

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA DE ÉGUAS COM
ENDOMETRITE PERSISTENTE PÓS-COBERTURA TRATADAS COM
FIROCOXIB**

Aimé de Medeiros Friso

Botucatu - SP
Dezembro/2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE
PERSISTENTE PÓS-COBERTURA TRATADAS COM FIROCOXIB**

AIMÉ DE MEDEIROS FRISO

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Adj. Marco Antonio Alvarenga

Botucatu - SP
Dezembro/2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Friso, Aimé de Medeiros.

Resposta inflamatória uterina de éguas com endometrite persistente pós-cobertura tratadas com firocoxib / Aimé de Medeiros Friso. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Capes: 50504002

1. Endometrite - Fisiopatologia. 2. Agentes anti-inflamatórios. 3. Equino - Inseminação artificial. 4. Endométrio.

Palavras-chave: Anti-inflamatório não esteroidal; Endométrio; Equino; Resposta inflamatória.

Nome do autor: AIME DE MEDEIROS FRISO

Título: RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA DE ÉGUAS COM
ENDOMETRITE PERSISTENTE PÓS-COBERTURA TRATADAS COM
FIROCOXIB

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Junior

Membro interno

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

PhD. Márcio Teoro do Carmo

Membro externo

-Botucatu /SP

Data da Defesa: 15 de dezembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Airton e Lucina por todo apoio, dedicação, carinho e amizade,

São os maiores e melhores exemplos que a vida me deu

Agradeço ao meu companheiro de vida Henrique, que sempre me apoiou e esteve presente em todos momentos, mesmo com alguns quilômetros de distância

Agradeço a minha família de amigos de Botucatu, que aos poucos foi crescendo e hoje somos muito mais que simples colegas, somos irmãos. Obrigada por todos os momentos, por todas as conversas, todo carinho trocado, todos foram fundamentais

Agradeço ao meu orientador Prof Dr Marco Alvarenga por todo auxílio, dedicação e ensinamentos

Agradeço aos demais professores do departamento de reprodução animal por todo auxílio e colaboração com a minha formação

Agradeço as funcionários da instituição pela colaboração

Agradeço aos animais, que são a razão do meu trabalho

Agradeço a CAPES pela bolsa durante o período do mestrado

Muito Obrigada a todos!!

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Lado esquerdo representando a cintilografia de uma égua normal reprodutivamente, e lado direito representando uma égua com atraso na limpeza uterina. A cérvix, o corno uterino e a vagina são rotulados como o ângulo u-c. 7
- FIGURA 2.** Reconhecimento das células espermáticas e dos patógenos pelas células sentinelas com posterior liberação dos PAMPS e produção de LPS, que se ligam a receptores do tipo toll-like desencadeando a transcrição genica de fatores pró-inflamatórios pelo NF-κB..... 9
- FIGURA 3.** Cascata do ácido araquidônico com a liberação das prostaglandinas que atuarão na resposta inflamatória 13
- FIGURA 4.** Recrutamento de neutrófilos para os locais de inflamação 13

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
cm	Centímetros
COX	Cicloxigenase
CTM	Células tronco mesenquimais
EGF	Fator de crescimento epidermal
EPMB	Extrato de parede de <i>mycobacterium</i>
EPPC	Endometrite persistente pós-cobertura
hCG	Gonadotrofina coriônica equina
IA	Inseminação artificial
ICAM-1	Glicoproteína de membrana-1
IFNγ	Interferom gama
Ig	Imunoglobulina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
IL-1	Interleucina-1
IL-1(ra)	Interleucina-1 (receptor antagonista)
IL-1α	Interleucina -1alfa
IL-1β	Interleucina- 1beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
iNOS	Óxido nítrico induzível sintetase
LAF1	Integria-1
LF	Lactoferrina
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB₄	Leucotrienos
NF-κB	Fator nuclear kappa-B
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos

PG	Prostaglandina
PGD2	Prostaglandina D2
PGE	Prostaglandina E
PGF2α	Prostaglandina 2 α
PGFM	13,14-di-hidro-15-ceto prostaglandina 2 alfa
PGG2	Prostaglandina G2
PGH2	Prostaglandina H sintetase 2
PGI	Prostaglandina I
PMNs	Polimorfonucleares
PRP	Plasma rico em plaquetas
SAA	Soro amiloide
SCA	Soro condicionado autólogo A
TE	Transferência de embrião
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
TLRs	Receptores Toll-like
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TxA	Tromboxano A
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VLA-4	Integrina-4

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Endometrite persistente pós-cobertura	3
2.1.1 Interação do sêmen com o endométrio	3
2.1.2 Éguas resistentes e susceptíveis a endometrite pós-cobertura	4
2.2 Mecanismos de defesa uterina	5
2.2.1 Barreiras físicas.....	5
2.2.2 Contrações uterinas	5
2.2.3 Resposta inflamatória uterina	7
2.3 Ativação da resposta imune	8
2.3.1 Resposta imune adaptativa	11
2.3.2 Recrutamento dos leucócitos para o local da infecção	11
2.3.3 Componentes da resposta imune avaliados em éguas susceptíveis e resistentes a endometrite	13
2.4 Possíveis tratamentos para a endometrite persistente pós-cobertura	14
2.4.1 Fármacos Ecbólicos	14
2.4.2 Lavagem Uterina	16
2.4.3 Imunomoduladores.....	17
2.4.4 Anti-inflamatórios não esteroidais.....	20
2.4.4.1 Firocoxib	23
3. REFERÊNCIAS	24
HIPÓTESE	34
OBJETIVOS	34
ARTIGO	36
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52

RESUMO

FRISO, A. M. RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE PERSISTENTE PÓS-COBERTURA TRATADAS COM FIROCOXIB. Botucatu – SP. 2016, p.52. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista

A endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) é uma afecção que acomete uma parcela significativa das éguas que estão em programas de reprodução. Em vista disso, o objetivo desta revisão de literatura foi abordar a fisiopatologia da EPPC e seus tratamentos. Após a cobertura ou inseminação artificial (IA) é fisiológico que ocorra inflamação no interior do útero a fim de promover a limpeza uterina e drenagem dos debris celulares e contaminantes. Éguas que são susceptíveis a EPPC permanecem com acúmulo de líquido uterino e elevado infiltrado neutrofílico no interior do útero por mais de 36 horas após o contato com o sêmen. Para que essas fêmeas possam ser utilizadas na reprodução e se obtenha índices de fertilidade aceitáveis é necessário controlar a inflamação, oferecendo um ambiente uterino adequado para o embrião. A maioria dos tratamentos usados para as éguas com EPPC são paliativos, como a utilização de fármacos ecbólicos e lavagem uterina para auxiliar na retirada do líquido e os polimorfonucleares (PMNs) acumulados no interior do útero. Outros tratamentos tem sido sugeridos, como os imunomoduladores que atuam bloqueando a resposta inflamatória inicial, evitando a liberação de mediadores inflamatórios. Recentemente tem sido mencionada a utilização de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) para o tratamento de éguas susceptíveis, que atuam bloqueando a cicloxigenase (COX) interrompendo assim liberação das prostaglandinas (PGs) que são as causadoras do processo inflamatório. Um dos AINEs utilizado em equinos para o tratamento de outras alterações é o firocoxib, por ser seletivo a COX-2, não atua sobre a COX-1, evitando os efeitos adversos por essa via fisiológica. Esse medicamento pode se tornar uma opção para o tratamento de EPPC após ser comprovada sua eficiência.

Palavras-chave: Anti-inflamatório não esteroidal, equino, endométrio, resposta inflamatória.

ABSTRACT

FRISO, A. M. INFLAMMATORY UTERINE RESPONSE OF MARES WITH PERSISTENT POST BREEDING ENDOMETRITIS TREATED WITH FIROCOXIB. Botucatu – SP. 2016, p.52. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The persistente post-breeding endometritis (PPBE) is one pathology that affects significant part of the mares that are in breeding programs. The objective of this study was to make a literature review on the PMIE and their possible treatments. After mating or artificial insemination (AI) an physiological inflammation happens inside the uterus for uterine cleaning and drainage of cellular debris and contaminants. Mares that are susceptible to this type of endometritis can not make the proper uterine cleaning and remain with accumulated fluid and a high neutrophilic infiltrate inside the uterus for more than 36 hours after contact with semen. For that these females can be used for reproduction and be able to get acceptable fertility rates is necessary the control of this inflammation, offering a suitable uterine environment for the embryo. Most treatments that are used for PMIE mares are palliative, such as the use of ecbolic drugs and uterine wash to aid in removal of liquid and polymorphonuclear (PMNs) accumulated in the uterus. Other treatments have been suggested, such as the immunomodulatory treatment that act by blocking the initial inflammatory response, preventing the release of inflammatory mediators. Recently it has been mentioned the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for the treatment of susceptible mares, working by blocking the cyclooxygenase (COX) and interrupting the release of prostaglandins (PGs) that are the cause of the inflammatory process. A NSAID used in horses for treatment of other pathologies is firocoxib, being a selective COX-2 drug that has no effect on COX-1, avoiding the adverse effects by this

physiological route. This medicine may become an option for the treatment of PMIE after proven effectiveness tests.

Keywords: Non-steroidal anti-inflammatory, equine, endometrium, inflammatory response

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Com a grande valorização econômica dos cavalos de genética comprovada e boa funcionalidade, os criadores procuram otimizar ao máximo a eficiência reprodutiva desses animais, na maioria das vezes, utilizando as biotecnologias da reprodução. No caso das fêmeas, uma das biotecnologias utilizadas é a transferência de embrião (TE), em que se consegue produzir vários potros durante o ano, filhos de uma mesma égua.

Devido à excessiva manipulação do trato reprodutivo e as repetidas IAs das fêmeas que estão em programas de TE, que na sua maioria são éguas de idade avançada, ocorre um aumento das desordens uterinas com consequente comprometimento da fertilidade. Como consequência, é comumente relatada a queda na taxa de concepção, aumento do número de serviço por concepção e sobrevivência embrionária prejudicada, levando a um grande prejuízo econômico aos criadores.

Após a monta natural ou IA, ocorre uma inflamação uterina fisiológica transitória em resposta ao sêmen, fazendo com que o conteúdo presente no útero seja eliminado pelas contrações miométriais e o ambiente uterino fique em condições adequadas para a chegada do embrião (TROEDSSON, 1999).

Em algumas fêmeas essa inflamação uterina torna-se exacerbada e com intensa migração de PMNs para interior do útero e a inflamação não é controlada entre 36 e 48h após o coito como nas éguas normais (KATILA, 1995). Essa afecção é chamada de EPPC e geralmente acomete éguas mais velhas com as características anatômicas já alteradas, com posicionamento pendular do útero na cavidade abdominal devido ao afrouxamento dos ligamentos, circulação linfática falha e produção de poucas e anormais contrações uterinas após a monta natural ou IA (LEBLANC et al., 1994; LEBLANC et al., 1998).

