lisossomo, glicogênio, α -grânulos e grânulos densos e lisossomais. Os grânulos lisossomais possuem hidrolases, guaninas, fosfolipases e quinases, os quais agem como enzimas proteolíticas e hidrolíticas (WEIBRICH et al., 2005). Os grânulos densos possuem adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina e cálcio. Os α -grânulos contêm diversas moléculas, como fatores de coagulação e de crescimento, além de outras proteínas como albumina e proteoglicanos (ZUCKER-FRANKLIN et al., 1988). Estas moléculas são importantes para todas as funções plaquetárias, como formação de coágulos, modulação da inflamação e síntese de matriz extracelular, no caso da reparação de tecidos (GENTRY et al., 2000).

As plaquetas encontram-se no seu estado inativo (EVERTS et al., 2006). Para a ativação destas, podem ser utilizados tanto agentes fisiológicos, como trombina, tromboxano, serotonina, epinefrina, como também agentes farmacológicos (cloreto de cálcio, ionóforo de cálcio, dentre outros) (CARMONA et al., 2006). A membrana plasmática das plaquetas é composta por diversos receptores. Desta maneira, acredita-se que tais agentes desencadeiam a ativação plaquetária através da ligação com receptores. Consequentemente, após esta estimulação, os α -grânulos liberam suas

moléculas por exocitose no local da lesão para iniciar o recrutamento de outras plaquetas, leucócitos e proteínas plasmáticas. (HARRISON e CRAMER, 1993). Quando ativadas, as plaquetas mudam seu formato, secretam seus grânulos, formam um tipo de “tampão” hemostático e realizam a retração do coágulo (GENTRY et al., 2000).

Além da função de coagulação, as plaquetas também liberam substâncias que promovem reparação tecidual e influenciam na reativação da vascularização e de células que promovem a angiogênese e a inflamação (ANITUA et al., 2004). Elas contêm fatores de crescimento como fator de crescimento beta transformante (TGF- β), fibrinogênio, fator de crescimento derivado da plaqueta (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), tromboplastina plaquetária, cálcio, entre outros (HARRISON & CRAMER, 1993). Estes fatores são peptídeos sinalizadores que regulam o metabolismo celular pela interação com um organizado complexo de receptores que se encontram na membrana celular, pelas vias de sinalização intracelular e também pelo aumento da transcrição de fatores e produção de proteínas que resultam na proliferação e diferenciação celular, como também no aumento da produção da matriz extracelular (DAHLGREN et al., 2001). Tais peptídeos liberados na matriz extracelular ligam-se ao receptor tirosina-quinase, presente nas células teciduais, e então o mRNA é transcrito após os genes que controlam a divisão celular serem acionados, e assim inicia-se a cascata que promove a reparação e regeneração tecidual (DINATO et al., 2001).

Os fatores de crescimento (Tabela 1) são essenciais na regulação dos eventos celulares envolvidos no processo de cicatrização por permitirem a quimiotaxia para o local da lesão (Declair, 1999).

TABELA 1. Moléculas bioativas encontradas nos α -grânulos das plaquetas*

Atividades gerais Categorias	Moléculas específicas	Atividades biológicas
Fatores de crescimento	TGF- β	Promoção da síntese da matriz
	PDGF	Quimiotaxia, proliferação celular
	IGF-I, II	Proliferação celular, maturação, síntese da matriz
	FGF	Angiogênese, proliferação dos fibroblastos
	EGF	Proliferação celular
	VEGF	angiogênese

	ECGF	Proliferação das células endoteliais, angiogênese
Proteínas aderentes	Fibrinogênio	Cascata da coagulação sanguínea (formação de coágulo de fibrina)
	Fibronectina	Se liga às integrinas da superfície celular, afetando a adesão celular, crescimento celular, migração e diferenciação
	Vitronectina	Adesão celular, quimiotaxia
	Trombospondina- 1	Inibição da angiogênese
Fatores de coagulação	Fator V, XI, proteína S, antitrombina	Todos tem papel na ativação da trombina e eventual formação do coágulo de fibrina.
Fatores fibrinolíticos	Plasminogênio	Produção de plasmina (leva a fibrinólise)
	Plasminogênio ativador e inibidor	Regulação da produção de plasmina
	α -2 antiplasmina	Inativação da plasmina
Proteases e antiproteases	TIMP-4	Regulação da degradação da matriz
	Metaloprotease-4	Degradação da matriz
	α - 1 antitripsina	Inibe grande variedade de proteases e enzimas
Proteínas básicas	Fator plaquetário 4	Inibição da angiogênese
	β – tromboglobulina	Ativação plaquetária, inibição da angiogênese
	endostatinas	Inibidoras da migração das células endoteliais e da angiogênese
Glicoproteínas das Membranas	CCD40 ligante	Inflamação, síntese das interleucinas e produção das integrinas; adesão plaquetária nas células endoteliais, sinalizador celular, modulação da molécula de adesão plaquetária (PECAM-1) nos leucócitos.
	P-selectina	Molécula de adesão das células vasculares, auxilia na ligação e recrutamento dos leucócitos para o tecido inflamado.

*TGF, fator de crescimento transformante; PDGF, fator de crescimento derivado da plaqueta; IGF, fator de crescimento semelhante à insulina; FGF, fator de crescimento fibroblástico; EGF, fator de crescimento epidermal; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial; ECGF, fator de crescimento celular endotelial; TIMP-4, tecido inibidor da metaloprotease-4. Fonte: FOSTER et al. (2009).

2.5.1 Plasma Rico em Plaquetas

O plasma rico em plaquetas (PRP) vem sendo muito utilizado na Odontologia, em cirurgias ortopédicas, reparação de músculos e tendões, reversão de úlceras na pele, entre outros. O PRP é uma fonte autógena de fácil aquisição e baixo custo, que contém diversos fatores de crescimento

importantes na reparação tecidual, devido à sua ação mitogênica, quimiotática e neovascular. É derivado do sangue total e deve conter entre três e cinco vezes mais plaquetas do que os níveis fisiológicos (GONSHOR, 2002; KEVY & JACOBSON, 2004).

Inicialmente o PRP era obtido através de máquinas de plasmaférese e utilizava-se a trombina bovina para sua ativação. Porém, com o intuito de facilitar sua obtenção e reduzir os custos, surgiram equipamentos automatizados e diversos protocolos, inclusive alterando-se os produtos utilizados para sua ativação. Ainda assim, o uso de “kits”, que tornam simples a obtenção do PRP, manteve seu custo elevado e, por isso, diversos protocolos utilizando centrífugas comuns vêm sendo usados. No estudo de Vendruscolo et al. (2012), no qual foram testados diversos protocolos de obtenção de PRP disponíveis na literatura, os autores concluíram que o protocolo de Carmona et al. (2007) foi o mais eficiente em concentrar plaquetas de equinos.

Os autores observaram que os protocolos com força de centrifugação relativa alta não obtiveram altas concentrações plaquetárias, provavelmente por ativar ou lesar as plaquetas durante a centrifugação, levando à formação de *pellets* no fundo do tubo que não se desfaziam facilmente, diminuindo a quantidade de leucócitos presentes no PRP. Nos protocolos com menor força esta condição não ocorreu, uma vez que os leucócitos e plaquetas contidos no fundo do tubo se soltaram mais facilmente.

As lipoxinas, moléculas lipídicas oriundas do ácido aracdônico, são moduladoras do processo inflamatório, pois exercem diminuição na quimioatração dos neutrófilos para o local lesado, além de promover a sua apoptose. Além disso, apresentam quimiotaxia para os monócitos que posteriormente se tornarão macrófagos nos tecidos, a fim de se realizar posterior cicatrização e resolução da inflamação (BANNENBERG et al., 2005). Uma das principais rotas para a biossíntese da Lipoxina A₄ (LXA₄) é a interação dos neutrófilos com as plaquetas nos vasos sanguíneos. As interações entre as células promovem a hidroxilação do 12-HETE das plaquetas pela 5- lipoxigenase das células mieloides para produzir as lipoxinas (FIORI et al., 1995), o que sugere que as plaquetas podem estar envolvidas com a resolução da inflamação. El-Sharkawy et al. (2007) demonstraram que além do PRP aumentar a distribuição dos fatores de crescimento para a área

lesionada, ainda há aumento local do nível de LXA₄ e de RANTES, quimiocinas secretadas por macrófagos, células endoteliais, dentre outras, que também tem a função de manter o gradiente quimiotático para migração dos leucócitos da circulação para os tecidos. Além disso, os RANTES podem inibir a liberação de histamina pelos basófilos (ALAM et al., 1992), levando à inibição do processo inflamatório. Desta maneira, tal estudo mostrou que os níveis de LXA₄ e RANTES derivados das plaquetas foram elevados, o que auxilia na promoção da resolução da inflamação.

Em estudo realizado por Woodall et al. (2008), foi analisada a atuação das plaquetas na liberação da IL-1 pelos macrófagos. Foi notado que as plaquetas causam uma supressão inicial da IL-1 liberada por macrófagos ativados. Posteriormente, a IL-1 liberada foi aumentando durante os 7 dias seguintes, indicando que o PRP pode ser usado como um agente anti-inflamatório transitório que inicialmente suprime a inflamação e depois estimula uma resposta de restabelecimento tardio.

Diante do exposto, o uso do PRP como modulador da reação inflamatória e como reparador de lesões no tecido uterino pode vir a ser uma terapia promissora para a resolução da EPPC.

Objetivos

3 OBJETIVOS

- Verificar o estímulo do sêmen na resposta inflamatória uterina de éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente 24 horas após a inseminação artificial.
- Determinar se o tratamento com plasma rico em plaquetas interfere na resposta inflamatória de éguas resistentes e susceptíveis a endometrite após a inseminação artificial.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Experimento 1

4.1.1 Seleção dos animais e local da pesquisa

Foram utilizadas 23 éguas, sem raça definida, com peso médio entre 300 e 400 kg e idade entre 5 e 18 anos. Os animais pertenciam à FMVZ – UNESP Botucatu, e estavam situados no Posto de Monta desta instituição, latitude 22°53'09", altura 804 metros. Todos os animais apresentavam ótimo estado de condição corporal e foram alimentados diariamente com ração e feno e receberam sal mineral e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em duas categorias: 15 éguas susceptíveis, com idade maior que 10 anos, sendo duas éguas com 6 anos, apresentando histórico de acúmulo de fluido intra-uterino após a IA por mais de 24 horas, determinado por ultrassonografia e baixa taxa de recuperação embrionária (<30%), e 8 éguas resistentes, com idade inferior a 10 anos sem qualquer tipo de alteração no aparelho reprodutivo, que não apresentavam histórico de acúmulo de líquido ou queda na taxa de fertilidade. Com o intuito de melhor selecionar os grupos experimentais de éguas resistentes e susceptíveis, foi realizada uma inseminação artificial e assim verificada a resposta inflamatória nestes animais para posterior tratamento com plasma rico em plaquetas.

4.1.2 Colheita de sêmen e preparo das doses inseminantes

A colheita de sêmen foi realizada com o auxílio da vagina artificial modelo Botucatu. Imediatamente após a obtenção do sêmen foi retirada a fração gel através de filtração e o sêmen foi diluído com produto comercial a base de leite desnatado Botu-semen[®] (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil) na proporção de 1:1 (o mesmo produto foi utilizado para todas as amostras de sêmen utilizadas). Após a diluição, a motilidade dos espermatozoides foi mensurada através de análise computadorizada (Hamilton Thorne Research, Danvers, USA) e a concentração mensurada através da câmara de Neubauer. Após

esses procedimentos, foram separadas doses contendo 800×10^6 de espermatozóides totais.

4.1.3 Inseminações artificiais

As éguas resistentes e as susceptíveis foram inseminadas em ciclos estrais consecutivos com o mesmo garanhão, utilizando-se sêmen fresco com uma dose de 800 milhões de espermatozóides totais. Este primeiro ciclo não sofreu nenhuma interferência medicamentosa.

Ao se detectar um folículo de 35 mm e edema uterino compatível, as éguas foram induzidas à ovulação com 1 mg de acetato de deslorelina intramuscular. Cada animal foi inseminado uma vez por ciclo. Nos ciclos em que a ovulação não ocorreu dentro do período desejado, as colheitas foram descartadas e o ciclo estral, desconsiderado.

4.1.4 Colheita e processamento do material uterino

Foram realizadas citologias exfoliativas uterinas 24 horas antes da IA e 24 horas após a IA. As coletas foram feitas com o auxílio de um aparelho para coleta de citologia uterina equina, cuja função é proteger a escova ginecológica do contato com o ambiente vaginal e cervical da fêmea, além de facilitar sua entrada no útero, como foi descrito por Alvarenga e Iwana de Matos (1990). Após a coleta, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e coradas pelo método Panótico Rápido. A leitura das amostras foi realizada por meio de microscopia óptica utilizando imersão (1000x), considerando a porcentagem de neutrófilos/100 células de forma aleatória.

Foram realizados exames ultrassonográficos 24 horas antes da IA e 24 horas após, a fim de se detectar a presença de fluido uterino acumulado na região de bifurcação dos cornos uterinos e mensuração do mesmo. Em tais momentos, foi realizada a coleta da secreção uterina através de um tampão de algodão (absorvente feminino modelo mini - OB® - Johnson & Johnson), utilizando um aplicador especialmente preparado de aço inox. Para facilitar a remoção do tampão, o mesmo teve seu puxador aumentado com fio cordonê grosso estéril. A retirada do tampão ocorreu após 30 minutos através da

introdução da mão enluvada via vaginal e tração do fio cordonê, mantendo-o protegido do contato com o canal vaginal da égua. Imediatamente após a retirada do tampão do interior do útero o mesmo foi colocado em uma seringa estéril, pressionando-se o êmbolo até a total liberação do líquido absorvido em um tubo estéril. A partir desta amostra foi separada uma alíquota para obtenção da concentração de neutrófilos/mL em câmara de Neubauer e microscopia óptica. Outra parte desta amostra foi submetida a um processo de centrifugação a 3000g por 10 minutos, conforme realizado por FIORATTI (2010) para retirada de células presentes, e as amostras foram congeladas imediatamente a temperatura de -20°C até o momento da realização das avaliações laboratoriais.

Em algumas éguas, não foi possível recuperar fluido uterino nos momentos antes da IA, desta maneira, tais animais não foram utilizados na mensuração da concentração de células PMNs e ON no fluido uterino.

4.1.5 Dosagem de Óxido Nítrico

Após o descongelamento das amostras de fluido uterino armazenadas dos momentos 24 horas antes e 24 horas após IA, as concentrações de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) foram determinadas pelo método da reação colorimétrica de Griess em espectrofotômetro (Multiskan EX primary EIA V 2.1-0) com absorbância de cor em 540 nm para estimar a concentração de Óxido Nítrico (ON) total.

Está bem estabelecido que o congelamento das amostras não altera a concentração de ON, portanto a primeira reação na amostra ocorre quando o nitrito forma o sal diazonium, que reage com o segundo reagente gerando-se a cor roxa, para a qual o pico de absorbância é de 540 nm. Com o objetivo de se reduzir o nitrato a nitrito, uma alíquota de 40 μL da amostra armazenada foi incubada em mistura contendo 1000 μL de nitrato reductase, 1000 μL do cofator NADPH (5 mg/mL) diluído em água deionizada e 1000 μL de PBS (0,5 M). As amostras foram incubadas em uma temperatura de 37°C por um intervalo de tempo de 14 a 16 horas numa placa de 96 poços. Após esta etapa, 80 μL do reagente de Griess foram adicionados à amostra. Todas as soluções foram completamente protegidas da luz durante o experimento. A curva padrão para

o nitrito foi diluída em PBS contendo concentrações variando entre 0,5 a 400 μM . Os valores de absorvância adquiridos nas concentrações pré estabelecidas foram usados para construir a curva de dispersão.

Dessa forma, foram realizadas as dosagens de nitrito, o metabólito de menor concentração, e de ON total, ou seja, nitrito e nitrato. As reações fazem com que todo nitrato seja reduzido a nitrito e por medições deste foi obtida a quantidade total de metabólitos (NO^{2-} e NO^{3-}).

4.2 Experimento 2

4.2.1 Seleção dos animais

Para o tratamento com PRP, foram utilizadas as mesmas éguas do experimento 1, sendo um ciclo controle e outro tratado. As éguas foram controle delas mesmas.

4.2.2 Colheita de sêmen e preparo das doses inseminantes

Os procedimentos para colheita de sêmen e preparo das doses inseminantes foram realizados conforme descritos no experimento 1.

4.2.3 Inseminações artificiais

As inseminações artificiais foram realizadas conforme foi descrito no experimento 1.

4.2.4 Obtenção do Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e infusão no útero

A obtenção do PRP foi realizada a partir do método descrito por CARMONA et al. (2007). Amostras de 100 mL de sangue de cada um dos animais foram colhidas através de punção da veia jugular externa, e acondicionadas em tubos contendo o anticoagulante citrato de sódio a 3,2%.

As amostras de sangue foram homogeneizadas e imediatamente centrifugadas a 120 g, durante 10 minutos. De cada tubo centrifugado foi

descartado 50% do plasma presente na superfície, com o intuito de se usar um plasma mais concentrado em plaquetas na segunda centrifugação. Para isso, o plasma obtido após a primeira centrifugação foi acondicionado em dois tubos plásticos sem anticoagulante, procedendo-se em seguida à centrifugação dos mesmos a 240 g por 10 minutos. Após a segunda centrifugação, o plasma foi dividido em duas frações: o sobrenadante (plasma pobre em plaquetas) e a fração remanescente denominada plasma rico em plaquetas. O plasma pobre foi descartado e o PRP, reservado. Os tubos com PRP foram acondicionados em caixa isotérmica Botuflex[®] (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil) com gelo em uma temperatura controlada entre 20-25°C, por um período de 1 hora até o momento da aplicação. A certificação da concentração de plaquetas no PRP foi realizada manualmente no Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ – Unesp, Botucatu/SP, logo após a segunda centrifugação.

A ativação das plaquetas para liberação dos grânulos plaquetários foi realizada com Cloreto de Cálcio a 10%, na proporção de 50µl para cada ml de PRP (ARGUELLES et al., 2006). A infusão de 20 mL de PRP no útero foi realizada 4 horas após a IA, com o auxílio de uma pipeta de inseminação introduzida no corpo uterino, com a mão enluvada e uso de lubrificante. As éguas foram higienizadas previamente.

Em alguns animais, não foi possível concentrar o número de plaquetas desejado, mesmo após várias tentativas. Sendo assim, tais animais foram retirados do experimento. A concentração plaquetária média utilizada foi de 257.000 plaquetas/µL.

4.2.5 Colheita e processamento do material uterino

Os procedimentos para colheita e processamento do material uterino foram realizados conforme descritos no experimento 1.

Em algumas éguas, não foi possível recuperar fluido uterino nos momentos antes da IA, desta maneira, tais animais não foram utilizados na mensuração da concentração de células PMNs e ON no fluido uterino.

4.2.6 Dosagem de Óxido Nítrico

Os procedimentos para dosagem de óxido nítrico foram realizados conforme descrito no experimento 1.

4.3 Análise Estatística

Para os valores da concentração de células polimorfonucleares e óxido nítrico no fluido uterino; porcentagem de neutrófilos na citologia uterina e acúmulo de fluido analisado através de exame ultrassonográfico, nos diferentes momentos e grupos de éguas foram realizados os cálculos das médias e desvio padrão, e os dados foram comparados por meio do teste T para os grupos com e sem tratamento com PRP, e T pareado para os momentos pré e pós IA, utilizando o Programa GraphPad InStat 3®. O nível de significância considerado foi de 5% e valores de p entre 5 e 10 % foram considerados tendência estatística (FISHER & BELLE, 1993).

Resultados

5 RESULTADOS

Experimento 1: Resposta inflamatória uterina após inseminação artificial em éguas resistentes e susceptíveis à endometrite.

Ao se comparar as duas categorias de éguas, no momento pré inseminação artificial, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) em todos os parâmetros avaliados (concentração de PMNs e ON no fluido uterino, porcentagem de PMNs na citologia exfoliativa uterina e acúmulo de fluido observados no exame ultrassonográfico) (Tabela 2 e figuras 1, 2, 3 e 4).

TABELA 2. Médias e desvio padrão do número de células polimorfonucleares no fluido uterino (PMNs; n resistentes=7; n susceptíveis =12); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT; n resistentes=8; n susceptíveis =15); quantidade de fluido uterino (FLU n resistentes=8; n susceptíveis =15) e concentração de ON no fluido uterino (ON; n resistentes=7; n susceptíveis =12) entre éguas susceptíveis e resistentes 24 horas antes da inseminação artificial.

PRÉ IA	RESISTENTES	SUSCEPTIVEIS
PMNs (células x 10^3 /ml)	237,86 ± 219,5 ^a	406,4 ± 416,6 ^a
CIT (%)	2,25 ± 1,6 ^a	6 ± 12,4 ^a
FLU (mm)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
ON (μ M)	506,99 ± 332,03 ^a	489,37 ± 364,09 ^a

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

Após a IA, a concentração de PMNs no fluido uterino, porcentagem de PMNs na citologia exfoliativa uterina e acúmulo de fluido observados no exame ultrassonográfico foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) entre as duas categorias de éguas, apresentando valores maiores para as éguas susceptíveis. A concentração de ON não variou entre as duas categorias de animais ($p > 0,05$) após a IA (Tabela 3 e Figuras 1, 2, 3 e 4).

TABELA 3. Médias e desvio padrão do número de células polimorfonucleares no fluido uterino (PMNs; n resistentes=7; n susceptíveis =12); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT; n resistentes=8; n susceptíveis =15), quantidade de fluido uterino (FLU; n resistentes=8; n susceptíveis =15) e concentração de óxido nítrico no fluido uterino (ON; n resistentes=7; n susceptíveis =12) entre éguas susceptíveis e resistentes 24 horas após a inseminação artificial.

PÓS IA	RESISTENTES	SUSCEPTIVEIS
PMNs (células x 10^3 /ml)	611,43 ± 324,8 ^a	3536,25 ± 3626,6 ^b
CIT (%)	26,63 ± 10,7 ^a	69,93 ± 12,5 ^b
FLU (mm)	0,25 ± 0,7 ^a	11,07 ± 6,6 ^b
ON (μ M)	310,15 ± 396,9 ^a	405,27 ± 446,3 ^a

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

Comparando-se os momentos pré e pós inseminação artificial na categoria de éguas resistentes, foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de PMNs no fluido uterino e na porcentagem de PMNs na citologia exfoliativa uterina, enquanto que a quantidade de fluido uterino mensurada na ultrassonografia e a concentração de ON no fluido uterino não apresentaram diferença estatística entre os momentos ($p > 0,05$) (Tabela 4 e figuras 1,2, 3 e 4).

TABELA 4. Médias e desvio padrão das células polimorfonucleares no fluido uterino (PMNs; n=7); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT; n=8), quantidade de fluido uterino (FLU; n=8) e concentração de ON no fluido uterino (ON; n =7) nas éguas resistentes 24 horas antes e 24 horas após a inseminação artificial.

RESISTENTES	Pré IA	Pós IA
PMNs (células x 10^3 /ml)	237,86 ± 219,5 ^a	611,43 ± 324,8 ^b
CIT (%)	2,25 ± 1,6 ^a	26,63 ± 10,7 ^b
FLU (mm)	0 ± 0 ^a	0,25 ± 0,7 ^a
ON (µM)	506,99 ± 332,0 ^a	310,15 ± 396,9 ^a

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

Já nos animais susceptíveis, todos os parâmetros aumentaram e diferiram significativamente após a inseminação artificial ($p < 0,05$), com exceção da concentração de ON, que não variou entre os dois momentos ($p > 0,05$) (Tabela 5 e figuras 1,2, 3 e 4).

TABELA 5. Médias e desvio padrão das células polimorfonucleares no fluido uterino (PMN's n=12); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT; n=15), quantidade de fluido uterino (FLU; n=15) e concentração de óxido nítrico (ON; n=12) nas éguas susceptíveis 24 horas antes e 24 horas após a inseminação artificial.

SUSCEPTÍVEIS	Pré IA	Pós IA
PMNs (células x 10^3 /ml)	406,42 ± 416,6 ^a	3536,2 ± 3626,6 ^b
CIT (%)	6,0 ± 12,4 ^a	69,93 ± 12,5 ^b
FLU (mm)	0 ± 0 ^a	11,07 ± 6,6 ^b
ON (µM)	489,37 ± 364,1 ^a	405,27 ± 446,3 ^a

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

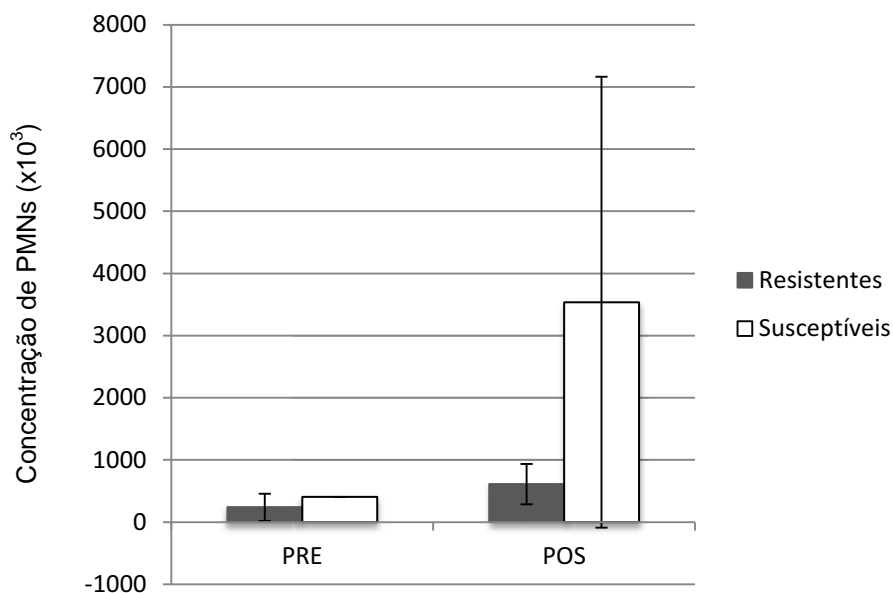


FIGURA 1. Médias e desvio padrão da concentração ($\times 10^3/\text{mL}$) de células polimorfonucleares no fluido uterino (PMNs) nos momentos 24 horas pré (PRE) e 24 horas após (POS) inseminação artificial, nas éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à endometrite persistente.

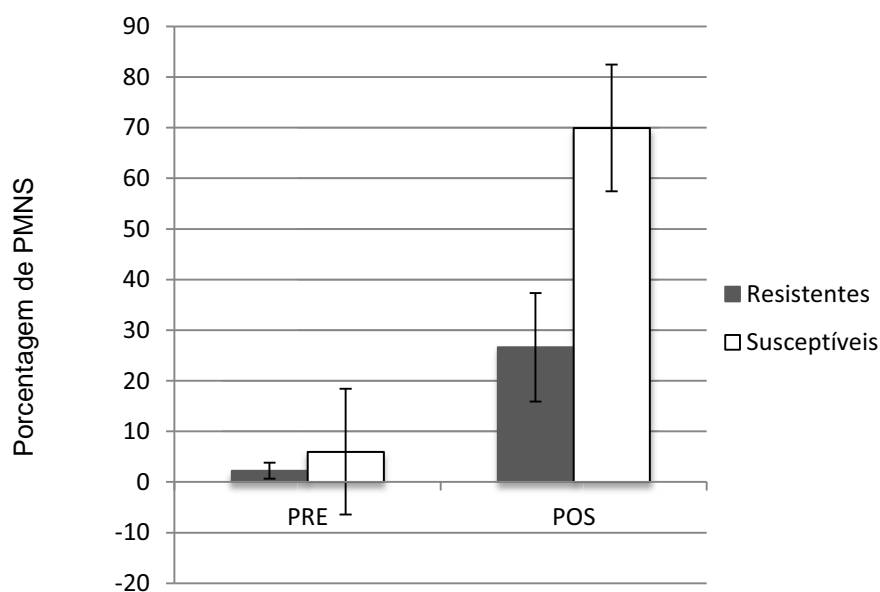


FIGURA 2. Médias e desvio padrão da porcentagem de células polimorfonucleares na citologia uterina nos momentos 24 horas pré (PRÉ) e 24 horas após (PÓS) inseminação artificial, nas éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à endometrite persistente.

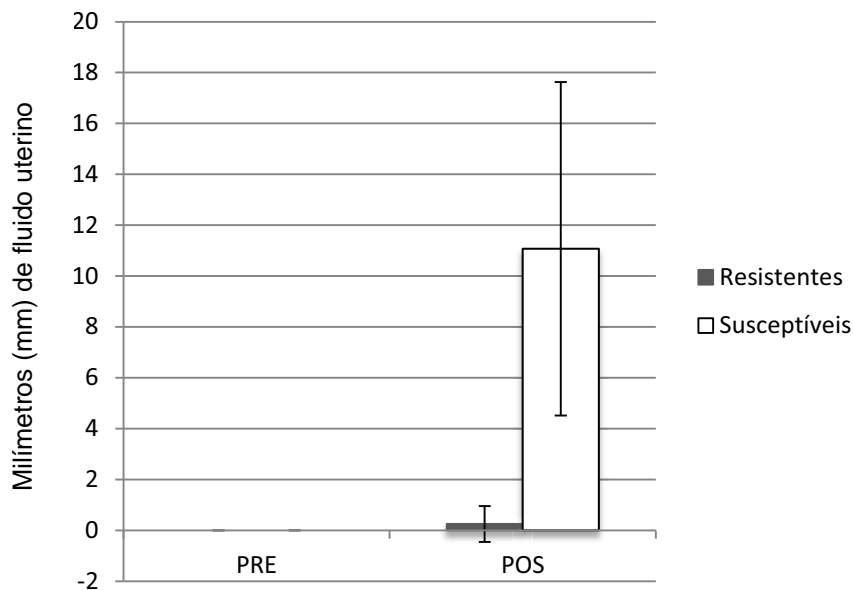


FIGURA 3. Médias e desvio padrão da quantidade de fluido uterino avaliada na ultrassonografia (mm), nos momentos 24 horas pré (PRÉ) e 24 horas após (PÓS) inseminação artificial, nas éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à endometrite persistente.

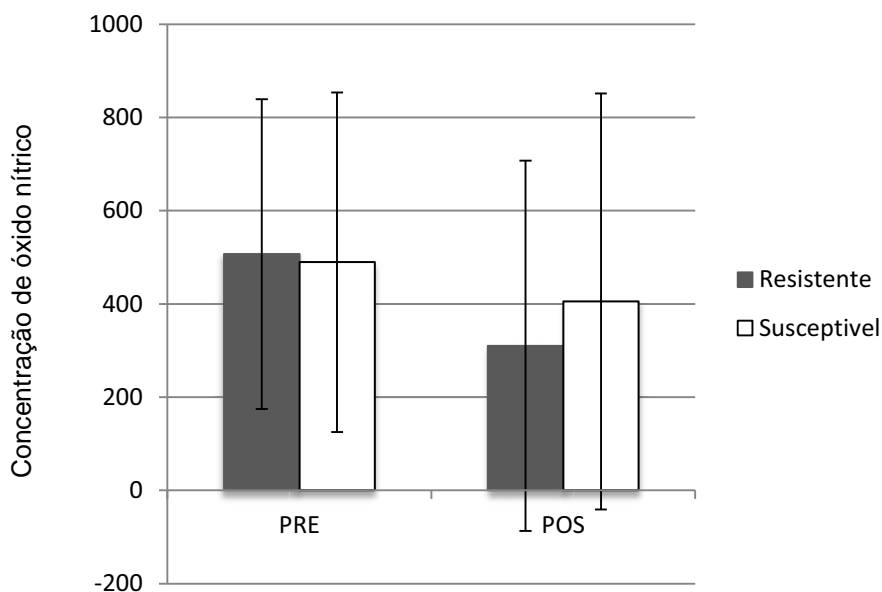


FIGURA 4. Médias e desvio padrão da concentração de óxido nítrico mensurado no fluido uterino nos momentos 24 horas pré (PRÉ) e 24 horas após (PÓS) inseminação artificial, nas éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à endometrite persistente.