Para que esses animais possam permanecer nos programas de reprodução e se consiga controlar essa inflamação uterina persistente, vários estudos já foram realizados. Os tratamentos utilizados visam auxiliar a limpeza do útero após a cobertura, sendo apenas uma medida paliativa, não atuando diretamente na causa da inflamação.

Alguns estudos têm demonstrado que a imunomodulação da resposta inflamatória anteriormente ou após a cobertura é capaz de melhorar as taxas de prenhez, já que há atuação diretamente nos mediadores inflamatórios, impedindo uma resposta exacerbada e persistente (FUMUSO et al., 2003; DELL AQUA JR et al., 2006; BUCCA et al., 2008).

Pesquisas vêm sendo realizadas com a utilização de AINEs para atuar diretamente no bloqueio da COX, principalmente com medicamentos seletivos para COX-2, interrompendo a cascata inflamatória e a produção de prostaglandinas, que são responsáveis pelo processo inflamatório, e ainda produzindo poucos efeitos adversos ao organismo do animal (CLARK, 2006).

Alguns dos resultados obtidos mostraram que os AINEs podem evitar que ocorra o desenvolvimento da EPPC em éguas com atraso de limpeza uterina após a IA e também podem levar a uma diminuição da expressão de COX-2 no estrato compacto do endométrio mostrando sua ação anti-inflamatória (AURICH et al., 2010; VILÉS et al., 2013).

O objetivo desta revisão de literatura foi abordar a fisiopatologia da EPPC e os tratamentos que já foram estudados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Endometrite persistente pós-cobertura

2.1.1 Interação do sêmen com o endométrio

Na monta natural e na inseminação artificial o sêmen é igualmente depositado no corpo uterino. Com a chegada dos espermatozoides ao útero ocorre um processo denominado quimiotaxia que ordena um influxo de PMNs (Polimorfonucleares) para o lúmen uterino (KOTILAINEN et al., 1994).

Essa resposta inflamatória tem o intuito de destruir os microrganismos e retirar do interior do útero os espermatozoides mortos e as sujidades que permaneceram no local. Os PMNs fagocitam as bactérias e as células espermáticas mortas. Além disso, outras ações se iniciam, como a cascata do ácido araquidônico ocorrendo a liberação de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) que induzirá à contrações uterinas proporcionando a drenagem do conteúdo em

direção a cérvix e pela circulação linfática (TROEDSSON et al., 1993; TROEDSSON et al., 1999). Os PMNs chegam ao lúmen uterino em meia hora após a deposição do sêmen no útero e a inflamação é controlada em torno de 36 a 48 horas após a cobertura ou IA na maioria das éguas, propiciando um ambiente adequado para o embrião no momento de sua migração para o útero (KATILA, 1995).

Essa resposta inflamatória é denominada como endometrite induzida pela cobertura e é um processo fisiológico nas éguas, sendo eficaz na remoção dos contaminantes e excesso de espermatozoides (TROEDSSON, 2006).

2.1.2 Éguas resistentes e susceptíveis a endometrite pós-cobertura

Animais resistentes a endometrite conseguem conter a inflamação uterina em até 48 horas pós-cobertura. No entanto, um grupo de éguas não consegue resolver o processo inflamatório naturalmente, apresentando falhas na limpeza uterina (BRITO; BARTH, 2003). A endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) prejudica a fertilidade e ameaça a viabilidade do embrião ao chegar no útero (OGURI; TSUTSUMI, 1972; BETTERIDGE et al., 1982). Segundo Troedsson (1999) a EPPC é uma das principais causas da redução de fertilidade em éguas.

Vários fatores que caracterizam a endometrite persistente e que contribuem para que ela ocorra são amplamente estudados. A idade avançada das éguas tem sido correlacionada por vários autores com a susceptibilidade à doença. Com o passar dos anos e com um elevado número de partos, as éguas apresentam posicionamento horizontal da vulva e o posicionamento do útero se modifica tornando-se pendular na cavidade abdominal devido ao afrouxamento dos ligamentos. Alterações cervicais e contratilidade endometrial deficiente acabam dificultando a drenagem do conteúdo que se acumula no lúmen uterino após a inseminação ou coito (HEMBERG et al., 2005; LEBLANC et al., 1994; LEBLANC et al., 1998; LEBLANC, 2003; CARD, 2005).

É sugerido que nas éguas susceptíveis a inflamação uterina o endométrio apresente diversas alterações como elevado grau de fibrose e alteração da circulação linfática (WOODWARD et al., 2012).

2.2 Mecanismos de defesa uterina

2.2.1 Barreiras físicas

Para que o lúmen uterino se mantenha protegido, livre de sujidades e contaminantes é necessário que as barreiras físicas como a vulva, o vestibulo e o colo uterino estejam funcionais e impeçam que ocorra uma infecção uterina. Essas barreiras não influenciaram no caso da inseminação artificial ou coito em que o sêmen é depositado no interior do útero (PASCOE, 1979; HINRICHS et al., 1988; CASLICK, 1937).

2.2.2 Contrações uterinas

As contrações uterinas são importantes após inseminação artificial ou monta natural para inicialmente conduzir as células espermáticas até o local da fertilização e posteriormente fazer a limpeza uterina eliminando pela cérvix as células espermáticas mortas e os contaminantes. A frequência das contrações uterinas move o sêmen para frente e para trás entre o corpo e os cornos uterinos durante a primeira meia hora. Passadas quatro horas após a inseminação a maioria dos espermatozoides foram eliminados para fora do útero das éguas sadias (KATILA, 1995).

Éguas que são suscetíveis a EPPC têm atraso da limpeza uterina. As razões para essa queda na atividade do miométrio permanecem obscuros. Rigby et al. (2001) observaram uma disfunção contrátil do miométrio em éguas que tinham uma limpeza uterina retardada e que a disfunção não foi dependente de idade e do número de partos. Foi demonstrado que as éguas resistentes à EPPC têm contrações uterinas mais longas e mais intensas do que as éguas que apresentam limpeza uterina atrasada e que as contrações miometriais de éguas resistentes tendem a ocorrer em direção à cérvix, facilitando a eliminação do conteúdo acumulado no lúmen uterino, enquanto que em éguas susceptíveis, essas contrações acontecem na direção oposta (REITZENSTEIN et al., 2002).

Troedsson et al.(1993) verificaram um aumento visível da eletricidade do miométrio em todas as éguas (resistentes e susceptíveis) após a infusão de

bactérias no útero. No entanto, as éguas resistentes apresentaram maior atividade miométrial do que as susceptíveis. Leblanc et al. (1998) utilizaram a cintilografia para demonstrar o posicionamento uterino de éguas normais e de éguas que acumulavam líquido no interior do útero após cobertura. Esse estudo demonstrou que éguas que apresentavam a cérvix mais vertical e o útero inclinado ventralmente em relação ao assoalho pélvico foram predispostas a reter líquido no interior do útero após acasalamento (Figura 1).

Nikolakopoulos et al.(2000) avaliaram a concentração de ocitocina e de 13,14-di-hidro-15-ceto PGF2 α (PGFM) após a IA de éguas resistentes e susceptíveis, e observaram um aumento significativo nas concentrações de ocitocina em ambas as fêmeas, não havendo diferença significativa na liberação de ocitocina entre os dois grupos de éguas. No entanto, as concentrações médias de PGFM foram significativamente maiores no grupo de éguas resistentes durante os primeiros 30 minutos após a IA, não explicando as alterações das contrações uterinas durante todo período da inflamação pós-cobertura, apenas na fase inicial.

Em um segundo experimento no qual foram realizadas aplicações de ocitocina nas éguas resistentes e susceptíveis, a administração de ocitocina exógena causou maior liberação de PGF2 α em fêmeas resistentes do que nas susceptíveis. Essa observação da redução das concentrações de PGFM no grupo de éguas susceptível após a administração de ocitocina e da IA indica um possível defeito na liberação PGF2 α a nível do receptor da ocitocina ou pós-receptor (NIKOLAKOPOULOS., et al 2000).

Sendo assim, falhas na atividade mioelétrica, alterações anatômicas do útero e falhas de liberação hormonal podem ser as principais causas da instalação da EPPC (TROEDSSON, 1999) e o acúmulo de líquido intrauterino ainda proporciona um ambiente adequado para o desenvolvimento de microrganismos oportunistas, predispondo desta forma, a instalação de infecções uterinas (LEBLANC, 2003).

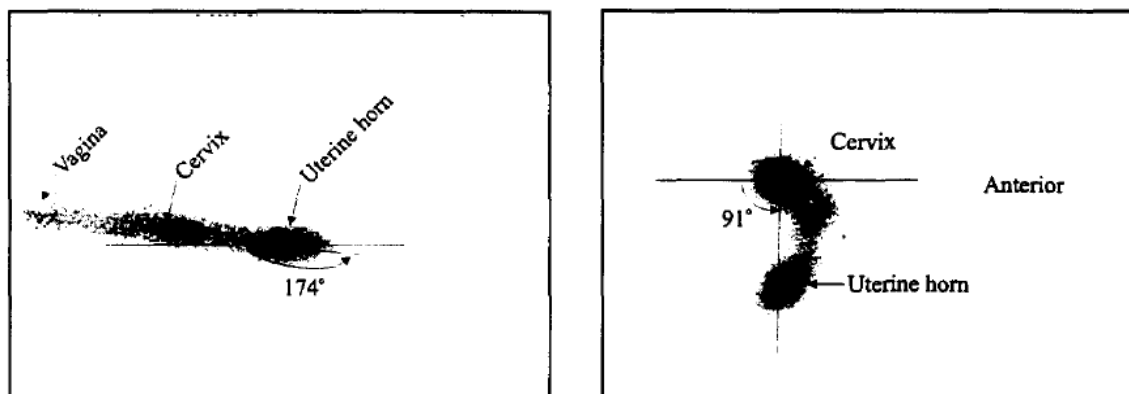


FIGURA 1. Lado esquerdo representando a cintilografia de uma égua normal reprodutivamente, e lado direito representando uma égua com atraso na limpeza uterina. A cérvix, o corno uterino e a vagina são rotulados como o ângulo U-C (LEBLANC et al., 1998).

2.2.3 Resposta inflamatória uterina

Uma reação inflamatória acontece fisiologicamente após a inseminação artificial/cobertura como resposta do sistema imune contra as células espermáticas e contaminantes depositados no interior do útero, com intuito de evitar infecções e lesões teciduais.

A defesa contra microrganismos é iniciada pela proteção da imunidade inata e mantida pelas respostas mais tardias do sistema imune adaptativo. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra os microrganismos, pode iniciar suas atividades em alguns minutos, conseguindo assim responder rapidamente a infecções. Esse mecanismo é ativado por produtos dos microrganismos e células lesionadas mantendo a mesma forma de resposta independente do número de vezes que foi exposta ao microrganismo. Faz parte dos componentes da imunidade inata: barreiras epiteliais, células fagocíticas, células dendríticas, células *natural killer* e proteínas plasmáticas, incluindo as proteínas do sistema complemento. A resposta imune inata realiza a defesa inicial e estimula a resposta imune adquirida (ABBAS et al., 2015).