Experimento 2: Efeito do tratamento com plasma rico em plaquetas na resposta inflamatória uterina de éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente.

Na comparação entre os momentos pré e pós inseminação artificial na categoria de éguas resistentes, a porcentagem de PMNs na citologia exfoliativa uterina aumentou significativamente após a IA ($p < 0,05$), enquanto que não foi observada alteração significativa ($p > 0,05$) na concentração de PMNs no fluido uterino, na quantidade de fluido uterino mensurada através de exame ultrassonográfico e na concentração de ON no fluido uterino (Tabela 6 e figuras 5, 6, 7 e 8).

TABELA 6. Médias e desvio padrão da concentração das células polimorfonucleares no fluido uterino (PMNs; $n=4$); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT; $n=8$), quantidade de fluido uterino (FLU, $n=8$) e concentração de óxido nítrico (ON; $n=4$) nas éguas resistentes 24 horas antes (Tratamento pré IA) e 24 horas após a inseminação artificial e tratamento com plasma rico em plaquetas (Tratamento pós IA).

RESISTENTES	Tratamento pré IA	Tratamento pós IA
PMNs (células x 10^3 /ml)	785,0 ± 687,6 ^a	705,0 ± 311,4 ^a
CIT (%)	5,25 ± 3,9 ^a	14,38 ± 10,8 ^b
FLU (mm)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
ON (µM)	394,20 ± 250,8 ^a	292,05 ± 297,6 ^a

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

Nos animais susceptíveis, todos os parâmetros aumentaram e apresentaram diferença estatística após a inseminação artificial ($p < 0,05$), com exceção da concentração de ON, que não diferiu estatisticamente entre os dois momentos ($p > 0,05$). A concentração de PMNs no fluido uterino apresentou uma tendência estatística em aumentar após a inseminação artificial e tratamento com PRP ($0,05 < p < 0,1$) (Tabela 7 e figuras 5, 6, 7 e 8).

TABELA 7. Médias e desvio padrão das células polimorfonucleares no fluido uterino (PMNs; $n=11$); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT; $n=15$), quantidade de fluido uterino (FLU; $n=15$) e concentração de óxido nítrico (ON; $n=11$) nas éguas susceptíveis 24 horas antes (Tratamento pré IA) e 24 horas após a inseminação artificial e tratamento com plasma rico em plaquetas (Tratamento pós IA).

SUSCEPTÍVEIS	Tratamento pré IA	Tratamento pós IA
PMNs (células x 10^3 /ml)	708,64 ± 741,3 ^a	2929,09 ± 4827,1 ^b
CIT (%)	7,93 ± 9,6 ^a	28,5 ± 23,1 ^b
FLU (mm)	0 ± 0 ^a	5,73 ± 4,5 ^b
ON (µM)	392,14 ± 435,93 ^a	272,79 ± 279,06 ^a

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

*Na mesma linha indicam tendência ($0,05 < p < 0,1$)

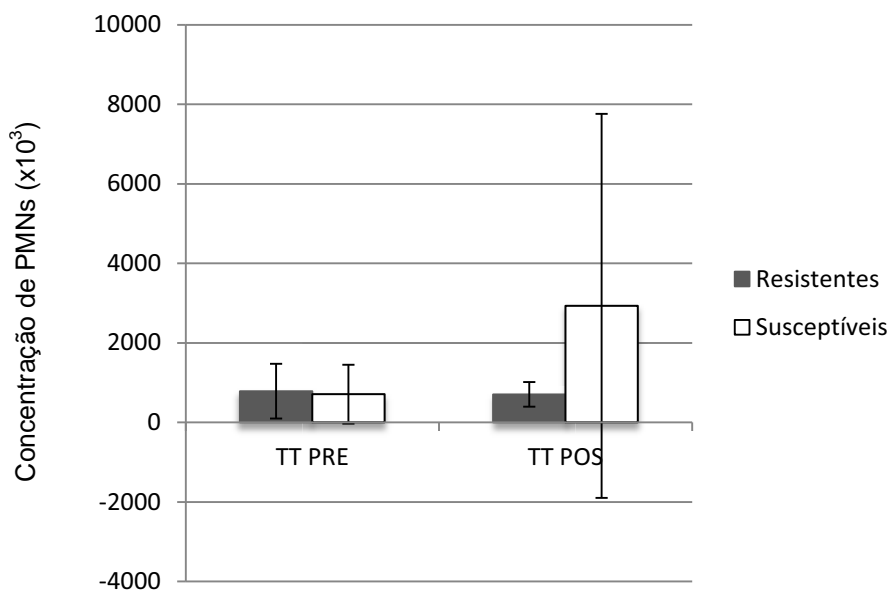


FIGURA 5. Médias e desvio padrão da concentração ($\times 10^3/\text{mL}$) de células PMNs recuperadas do fluido uterino das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, no grupo tratado, 24 horas antes (TT PRÉ) e 24 horas após (TT PÓS) a inseminação artificial e tratamento com plasma rico em plaquetas.

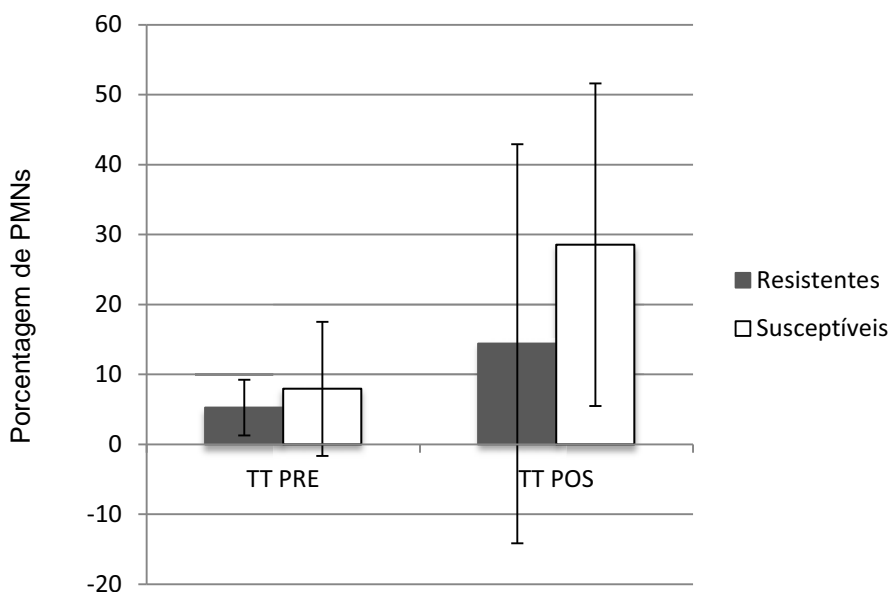


FIGURA 6. Médias e desvio padrão da porcentagem de células PMNs na citologia exfoliativa uterina das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, no grupo tratado, 24 horas antes (TT PRÉ) e 24 horas após (TT PÓS) a inseminação artificial e tratamento com plasma rico em plaquetas.

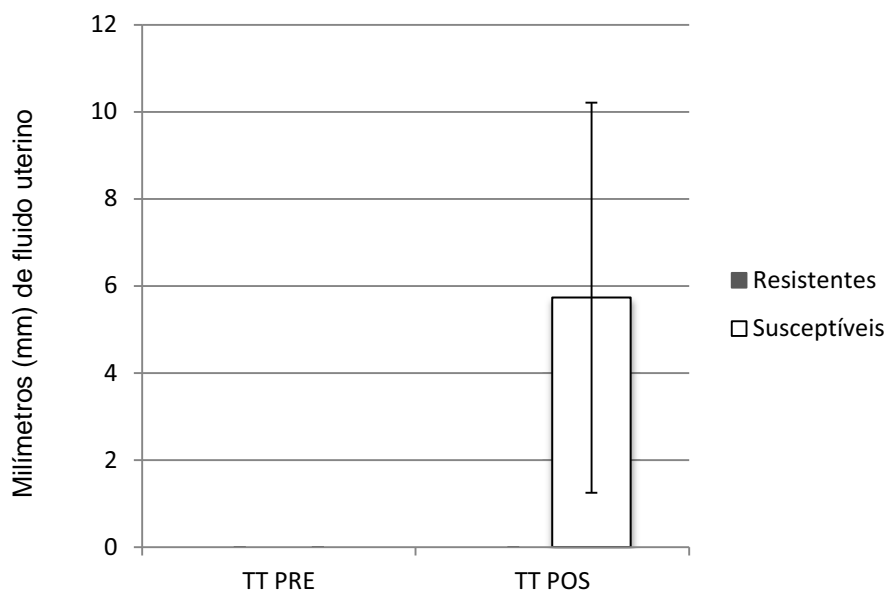


FIGURA 7. Médias e desvio padrão da quantidade de fluido uterino mensurado ao ultrassom (mm) das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, no grupo tratado, 24 horas antes (TT PRÉ) e 24 horas após (TT PÓS) a inseminação artificial e tratamento com plasma rico em plaquetas.

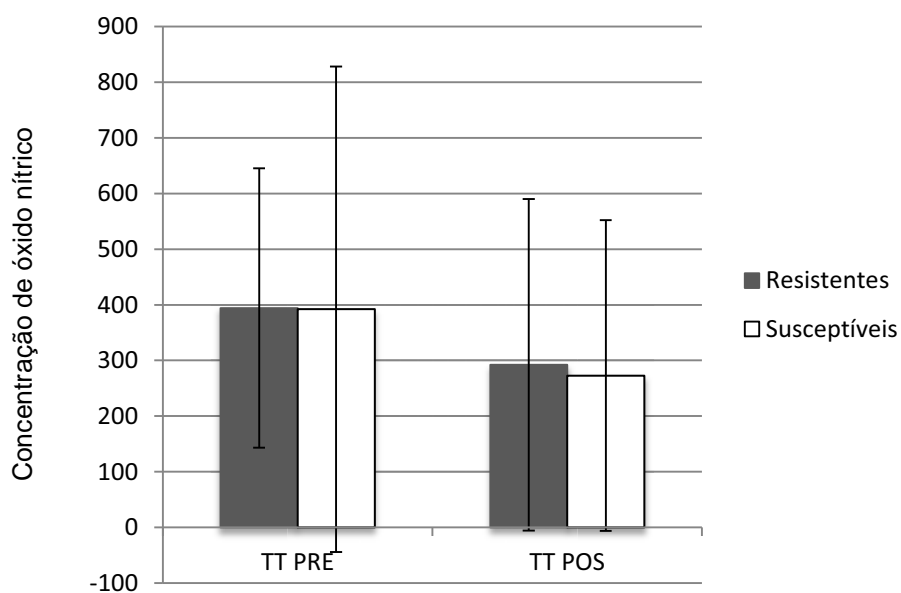


FIGURA 8. Médias e desvio padrão concentração de óxido nítrico (μM) no fluido uterino das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, no grupo tratado, 24 horas antes (TT PRÉ) e 24 horas após (TT PÓS) a inseminação artificial e tratamento com plasma rico em plaquetas.

Ao se avaliar os dois grupos, controle e tratado, 24 horas após a inseminação artificial, observou-se nos animais resistentes que a concentração de PMNs no fluido uterino, a quantidade de fluido uterino mensurada no exame

ultrassonográfico e a concentração de ON no fluido uterino não apresentaram diferença estatística ($p>0,05$), enquanto que a citologia exfoliativa uterina apresentou diferença estatística ($p<0,05$), diminuindo seu valor no grupo tratado (Tabela 8 e figuras 9, 10, 11 e 12).

Tabela 8. Médias e desvio padrão das células polimorfonucleares no fluido uterino (PMNs, $n=7$); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT, $n=8$), quantidade de fluido uterino (FLU, $n=8$) e concentração de óxido nítrico (ON; $n=7$) nas éguas resistentes no grupo controle 24 horas após inseminação artificial (Controle pós IA) e no grupo inseminado e tratado com plasma rico em plaquetas (Tratamento pós IA).

RESISTENTES	Controle pós IA	Tratamento pós IA
PMNs (células x $10^3/ml$)	600, \pm 327,5 ^a	517,14 \pm 321,6 ^a
CIT (%)	26,63 \pm 10,7 ^a	14,38 \pm 10,8 ^b
FLU (mm)	0,25 \pm 0,7 ^a	0 \pm 0 ^a
ON (μ M)	252,09 \pm 397,4 ^a	368,88 \pm 393,3 ^a

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p<0,05$)

Os animais susceptíveis apresentaram, 24 horas após a inseminação artificial, diferença estatística significativa ($p<0,05$) entre os dois grupos na citologia exfoliativa uterina, concentração de ON no fluido uterino e quantidade de fluido uterino mensurado ao ultrassom, enquanto que a concentração de PMNs no fluido uterino apresentou tendência estatística à redução após o tratamento com PRP ($0,05<p<0,1$) (Tabela 9 e figuras 9, 10, 11 e 12).

Tabela 9. Médias e desvio padrão das células polimorfonucleares no fluido uterino (PMNs); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT), quantidade de líquido uterino (FLU) e concentração de óxido nítrico (ON) nas éguas susceptíveis ($n=15$) no grupo controle 24 horas após inseminação artificial (Controle pós IA) e no grupo inseminado e tratado com plasma rico em plaquetas (Tratamento pós IA).

SUSCEPTÍVEIS	Controle pós IA	Tratamento pós IA
PMNs (células x $10^3/ml$)	3852,7 \pm 4332,3 ^a	2794,67 \pm 4244,6 ^a
CIT (%)	69,93 \pm 12,5 ^a	28,5 \pm 23,1 ^b
FLU (mm)	11,07 \pm 6,6 ^a	5,73 \pm 4,5 ^b
ON (μ M)	379,39 \pm 415,9 ^a	230,48 \pm 258,9 ^b

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p<0,05$)

*Na mesma linha indicam tendência ($0,05<p<0,1$)

PMNs FLUIDO

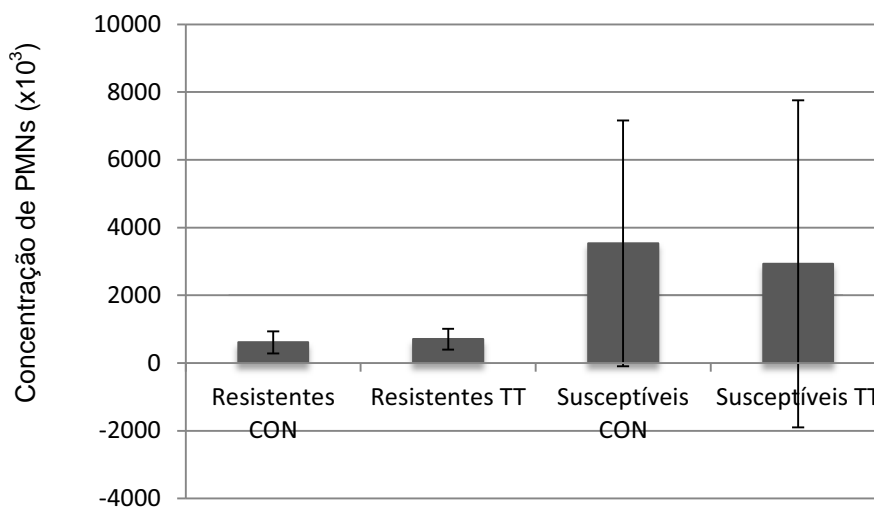


FIGURA 9. Médias e desvio padrão da concentração ($\times 10^3/\text{mL}$) de células PMNs recuperadas do fluido uterino das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, comparando-se os grupos controle (CON) e tratado (TT) 24 após a inseminação artificial.