Para colaborar com a erradicação da infecção existe também a resposta imune adaptativa. Ao contrário da resposta inata, ocorre um aumento da sua capacidade defensiva a cada nova exposição ao microrganismo agindo sobre um grande número de substâncias microbianas e não microbianas. A

imunidade adaptativa possui uma característica chamada de especificidade que faz com que o sistema imune consiga diferenciar substâncias e microrganismos. São componentes exclusivos da imunidade adaptativa os linfócitos e produtos secretados por eles como os anticorpos. Para que as atividades do sistema imune inato e adaptativo sejam reguladas, ocorre a liberação de um grupo de proteínas chamadas citocinas como as interleucinas (IL) e o fator de necrose tumoral (TNF) (ABBAS et al., 2015).

A inflamação aguda se desenvolve rapidamente e pode durar alguns dias, se a infecção não for eliminada nesse período ou o dano tecidual for prolongado, a inflamação passa a ser classificada como crônica, podendo ocorrer remodelamento tecidual, angiogênese e fibrose. (COLLINS et al., 1999).

2.3 Ativação da resposta imune

Segundo Troedsson et al. (1993; 2001), a ativação da resposta imune é iniciada pelo contato do sêmen no interior do útero após a cobertura ou IA. Essa resposta é mediada primeiramente pela imunidade inata para que o sêmen do mesmo garanhão possa ser utilizado várias vezes na mesma égua sem que ocorra resposta imune mediada impedindo a fecundação (LYLE, 2011). Com a presença do sêmen no lúmen uterino inicia-se as ativações do sistema imune, os patógenos e células espermáticas são reconhecidos por células sentinelas no endométrio. Ocorre a liberação dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPS) que então estimulam a resposta inflamatória pela liberação de lipopolissacarídeos (LPS) e lipoproteínas que se ligam aos receptores do tipo Toll (TLRs) das células endometriais e das células sentinelas principalmente aos macrófagos circulantes no endométrio (TAKEDA; AKIRA, 2004; TIZARD, 2008).

A ativação dos TLRs é a chave para o início da reação inflamatória (TAKEDA; AKIRA, 2004) estimulando a síntese do fator nuclear kappa- β (NF- $\kappa\beta$). O fator de transcrição NF- $\kappa\beta$ regula numerosos genes que funcionam em diversos processos, incluindo respostas inflamatórias ativando os genes para a codificação de citocinas pró-inflamatórias (GHOSH et al., 1998). As citocinas

são pequenas proteínas não estruturais que são produzidas e atuam nas células nucleadas. Algumas citocinas promovem a inflamação e são chamadas citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e o interferom gama (IFN γ) (DINARELLO, 2000). A interleucina 1 alfa (IL-1 α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β) são liberadas no início da inflamação, sendo responsáveis pela regulação positiva para transcrição de outras citocinas pró-inflamatórias. O IFN γ é uma citocina pró-inflamatória envolvida na resposta imune inata e adaptativa que atua sobre a regulação do óxido nítrico induzível (iNOS), que produz de óxido nítrico (NO) levando a um aumento do fluxo sanguíneo e ampliando a resposta inflamatória (ALGHAMDI et al., 2005) (WOODWARD et al., 2013).

As citocinas devem ser ativadas pela enzima caspase-1, que também é sintetizada pelo estímulo do NF- κ B (Figura 2) (TIZARD, 2008).

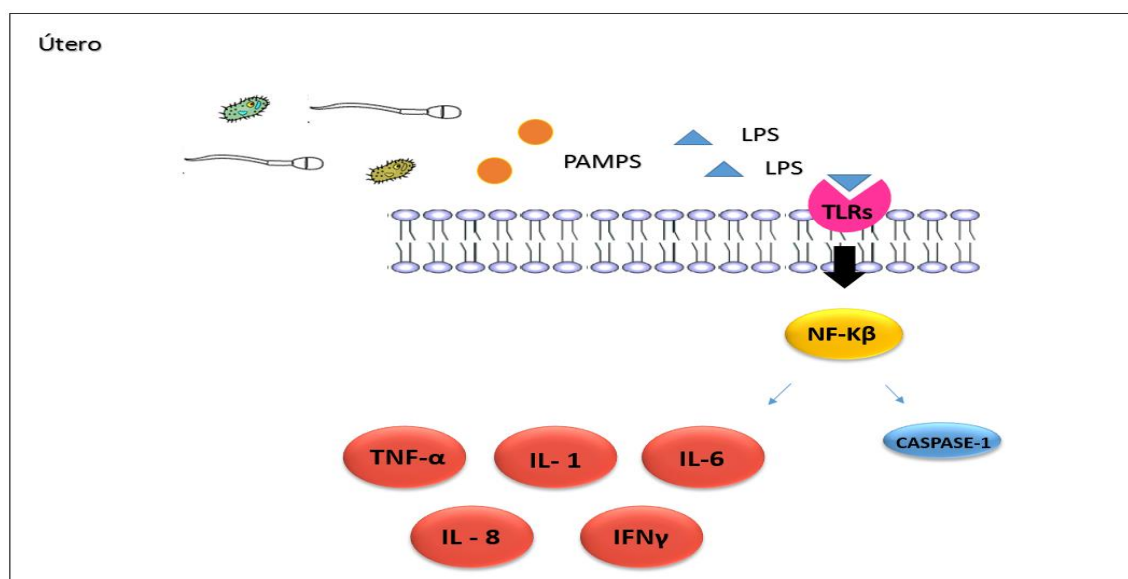


FIGURA 2. Reconhecimento das células espermiáticas e dos patógenos pelas células sentinelas com posterior liberação dos PAMPs e produção de LPS, que se ligam a receptores do tipo toll-like desencadeando a transcrição gênica de fatores pró-inflamatórios pelo NF- κ B (Adaptado de TIZARD, 2008).

A partir da síntese de quimiocinas e citocinas, principalmente IL-1, IL-6, TNF- α e IFN γ é desencadeada a cascata de mediadores inflamatórios, com a liberação de ácido araquidônico a partir de fosfolípidos da membrana. O ácido

araquidônico livre é convertido em prostaglandina G₂ (PGG₂) pela ciclooxigenase (KAM; SEE, 2000). A prostaglandina G₂ é convertida em prostaglandina H₂ (PGH₂) por uma reação de peroxidase, que é também catalisada pela enzima ciclooxigenase (COX). A PGH₂ sintetiza a prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), PGF₂α, prostaglandina I (PGI) e tromboxano A (TxA).

A PGE₂ é então convertido em outras PGs, prostaciclina e tromboxanos por isomerases do tecido. Dentro das plaquetas, quase toda a PGH₂ é convertida em tromboxano A₂ (SMITH, 1992)(Figura 3). Com a produção da COX-2 e posterior liberação de prostaglandinas e tromboxanos ocorre o aparecimento dos sinais clínicos da inflamação e ainda ocorre concomitantemente a migração das células do sistema imune para o local da lesão.

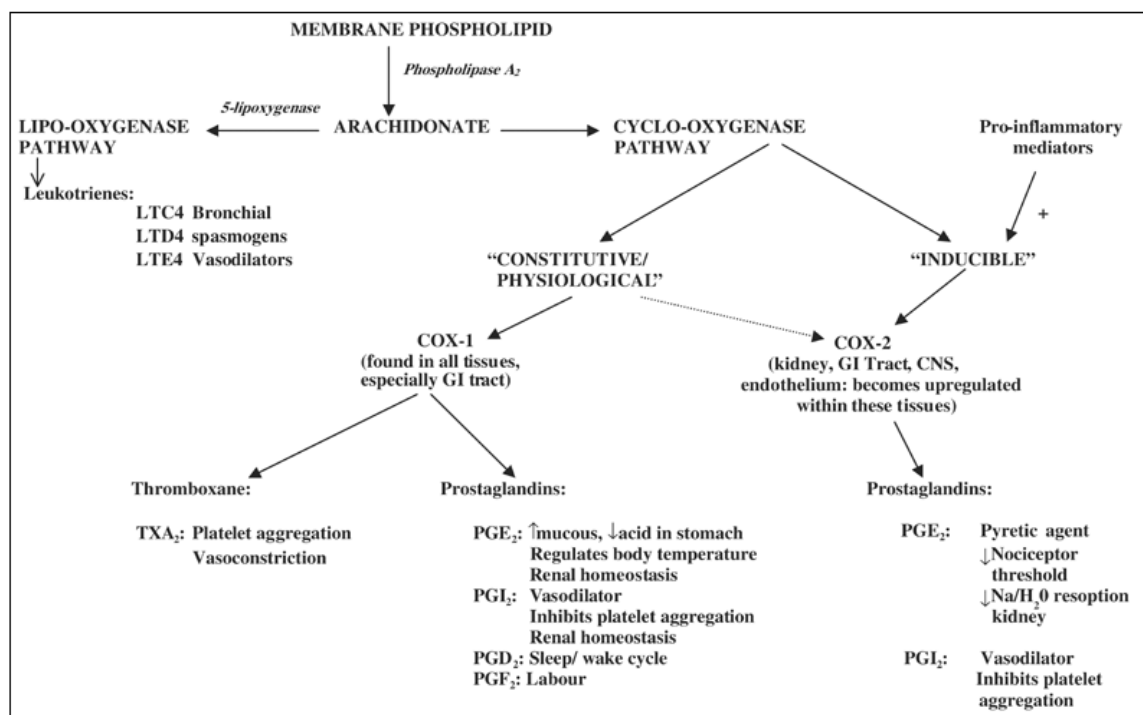


FIGURA 3. Função das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) na produção dos eicosanóides (JUSTICE; CARRUTHERS, 2005).

As citocinas anti-inflamatórias podem bloquear este processo ou pelo menos suprimir a intensidade da cascata inflamatória, são estas a interleucina 1 receptor antagonista (IL-1(ra)), interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10) e a interleucina 13 (IL-13). A IL-1(ra) se liga ao receptor de IL-1 e impede a ligação

da IL-1, a IL-10 e a IL-6 em uma fase mais avançada, tem importante papel no término da resposta inflamatória. Portanto, há um "equilíbrio" entre os efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios das citocinas em animais saudáveis para controlar o processo inflamatório (DINARELLO, 1992 ,2000).

2.3.1 Resposta imune adaptativa

Após algumas horas do início do processo inflamatório ou lesão, é iniciada a resposta imune adaptativa. A resposta imune adaptativa se divide em imunidade humoral e imunidade celular. A humoral é realizada pelos linfócitos B que produzem os anticorpos/imunoglobulinas que são o principal mecanismo de defesa contra microrganismos extracelulares e que ao serem secretados, podem se ligar aos antígenos ou as suas toxinas. No trato reprodutivo são secretadas algumas imunoglobulinas (Ig), principalmente a IgG e a IgA (TROEDSSON, 1999). Essas imunoglobulinas atuam juntamente ao componente C3b do sistema complemento auxiliando as células inflamatórias, principalmente os neutrófilos, na fagocitose de microrganismos invasores (BRITO; BARTH, 2003). No entanto, esses mecanismos não aparentam ser a causa da susceptibilidade a EPPC em éguas, já que as concentrações de imunoglobulinas não diferem entre éguas resistentes e susceptíveis (TROEDSSON, 1999; DELL AQUA JR et al., 2006).