CITOLOGIA

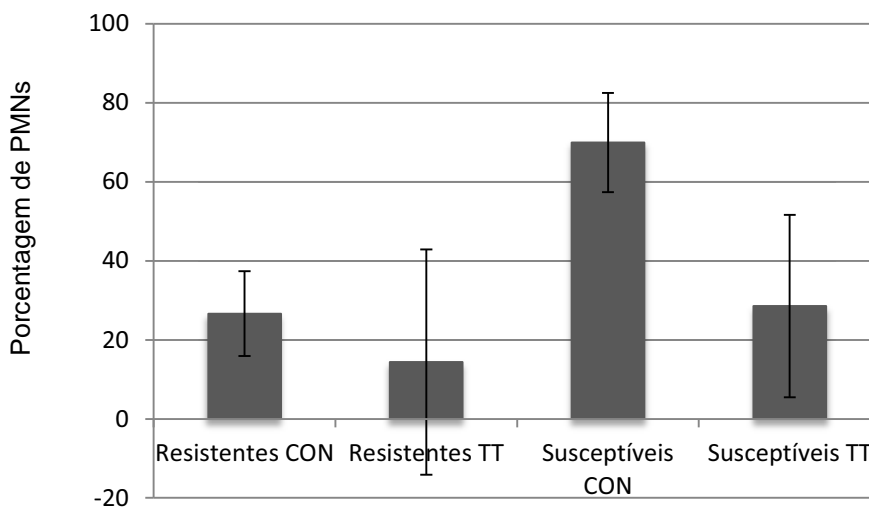


FIGURA 10. Médias e desvio padrão da porcentagem de células PMNs na citologia exfoliativa uterina das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, comparando-se os grupos controle (CON) e tratado (TT) 24 horas após a inseminação artificial.

FLUIDO UTERINO

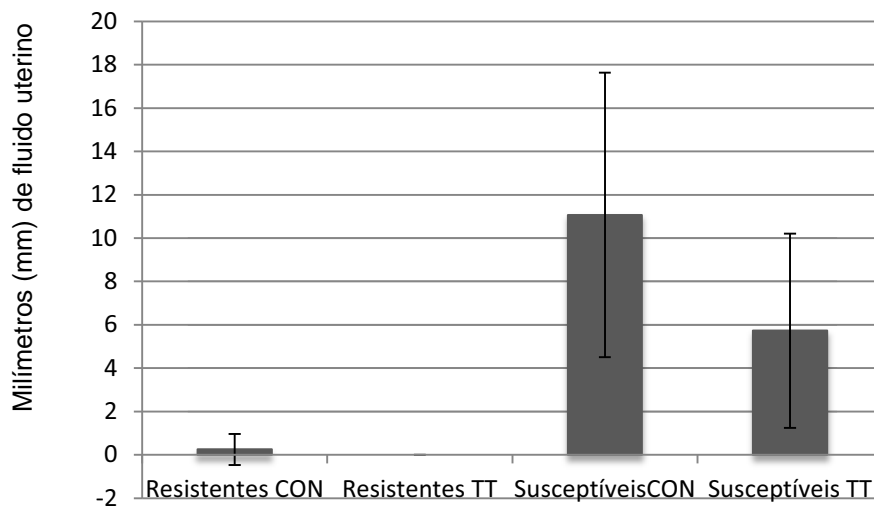


FIGURA 11. Médias e desvio padrão da quantidade de fluido uterino mensurado ao ultrassom (mm) das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, comparando-se os grupos controle (CON) e tratado (TT) 24 horas após a inseminação artificial.

ÓXIDO NÍTRICO

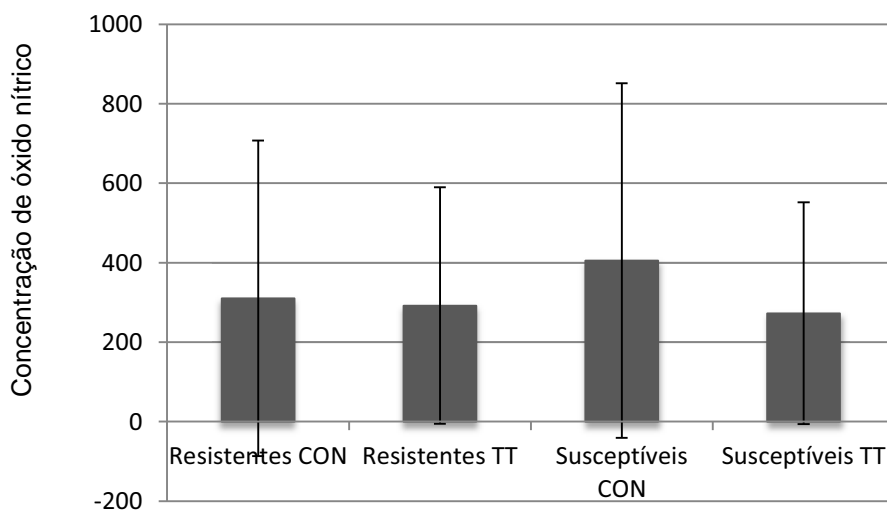


FIGURA 12. Médias e desvio padrão concentração de óxido nítrico (μM) no fluido uterino das éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à EPPC, comparando-se os grupos controle (CON) e tratado (TT) 24 horas após a inseminação artificial.

Discussão

6 DISCUSSÃO

A contaminação bacteriana ou espermática provoca um rápido infiltrado de PMNs no lúmen uterino após a IA ou monta natural. Este processo inflamatório em principio é benéfico; contudo, se for exacerbado e /ou persistir por um período de tempo superior ao esperado pode prejudicar a função espermática no caso de uma segunda inseminação artificial ou cobertura, causar luteólise prematura, assim como pode interferir na viabilidade embrionária após migração do embrião para o útero, devido aos efeitos tóxicos do conteúdo uterino.

O objetivo do presente estudo foi comparar a resposta inflamatória uterina através da contagem de células polimorfonucleares e dosagem da concentração de óxido nítrico no fluido uterino, do percentual de células polimorfonucleares observado na citologia exfoliativa uterina e do acúmulo de fluido intrauterino avaliado através de ultrassonografia 24 horas antes e 24 horas após a inseminação artificial em éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente pós cobertura, e avaliar se o tratamento com PRP interfere na resposta inflamatória de tais éguas.

Os resultados demonstraram que o fluido uterino mensurado durante o exame ultrassonográfico aumentou significativamente 24 horas após a inseminação artificial nas éguas susceptíveis quando comparadas às éguas resistentes, dados condizentes com os encontrados por Fioratti (2010), o qual observou um acúmulo de praticamente o dobro da quantidade de fluido nas éguas susceptíveis, e com Troedsson (2006), o qual relatou que a presença de fluido uterino no período maior que 12 horas após a inseminação artificial indica que a égua é susceptível à endometrite pós cobertura. Troedsson e Liu (1992) relataram que as éguas susceptíveis acumularam até seis vezes mais fluido no útero após desafio bacteriano do que as éguas resistentes.

A porcentagem de neutrófilos presentes em uma amostra de citologia uterina é usada para determinar o grau da inflamação presente no útero. No presente experimento foi utilizada a classificação realizada por Brook (1993), segundo o qual um percentual menor do que 5% de neutrófilos é indicativo de um endométrio não inflamado, de 5 a 15% uma inflamação discreta, de 15 a 30% uma inflamação moderada e acima de 30% uma inflamação severa.

O influxo de células PMNs nos tecidos é o marco da resposta inflamatória aguda. Segundo Katila (1995), os primeiros neutrófilos entram no útero 1 hora após a inseminação artificial, tendo seu pico entre 6 e 12 horas. Em éguas resistentes à endometrite, os PMNs tem seu número reduzido gradualmente até 48 horas após a inseminação, o que não ocorre com os animais susceptíveis, que mantêm os níveis de neutrófilos elevados por um período de tempo mais longo. Estes dados corroboram com os achados do presente experimento, no qual 24 horas após a inseminação artificial, as éguas susceptíveis apresentaram número de neutrófilos bastante elevados, indicando um processo inflamatório ativo, diferentemente das éguas resistentes, que apresentaram relação neutrófilos/células endometriais significativamente menor quando comparadas às éguas susceptíveis. Tais achados concordam com os de Katila (1995), e discordam de Liu et al. (1986), no qual as éguas resistentes e susceptíveis não apresentaram diferenças na migração de células polimorfonucleares para o útero. Portanto, no presente experimento, o processo inflamatório uterino foi mais intenso nas éguas susceptíveis do que nas resistentes.

Verificou-se ainda, neste estudo, a presença de neutrófilos por citologia exfoliativa antes da inseminação artificial, tanto no grupo de éguas resistentes, como no de éguas susceptíveis. As éguas resistentes apresentaram tais neutrófilos, numa proporção aceitável para o período de estro, e algumas susceptíveis apresentaram esses valores mais elevados, porém sem acúmulo de líquido no interior do útero, dados que estão de acordo com os encontrados por Fioratti (2010), que obteve resultados semelhantes. Nikolakopoulos & Watson (2000) observaram uma pequena população de neutrófilos no útero em éguas controle, que fazem parte do ambiente uterino normal.

A presença de espermatozoides no útero resulta em um processo inflamatório no local, resultando em alteração na permeabilidade dos vasos sanguíneos e liberação de fatores quimiotáticos que provocam influxo de neutrófilos no local agredido (PALM et al., 2006). No presente estudo, observou-se que a quantidade de células PMNs recuperadas no fluido uterino foi significativamente maior nas éguas susceptíveis quando comparadas às resistentes, concordando com o estudo de Fioratti (2010), após a inseminação artificial. A concentração elevada de tais células inflamatórias nos animais

susceptíveis 24 horas após a IA corrobora com os achados de Katila (1995) e de Nikolakopoulos & Watson (1997), que estudaram a resposta inflamatória em éguas resistentes e susceptíveis à EPPC após IA e monta natural, e observaram que o fluido recuperado dos animais susceptíveis se apresentava mais turvo do que o das éguas resistentes, demonstrando assim o maior número de células presentes, através da grande quantidade de neutrófilos detectada na secreção uterina.

Sabe-se que o método da citologia exfoliativa uterina proporciona uma grande confiabilidade em diagnosticar a inflamação endometrial na égua, embora ainda assim possa haver casos falso-negativos (NIELSEN et al., 2010). Tal método diagnóstico é de grande valor por prover uma avaliação imediata do endométrio, baseando-se na presença de células inflamatórias, principalmente neutrófilos (KNUDSEN, 1982). Nielsen (2005) verificou que a identificação de células PMNs no esfregaço citológico do endométrio apresentou uma sensibilidade de 0,77 quando comparado ao índice de PMNs da histologia dos mesmos animais. Riddle et al. (2007) relacionaram a citologia uterina e os achados bacteriológicos com os índices de prenhez, e observaram que as éguas que apresentavam inflamação no exame citológico obtiveram índices de prenhez menores do que aquelas que possuíam achados citológicos considerados normais, independente dos resultados das culturas bacteriológicas, demonstrando assim que o exame citológico pode ser bastante confiável. No presente experimento, o exame citológico foi realizado com a escova cervical, diferente da maioria dos estudos feitos em éguas, nos quais foram realizados esfregaços citológicos obtidos a partir da coleta de uma pequena quantidade de lavado uterino ou *swab* de algodão.

Segundo Trimbos & Arentz (1986), está bem estabelecido que o material obtido pela escova cervical é melhor preservado e apresenta mais células do que o coletado através do *swab* de algodão, pois neste último método pode haver aderência das células nas fibras de algodão e a pressão aplicada no momento da coleta das células também pode influenciar no diagnóstico. Walter et al. (2012), comparando-se a técnica de citologia feita através de *swab* uterino com a escova cervical, relataram que, neste último, as deformações celulares eram raras e os PMNs foram detectados mais frequentemente quando comparados com o uso do *swab*, concordando com os achados de

Bourke et al. (1997), que utilizaram *swab* de algodão e escova cervical, e concluíram que esta última apresentou resultados mais confiáveis. No material coletado com a escova cervical, há possibilidade de recuperarem-se células inflamatórias que estão na superfície do endométrio e que não tenham migrado para a luz uterina, o que pode justificar as diferenças encontradas entre as duas técnicas no presente trabalho. Segundo, Cocchia et al. (2012), a técnica de citologia utilizando-se escova ginecológica resultou em menor distorção das células comparadas com técnicas de recuperação de células através de lavado uterino, discordando dos resultados de LeBlanc et al. (2007), que considera a técnica de recuperação de pequena quantidade de fluido uterino como um método preciso em identificar éguas que apresentem endometrite crônica.

Comparando-se os grupos controle e tratado com PRP, notou-se que após o tratamento, nos animais susceptíveis, ainda houve acúmulo de fluido no interior do útero, porém em menor quantidade quando comparado ao grupo o qual não foi submetido ao tratamento com PRP, mostrando assim, seu potencial efeito benéfico, devido à redução do exsudato inflamatório nestes animais. Nos animais resistentes não foi observada alteração entre o grupo tratado e não tratado.

Nas éguas resistentes, o percentual de neutrófilos observado na citologia uterina sofreu redução após o tratamento com plasma rico em plaquetas, o que também ocorreu nas éguas susceptíveis, nas quais foi observado que tais células tiveram seu número reduzido após a aplicação do PRP, a níveis considerados aceitáveis para o momento 24 horas após contato do útero com o sêmen.

Apesar de não ter sido observada diferença estatística ($p > 0,05$) nas médias da concentração de PMNs recuperados do fluido uterino entre os grupos controle e tratado nos animais susceptíveis, foi constatada tendência estatística à redução ($0,05 < p < 0,1$) destas células após tratamento com PRP. Além disso, em 11 éguas classificadas como susceptíveis (aproximadamente 74% dos animais), foi observada queda no número de PMNs. Já nas éguas resistentes, a concentração destas células não foi alterada, visto que nestes animais, a resposta inflamatória é menos intensa e mais controlada. Sendo assim, a imunomodulação não se faz necessária.

As plaquetas são ricas em fatores de crescimento que podem atenuar a inflamação. Os mecanismos através dos quais a inflamação local é de fato reduzida precisam ser elucidados. O plasma rico em plaquetas pode alterar a liberação de citocinas, limitar a inflamação e ainda ter outros efeitos ainda não estudados. A liberação dos fatores de crescimento pelas plaquetas vem sendo muito pesquisada ultimamente. Estudos *in vitro* e *in vivo* acerca do TGF- β 1, fator de crescimento abundante liberado pelas plaquetas, constataram que os macrófagos secretam tal fator atuando de maneira bifásica, como um mediador anti-inflamatório, apesar das suas propriedades pró-inflamatórias. Sendo assim, as propriedades reparadoras do TGF- β 1 indicam uma ligação entre os mecanismos que governam a resolução da inflamação e o reparo do tecido lesado (LUCAS et al., 2003).

Argüelles et al. (2008) observaram uma notável melhora clínica em equinos com desmopatias e tendinopatias agudas e crônicas após a injeção de concentrados de plaquetas no local lesionado. Em outro estudo de Argüelles et al. (2005), foi aplicado PRP intralesional em sete equinos com tendite ou desmite, e foi observada redução na severidade da claudicação e melhora na imagem ultrassonográfica das estruturas envolvidas, mostrando assim a melhora clínica de tais animais, que voltaram às atividades físicas após dois meses de tratamento. Estes trabalhos demonstram o potencial terapêutico do PRP em reduzir os processos inflamatórios nos tecidos lesionados.

De acordo com Marx et al. (1998), o PRP deve conter entre três e cinco vezes mais plaquetas que os níveis fisiológicos. Entretanto, no estudo de Vendruscolo et al (2012), o qual serviu como referência para o presente experimento, não foi possível obter esta concentração utilizando-se a centrífuga. Apesar disso, este método vem ganhando credibilidade por ser um procedimento simples e fácil de ser aplicado, além de apresentar baixo custo em relação às demais técnicas. Desta maneira, o protocolo de eleição, no qual foi obtido o maior número de plaquetas, mas ainda variável entre os diferentes animais, foi o descrito por Carmona et al. (2007). Como era necessário um volume relativamente alto de PRP para sua infusão no útero, houve muita dificuldade na concentração de plaquetas, pois para a produção 20 mL de PRP, é preciso coletar uma grande quantidade de sangue total de cada animal. Em muitos casos houve formação de coágulos de fibrina nos tubos de citrato, e

este material teve de ser descartado. A concentração de plaquetas variou entre os animais no presente experimento, e foi utilizada uma concentração média de 257.000 plaquetas/ μ L concordando com outros resultados de estudos com PRP em equinos, como no de Argüelles et al (2008), cujos autores obtiveram uma concentração média de 250.000 plaquetas/ μ L. Neste mesmo estudo, embora a concentração de plaquetas tenha sido menor do que a obtida por Carter et al. (2003), que obteve média de 490.000 plaquetas/ μ L, foi constatado que a concentração de TGF- β 1 foi maior no estudo de Argüelles (12515 pg/mL x 7480 pg/mL), mostrando que mesmo havendo menor concentração plaquetária no PRP, houve uma considerável produção de fatores de crescimento pelas plaquetas. No estudo de Meirelles et al. (2010), no qual o PRP foi utilizado no tratamento de tendinite aguda e crônica do tendão flexor digital profundo e tendão flexor digital superficial de equinos, houve melhora clínica e ultrassonográfica na reparação tendínea, e a concentração de plaquetas variou entre 290.000 a 375.000 plaquetas/ μ L.