Para garantir a defesa do organismo também se desenvolve a imunidade celular que é mediada por linfócitos T. A imunidade celular realiza a proteção contra microrganismos intracelulares, como por exemplo vírus e bactérias que sobrevivem dentro das células do hospedeiro. Essa defesa atua destruindo os patógenos através dos linfócitos T auxiliares ativando os macrófagos para que destruam o microrganismo realizando a fagocitose ou causando a morte das células infectadas com o auxílio dos linfócitos T citolíticos (ABBAS et al., 2015).

2.3.2 Recrutamento dos leucócitos para o local da infecção

O movimento dos leucócitos do sangue para os tecidos é chamado de migração ou recrutamento, mecanismo que ocorre durante o processo

inflamatório. É iniciado pelo reconhecimento de microrganismos ou lesão tecidual por células da imunidade inata e o processo é continuado com a resposta imune adaptativa (ABBAS et al., 2015).

O processo de recrutamento começa quando os macrófagos circulantes encontram microrganismos e os englobam, ocorrendo a liberação de citocinas, tais como IL-1 e TNF pelas células do sistema imune. Desta forma, é iniciada a sensibilização das células do endotélio para a passagem dos leucócitos para fora do vaso em direção ao tecido inflamado. Os neutrófilos e os monócitos são as primeiras células a chegarem no local da inflamação ou de dano tecidual (MEGIOVANNI et al., 2006). Para um efetivo recrutamento celular é necessário a adesão dos leucócitos ao endotélio das vênulas e capilares, e essa adesão é realizada com auxílio de moléculas que fortalecem essa ligação (RIGBY et al., 2015).

As citocinas liberadas inicialmente pelas células de defesa estimulam a expressão endotelial de E-selectina e P-selectina, provocam dilatação do vaso no local da inflamação e diminuição do fluxo sanguíneo fazendo com que os leucócitos fiquem na região marginal do vaso permitindo assim a interação com as selectinas, sendo essa ligação de baixa afinidade. A seguir, a L-selectina começa a ser expressada pelos leucócitos, ligando-se às sialomucinas das células endoteliais aumentando a adesão entre as células. As quimiocinas começam a ser produzidas nos tecido infectados ou pelas células endoteliais ligando-se aos receptores dos leucócitos, principalmente em células T, promovendo uma série de ações como a ativação das integrinas que são proteínas que medeiam a adesão de células e a sua ligação com a matriz extracelular. As integrinas mais importantes expressas nos leucócitos são LAF-1 e a VLA-4. Essas integrinas se ligam em glicoproteínas de membrana como por exemplo a ICAM-1 resultando em um estado de alta afinidade de ligação e alta adesão dos leucócitos. Após esse processo os leucócitos passam pelas junções das células endoteliais e migram para fora do vaso, lembrando que os neutrófilos, monócitos e linfócitos T utilizam os mesmos mecanismos de migração (Figura 4) (SPERANDIO et al., 2003; CHAN et al., 2001; BERLIN et al., 1995; RIGBY et al., 2015).

As quimiocinas exercem outras funções importantes durante a inflamação. Atuam também sobre os leucócitos que saem dos vasos estimulando a movimentação ao longo de um gradiente de concentração de proteínas secretadas em direção as células infectadas por um processo chamado quimiotaxise, que também regulam o tráfego dos linfócitos e outros leucócitos nas regiões dos tecidos linfoides periféricos (CHTANOVA et al., 2008).

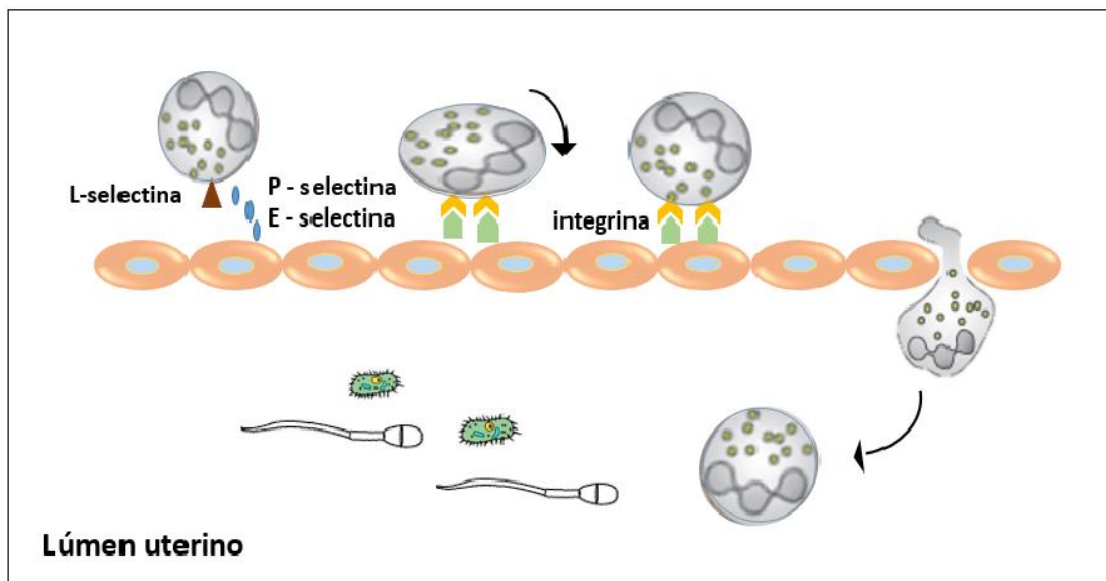


FIGURA 4. Recrutamento de neutrófilos para os locais de inflamação (adaptado AMULIC et al., 2012).

2.3.3 Componentes da resposta imune avaliados em éguas susceptíveis e resistentes a endometrite

Foi demonstrado um aumento da expressão endometrial do TLR-4 e TLR-2 após a inoculação de *E. coli* no útero de éguas resistentes, no entanto a resposta destes receptores aos espermatozoides ainda é controversa (MARTH., et al 2015). Eaton et al. (2010) observaram um aumento dos TLR-4 em éguas resistentes 24 horas após a IA, já Nash et al. (2010) não encontraram mudança na expressão dos TLR-4 após IA em éguas resistentes e Cuervo-Arango et al. (2008) observaram uma tendência no aumento dos receptores TLR-4 no endométrio de éguas susceptíveis após a IA, o que não foi observado nas éguas resistentes. Esses resultados controversos podem ser

explicados pelo fato do TLR-4 reconhecer principalmente os lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por bactérias gram negativas, sendo variável a contaminação do sêmen utilizado em cada estudo (CHOW et al., 1999; HOSHINO et al., 1999).

As citocinas pró e anti-inflamatórias foram estudadas e observou-se que a expressão das citocina pró-inflamatória IL-1 β foi maior no estro e diestro de éguas susceptíveis (FIORATTI, 2013). A expressão da IL-1 β , TNF- α e IL-6 foi maior e mais prolongada em éguas susceptíveis em comparação com os animais resistentes após a inseminação artificial, e a expressão da IL-8, citocina que atua na quimioatração de PMNs foi maior em éguas susceptíveis em comparação com as fêmeas resistentes nas 24 h após a inseminação e no diestro, e a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 foi menor nas éguas susceptíveis nas mesmas condições (FUMOSO et al. 2003; 2006). Ainda, verificou-se que as éguas resistentes apresentavam maior expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-1(ra) e IL-10 seis horas após a IA (KAPLANSKI et al., 2003; CHRISTOFFERSEN et al., 2012; WOODWARD et al., 2013).

2.4 Possíveis tratamentos para a endometrite persistente pós-cobertura

Éguas que são mantidas em programas de reprodução mesmo com baixas taxas de fertilidade são animais, em sua maioria, de alto valor genético e financeiro, principalmente doadoras de embriões, sendo a EPPC uma das afecções que diminuem as taxas de prenhez e de recuperação embrionária. Para que esses animais continuem a se reproduzir, é necessário minimizar os fatores que desencadeiam a inflamação uterina. No primeiro momento é preciso melhorar as condições uterinas para que os espermatozoides cheguem viáveis até o oviduto, e posteriormente é fundamental um ambiente uterino adequado para a chegada do embrião (ALVARENGA et al., 2014).

2.4.1 Fármacos Ecbólicos

A utilização de fármacos ecbólicos estimula as contrações miométriais promovendo a drenagem do conteúdo presente no interior do útero,

mimetizando o processo de limpeza uterina fisiológica pós-cobertura. Os medicamentos comumente utilizados para estimular a contração uterina são a ocitocina, PGF2 α e a carbetocina (ALLEN, 1991; COMBS et al., 1996; SCHRAMME et al., 2008).

A ocitocina, devido ao sua ação ecbólica foi sugerido em primeiro lugar como um possível tratamento para éguas com endometrite recorrente por Allen (1991) e posteriormente por Leblanc et al. (1994) que estabeleceu que a ocitocina ajuda a expulsar o radiocolóide do interior do útero de éguas susceptíveis. Várias doses e vias de aplicação da droga já foram testadas, sendo as principais vias a parenteral e a intrauterina, as doses utilizadas variam de 5 a 40 UI (ALLEN, 1991; BRINSKO, 1993; PYCOCK; NEWCOMBE, 1996).

Campbell; Englad (2002) observaram contrações uterinas de forma crescente quando utilizaram doses de 2,5 até 20 UI de ocitocina intravenosa e intrauterino, já na dose 30 UI obtiveram uma diminuição no número de contrações em ambas as vias de aplicação. A ocitocina pode ser utilizada em até 48 horas após a ovulação, já que após este período ocorre o fechamento cervical impedindo a eliminação do líquido pela cérvix (TROEDSSON, 1997).

Outros medicamentos ecbólicos como a prostaglandina e seus análogos já foram testados para avaliar seu padrão de contração endometrial e sua efetividade na limpeza uterina. Combs et al. (1996) avaliaram a ação de três fármacos diferentes: dinoprost 5mg IM, cloprostenol 2mg IM e fenoprostalene 250ug subcutâneo, aplicados no segundo dia após o estro em éguas sadias e em éguas com limpeza uterina atrasada. O cloprostenol se mostrou mais eficiente por proporcionar uma limpeza uterina mais rápida do que os outros fármacos, e o dinoprost apesar de aumentar a atividade elétrica do miométrio e a pressão intrauterina nas éguas, não conseguiu induzir o esvaziamento uterino de forma eficaz, principalmente nas éguas susceptíveis.

Devido a ação luteolítica desses fármacos não é indicado utilizá-los após a ovulação. Demonstraram que o tratamento com PGF2 α tem efeito negativo na função luteal precoce e na gestação quando aplicada no dia 0, 1 e 2 dias após a ovulação. Sendo assim, a ocitocina é o fármaco de eleição devido a prostaglandina atuar de forma mais lenta e mais prolongada no endométrio,

provocando contrações até 5 horas após sua aplicação (TROEDSSON, 1995; TROEDSSON et al., 2000).

Um análogo da ocitocina chamado carbetocina foi testado em equinos, o qual promoveu a contração miometrial (SCHRAMME et al., 2008). Sendo que sua ação é a mesma independente da fase do ciclo estral e ainda com a vantagem de apresentar meia-vida mais longa (17 minutos) do que a meia-vida da ocitocina que é mais curta (6 min) na égua (STECKLER et al., 2012).

2.4.2 Lavagem Uterina

A lavagem uterina é utilizada com o intuito de retirar do interior útero espermatozoides mortos, sujidades e bactérias após a IA ou cobertura em éguas com endometrite persistente. É também ferramenta para a limpeza uterina antes da aplicação de antibióticos no tratamento de endometrites, para que ocorra uma melhor ação do fármaco. Pode também ser utilizada no pós-parto em casos em que ocorre retenção de membranas fetais, atraso na involução uterina e manipulações obstétricas (BRINSKO, 2001).

Brinsko et al. (1989) realizaram a lavagem uterina de éguas 0,5 e 2 horas após a inseminação artificial e obtiveram baixas taxas de prenhez, sugerindo que a lavagem uterina seja realizada em um tempo > 2 horas após a inseminação artificial para não interferir na viabilidade dos gametas masculinos. Em um novo experimento foi constatado que nas éguas que receberam as lavagens uterinas 4 horas após a IA com solução fisiológica 0,9% ou solução de iodopovidona 0,05% as taxas de prenhez foram maiores do que nos animais que não foram realizadas as lavagens (BRINSKO et al., 1991). Realizando a lavagem uterina com solução salina no intervalo de 4 a 6 horas após a IA, Knutti et al. (2010) obtiveram maiores taxas de prenhez em éguas com endometrite persistente pós-cobertura, os resultados deste estudo corroboram com o achados de Brinsko et al., (1991).

A lavagem uterina pode ser realizada previamente a inseminação artificial no caso de éguas que acumulam grande quantidade de líquido uterino, principalmente animais que apresentam endometrite crônica ou foram inseminados mais de uma vez no mesmo ciclo, atuando de forma benéfica ao

remover os fluidos uterinos e evitando que os mesmos diminuam a qualidade espermática e conseqüentemente as taxas de prenhez (BRINSKO, 2001).

Vanderwall; Woods (2003) observaram taxas de prenhez e tamanho de vesícula embrionária semelhantes nas fêmeas que receberam a lavagem uterina com ringer lactato no momento imediatamente antes da inseminação comparadas com as éguas que não receberam a lavagem uterina antes da IA, mostrando que a lavagem uterina não afeta a fertilidade desses animais.

Em geral as lavagens uterinas são realizadas em animais que estão em programas de reprodução e apresentam uma coluna de líquido maior que 2 cm ou apresentam coluna de líquido com presença de pontos anecóicos na imagem ultrassonográfica (BRINSKO et al., 2003). A lavagem é realizada pelo método de sifonagem, em que é colocado um volume de 1 a 2 litros no interior do útero e em seguida é escoado para fora por efeito da gravidade. A lavagem uterina pode ser realizada diversas vezes até que o conteúdo que retorna do útero seja de cor clara e sem sujidades (BRINSKO, 2001; LEBLANC, 2003).

2.4.3 Imunomoduladores

Diversos protocolos de tratamento com substâncias e/ou fármacos imunomoduladores estão sendo amplamente utilizados em equinos para o tratamento de EPPC. Esses imunomoduladores atuam na cascata inflamatória, bloqueando o processo inflamatório, evitando assim o influxo de células para lúmen uterino e o acúmulo de líquido (FUMUSO et al., 2003; CHRISTOFFERSEN et al., 2012).

O extrato da parede de *Mycobacterium* (EPMB) é um dos tratamentos mais antigos utilizados para modular o sistema imune. Fumoso et al. (2003) observaram a diminuição da expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 e diminuição de acúmulo de líquido uterino com a utilização 1,5mg do EPMB no momento da IA. Em um novo estudo, utilizando o mesmo tratamento observou-se um aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 (FUMUSO et al., 2007). Christoffersen et al. (2012) avaliaram a expressão gênica de várias citocinas pró e anti-inflamatórias após a aplicação de 1,5mg de EPMB posterior à inoculação de *E. coli*. A expressão das citocinas não se diferenciaram do

grupo de éguas que não receberam o tratamento e apenas a expressão do soro amiloide A (SAA), que é uma proteína expressa na fase aguda da inflamação, foi significativamente mais baixa com o tratamento. Woodward et al. (2015) avaliaram a expressão de citocinas pró e anti-inflamatória no endométrio de éguas com EPPC tratadas com EPMB 24 horas antes da IA, e observaram alteração da expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β seis horas após a IA, sendo essa citocina responsável por desencadear a transcrição de outras citocinas no início da inflamação.

Uma dos medicamentos utilizados para o tratamento de EPPC são os anti-inflamatórios esteroidais, estes atuam deprimindo a resposta pró-inflamatória impedindo assim a liberação de quimiocinas e outras proteínas relacionadas a inflamação e ainda conseguem regular positivamente as citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e a IL-1(ra) auxiliando na profilaxia da EPPC (CHRISTOFFERSEN et al., 2012).

Dell'Aqua Jr et al. (2006) realizaram tratamento com corticoterapia a cada 12h em um total de cinco doses (0,1mg/kg de acetato de prednisolona), sendo quatro aplicações realizadas anteriormente a IA e uma no momento IA. Na tentativa de modular a resposta imune, obtiveram resultados satisfatórios com a diminuição de acúmulo de líquido uterino e aumento da taxa de prenhez em éguas com histórico reprodutivo de resposta inflamatória exacerbada após a IA. Bucca et al. (2008) utilizaram uma dose única 50mg de dexametasona no momento da IA na tentativa de controlar a EPPC em éguas susceptíveis. Após o tratamento e IA observaram uma diminuição da inflamação uterina e um aumento na taxa de prenhez quando comparando com as éguas que não receberam tratamento. Christoffersen et al.(2012) realizaram tratamento com dexametasona na dose de 0,1 mg/kg no momento da inoculação de *Escherichia coli* no útero das éguas e observaram uma diminuição na expressão da IL-1, IL-6, IL-8 e de SAA, e também verificaram um aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 comparado com as éguas que não receberam tratamento. Fioratti et al. (2012) testaram a utilização de dexametasona junto ao meio diluidor de sêmen. O tratamento não causou nenhum dano as células espermáticas e proporcionou um aumento nas taxas de prenhez. Woodward et al. (2015) encontraram diferenças na expressão

endometrial de IL-1 β após a administração de dexametasona no momento da IA, diferindo das éguas que receberam apenas a IA. 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; CAUSEY, 2009).

Recentemente novas terapias para a EPPC estão sendo testadas com intuito de melhorar ainda mais o ambiente uterino, as taxas de prenhez e de recuperação embrionária.

A lactoferrina (LF) é uma glicoproteína regulada por estrogênio com propriedades antibacterianas e imunomoduladoras (KOLM et al., 2006). Na tentativa de controlar a resposta inflamatória pós-cobertura, a LF foi utilizada e observaram redução da expressão endometrial das interleucinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-8 após a cobertura (FORSHEY et al., 2011).

Ferris et al. (2014) avaliaram a capacidade do soro condicionado autólogo (SCA) e das células tronco mesenquimais (CTMs) em modular a resposta inflamatória aos espermatozoides após acasalamento em éguas saudáveis, e encontraram a diminuição do número de neutrófilos no lúmen uterino 6 horas após a IA. Com o uso das CTMs ainda houve um aumento da citocina anti-inflamatória IL-1(ra). As CTMs têm como função secretar moléculas bioativas em resposta a lesão tecidual e o soro condicionado autólogo tem concentrações elevadas de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento.

A terapia com plasma rico em plaquetas (PRP) também está sendo estudada como tratamento para EPPC. As plaquetas secretam moléculas bioativas com capacidade de regenerar tecidos e fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Metcalf et al. (2012) obtiveram uma redução na expressão das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8) e de óxido nítrico sintetase indutor (iNOX) no grupo de éguas em que foi infundido o PRP no interior do útero anteriormente a IA. Em um novo estudo a utilização do PRP em éguas com EPPC houve diminuição de líquido uterino e aumento no índice de prenhez (METCALF, 2014). Ainda, ocorreu diminuição do líquido uterino e

redução do influxo de PMNs para o lúmen uterino das éguas com EPPC após a IA após a infusão de PRP (REGHINI et al., 2016).

Outros tratamentos para éguas com EPPC são utilizados como o estimulante da resposta imune inata, a utilização do propionibacterium acnes resultou em aumento das taxas de prenhez (ROHRBCH et al., 2007). A N-acetilcisteína é um agente mucolítico e com propriedades anti-inflamatórias, quando utilizado para controlar a hipersecreção de muco em éguas sem a presença de agentes patogênicos uterinos as fêmeas apresentaram taxa de 77% de prenhez. O protocolo consiste na infusão intra-uterina de solução de 3,3% de N-acetilcisteína associado a lavagem uterina e ocitocina (GORES-LINDHOLM et al., 2013).

2.4.4 Anti-inflamatórios não esteroidais

Os AINEs vem sendo testados para o tratamento de EPPC. Esses fármacos inibem as cicloxigenases interrompendo a produção de prostaglandinas que são responsáveis pelo processo inflamatório. Esses medicamentos podem ser associados a outros fármacos, como por exemplo a ocitocina, para minimizar o efeito negativo do bloqueio da liberação das prostaglandinas, auxiliando na realização de contrações miométriais.

Em um dos primeiros estudos para avaliar a associação de AINE com fármacos ecbólicos utilizaram o AINE fenilbutazona por via intravenosa antes da infusão uterina do radiocolóide e após a infusão aplicaram 20 UI de ocitocina. Todas as éguas apresentaram limpeza uterina >90% do radiocolóide em 30 minutos. Foram utilizadas apenas éguas saudáveis nesse experimento (CARDARIO et al., 1995). Com a utilização apenas da fenilbutazona e posterior infusão do radiocolóide no útero de éguas sadias obteve uma taxa de limpeza uterina de apenas 23,5 % durante duas horas após a infusão, mostrando que o AINE interferiu negativamente na limpeza uterina desses animais (LEBLANC, 1997).

Realizou-se a comparação da resposta inflamatória de éguas sadias após a IA utilizando dois protocolos de tratamentos diferentes. Em um dos grupos as éguas receberam 0,01 UI/kg de ocitocina as 2, 4, 8 e 25h após a IA e em outro

grupo os animais foram tratados apenas com flunixin meglumine 1,1 mg/kg duas horas após a IA. As éguas do grupo ocitocina acumularam pouco líquido no útero durante todo acompanhamento e foram encontrados baixa quantidade de PMNs no lúmen uterino. Já as éguas do grupo que recebia o AINE apresentaram um elevado número de PMNs no lúmen uterino, sendo explicado pela possível diminuição da contratilidade uterina e falha na drenagem. Esse grupo também demonstrou as 8h após a IA uma menor quantidade de PMNs no estroma uterino pela ação do anti-inflamatório que diminuiu o influxo de células inflamatórias para útero. Não houve diferença quanto a taxa de prenhez dos dois grupos (RISCO et al., 2009).