Vários estudos demonstraram que o ON apresenta potente propriedade anti-inflamatória, ao passo que outros sugerem que tal composto pode promover inflamação e conseqüente disfunção tecidual (GRISHAM et al. 1999). No presente estudo observou-se que as éguas resistentes mantiveram a concentração de ON em níveis constantes e tal índice não variou após a IA nestes animais. Nas éguas susceptíveis, a concentração de ON também não se alterou com a reação inflamatória induzida após a IA, contudo, observou-se redução nestes valores após o tratamento com plasma rico em plaquetas.

Sabe-se que o ON pode estar envolvido na regulação das células endometriais e nas interações parácrinas entre as células. Roberto da Costa et al. (2007) detectaram as isoformas eNOS e iNOS no endométrio equino, sendo a iNOS encontrada em níveis menores, sugerindo que o ON é produzido localmente no útero desta espécie. Os mesmos autores observaram que, além do endométrio equino expressar as enzimas NOS, ele também é capaz de produzir ON *in vitro*, com maior produção na fase luteal do que na fase folicular, sugerindo que o ON pode ter um papel tanto na fase proliferativa quanto na secretória do endométrio, o que pode explicar a concentração constante deste composto nas duas categorias de éguas constatada neste experimento.

Mudanças no fluxo sanguíneo uterino durante o ciclo estral em várias espécies são mediadas principalmente pelo estrógeno (FORD, 1982). Há evidências de que o efeito vasodilatador do estrógeno seja atribuído à sua ação direta nas células vasculares do músculo liso ou devido à ativação endotelial (SCOTT et al., 2007), com subsequente liberação de ON (CAULIN-GLASER et al., 1997), o que pode explicar a sua concentração elevada inclusive nos momentos pré IA no presente experimento, que coincide com o período de estro dos animais (momento em que o estrógeno se encontra em níveis maiores). Honnens et al. (2011) observaram correlação entre o fluxo sanguíneo uterino e a expressão de mRNA da eNOS. Também concluíram que o fluxo sanguíneo uterino durante o ciclo estral é regulado pela estimulação da NOS mediada pelos hormônios esteróides, e que tanto o estrógeno como a progesterona podem causar vasodilatação mediada pelo ON no leito vascular uterino durante o ciclo estral na égua, sendo que a progesterona parece estimular o fluxo sanguíneo uterino durante o início do diestro, enquanto que o estrógeno estimula durante o estro. Segundo Roberto da Costa et al. (2008), na fase luteal inicial, o ON pode estimular a produção da PGE₂, que é luteotrófica, ajudando assim a manutenção da gestação. Sendo assim, conclui-se que a presença e o aumento das enzimas NOS detectadas no período inicial da gestação provê um ambiente ideal para uma gestação bem sucedida.

Woodward et al. (2012) relataram que após inseminação artificial com espermatozoides mortos, não houve diferença na quantificação da expressão do mRNA ou expressão de proteínas da enzima iNOS entre éguas resistentes e susceptíveis, discordando dos achados de Alghamdi et al. (2005), que observaram maior expressão desta enzima em éguas susceptíveis. Os mesmos autores também observaram que as éguas resistentes apresentaram uma quantidade relativamente estável de ON total intrauterino durante as primeiras 24 horas após IA, corroborando com os dados do presente experimento, enquanto que as susceptíveis apresentaram um aumento com o tempo do ON total quando comparadas as resistentes, nos períodos de 6 horas e 12 horas após a IA, discordando dos dados deste estudo, no qual a análise foi feita 24 horas após a IA. Os resultados do presente experimento mostram que as éguas susceptíveis apresentaram concentração constante de ON no momento 24 horas após IA, dados que discordam de Fioratti (2010), que

observou que as éguas susceptíveis mantiveram altas concentrações de ON durante as primeiras 24 horas após IA, e de Alghamdi & Troedsson (2002) que verificaram, 13 horas após a cobertura, que as éguas susceptíveis apresentaram maior concentração de ON do que as éguas resistentes. Segundo Alghamdi et al. (2005), os neutrófilos presentes no endométrio não demonstram capacidade de produzir ON por não exibirem nenhuma isoforma da NOS, fato este que pode explicar os dados do presente estudo, no qual houve um aumento do número de neutrófilos no lúmen uterino das éguas susceptíveis, e tais animais não apresentaram grande concentração de óxido nítrico.

Outro fator relevante que corrobora com os achados do presente estudo é que diversos autores demonstraram que, devido à produção das enzimas iNOS e eNOS pelo endométrio equino, o óxido nítrico encontrado no lúmen uterino destes animais seja produzido não só por células inflamatórias, mas também seja oriundo de outras células endometriais, como células endoteliais, glândulas endometriais, fibroblastos e células do miométrio (WELTER et al., 2004; ROBERTO DA COSTA et al. 2007), o que pode explicar a presença de ON no fluido uterino de éguas resistentes no presente estudo, concordando com os achados de Fioratti (2010), que observou uma elevação da concentração de ON nas 24 horas seguintes à IA nos animais resistentes.

O estudo de Woodward et al. (2012), demonstrou que nas éguas previamente inseminadas e tratadas com extrato da parede celular de micobactéria, considerado um imunomodulador, foi constatada redução da concentração de ON total das éguas susceptíveis, o que não ocorreu nas éguas resistentes. Os resultados obtidos com PRP no presente estudo concordam com tais achados, pois comparando o grupo controle com o grupo tratado, nas éguas susceptíveis, notou-se uma redução da concentração de ON após a infusão do PRP, demonstrando que houve uma imunomodulação do ON. Nas éguas resistentes o PRP não reduziu as concentrações de ON no lúmen uterino, provavelmente por estes animais não necessitarem de uma imunomodulação, já que sua resposta inflamatória é controlada.

Desta maneira, o PRP se mostrou eficiente na melhora dos animais susceptíveis à endometrite através da redução da quantidade de fluido uterino, redução da quantidade de células polimorfonucleares observadas no exame

citológico endometrial e diminuição da concentração de óxido nítrico no fluido uterino. Tais observações clínicas sugerem que a infusão de PRP no interior do útero pode ser um tratamento promissor em animais que apresentam susceptibilidade à endometrite persistente pós-cobertura, modulando a resposta inflamatória nestes animais, sendo necessários estudos futuros para verificar o efeito do tratamento do PRP na taxa de fertilidade dos animais tratados, assim como na expressão de moduladores da inflamação.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados, e nas condições em que o experimento foi realizado, podemos concluir que:

- O processo inflamatório uterino após a inseminação artificial foi mais intenso nas éguas susceptíveis do que nas éguas resistentes.
- O tratamento com plasma rico em plaquetas reduziu a resposta inflamatória nas éguas classificadas como susceptíveis.

Bibliografía

8 BIBLIOGRAFIA

ALAM, R.; FORSYTHE, P. A.; LETT-BROWN, M.A.; GRANT, J.A. Interleukin-8 and RANTES inhibit basophil histamine release induced with monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant peptide-1 and histamine releasing factor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 7, p. 427-233, 1992.

ALBRECHT, E. W.; STEGEMAN, C. A.; HEERINGA, P.; HENNING, R. H. van GOOR, H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *Journal of Pathology*, v. 199, p. 8-17, 2003.

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, G.N.; 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. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 53, p. 230-237, 2005.

ALGHAMDI, A.; TROEDSSON, M. H. T.; LASCKEWITSCH, T.; XUE, J. L. Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. *Theriogenology*, v.55, p. 1019-1028, 2001.

ALLEN, W. R.; PYCOCK, J. P. Current views on the pathogenesis of bacterial endometritis in mares. *Veterinary Record*, v. 125, p. 241-262, 1989.

ALLEN, W. E. Investigations into the use of exogenous oxytocin for promoting uterine drainage in mares susceptible to endometritis. *Veterinary Record*, v.128, p. 593-594, 1991.

ALVARENGA, M.A.; IWANA DE MATOS, M.C. Utilização da escova ginecológica cytobrush na coleta de material endometrial de éguas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v. 42, p. 67-68, 1990.

ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous platelet source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis*, v.91, p.4-15, 2004.

ARGUELLES, D.; CARMONA, J. U.; CLIMENT, F.; PRADES, M. Clinical experiences with platelet-rich plasma as a treatment of tendon and ligament injuries in the horse. In: ANNUAL SCIENTIFIC MEETING, 16, 2005, Dublin, Ireland. *Proceedings...* Dublin: European College of Veterinary Surgeons, 2005, p. 217-222.

ARGUELLES, D.; CARMONA, J.; PASTOR, J. D.; IBORRA, A.; VIÑALS, L.; MARTINEZ, P.; BACH, E.; PRADES, M. *Evaluation of single and double centrifugation tube method for concentrating equine platelets*, v. 81, p. 237-245,

2006.

ARGUELLES, D.; CARMONA, J. U.; CLIMENT, F.; MUÑOZ, E.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Veterinary Record*, v.162, p. 208-211, 2008.

ASBURY, A. C. Endometritis in the mare. In: MORROW, D. A. *Current therapy in theriogenology*. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986, p. 718 – 722.

BANNENBERG, G. L.; CHIANG, N.; ARIEL, A.; TJONAHEN, E., GOTLINGER, K. H., HONG, S., SERHAN, C. N. Molecular circuits of resolution: Formation and actions of resolvins and protectins. *The Journal of Immunology*, v. 174, p. 4345-4355, 2005.

BARAÑO, R. Citoquinas en el proceso reproductivo. *Reproducción (Argentina)*, v.1, p.13-27, 1997.

BOURKE, M.; MILLS, J.N.; BARNES, A.L. Collection of endometrial cells in the mare. *Australian Veterinary Journal*, v. 75, p. 755-758, 1997.

BRINSKO S. P.; RIGBY S. L.; VARNER, D. D; BLANCHARD, J. L. A practical method for recognizing mares susceptible to post breeding endometritis. *American Association of equine Practitioners*, New Orleans, LA, v. 49, p. 363-365, 2003.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rates in mares. *Theriogenology*, v.35, p. 1111-1119, 1991.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; MEYERS, S. A. The effect of post-breeding uterine lavage on pregnancy rates in mares. *Theriogenology*, v.33, p. 465-475, 1990.

BROOK, D. Uterine cytology. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (ed). *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 246-253.

BUCCA, S.; CARLI, A.; BUCKLEY, T.; DOLCI, G.; FOGARTY, U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. *Theriogenology*, v. 70, p.1093-1100, 2008.

CADARIO, M. E.; THATCHER, W. W.; KLAPSTEIN, E.; MERRIT, A. M.; ARCHBALD, L. F.; THATCHER, M. J.; LEBLANC, M. M. Dynamics of prostaglandin secretion, intrauterine fluid and uterine clearance in reproductively normal mares and mares with delayed uterine clearance. *Theriogenology*, v.52, p. 1181-1192, 1999.

CAMPBELL, M. H. L.; ENGLAND, G. C. W. The effect of coitus and artificial insemination of different volumes of fresh semen on uterine contractions in the mare. *Animal Reproduction Science*, v. 94, p.248-251, 2006.

CARD, C. Post- breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*, v.64,p. 580-588, 2005.

CARMONA, J. U. *Use of autologous platelet concentrate for the treatment of musculoskeletal injuries in the horse*. Barcelona, Espanha, 2006. 91 p. Tese (PhD). Universitat Autonoma de Barcelona, Barcelona.

CARMONA, J. U.; ARGUELLES, D.; CLIMENT, F.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 17, p. 167-170, 2007.

CARTER, C. A., JOLLY, D. G., WORDEN, C. E., HENDREN, D. G. & KANE, C. J. Platelet-rich gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 74, p. 244-255, 2003.

CAULIN-GLASER, T.; GARCIA-CARDENA, G.; SARREL, P.; SESSA, W.C.; BENDER, J.R. 17-Beta estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circulation Research*, v. 81, p.885-892, 1997.

CAUSEY, R.C. Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. *Veterinary Journal*, v. 172, p. 405-421, 2006.

CAUSEY, R.C.; MILETELLO, T.; O'DONNELL, L.; LYLE, S.K.; PACCAMONT, D.L.; ANDERSON, K.J.; EILTS, B.E.; MORSE, S.; LEBLANC, M.M. Pathologic effects of clinical uterine inflammation on the equine endometrial mucosa. *American Association of Equine Practitioners*, San Diego, CA, v. 54, p. 276- 277, 2008.

COCCHIA, N.; PACIELLO, 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.

COLLINS, T.; CONTRAN, R.S.; KUMAR, V. Robbins. *Pathologic Basic of Disease*. 6 ed., Ed WB Saunders, 1999.

COMBS G.B.;LEBLANC,M.M; NEUWIRTH, L; TRAN, T.Q. Effects of Prostaglandin F2 alpha cloprostenol and fenprostalene on uterine clearance of radiocolloid in the mare. *Theriogenology*, v.45, p. 1449-1455, 1996.

DAHLGREN, L.A. Pathobiology of tendon and ligament injuries. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v.6, p. 168-173, 2007.

DECLAIR, V. The importance of growth factors in wound healing. *Ostomy Wound Manage*, v.45, p.64-68, 1999.

DELL'AQUA JUNIOR, J.A. *Efeito da cortico-terapia e plasma seminal na resposta inflamatória e fertilidade de éguas submetidas à inseminação artificial*. Botucatu, 2004. 120p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; PAPA, F.O.; LOPES, M.D.; ALVARENGA, M.A.; MACEDO, L.P.; MELO, C.M. Modulation of acute uterine inflammatory response after insemination with equine frozen semen. *Animal Reproduction Science*, v.94, p.270-273, 2006.

DINATO, C.J.; BARRETO, M.A.; MENDONÇA, R.G.; SCARSO, J. Plasma Rico em plaquetas. In: DINATO C.J.; PÓLIDO, D.W. (Eds). *Implantes osseointegrados: cirurgia e prótese*. São Paulo: Artes Médicas, 2001. P. 315-342.

EL-SHARKAWY, H.; KANTARCI, A.; DEADY, J.; HASTURK, H.; LIU, H.; ALSHAHAT, M.; VAN DYKE, T.E. Platelet-Rich Plasma: growth factors and anti-inflammatory properties. *Journal of Periodontology*, v. 78, p. 661-669, 2007.

ENGLAND, G. *Fertility & Obstetrics in The Horse*. 3 ed. Oxford: Blackwell Publishing. 2005. p. 121.

EVERTS, P.A.M.; KNAPE, J.T.A.; WIBRICH, G.; SCHÖNBERGER, J.P.A.M.; HOFFMAN, J. PVERDEVEST, E.P.; BOX, H.A.M., van ZUNDERT, A. Platelet rich plasma and platelet gel: a review. *The Journal of Extracorporeal Technology*, v.38, p.174-187, 2006.

FIORATTI, E.G. *Efeito dos anti-inflamatórios esteróides na reação inflamatória e na fertilidade de éguas normais e susceptíveis à endometrite persistente após inseminação artificial*. Botucatu, 2010. 141p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

FIORE, S.; SERHAN, C.N. Lipoxin A4 receptor activation is distinct from that of the formyl peptide receptor in myeloid cells: Inhibition of Cd11/18 expression by lipoxin A4-lipoxin A4 receptor interaction. *Biochemistry*, v. 34, p. 16678-16686, 1995.

FISCHER, B.; BEIER, H.M. Uterine environment in early pregnancy. In: Sreenan, J.M.; Diskin, M.G. (eds). *Embryonic mortality in farm animals*. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands: p. 93-108, 1986.

FISHER, L.D.; BELLE GV. *Biostatistics a methodology for the health sciences*. Wiley Interscience, p. 991, 1993.

FORD, S.P. Control of uterine and ovarian blood flow throughout the estrous cycle and pregnancy ewes, sows and cows. *Journal of Animal Science*, v. 55, p. 32-42, 1982.