Aurich et al. (2010) utilizaram três protocolos diferentes na tentativa de controlar a resposta inflamatória uterina após a IA. No grupo controle as éguas receberam ocitocina três vezes ao dia, no segundo grupo as éguas receberam ocitocina e o AINE vedaprofeno (2mg/kg/BID) e posteriormente (1mg/kg/BID), sendo o tratamento iniciado no dia da indução da ovulação, no terceiro grupo as éguas receberam ocitocina e vedaprofeno nas mesmas concentrações, porém o tratamento foi iniciado no dia seguinte a ovulação. Todos os tratamentos foram mantidos até um dia depois da confirmação da ovulação. Em ambos os tratamentos com o AINE ocorreu uma redução na resposta inflamatória, no terceiro grupo houve redução significativa do número de PMNs no endométrio no momento pós-cobertura comparando com outros grupos. Quanto a expressão de COX-2 não houve diferença entre os grupos tratados com o AINE nos momentos pré-IA e pós-IA.

Vilés et al. (2013) avaliaram o efeito do tratamento com o AINE cetoprofeno no controle da resposta inflamatória em jumetas após o uso de sêmen congelado. O medicamento foi administrado por via intravenosa, iniciando o tratamento 24h antes da IA e mantendo por mais quatro dias. O tratamento com cetoprofeno não conseguiu reduzir significativamente o número de PMNs após a IA, mas houve uma redução na expressão da COX-2 no estrato compacto mostrando que o AINE utilizado teve ação anti-inflamatória sobre o útero.

Ainda podemos citar um AINE que foi estudado apenas em éguas receptoras de embriões que é Ácido meclofenâmico, quando utilizado em

receptoras de embrião para evitar inflamação uterina pós TE conseguiu suprimir a resposta inflamatória do endométrio, mostrando uma diminuição de linfócitos e PMNs na histopatologia endometrial, e ainda reduziu a concentração de PGFM plasmática e expressão de COX-2 no epitélio luminal, podendo ser uma opção para o controle da resposta inflamatória uterina pós-IA (KOBLSCHKE et al., 2008).

Por provocar bloqueio na liberação das prostaglandinas o uso dos AINES pode interromper outros processos fisiológicos da reprodução. As prostaglandinas desempenham um importante papel durante o processo de ovulação em mamíferos. Na a COX-1 e a COX-2 estão envolvidas na produção de PGF₂ α e PGE₂ no folículo 10 a 12 h antes da ovulação. Um aumento gradual da expressão nas células granulosa de PGH-2 ocorre a partir de 24 h para 39 h após o tratamento com 2500 IU de hCG (gonadotrofina coriônica humana). É possível que a PGF₂ α e a PGE₂ iniciem a síntese de enzimas envolvidas no colapso da parede folicular, e que ocasionem aumento do fluxo sanguíneo e da pressão intrafolicular, acarretando a ruptura da parede folicular e liberação do oócito (SIROIS; DORÉ, 1997).

Os efeitos do tratamento sistêmico com os AINEs ainda estão sendo estudados na função reprodutiva da espécie equina. Cuervo-Arango; Domingo-Ortiz, (2011) utilizaram uma dose alta de flunixin meglumine, que é um AINE parcialmente seletivo, em éguas no período periovulatório para avaliar se ocorreria ou não o bloqueio da ovulação. Seis éguas receberam 2mg/kg/BID de flunixin meglumine iniciando o tratamento no dia da indução e mantendo até que ocorresse a ovulação, com cinco dos seis animais apresentando falha da ovulação. Em novo estudo Cuervo-Arango (2011) avaliou em qual momento após a administração do hCG o flunixin meglumine na dose de 1,7mg/kg/BID bloquearia a ovulação. O AINE bloqueou a ovulação quando aplicado até 24h após a administração hCG com continuação da aplicação até 36 horas. Lima et al. (2015) utilizaram os AINEs fenibutazona e meloxicam no período periovulatório, sendo o tratamento iniciado quando as éguas apresentaram pelo menos um folículo com tamanho de 32 mm e edema uterino grau 2. Com os tratamentos de 4,4mg/kg de fenilbutazona e 0,6 mg/kg de meloxicam tiveram bloqueio da ovulação em 92% e 83% das éguas respectivamente.

2.4.4.1 Firocoxib

O firocoxib é um coxib de classe dos AINEs aprovado para utilização em cavalos e cães. É um inibidor de ciclo-oxigenase, altamente seletivo para a COX-2 com pouco efeito sobre as enzimas COX-1, reduzindo assim as complicações associadas com a inibição da via fisiológica.

A COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios, hormônios e fatores de crescimento, é a fonte mais importante de prostenóides na inflamação (DUBOIS et al., 1998). Com o bloqueio da COX-2 ocorre a diminuição da produção de PGE, que tem um papel fundamental em promover a inflamação, e também da PGI que realiza vasodilatação e edema durante o processo inflamatório (TREBINO et al., 2003; NODA et al., 2007).

A dosagem recomendada para o tratamento em cavalos é de 0,09mg/kg por via intravenosa a cada 24 h durante 5 dias ou 0,1 mg/kg por via oral a cada 24 h durante 14 dias. Os estudos de farmacocinética em cavalos indicam que a utilização do firocoxib por via oral a cada 24 h alcança as concentrações plasmáticas no estado estacionário do quinto ao sétimo dia de tratamento (LETENDRE et al., 2008).

Uma característica da farmacodinâmica importante do firocoxib é que o tempo do pico de concentração plasmática do fármaco é de 3,9 h após o fornecimento de uma dose oral (KVATERNICK et al., 2007b). Em contraste com os AINEs clássicos, o firocoxib apresenta um grande volume de distribuição ($1,69 \pm 0,53$ L/Kg) e sua meia-vida terminal é longa ($29,6 \pm 7,5$ h) após a administração por via oral, o que permite a utilização do fármaco a cada 24h. O firocoxib sofre metabolismo hepático e excreção renal (KVATERNICK et al., 2007b).

A utilização de doses mais altas do fármaco é recomendada para acelerar o tempo de ação necessário para atingir o estado estacionário de concentração (COX et al., 2013). Podendo encurtar o tempo para se obter uma resposta terapêutica (TOZER; ROWLAND, 2006). Cox et al. (2013) utilizaram uma dose maior de firocoxib e alcançaram concentrações da droga no estado estacionário rapidamente.

O firocoxib tem diferentes apresentações, a pasta de fornecimento via oral para equinos, a apresentação injetável e ainda comprimidos mastigáveis para cães. Barton et al. (2014) avaliaram se os comprimidos de firocoxib para cães apresentavam a mesma eficiência em diminuir a produção de PGE2 do que a pasta própria para equinos. Os comprimidos mastigáveis de firocoxib para tratamento de cães se mostraram tão eficazes quanto a pasta de firocoxib equina na redução de PGE2. Os comprimidos mastigáveis para cães podem ser uma alternativa adequada para a formulação da pasta para cavalos, proporcionando uma maior facilidade de acesso ao fármaco, além de ser uma alternativa de menor custo financeiro (BARTON et al., 2014).

O AINE firocoxib pode ser uma alternativa viável para o tratamento de éguas que apresentam inflamação uterina após a cobertura ou IA, suas características farmacológicas como o grande volume de distribuição, meia vida longa, que possibilita sua utilização a cada 24h, e sua alta seletividade a COX-2 que o torna um medicamento seguro e sem efeitos colaterais o diferenciam dos outros medicamentos já estudados.

3. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LITCHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Elsevier . Rio de Janeiro, 2015.
- ALGHAMDI AS, FOSTER DN, CARLSON CS, T. M. 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, n. 5, p. 230–237, 2005.
- ALLEN, W. Investigations into the Use of Exogenous Oxytocin for Promoting Uterine Drainage in Mares Susceptible to Endometritis. **Veterinary Record**, v. 128, n. 25, p. 593–594, 22 jun. 1991.
- ALVARENGA, M. A.; RAMIRES NETO, C.; CATRO, M, M, B. Avanços na terapia de Problemas reprodutivos na égua: Enfoque na endometrite. **Spermova**, v. 4, n. 1, p. 17–19, 2014.
- AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil Function : From Mechanisms to Disease. **Annu. Rev. Immunol**, v. 30, p. 459–489, 2012.

AURICH, C.; ROJER, H.; WALTER, I. Treatment of estrous mares with the non-steroidal anti-inflammatory drug vedaprofen reduces the inflammatory response of the endometrium to insemination. **Animal Reprod. Science**, v. 121, p. 104–106, 2010.

BARTON, M. H.; PASKE, E.; NORTON, N.; KING, D.; GIGUERE, S.; BUDSBERG, S. Efficacy of cyclo-oxygenase inhibition by two commercially available firocoxib products in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, n. 1, p. 72–75, 2014.

BERLIN, C.; CAMPBELL, J. J.; BARGATZE, R. F.; ANDRIAN, U. H. Von; SZABO, M. C.; HASSLEN, S. R.; NELSON, R. D.; BERG, E. L.; ERLANDSEN, S. L.; BUTCHER, E. C. $\alpha 4$ Integrins Mediate Lymphocyte Attachment and Rolling under Physiologic Flow. **Cell Press**, v. 80, p. 413–422, 1995.

BETTERIDGE, K. J.; EAGLESOME, M. D.; MITCHELL, D.; FLOOD, P. F.; BERIAULT, R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation observations on fresh specimens. **J Anat**, v. 135, p. 191–209, 1982.

BRINSKO, S. P. How to perform uterine lavage: Indications and practical techniques. **Proceedings of the 47th AAEP Annual Convention: 24- ...**, v. 47, n. April, p. 407–411, 2001.

BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. **Proc Am Assoc Equine Pract**, v. 49, p. 363–3, 2003.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; MEYERS, S. A. The effect of postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares. **Theriogenology**, v. 33, n. 2, p. 465–475, 1989.

BRINSKO, S.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. THE EFFECT OF UTERINE LAVAGE PERFORMED FOUR HOURS POST INSEMINATION ON PREGNANCY RATE IN MARES. **Theriogenology**, v. 35, n. 6, p. 1111–1119, 1991.

BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D. Endometritis in mares. **Large Anim. Vet. Rounds**, v. 3, n. 3, 2003.

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.

CAMPBELL, M. L. H.; ENGLAND, G. C. W. A comparison of the ecbolic efficacy of intravenous and intrauterine oxytocin treatments. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 473–477, 2002.

CARD, C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares.

Theriogenology, v. 64, p. 580–588, 2005.

CARDARIO, M. E.; THATCHER, M. J. D.; LEMBLANC, M. M. Relation between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. **Biol Reprod Mono**, v. 1, p. 495–500, 1995.