FOSTER, T.E.; PUSKAS, B.L.; MANDELBAUM, B.R.; GERHARDT, M.B.; SCOTT, A.R. Platelet rich plasma: from basic science to clinical applications. *The American Journal of Sports Medicine*, v. 37, p. 2259-2272, 2009.

FUMUSO, E.A.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; RIVULGO, M.; WADE, J.; ROGAN, D. Immune parameters in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 118, p. 30-39, 2007.

FUMUSO, E.A.; GIGUÈRE, S.; WADE, J.; ROGAN, D.; VIDELADORNA, I.; BOWDEN, R.A. Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis and immunomodulation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 96, p. 31-41, 2003.

GALINDO, A.S.D.; KUNZ, T.L.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA, B.D. Mecanismos de defesa uterinos na fêmea bovina. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, v. 9, n.30, p. 49-58, 2003.

GENTRY, P.A. Platelet Biology. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. *Schulman's veterinary Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkin, p. 459-466, 2000.

GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, v.22, p.547-557, 2002.

GRISHAM, M.B.; JOURD'HEUIL, D.; WINK, D.A. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *American Journal of Physiology*, v. 276, p. G-315-321, 1999.

HARRISON, P.; CRAMER, E.M. Platelet alpha-granules. *Blood Review*, v.7, p.52-62, 1993.

HARTWIG, J.; ITALIANO, JR. The birth of the platelet. *Journal of Thrombosis and Hemostasis*, v.1, p. 1580-1586, 2003.

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. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.193, p.72-75, 1988.

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

JANSSENS, S.P.; SIMOUCHI, A.; QUERTERMOUS, T.; BLOCH, D.B.; BLOCH, K.D. Cloning and expression of cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *The Journal of Biological*

Chemistry, v. 267, p. 22 694.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 2004.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biology of Reproduction Monograph Series*, v.1, p.515-517, 1995.

KATILA, T. Sperm-uterine interactions: a review. *Theriogenology*, v.68, p.267-272, 2001.

KEVY, S.V.; JACOBSON, M.S. Comparison of methods for point of care preparation of autologous platelet gel. *The Journal of Extra Corporeal Technology*, v.36, p.28-35, 2004.

KHATRI, V.P.; CALIGIURI, M.A. Interleukin 10 and its receptor. In: DELVES, P.J., ROIT, I.M.(Eds.), *Encyclopedia of Immunology*. 2 ed. Academic Press, San Diego, USA, 1998, p. 1475–1478.

KNUDSEN, O. A combined cytologic and bacteriologic endometrial examination in the mare. *Proceedings of American Association of Equine Practitioners*, p. 431-433, 1982.

KNUTTI, B.; PYCOCK, J.F.; van der WEIJDEN, G.C.; KUPPER, U. The influence of early post breeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. *Equine Veterinary Education*, v. 5, p. 346- 349, 2000.

KOTILAINEN, T.; HUHTINTN, M.; KATILA, T. Sperm induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, v.41, p. 629-636, 1994.

LEBLANC, M.M. Effects of oxytocin, prostaglandin and phenylbutazone on uterine clearance of radiocolloid. *Pferdeheilkunde*, v.13, p. 483, 1997.

LEBLANC, M.M. Persistent mating-induced endometritis. In: ROBINSON, N.E. *Current therapy in equine medicine*. 5.ed. St. Louis: Elsevier Science, 2003. p.234-237.

LEBLANC, M.M.; CAUSEY, R.C. Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare: Both threats to Fertility. *Reproduction of Domestic Animals*, v.44, p. 10-22, 2009.

LEBLANC, M.M.; NEUWIRTH, L.; MAURAGIS, D.; KLAPSTEIN, E.; TRAN, T. Oxytocin enhances clearance of radiocolloid from the uterine lumen of reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*, v.26, p. 279-282, 1994.

LEBLANC, M.M.; TRAN, T.; WIDDERS, P. Identification and opsonic activity of immunoglobulins recognizing *Streptococcus zooepidemicus*, antigens in uterine fluid of mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, Suppl. 44, p.

289-296, 1991.

LEBLANC, M.M.; NEUWIRTH, L.; JONES, L.; CAGE, C.; MAURAGIS, D. Differences in uterine position os reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. *Theriogenology*, v.50, p. 49- 54, 1998.

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

LEFRANC, A.C.; ALLEN, W.R. Uterine fluid accumulation and endometrial integrity in the barren mare. *Pferdeheilkunde*, v.24. p. 27-30, 2008.

LEHRER, R.I. Neutrophils and host defense. *Annals of Internal Medicine*, v. 109, p. 127-142, 1988.

LIU, I.K.M.; CHEUNG, A.T.W.; WALSH, E.M; AYIN, S. The functional competence of uterine-derived polymorpho-nuclear neutrophils (PMN) from mares resistant and susceptible to chronic uterine infection: a sequential migration analysis. *Biology Reproduction*, v. 35, p. 1168- 1174, 1986.

LUCAS, M; STUART, L.M.; SAVILL, J.; LACY-HULBERT, A. Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion. *The Journal of Immunology*, v. 171, p. 2610-1615, 2003.

MACKAY, R.J. Inflammation in horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.16, p. 15-27, 2000.

MAISCHBERGER, E.; IRWIN, J.A.; CARRINGTON, S.D.; DUGGAN, V.E. Equine post-breeding endometritis: a review. *Irish Veterinary Journal*, v. 61, p. 163-168, 2008.

MALSCHITZKY, E.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Endometritis in the mare, new concepts. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p. 17-26, 2007.

McCAN, S.M.; KARANTH, S.; KIMURA, M.; YU, W.H.; RETTORI, V. The role of nitric oxide (NO) in control of hypothalamic-pituitary function. *Brazilian Journal of Biology*, v.56, p. 105-112, 1996.

McRAE, A.C. The blood uterine lumen barrier and exchange between extracellular fluids. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.82, p. 857-873, 1988.

MARX, R.E.; CARLSON, E.R.; EICHSTAEDT, R.M.; SCHIMELLE, S.R.; STRAUSS, J.E.; GEORGEFF, K.R.. Platelet rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v.85, p. 638-646, 1998.

MOREL, M.C.G.D. 2 ed. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Study Management*. Oxon: CAB International, 2003. p. 287.

MONCADA, S.; PALMER, R.M. Inhibition of the induction of nitric oxide synthase by glucocorticoids: yet another explanation for their anti-inflammatory effects? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 12, p. 130-131, 1991.

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

NIELSEN, J.M.; TROEDSSON, M.H.; PEDERSEN, M.R.; BOJESSEN, A. M.; LEHN-JENSEN, H.; ZENT, W.W. Diagnosis of endometritis in the mare based on bacteriological and cytological examinations of the endometrium: comparison of results obtained by swabs and biopsies. *Equine Veterinary Science*, v.30, p. 27-30, 2010.

NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E.D. Does artificial insemination with chilled, extended semen reduce the antigenic challenge to the mare's uterus compared with natural service? *Theriogenology*, v. 47, p. 583-590, 1997.

NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E.D. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. *Theriogenology*, v.52, p.413-423, 1999.

NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E.D. Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. *Equine Veterinary Journal*, v. 32, p. 164–666, 2000.

PALM, F.; WALTER, I.; BUDIK, S. AURICH, C. Influence of different semen extenders and seminal plasma on the inflammatory response on the endometrium in estrous mares. *Animal Reproduction Science*, v.94, p. 286-289, 2006.

PALMER, R.M.; REES, D.D.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 30, p. 1251- 1256, 1988.

PAPA, F.O.; DELL'AQUA J.A Jr; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; SOARES Z.F.; LOPES, M.D. Use of corticosteroid therapy on the modulation of uterine inflammatory response in mares after artificial insemination with frozen semen. *Pferdeheilkunde*, v.24, p. 79-82, 2008.

PURCELL, T.L.; GIVEN, R.; CHWALISZ, K.; GARFIELD, R.E. Nitric oxide synthase distribution during implantation in the mouse. *Molecular Human Reproduction*, v.5, p. 467-475, 1999.

REITZENSTEIN, M.; CALLHAN, M.A.; HANSEN, P.J.; LEBLANC, M.M. Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine

clearance after administration of detomidine and oxytocin. *Theriogenology*, v.58, p.887-898, 2002.

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.

RIGBY, S.L.; HILL, J.; MILLER, C.; THOMPSON, J.; VARNER, D.; BLANCHARD, T. Administration of oxytocin immediately after insemination does not improve pregnancy rates in mares bred by fertile or subfertile stallions. *Theriogenology*, v.51, p. 1143-1150, 1999.

RIGBY, S.L.; BARHOUMI, R.; BURGHARDT, R.C.; COLLERAN, P.; THOMPSON, J.A.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P.; TAYLOR, T.; WILKERSON, M.K.; DELP, M.D. Mares with Delayed Uterine Clearance Have an Intrinsic Defect in Myometrial Function. *Biology of Reproduction*, v.65, p.740-747, 2001.

ROBERTO DA COSTA, R.P.; FERREIRA-DIAS, G.; MATEUS, L.; KORZEKWA, A.; ANDRONOWSKA, A.; PLATEK, R.; SKARZYNSKI, D.J. Endometrial nitric oxide production and nitric oxide synthases in the equine endometrium: relationship with microvascular density during the estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*, v.32, p. 287-302, 2007.

ROBERTO DA COSTA, R.P.; COSTA, S.A.; KORZEKWA, A. J.; PLATEK, R.; SIEMIENIUCH, .; GALVÃO, A.; REDMER, D.A.; SILVA, J.R.; SKARZYNSKI, D.J.; FERREIRA-DIAS, G. Actions of nitric oxide donor on prostaglandin production and angiogenic activity in the equine endometrium. *Reproduction Fertility and Development*, v.20, p.674-683, 2008.

SAXENA, D.; PUROHIT, S.B.; KUMER, G.P.; LALORAYA, M. Increased appearance of inducible nitric oxide synthase in the uterus and embryo at implantation. *Nitric Oxide*, v.4, p. 384-391, 2000.

SCOTT, P.A.; TREMBLAY, A.; BROCHU, M.; ST-LOUIS, J. Vasorelaxant action of 17 β -estradiol in rat uterine arteries: role of nitric oxide synthases and estrogen receptors. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, v.293, p. 3713-3719, 2007.

SOORANNA, S.R.; DAS, I. The inter-relationship between polyamines and the L-arginine nitric oxide pathway in the human placenta. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 212, p. 229-234, 1995.

TIZARDI, I.R. Resistência às bactérias. In: _____. *Imunologia veterinária*. 5 ed. São Paulo: Editora Roca, 1998. p. 294-309.

TRIMBOS, J.B.; ARENTZ, N.P. The efficiency of the citobrush versus the cotton swab in the collection of endocervical cells in cervical smears. *Acta Cytologica*, v. 30, p. 261-263, 1986.

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

TROEDSSON, M.H.T. Breeding-induced endometritis in mares. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.22, p. 705-712, 2006.

TROEDSSON, M.H.T. Uterine defense mechanisms in the mare. *Archives of Std/Hiv Research*, v. 8, p. 259-269, 1994.

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; MACPHERSON, M.L., POZOR, M.P. Persistent breeding-induced endometritis. *Pferdeheilkunde*, v.24. p.56-60, 2008.

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

TROEDSSON, M.H.T.; LOSET, K.; ALGHAMDI, A.M.; DAHMS, B.; CRABO, B.G. Interactions between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.273-278, 2001.

TROEDSSON, M.H.T.; LOSETH, K.; ALGHAMDI, A.M.; DAHMS, B.; CRABO, B.G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science*, v.68, p. 273-278, 2002.

TROEDSSON, M.H.T.; STEIGER, B.N.; IBRAHIM, N.M., KING,V.L.; FOSTER, D.N.; CRABO, B.G. Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. *Biology of Reproduction*, v.52 (Suppl.1), p.507, 1995.

TROEDSSON, M.H.T; LIU,I.K.M.;CRABO,B.G. Sperm transport and survival in the mare: a review.*Theriogenology*, v.50. p. 807-818, 1998.

TROEDSSON, M.H.T., LIU, I.K.M. Measurement of total volume and protein concentration of intrauterine secretion after intrauterine inoculation of bacteria in mares that were either resistant or susceptible to chronic infection. *American Journal Vet. Res.* v. 53, p.1641–1644.

TSENG, L.; ZHANG, J.; PERESLENI, T.Y.; GOLIGORSKY, M.S. Cyclic expression of endothelial nitric oxide synthase mRNA in the epithelial glands of human endometrium. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, v.3, p. 33-38, 1996.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L. Effect on fertility of uterine lavage performed immediately prior to insemination in mares. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v. 222, p. 1108-1119, 2003.

VENDRUSCOLO, C.P.; CARVALHO, A. M.; MORAES, L.F.; MAIA, L.; QUEIROZ, D.L.; WATANABE, M.J.; YAMADA, A.L.M.; ALVES, A.L.G. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do plasma rico em plaquetas para uso em medicina equina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, p. 106-110, 2012.

VERONESI, M.C.; CARLLUCIO, A.; KINDHAL, H.; FAUSTINI, M.; BATTOCCHIO, M. CAIROLI, F. Oxytocin- induced PGF 2α release in mares with and without post-breeding delayed uterine clearance. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 53, p. 259-262, 2006.

VON REITZENSTEIN M.; CALLAHAN, M.A.; HANSEN, P.J.; LEBLANC, M.M. Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after administration of detomidine and oxytocin. *Theriogelony*, v.58, p. 887- 898, 2002.

WALTER, J.; NEUBERG, K.P.; FAILING, K. WEHREND, A. Cytological diagnosis of endometritis in the mare: investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. *Animal Reproduction Science*, v.132, p.178-186, 2012.

WATSON, E.D.; STOKES, C.R.; BOURNE, F.J. Cellular and humoral mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.6, p. 107-121, 1987.

WATSON, E.D.; THOMSON, S.R. Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*, v. 28, p. 106-110, 1996.

WEIBRICH, G.; KLEIS, W.K.; HITZLER, W.E.; HAFNER, G. Comparison of the platelet concentrate collection system with plasma rich in growth factor kit to produce platelet rich plasma: a technical report. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v.29, p. 118-123, 2005.

WELTER, H.; BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; ROHR, S.;EINSPANIER, R. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthases is modulated in the endometrium os cyclic and early pregnant mares. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 16, p. 689-698, 2004.

WOODALL, J. Jr.; TUCCI, M.; MISHRA, A.; ASFOUR, A.; BENGHUZZI, H. Cellular effects of platelet rich plasma interleukin1 release from PRP treated macrophages. *Biomedical Sciences Instrumentation*, v.44, p. 489-494, 2008.

WOODWARD, E.M.; CHRISTOFFERSEN, M.; CAMPOS, J.; HOROHOV, D.W.; SCOGGIN, K.E.; SQUIRES, E.; TROEDSSON, M.H.T. An investigation of uterine nitric oxide production in mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis and the effects of immunomodulation. *Reproduction of Domestic Animals*, p.1-8, 2012.

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

ZUCKER-FRANKLIN, D.; GREAVES, M.F.; GROSSI, C.E.; MARMOUNT, A.M. *Atlas of blood cells: function and pathology*, 2 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1998. 777p.

Trabalho Científico

9 TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado para a Revista Medicina Veterinária e Zootecnia

RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS À ENDOMETRITE.

UTERINE INFLAMMATORY RESPONSE AFTER ARTIFICIAL INSEMINATION IN MARES RESISTANT AND SUSCEPTIBLE TO ENDOMETRITIS.

RESPUESTA INFLAMATORIA DEL ÚTERO DESPUÉS DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN YEGUAS RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A ENDOMETRITIS.

Maria Fernanda Svizzero Reghini¹

Carlos Ramires Neto²

Marcel Cavalcanti Farrás³

Eduardo Gorzoni Fioratti⁴

Marco Antônio Alvarenga⁵

Maria Fernanda Svizzero Reghini, fernandasr@hotmail.com

Entidade financiadora: FAPESP (2010/03717-5; 2011/05714-6).