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

CHAN, B. J. R.; HYDUK, S. J.; CYBULSKY, M. I. Chemoattractants Induce a Rapid and Transient Upregulation of Monocyte $\alpha 4$ Integrin Affinity for Vascular Cell Adhesion Molecule 1 Which Mediates Arrest: An Early Step in the Process of Emigration. **J. Exp. Med**, v. 193, n. 10, p. 1149–1158, 2001.

CHOW, J. C.; YOUNG, D. W.; GOLENBOCK, D. T.; CHRIST, W. J.; GUSOVSKY, F. Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 15, p. 10689–10693, 1999.

CHRISTOFFERSEN, M.; WOODWARD, E. M.; BOJESEN, A. M.; PETERSEN, M. R.; SQUIRES, E. L.; LEHN-JENSEN, H.; TROEDSSON, M. H. T. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. **Theriogenology**, v. 78, n. March, p. 991–1004, 2012.

CHTANOVA, T.; SCHAEFFER, M.; HAN, S.; DOOREN, G. G. Van; NOLLMANN, M.; HERZMARK, P.; CHAN, S. W.; SATIJA, H.; CAMFIELD, K.; AARON, H.; STRIEPEN, B.; ROBEY, E. A. Article Dynamics of Neutrophil Migration in Lymph Nodes during Infection. **Immunity**, v. 29, p. 487–496, 2008.

CLARK, T. P. The Clinical Pharmacology of Cyclooxygenase-2–Selective and Dual Inhibitors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 36, n. 5, p. 1061–1085, 2006.

COLLINS, T.; CONTRAN, R. S.; KUMA, V. **Robins basic of diases**. 6. ed. 1999.

COMBS, G. B.; LEBLANC, M. M.; NEUWIRTH, L.; TRAN, T. Q. Effects of prostaglandin F_{2a}, cloprostenol and fenprostalene on uterine clearance of radiocolloid in the mare. **Theriogenology**, v. 45, n. 8, p. 1449–1455, 1996.

COX, S.; VILLARINO, N.; SOMMARDAHL, C.; KVATERNICK, V.; ZARABADIPOUR, C.; SIGER, L.; YARBROUGH, J.; AMICUCCI, A.; REED, K.; BREEDING, D.; DOHERTY, T. Disposition of firocoxib in equine plasma after an oral loading dose and a multiple dose regimen. **Veterinary Journal**, v. 198, n. 2, p. 382–385, 2013.

CUERVO-ARANGO, J. The effect of treatment with flunixin meglumine at

different times relative to hCG administration on ovulation failure and luteal function in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 1-2, p. 84–90, 2011.

CUERVO-ARANGO, J.; DOMINGO-ORTIZ, R. Systemic treatment with high dose of flunixin-meglumine is able to block ovulation in mares by inducing hemorrhage and luteinisation of follicles. **Theriogenology**, v. 75, n. 4, p. 707–714, 2011.

CUERVO-ARANGO, J.; WORGAN, H.; MACIAS, B.; NASH, D. Endometrial toll-like receptor 4 (TLR4) and Interleukin-8 (IL-8) expression in mares resistant (RM) or susceptible (SM) to endometritis. **Annual Conference of the European in Domestic Animals**, v. 43, p. 75, 2008.

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

DINARELLO, C. Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonism. **Blood**, v. 1, p. 1627–1652, 1992.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory Cytokines. **Chest**, v. 118, p. 503–508, 2000.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **The FASEB journal**, v. 12, n. 12, p. 1063–1073, 1998.

EATON, S.; RAZ, T.; CARD, C. Toll-like receptor-2 and -4 in the equine endometrium during physiologic post-breeding endometritis. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 96–97, 2010.

FERRIS, R. A.; FRISBIE, D. D.; MCCUE, P. M. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. **Theriogenology**, v. 82, n. 1, p. 36–42, 2014.

FIORATTI, E. G.; VILLAVARDE, A. I. S. B.; MELO, C. M.; TSUNEMI, M. H.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Influence of Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Viability and Fertility of Equine Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 12, p. 771–775, 2012.

FORSHEY, B. S.; MESSERSCHMIDT, C. A.; PINTO, C. R. F.; COUTINHO SILVA, M. A. Effects of lactoferrin on post-breeding uterine inflammation in the mare. **Clinical Theriogenology**, v. 3, p. 369, 2011.

FUMUSO, E. A.; AGUILAR, J.; GIGUE, S.; RIVULGO, M.; WADE, J.; ROGAN, D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-

breeding endometritis : Effects of immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, p. 30–39, 2007.

FUMUSO, E.; GIGUE, S.; WADE, J.; ROGAN, D.; VIDELA-DORNA, I.; BOWDEN, R. A. Endometrial IL-1 b , IL-6 and TNF- a , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis Effects of estrous cycle , artificial insemination and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 31–41, 2003.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF- κ B AND REL PROTEINS : Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. **Annu. Rev. Immunol**, v. 16, p. 225–60, 1998.

GORES-LINDHOLM, A. R.; LEBLANC, M. M.; CAUSEY, R.; HITCHBORN, A.; FAYRER-HOSKEN, R. A.; KRUGER, M.; VANDENPLAS, M. L.; FLORES, P.; AHLSCHEDE, S. Relationships between intrauterine infusion of N - acetylcysteine , equine endometrial pathology , neutrophil function , post-breeding therapy , and reproductive performance. **Theriogenology**, v. 80, n. 3, p. 218–227, 2013.

HEMBERG, E.; LUNDEHEIM, N.; EINARSSON, S. Retrospective Study on Vulvar Conformation in Relation to Endometrial Cytology and Fertility in Thoroughbred Mares. **J. Vet. Med**, v. 52, p. 474–477, 2005.

HINRICHS, K.; CUMMINGS, M. R.; SERTICH, P. L.; KENNEY, R. M. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. **J Am Vet Assoc**, v. 193, p. 72–5, 1988.

HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; SANJO, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, Y.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. **The Journal of Immunology**, v. 162, p. 3749–3752, 1999.

JUSTICE, E.; CARRUTHERS, D. M. Cardiovascular risk and COX-2 inhibition in rheumatological practice. **Journal of human hypertension**, v. 19, p. 1–5, 2005.

KAM, P. C. A.; SEE, A. U. Cyclo-oxygenase isoenzymes : physiological and pharmacological role. **Anaesthesia**, v. 55, p. 442–449, 2000.

KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTEIRO-JULIAN, F.; MANTOVANI, A.; FARNARIER, C. IL-6 : a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **TRENDS in Immunology**, v. 24, n. 1, p. 25–29, 2003.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response in mare after insemination with fresh semen. **Biol.Reprod. Mono**, v. 1, p. 515–518, 1995.

KNUTTI, B.; PYCOCK, J. F.; WEIJDEN, G. C.; KÜPFER, U. The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. **Equine Veterinary Education**, v. 12, n. 5, p. 267–270, 2010.

KOBLISCHKE, P.; KINDAHL, H.; BUDIK, S.; AURICH, J.; PALM, F.; WALTER, I.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; HOPPEN, H. O.; AURICH, C. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. **Theriogenology**, v. 70, n. 7, p. 1147–1158, 2008.

KOLM, G.; KLEIN, D.; KNAPP, E.; WATANABE, K.; WALTER, I. Lactoferrin expression in the horse endometrium: Relevance in persisting mating-induced endometritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, n. 1-2, p. 159–167, 2006.

KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 629–636, 1994.

KVATERNICK, V.; MALINSKI, T.; WORTMANN, J.; FISCHER, J. Quantitative HPLC-UV method for the determination of firocoxib from horse and dog plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 854, n. 1-2, p. 313–319, 2007a.

KVATERNICK, V.; POLLMEIER, M.; FISCHER, J.; HANSON, P. D. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, n. 3, p. 208–217, 2007b.

LEBLANC, M.; CAUSEY, R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 10–22, 2009.

LEBLANC, M. M. **Persistent mating-induced endometritis**. Five Ed Elsevier Inc., 2003.

LEBLANC, M. M.; NEUWIRTH, L.; ASBURY, a C.; TRAN, T.; MAURAGIS, D.; KLAPSTEIN, E. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine veterinary journal**, v. 26, n. 2, p. 109–113, 1994.

LEBLANC, M. M.; NEUWIRTH, L.; JONES, L.; CAGE, C.; MAURAGIS, D. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. **Theriogenology**, v. 50, n. 352, p. 49–54, 1998.

LETENDRE, L.; TESSMAN, R. K.; MCCLURE, S. R.; KVATERNICK, V. J.; FISCHER, J. B.; HANSON, P. D. Pharmacokinetics of firocoxib after

administration of multiple consecutive daily doses to horses. **Am J Vet**, v. 11, p. 1399–405, 2008.

LIMA, A. G.; COSTA, L. C. B.; ALVARENGA, M. A.; MARTINS, C. B. Does Clinical Treatment with Phenylbutazone and Meloxicam in the Pre-ovulatory Period Influence the Ovulation Rate in Mares? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 5, p. 771–775, 2015.

LYLE, S. K. Immunological considerations. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VRNER, D.D. **Equine reproduction**. 2. ed. Ames: Blackwell Publishing. p. 2587-2596, 2011.

MARTH, C. D.; YOUNG, N. D.; GLENTON, L. Y.; NODEN, D. M.; BROWNING, G. F.; KREKELER, N. Deep sequencing of the uterine immune response to bacteria during the equine oestrous cycle. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 934, 2015.

MEGIOVANNI MARIA, A.; SANCHEZ, F.; ROBLEDO-SARMIENTO, M.; MOREL, C.; GLUCKMAN, J. C.; BOUDALY, S. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes and mutually influence the two leukocyte populations occurring upstream of the interactions between. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 79, n. May, p. 977–988, 2006.

METCALF, E. S. The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to Persistent Mating-Induced Endometritis (PMIE). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 1, p. 128, 2014.

METCALF, E. S.; SCOGGIN, K.; TROEDSSON, M. H. T. The effect of platelet-rich plasma on endometrial pro-inflammatory cytokines in susceptible mares following semen deposition. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 475–518, 2012.

NASH, D. M.; SHELDON, I. M.; HERATH, S.; LANE, E. A. Markers of the uterine innate immune response of the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 31–39, 2010.

NIKOLAKOPOULOS, E.; KINDAHI, H.; WATSON, E. D. Oxytocin and PGF2 α release in mares resistant and susceptible to persistent mating-induced endometritis. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 56, p. 363–72, 2000.

NODA, M.; KARIURA, Y.; PANNASCH, U.; NISHIKAWA, K.; WANG, L.; SEIKE, T.; IFUKU, M.; KOSAI, Y.; WANG, B.; NOLTE, C.; AOKI, S.; KETTENMANN, H.; WADA, K. Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory cytokine release from activated microglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 101, n. 2, p. 397–410, 2007.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. **Journal of reproduction and fertility**, v. 31, n. 2, p. 187–95, 1972.

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

PYCOCK, J. F.; NEWCOMBE, J. R. Assessment of the effect of three treatments to remove intrauterine fluid on pregnancy rate in the mare. **Veterinary Record**, v. 138, n. April 2016, p. 320–323, 1996.