¹ Mestranda do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ UNESP – Campus de Botucatu

² Aluno de graduação da FMVZ UNESP – Campus de Botucatu

³ Doutorando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ UNESP – Campus de Botucatu

⁴ Doutorando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ UNESP – Campus de Botucatu

⁵ Professor Adjunto do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ UNESP – Campus de Botucatu

RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS À ENDOMETRITE.

RESUMO

A endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) é a principal causa da redução de fertilidade em éguas. Tal desordem pode acarretar grande prejuízo econômico para os produtores, devido à possível queda na taxa de concepção dos animais, aumento do número de serviço por concepção e sobrevivência embrionária prejudicada. O objetivo deste trabalho foi verificar o estímulo do sêmen na resposta inflamatória uterina de éguas resistentes e susceptíveis à endometrite pós cobertura. Foram selecionadas 15 éguas resistentes e 8 susceptíveis à EPPC com base nos seus índices reprodutivos e exames ultrassonográficos. A concentração de células polimorfonucleares (PMNs) na secreção uterina, citologia exfoliativa uterina e acúmulo de fluido uterino verificado no exame ultrassonográfico foram analisados nos dois grupos de animais (1) 24 horas antes da inseminação artificial (IA) e (2) 24 horas após a IA com sêmen fresco. As células polimorfonucleares na secreção uterina foram quantificadas com o uso da câmara de Neubauer e a leitura das amostras de citologia foi feita através de microscopia óptica utilizando imersão, considerando a porcentagem de neutrófilos/100 células de forma aleatória. Os resultados demonstraram que houve uma resposta inflamatória mais intensa nas éguas susceptíveis quando comparadas às resistentes, através do aumento do acúmulo de fluido uterino verificado no exame ultrassonográfico, aumento do número de células polimorfonucleares observadas na citologia exfoliativa endometrial e no aumento da concentração destas células no fluido uterino. Portanto, foi constatado que o sêmen estimula uma resposta inflamatória mais severa no ambiente uterino das éguas susceptíveis.

Palavras- chave: Éguas; Endometrite; Sêmen.

UTERINE INFLAMMATORY RESPONSE AFTER ARTIFICIAL INSEMINATION IN MARES RESISTANT AND SUSCEPTIBLE TO ENDOMETRITIS.

ABSTRACT

Post breeding endometritis (PBE) is the major cause of fertility reduction in mares. Such disorder can result in a great economic injury to producers due to the possible fall in the rate of conception, increase in the number of service per conception and impaired embryonic survival. The aim of this study was to verify semen's stimulus on inflammatory response in mares resistant and susceptible to PBE. 15 mares susceptible to PBE and 8 mares resistant to PBE were selected based on their reproductive index and ultrasonographic examination. The concentration of polymorphonuclear (PMNs) cells in the uterine secretion, exfoliative cytology of the uterus and uterine fluid accumulation observed by ultrasonography were analyzed in both group of animals (1) 24 hours before artificial insemination (AI) and (2) 24 hours after AI with fresh semen. PMNs in uterine secretion were quantified by the use of Neubauer chamber and the lecture of endometrial cytology samples were analyzed by optical microscopy using immersion, considering the percentage of neutrophils/100 cells in an alleatory form. The results showed that semen can stimulate a major inflammatory response inside the uterine environment in susceptible mares when compared to resistant mares, by increasing the amount of fluid inside the uterus verified by ultrasonographic exam, increase in PMN number observed in uterine cytology, and increase in concentration of PMN in uterine fluid. Therefore, it was found that semen stimulate a more severe inflammatory response inside the uterine environment of susceptible mares.

Key-words: Endometritis; Mares; Semen.

RESPUESTA INFLAMATORIA DEL ÚTERO DESPUÉS DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN YEGUAS RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A ENDOMETRITIS.

RESUMEN

Endometritis después de la cobertura es la principal causa de disminución de la fertilidad en yeguas. Este trastorno puede causar una gran pérdida económica para los creadores debido a la posible disminución de la tasa de concepción de los animales, el aumento del número de servicios por concepción y supervivencia de los embriones afectada. El objetivo de este estudio fue evaluar el estímulo del semen en la respuesta inflamatoria uterina de yeguas resistentes y susceptibles a la endometritis. 15 yeguas resistentes y 8 susceptibles a endometritis fueron seleccionadas en base a sus índices reproductivos y exámenes de ultrasonido. La concentración de las células polimorfonucleares (PMN) en la secreción uterina, citología exfoliativa y la acumulación de fluido uterino observado en el examen de ultrasonido uterino se analizaron en ambos grupos de animales (1) 24 horas antes de la inseminación artificial (IA), y (2) 24 horas después de la inseminación artificial con semen fresco. Las células polimorfonucleares en las secreciones uterinas se cuantificaron utilizando una cámara de Neubauer y la lectura de las muestras para citología se realizó por inmersión usando microscopía óptica, mientras que el porcentaje de células neutrófilos/100 al azar. Los resultados mostraron que había una respuesta inflamatoria más intensa en las yeguas susceptibles en comparación con las resistentes al aumentar la cantidad de fluido observado en ultrasonido uterino, incremento en el número de células polimorfonucleares observados en citología exfoliativa endometrial y aumento de la concentración de estas células en el fluido uterino. Por lo tanto, se encontró que el semen estimula una respuesta inflamatoria en el entorno uterino más grave en yeguas susceptibles.

Palabras clave: Endometritis; Yeguas; Semen.

INTRODUÇÃO

Com a expansão da equinocultura nas últimas décadas, na qual o Brasil se destaca por estar entre os 3 países com maior número de animais puros de raça, os criadores procuram otimizar a eficiência reprodutiva dos reprodutores, buscando incrementar a produção através de um grande número de embriões coletados por égua doadora. Porém, a excessiva manipulação do trato reprodutivo tem levado ao aumento das desordens uterinas, com consequente comprometimento da fertilidade da fêmea equina.

Desta maneira, tais desordens podem acarretar grande prejuízo econômico para os produtores, devido à possível queda na taxa de concepção dos animais, aumento do número de serviço por concepção e sobrevivência embrionária prejudicada.

Segundo a literatura, a inflamação uterina induzida pela cobertura/inseminação artificial é uma resposta ao sêmen depositado no útero, sendo um processo transitório, pelo qual os espermatozóides são eliminados do trato genital feminino. A reação é necessária para a sobrevivência e desenvolvimento do embrião. Porém, quando exacerbada, apresenta uma intensa migração de células polimorfonucleares para o interior do útero originada pela presença dos espermatozóides, resultando em perda embrionária ou interferindo na sobrevivência do embrião.

A EPPC caracteriza-se por uma rápida infiltração de neutrófilos uma hora após a inseminação artificial (1,2). A mucosa do sistema reprodutivo apresenta um sistema imune que retira os contaminantes através de uma combinação entre os fatores celulares, humorais e mecânicos de drenagem que permitem a depuração uterina e a eliminação desse processo fisiológico em até 72 horas. A endometrite se instala de forma exacerbada quando há uma falha em algum desses mecanismos naturais de defesa (3). Éguas que apresentam inflamação persistente tipicamente apresentam vários fatores predisponentes, como uma conformação perineal alterada, idade avançada, localização uterina fora dos padrões anatômicos ou uma falha no “clearance” uterino devido a uma contração miometrial deficiente (1).

Assim, após o contato do sêmen com o útero, ocorre uma forte reação inflamatória entre 4 e 24 horas (1). O pico da reação ocorre entre 6 e 12 horas, e

esta decresce entre 24 e 48 horas (4).

O estudo de Troedsson (5) relata que durante a realização do exame ginecológico pode ser difícil identificar éguas susceptíveis antes da cobertura. Alguns animais apresentam líquido livre no lúmen uterino antes da cobertura, mas a maioria destes não o apresenta até que sejam cobertos. Se há suspeita de EPPC, a égua deve ser monitorada por ultrassonografia transretal de 6 até 48 horas após cobertura.

Assim, os animais acometidos pela EPPC podem apresentar alta contagem de leucócitos, aumento do fluxo sanguíneo uterino, edema uterino com acúmulo de fluido, útero distendido e flácido, ciclo estral com menor duração (devido à regressão precoce do corpo lúteo) (6), histórico de repetição de cio e cultura endometrial positiva (7).

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta inflamatória uterina após inseminação artificial em éguas resistentes e susceptíveis à endometrite, a fim de facilitar a detecção dos animais susceptíveis e assim auxiliar o útero na limpeza de produtos inflamatórios e contaminantes após a cobertura para manter os níveis de prenhez em níveis satisfatórios.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção dos animais e local da pesquisa

Foram utilizadas 23 éguas, sem raça definida, com peso médio entre 300 e 400 kg e idade entre 5 e 18 anos. Os animais pertenciam à FMVZ – UNESP Botucatu, e estavam situados no Posto de Monta desta instituição, latitude 22°53'09'', altura 804 metros. Todos os animais apresentavam ótimo estado de condição corporal e foram alimentados diariamente com ração e feno e receberam sal mineral e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em duas categorias: 15 éguas susceptíveis, com idade maior que 10 anos, sendo duas éguas com 6 anos, apresentando histórico de acúmulo de fluido intra-uterino após a cobertura por mais de 24 horas após IA, determinado por ultrassonografia e baixa taxa de recuperação embrionária (<30%), e 8 éguas resistentes, com idade inferior a 10 anos sem qualquer tipo de alteração no aparelho reprodutivo, que não apresentavam histórico de acúmulo de líquido e queda na taxa de fertilidade.

Colheita de sêmen e preparo das doses inseminantes

A colheita de sêmen foi realizada com o auxílio da vagina artificial modelo Botucatu. Imediatamente após a obtenção do sêmen foi retirada a fração gel através de filtração e o sêmen foi diluído com produto comercial a base de leite desnatado Botu-semen[®] (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil) na proporção de 1:1 (o mesmo produto foi utilizado para todas as amostras de sêmen utilizadas). Após a diluição, a motilidade dos espermatozóides foi mensurada através de análise computadorizada (Hamilton Thorne Research, Danvers, USA) e a concentração mensurada através da câmara de Neubauer. Após esses procedimentos, foram separadas doses contendo 800×10^6 de espermatozóides totais.

Inseminações artificiais

As éguas resistentes e as susceptíveis foram inseminadas em ciclos estrais consecutivos com o mesmo garanhão, utilizando-se sêmen fresco com uma dose de 800 milhões de espermatozóides totais.

Ao se detectar um folículo de 35 milímetros e edema uterino compatível, as éguas foram induzidas à ovulação com 1 miligrama de acetato de deslorelina intramuscular. Cada animal foi inseminado uma vez por ciclo com 800 milhões de espermatozóides totais. Nos ciclos em que a ovulação não ocorreu dentro do período desejado, as colheitas foram descartadas e o ciclo estral, desconsiderado.

Colheita e processamento do material uterino

Foram realizadas citologias exfoliativas uterinas 24 horas antes da IA, e 24 horas após a IA. As coletas foram feitas com o auxílio de um aparelho para coleta de citologia uterina equina, cuja função é proteger a escova ginecológica do contato com o ambiente vaginal e cervical da fêmea, além de facilitar sua entrada no útero, como foi descrito por Alvarenga & Iwana de Matos (8) Após a coleta, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e coradas pelo método Panótico Rápido. A leitura das amostras foi feita através de microscopia óptica utilizando imersão (1000x), considerando a porcentagem de neutrófilos/100 células de forma aleatória.

Foram realizados exames ultrassonográficos 24 horas antes da IA e 24 horas após, a fim de se detectar a presença de fluido uterino acumulado na região de bifurcação dos cornos uterinos e mensuração do mesmo. Em tais momentos, foi realizada a coleta da secreção uterina através de um tampão de algodão (absorvente feminino modelo mini - OB® - Johnson & Johnson), utilizando um aplicador especialmente preparado de aço inox. Para facilitar a remoção do tampão, o mesmo teve seu puxador aumentado com fio cordonê grosso estéril. A retirada do tampão ocorreu após 30 minutos através da introdução da mão enluvada via vaginal e tração do fio cordonê, mantendo-o protegido do contato com o canal vaginal da égua. Imediatamente após a retirada do tampão do interior do útero o mesmo foi colocado em uma seringa estéril até a total liberação do líquido absorvido em um tubo estéril. A partir desta amostra foi separada uma alíquota para obtenção da concentração de neutrófilos/mililitros (mL) em câmara de Neubauer e microscopia óptica.

Em algumas éguas, não foi possível recuperar fluido uterino nos momentos antes da IA, desta maneira, tais animais não foram utilizados na mensuração da concentração de células PMNs no fluido uterino.

Análise estatística

Para os valores da concentração de células polimorfonucleares no fluido uterino, porcentagem de neutrófilos na citologia uterina e acúmulo de fluido analisado através de exame ultrassonográfico, nos diferentes momentos e grupos de éguas foram realizados os cálculos das médias e desvio padrão e os dados pré e pós IA foram comparados através do teste T pareado, utilizando o Programa GraphPad InStat 3®. O nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

Ao se comparar as duas categorias de éguas, no momento pré inseminação artificial, não houve diferença estatística ($p>0,05$) em todos os parâmetros avaliados (concentração de PMNs no fluido uterino, porcentagem de PMNs na citologia exfoliativa uterina e acúmulo de fluido observados no exame ultrassonográfico) (Tabela 1 e figuras 1,2 e 3).

Tabela 1. Médias e desvio padrão do número de células polimorfonucleares no fluido uterino (PMN`s; n resistentes=7; n susceptíveis =12); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT) e quantidade de fluido uterino (FLU) entre éguas susceptíveis (n=15) e resistentes (n=8) 24 horas antes da inseminação artificial.

PRÉ IA	RESISTENTES	SUSCEPTIVEIS
PMN'S (células x 10 ³ /ml)	237,86 ± 219,5 ^a	406,4 ± 416,6 ^a
CIT (%)	2,25 ± 1,6 ^a	6 ± 12,4 ^a
FLU (mm)	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (p<0,05).

Após a IA, a concentração de PMNs no fluido uterino, porcentagem de PMNs na citologia exfoliativa uterina e acúmulo de fluido observados no exame ultrassonográfico foram estatisticamente diferentes (p<0,05) entre as duas categorias de éguas, apresentando valores maiores para as éguas susceptíveis (Tabela 2 e figuras 1, 2 e 3).

Tabela 2. Médias e desvio padrão do número de células polimorfonucleares no fluido uterino (PMN`s; n resistentes=7; n susceptíveis=12); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT) e quantidade de fluido uterino (FLU) entre éguas susceptíveis (n=15) e resistentes (n=8) 24 horas após inseminação artificial.

PÓS IA	RESISTENTES	SUSCEPTIVEIS
PMN'S (células x 10 ³ /ml)	611,43 ± 324,8 ^a	3536,25 ± 3626,6 ^b
CIT (%)	26,63 ± 10,7 ^a	69,93 ± 12,5 ^b
FLU (mm)	0,25 ± 0,7 ^a	11,07 ± 6,6 ^b

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si (p<0,05).

Comparando-se os momentos pré e pós inseminação artificial na categoria de éguas resistentes, foi observado aumento significativo (p<0,05) na concentração de PMNs no fluido uterino e na porcentagem de PMNs na citologia exfoliativa uterina,

enquanto que a quantidade de fluido uterino mensurada na ultrassonografia não apresentou diferença estatística entre os momentos ($p>0,05$) (Tabela 3 e figuras 1,2 e 3).

Tabela 3. Médias e desvio padrão das células polimorfonucleares no fluído uterino (PMN's n=7); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT; n=8) e quantidade de fluido uterino (FLU; n=8) nas éguas resistentes 24 horas antes e 24 horas após a inseminação artificial.

RESISTENTES	Pré IA	Pós IA
PMN's (células x 10^3 /ml)	237,86 ± 219,5 ^a	611,43 ± 324,8 ^b
CIT (%)	2,25 ± 1,6 ^a	26,63 ± 10,7 ^b
FLU (mm)	0 ± 0 ^a	0,25 ± 0,7 ^a

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p<0,05$).

Já nos animais susceptíveis, todos os parâmetros aumentaram e diferiram significativamente após a inseminação artificial ($p<0,05$) (Tabela 4 e figuras 1,2 e 3).

Tabela 4. Médias e desvio padrão das células polimorfonucleares no fluído uterino (PMN's n=12); porcentagem de polimorfonucleares na citologia uterina (CIT n=15) e quantidade de fluido uterino (FLU n=15) nas éguas susceptíveis 24 horas antes e 24 horas após a inseminação artificial.

SUSCEPTÍVEIS	Pré IA	Pós IA
PMN's (células x 10^3 /ml)	406,42 ± 416,6 ^a	3536,2 ± 3626,6 ^b
CIT (%)	6,0 ± 12,4 ^a	69,93 ± 12,5 ^b
FLU (mm)	0 ± 0 ^a	11,07 ± 6,6 ^b

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p<0,05$).

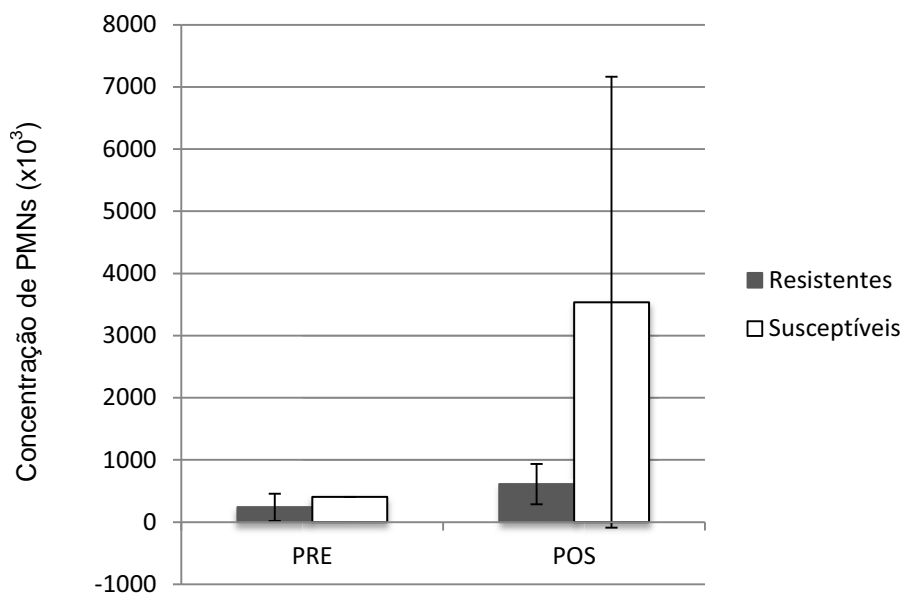


Figura 1. Médias e desvio padrão da concentração ($\times 10^3/\text{mL}$) de células polimorfonucleares no fluido uterino (PMN's) nos momentos 24 horas pré (PRE) e 24 horas após (POS) inseminação artificial, nas éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à endometrite persistente.

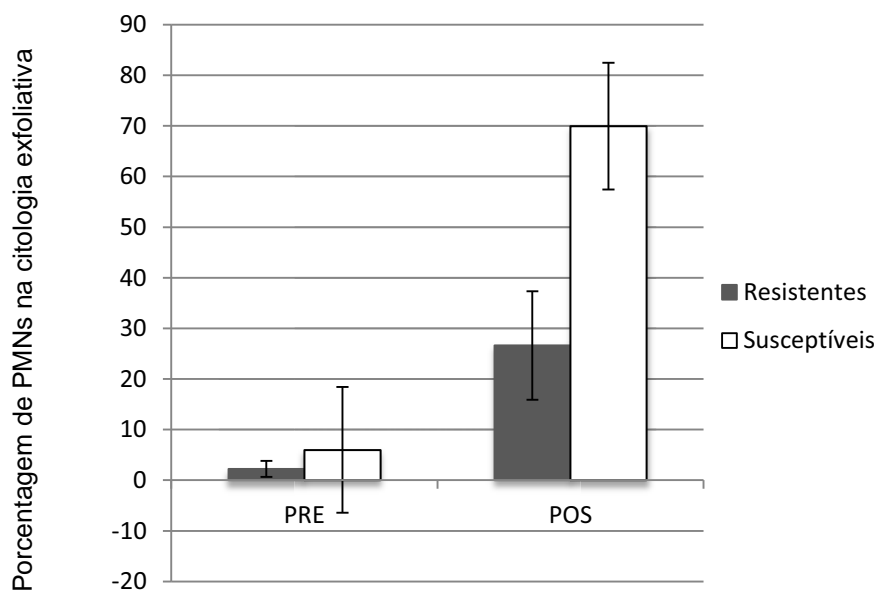


Figura 2. Médias e desvio padrão da porcentagem de células polimorfonucleares na citologia uterina nos momentos 24 horas pré (PRÉ) e 24 horas após (PÓS) inseminação artificial, nas éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à endometrite persistente.

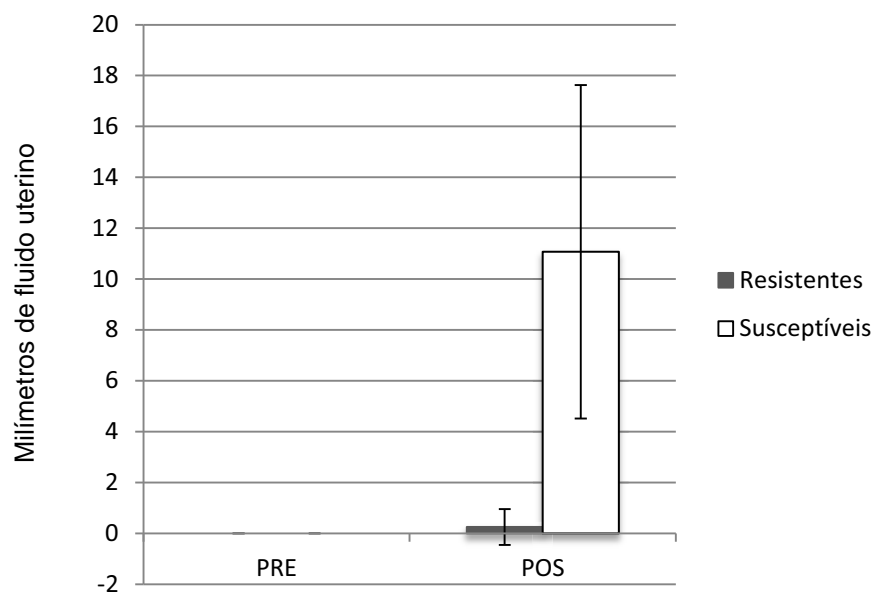


Figura 3. Médias e desvio padrão da quantidade de fluido uterino avaliada na ultrassonografia (mm), nos momentos 24 horas pré (PRÉ) e 24 horas após (PÓS) inseminação artificial, nas éguas resistentes (Resistentes) e susceptíveis (Susceptíveis) à endometrite persistente.

DISCUSSÃO

A contaminação bacteriana ou espermática provoca uma rápida infiltração de PMNs no lúmen uterino após a IA ou monta natural. Este processo inflamatório a princípio é benéfico; contudo, se for exacerbado e /ou persistir por um período de tempo superior ao esperado pode prejudicar a função espermática no caso de uma segunda inseminação artificial ou cobertura, causar luteólise prematura, assim como pode interferir na viabilidade embrionária após migração do embrião para o útero, devido aos efeitos tóxicos do conteúdo uterino.

O objetivo do presente trabalho foi comparar a resposta inflamatória uterina através da concentração de células polimorfonucleares no fluido uterino, o percentual de polimorfonucleares na citologia exfoliativa uterina e o acúmulo de fluido intrauterino avaliado através de ultrassonografia 24 horas antes e 24 horas após a inseminação artificial em éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente pós cobertura.

Os resultados do presente experimento mostraram que o fluido uterino mensurado durante o exame ultrassonográfico aumentou significativamente 24 horas após a inseminação artificial nas éguas susceptíveis quando comparadas às éguas resistentes, dados condizentes com os encontrados por Fioratti (9), o qual observou um acúmulo de praticamente o dobro da quantidade de fluido nas éguas susceptíveis, e com Troedsson (5), que relata que quando há presença de fluido uterino no período maior que 12 horas após a inseminação artificial, a égua pode ser considerada como susceptível à endometrite pós cobertura. Troedsson e Liu (10) relataram que as éguas susceptíveis acumularam até seis vezes mais fluido no útero após desafio bacteriano do que as éguas resistentes.

A porcentagem de neutrófilos presentes em uma amostra de citologia uterina é usada para determinar o grau da inflamação presente no útero. No presente experimento foi utilizada a classificação realizada por Brook (11), na qual a presença de menos do que 5% de neutrófilos é indicativo de um endométrio não inflamado, de 5 a 15% uma inflamação discreta, de 15 a 30% uma inflamação moderada e acima de 30% uma inflamação severa.

O influxo de células PMNs nos tecidos é o marco da resposta inflamatória aguda. Segundo Katila (12), os primeiros neutrófilos entram no útero 1 hora após a inseminação artificial, tendo seu pico entre 6 e 12 horas. Em éguas resistentes à endometrite, os PMNs tem seu número reduzido gradualmente até 48 horas após a inseminação, o que não ocorre com os animais susceptíveis, que mantêm seus níveis de neutrófilos elevados por um período de tempo mais longo. Estes dados corroboram com os achados do presente experimento, no qual 24 horas após a inseminação artificial, as éguas susceptíveis apresentaram número de neutrófilos bastante elevados, indicando um processo inflamatório ativo, diferentemente das éguas resistentes, que apresentaram relação neutrófilos/células endometriais significativamente menor quando comparadas às éguas susceptíveis. Tais achados concordam com os achados de Katila (12), e discordam dos achados de Liu et al. (13), no qual ambas as categorias não apresentaram diferenças na migração de células polimorfonucleares para o útero. Portanto, no presente estudo, o processo inflamatório uterino foi mais intenso nas éguas susceptíveis do que nas resistentes.

Verificou-se ainda, neste estudo, a presença de neutrófilos por citologia exfoliativa antes da inseminação artificial, tanto no grupo de éguas resistentes, como no de éguas susceptíveis. As éguas resistentes apresentaram tais neutrófilos, numa proporção aceitável para o período de estro, e algumas susceptíveis apresentaram esses valores mais elevados, porém sem acúmulo de líquido no interior do útero, dados que estão de acordo com os encontrados por Fioratti (9). Nikolakopoulos & Watson (14) observaram uma pequena população de neutrófilos no útero em éguas controle, que fazem parte do ambiente uterino normal.

A presença de espermatozóides no útero resulta em um processo inflamatório no local, resultando em alteração na permeabilidade dos vasos sanguíneos e liberação de fatores quimiotáticos que provocam influxo de neutrófilos no local agredido (15). No presente estudo, observou-se que a quantidade de células PMNs recuperadas no fluido uterino foi significativamente maior nas éguas susceptíveis quando comparadas às resistentes, concordando com o estudo de Fioratti(9), após a inseminação artificial. A concentração elevada de tais células inflamatórias nos animais susceptíveis 24 horas após a IA corrobora com os achados de Katila (12), mostrando uma resposta inflamatória exacerbada na categoria de éguas susceptíveis, e de Nikolakopoulos & Watson (16) que estudaram a resposta inflamatória em éguas resistentes e susceptíveis à EPPC após IA e monta natural, e observaram que o fluido recuperado dos animais susceptíveis se apresentava mais turvo do que o das éguas resistentes, demonstrando assim o maior número de células presentes, através da intensa neutrofilia detectada na secreção uterina.

Segundo Trimbos & Arentz (17), está bem estabelecido que o material obtido pela escova cervical é melhor preservado e apresenta mais células do que o coletado através do “swab” de algodão, pois neste caso pode haver aderência das células nas fibras de algodão e a pressão aplicada no momento da coleta das células também pode influenciar no diagnóstico. Walter et al. (18), comparando-se a técnica de citologia feita através de swab uterino com a escova cervical, relatou que, neste último, deformações celulares eram raras e os PMNs foram detectados mais frequentemente quando comparados com o uso do swab, concordando com os achados de Bourke et al. (19), que utilizou swab de algodão e escova citológica, e concluiu que esta última apresentou resultados mais confiáveis. No material coletado com a escova cervical, há possibilidade de serem recuperadas células inflamatórias que estão na superfície do endométrio e que não

tenham migrado para a luz uterina, o que pode justificar as diferenças encontradas entre as duas técnicas no presente trabalho. Segundo Cocchia et al. (20), a técnica de citologia utilizando-se escova ginecológica resultou em menor distorção das células comparadas com técnicas de recuperação de células através de lavado uterino, discordando dos resultados de Leblanc et al. (21), que considera a técnica de recuperação de pequena quantidade de fluido uterino como um método preciso em identificar éguas que apresentam endometrite crônica.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados, e nas condições em que o experimento foi realizado, podemos concluir que o processo inflamatório uterino após a inseminação artificial foi mais intenso nas éguas susceptíveis do que nas éguas resistentes.

REFERÊNCIAS

1. Card C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*. 2005; 64:580-8.
2. Troedsson MHT. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*. 1999; 52:461-71.
3. Leblanc MM. Persistent mating-induced endometritis. In: ROBINSON, N.E. *Current therapy in equine medicine*. 5.ed. St. Louis: Elsevier Science, 2003; 234-7.
4. Troedsson MHT. Uterine defense mechanisms in the mare. *Archives of Std/Hiv Research*. 1994; 8:259-69.
5. Troedsson MHT. Breeding-induced endometritis in mares. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 2006; 22:705-12.
6. Morel MCGD. *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Study Management*. 3 ed. Oxon: CAB International, 2003; 287.
7. Bucca S, Carli A, Buckley T, Dolci G, Fogarty U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. *Theriogenology*. 2008; 70:1093-1100.
8. Alvarenga MA, Iwana de matos MC. Utilização da escova ginecológica cytobrush na coleta de material endometrial de éguas. *Arq Bras Med Vet Zoot*. 1990; 42:67-8.
9. Fioratti EG. Efeito dos anti-inflamatórios esteróides na reação inflamatória e na fertilidade de éguas normais e susceptíveis à endometrite persistente após inseminação artificial. [Dissertação] Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2010.
10. Troedsson MHT, Liu IKM. Measurement of total volume and protein concentration of intrauterine secretion after intrauterine inoculation of bacteria in mares that were either resistant or susceptible to chronic infection. *American Journal Vet. Res*. 1992; 53:1641-44.
11. Brook D. Uterine cytology. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (ed). *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 246-53.
12. Katila T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biol Reprod Monograph Series*. 1: Equine Reproduction 1995; 1: 515-17.
13. Liu IKM, Cheung ATW, Walsh EM, Ayin S. The functional competence of uterine-derived polymorpho-nuclear neutrophils (PMN) from mares resistant and susceptible to chronic uterine infection: a sequential migration analysis. *Biol Reprod*. 1986; 35: 1168-74.

14. Nikolakopoulos E, Watson ED. Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. *Equine Vet J.* 2000;32:164–6.
15. Palm F, Walter I, Budik S, Aurich C. Influence of different semen extenders and seminal plasma on the inflammatory response on the endometrium in estrous mares. *Anim Reprod Sci.* 2006; 94: 286-9.
16. Nikolakopoulos E, Watson ED. Does artificial insemination with chilled, extended semen reduce the antigenic challenge to the mare's uterus compared with natural service? *Theriogenology.* 1997;47:583-90.
17. Trimbos JB, Arentz NP. The efficiency of the cytobrush versus the cotton swab in the collection of endocervical cells in cervical smears. *Acta Cytol.* 1986;30:261-3.
18. Walter J, Neuberg KP, Failing K, Wehrend A. Cytological diagnosis of endometritis in the mare: investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. *Anim Reprod Sci.* 2012;132:178-86.
19. Bourke M, Mills JN, Barnes AL. Collection of endometrial cells in the mare. *Aust Vet J.* 1997;75:755-8.
20. Cocchia N, Paciello O, Auletta L, Uccello V, Silvestro L, Mallardo K, Paraggio, G, Pasolini MP. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology.* 2012;77:89-98.
21. Leblanc MM, Magsig J, Stromberg AJ. Use of a low uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology.* 2007;68: 403-12.

Normas da Revista Veterinária e Zootecnia

• Artigos Científicos

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;

Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço simples, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.

Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara, objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a **forma de tabelas**, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a **forma de figuras**, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figura.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados,

confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e na discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

Referências e Citações

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus* disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>.

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço simples, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas no decorrer do texto. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.