REGHINI, M. F. S.; RAMIRES NETO, C.; SEGABINAZZI, L. G.; CASTRO CHAVES, M. M. B.; DELL'AQUA, C. de P. F.; BUSSIÈRE, M. C. C.; DELL'AQUA, J. A.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 516–522, 2016.

REITZENSTEIN, M. Von; 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. **Theriogenology**, v. 58, p. 887–898, 2002.

RIGBY, D. A.; FERGUSON, D. J. P.; JOHNSON, L. A.; JACKSON, D. G. Neutrophils rapidly transit inflamed lymphatic vessel endothelium via integrin-dependent proteolysis and lipoxin-induced junctional retraction. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 98, n. December, p. 897–912, 2015.

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 1. **Biology of reproduction**, v. 747, n. November 1998, p. 740–747, 2001.

RISCO, A. M.; REILAS, T.; MUILU, L.; KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Effect of oxytocin and flunixin meglumine on uterine response to insemination in mares. **Theriogenology**, v. 72, n. 9, p. 1195–1201, 2009.

ROHRBACH, B. W.; SHEERIN, P. C.; CANTRELL, C. K.; MATTHEWS, P. M.; STEINER, J. V.; DODDS, L. E. Effect of adjunctive with intravenously administered *Propionibacterium acnes* on reproductive performance in mares with persistent endometritis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 231, n. 1, p. 107–113, 2007.

SCHRAMME, A. R.; PINTO, C. R. F.; DAVIS, J.; WHISNANT, C. S.; WHITACRE, M. D. Pharmacokinetics of carbetocin, a long-acting oxytocin analogue, following intravenous administration in horses. **Equine veterinary**

journal, v. 40, n. 7, p. 658–661, 2008.

SIROIS, J.; DORÉ, M. The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4427–4434, 1997.

SMITH, L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **American Journal of Physiological**, v. 263, p. 181–191, 1992.

SPERANDIO, M.; SMITH, M. L.; FORLOW, S. B.; OLSON, T. S.; XIA, L.; MCEVER, R. P.; LEY, K. P-selectin Glycoprotein Ligand-1 Mediates L-Selectin – dependent Leukocyte Rolling in Venules. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 10, p. 1355–1363, 2003.

STECKLER, D.; NAIDOO, V.; GERBER, D.; KAHN, W. Ex vivo influence of carbetocin on equine myometrial muscles and comparison with oxytocin. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 502–509, 2012.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 16, p. 3–9, 2004.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

TOZER; ROWLAND. Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: **The quantitative basis of drug therapy**. 2006.

TREBINO, C. E.; STOCK, J. L.; GIBBONS, C. P.; NAIMAN, B. M.; WACHTMANN, T. S.; UMLAND, J. P.; PANDHER, K.; LAPOINTE, J.-M.; SAHA, S.; ROACH, M. L.; CARTER, D.; THOMAS, N. A.; DURTSCHI, B. A.; MCNEISH, J. D.; HAMBOR, J. E.; JAKOBSSON, P.-J.; CARTY, T. J.; PEREZ, J. R.; AUDOLY, L. P. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 15, p. 9044–9, 2003.

TROEDSSON, M. Managing Mares With Chronic Uterine Inflammation. **Journal of equine veterinary science**, v. 15, p. 112–114, 1995.

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

TROEDSSON, M. H. T. Clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, n. 93, p. 461–471, 1999.

TROEDSSON, M. H. T. Breeding-Induced Endometritis in Mares. **Vet Clin Equine**, v. 22, p. 705–712, 2006.

TROEDSSON, M. H. T.; ABABNEH, M. M.; OHLGREN, A. F.; MADILL, S.; VETSCHER, N.; GREGAS, M. Effect of periovulatory prostaglandin F_{2α} on pregnancy rates and luteal function in the mare. **Theriogenology**, v. 55, n. 9, p. 1891–1899, 2000.

TROEDSSON, M. H. T.; FRANKLIN, B. K.; CRABO, B. G. Suppression of PMN-chemotaxis by different molecular weight fractions of equine seminal plasma. **Pferdeheikunde**, v. 15, p. 568–573, 1999.

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. 307–317, 1993.

VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Effect on fertility of uterine lavage performed immediately prior to insemination in mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 8, p. 1108–10, 2003.

VILÉS, K.; RABANAL, R.; RODRÍGUEZ-PRADO, M.; MIRÓ, J. Effect of ketoprofen treatment on the uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen. **Theriogenology**, v. 79, n. 7, p. 1019–1026, 2013.

WOODWARD, E. M.; CHRISTOFFERSEN, M.; CAMPOS, J.; BETANCOURT, A.; HOROHOV, D.; SCOGGIN, K. E.; SQUIRES, E. L.; TROEDSSON, M. H. T. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. **Reproduction**, v. 145, n. 3, p. 289–296, 2013.

WOODWARD, E. M.; CHRISTOFFERSEN, M.; CAMPOS, J.; SQUIRES, E. L.; TROEDSSON, M. H. T. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: Relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 495–501, 2012.

WOODWARD, E. M.; CHRISTOFFERSEN, M.; HOROHOV, D.; SQUIRES, E. L.; TROEDSSON, M. H. T. The effect of treatment with immune modulators on endometrial cytokine expression in mares susceptible to persistent breeding-induced endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, p. 235–239, 2015.

HIPÓTESE

- O tratamento com o anti-inflamatório não esteroideiro firocoxib controla a resposta inflamatória uterina após a inseminação artificial em éguas susceptíveis a EPPC

OBJETIVOS

- Avaliar o efeito do firocoxib sobre a resposta inflamatória uterina após a inseminação artificial de éguas com EPPC
- Avaliar se o firocoxib interferirá no mecanismo da ovulação

CAPÍTULO 2

1 **ARTIGO – Resposta inflamatória uterina de éguas com endometrite persistente pós-**
2 **cobertura tratadas com firocoxib**

3

4 Artigo redigido segundo as normas do periódico PAB- Pesquisa Agropecuária Brasileira
5 Print version ISSN 0100-204X, On-line version ISSN 1678-3921, fator de impacto 0.564,
6 ranqueada como B1 pelo QUALIS-CAPES de 2015.

7

8 **Resumo**

9

10 A endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) afeta uma parcela significativa das éguas
11 que estão em programas de reprodução, acarretando a diminuição da fertilidade desses
12 animais. O anti-inflamatório não esteroideal (AINE) firocoxib tem se mostrado um
13 excelente modular da resposta imune quando utilizado em equinos para o tratamento de
14 inflamações ostearticulares. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do
15 firocoxib sobre o controle da resposta inflamatória uterina pós-inseminação artificial em
16 éguas com EPPC. Foram utilizadas 9 éguas com histórico reprodutivo de baixos índices
17 de fertilidade, classificadas como susceptíveis a EPPC. Todas as fêmeas participaram dos
18 dois grupos experimentais em dois ciclos estrais consecutivos, sendo cada égua o seu
19 próprio controle. O primeiro ciclo foi designado como o grupo controle, em que as fêmeas
20 foram apenas inseminadas. O segundo ciclo foi designado como grupo tratado e as fêmeas
21 recebiam o anti-inflamatório não esteroideal firocoxib (0,2mg/kg/VO) a partir do dia da
22 indução da ovulação até um dia após a IA, no total de três administrações com intervalos
23 de 24 horas. A inflamação uterina foi avaliada por quatro parâmetros: citologia, biópsia
24 uterina, avaliação ultrassonográfica da área de líquido uterino e imunohistoquímica para
25 avaliação da COX-2 (ciclooxigenase-2) as 24 horas antes da IA e 24 horas após a IA. As
26 inseminações foram realizadas 24 horas após a indução das ovulações com dose
27 inseminante de 1×10^9 espermatozoides viáveis. Foram feitas as comparações entre os
28 grupos controle e tratado no momento 24h pré-IA e 24h pós-IA. Houve redução no
29 número de PMNs na citologia, e na histopatologia uterina, 24h após a IA (41,0% X 26,1%
30 e 20,4 X 11,7, respectivamente nos grupos controle e tratado, com $p < 0,05$ e $p = 0,05$).
31 Também ocorreu a diminuição da marcação de COX-2 nas 24h após a IA (2,6 X 1,7,
32 respectivamente nos grupos controle e tratado, com $p < 0,05$). Quanto a área de líquido
33 uterino não houve diferença estatística em nenhum dos momentos na comparação entre

34 os grupos. O AINE firocoxib reduziu a resposta inflamatória pós-IA, podendo ser
35 utilização como adjuvante no tratamento de EPPC.

36

37 Palavras-chave: Anti-inflamatório não esteroideal, equino, endométrio, resposta
38 inflamatória.

39

40 **1. Introdução**

41

42 Após a monta natural ou IA ocorre uma inflamação uterina fisiológica nas éguas,
43 que é desencadeada pelo contato do sêmen com o endométrio [1, 2]. Essa endometrite é
44 transitória e promove um influxo de PMNs para dentro do útero [3,4], o pico da
45 inflamação acontece entre 6 e 12 horas, e sua diminuição tende a ocorrer a partir das 24h
46 horas após a deposição do sêmen no útero [5].

47 As fêmeas que não conseguem controlar a inflamação uterina até as 36 horas pós-
48 cobertura são classificadas como susceptíveis, e apresentam EPPC [6,7]. Esta patologia
49 leva a diminuição da fertilidade e a baixa sobrevivência embrionária [8,9].

50 Alguns fatores contribuem para a ocorrência da EPPC, como a idade avançada
51 das éguas, elevado número de partos, o afrouxamento dos ligamentos que sustentam o
52 útero, a falha na contratilidade endometrial [10,11], e também é relatado a presença de
53 patologias endometriais nessas fêmeas [12,13].

54 Na tentativa de conter a EPPC, além do uso de paliativos como lavagem uterina
55 [14] e a utilização de fármacos ecbólicos [15,16], já foram realizados tratamentos com
56 anti-inflamatórios esteroidais, obtendo resultados positivos sobre o controle da
57 inflamação [17,18] e fertilidade desses animais [19,20,21]. Os anti-inflamatórios
58 esteroidais apresentam efeitos adversos, como a ocorrência de problemas gástricos e
59 laminite nos equinos [22], portanto os novos estudos estão voltados para o uso de AINEs.
60 Estes são considerados fármacos mais seguros, principalmente aqueles que bloqueiam a
61 COX-2, não atuando na via fisiológica, permitindo assim um uso prolongado do fármaco
62 sem acarretar problemas de saúde ao animal [23].

63 Com o uso de AINEs estão sendo obtidos resultados promissores, como a
64 diminuição de PMNs [24] e da expressão de COX-2 no endométrio [25], resultando em
65 uma modulação na inflamação após a IA.

66 Um AINE que está sendo utilizado na medicina esportiva equina para o
67 tratamento de doenças inflamatórias osteoarticulares é o firocoxib [26], se mostrando

68 altamente eficaz, com boa disponibilidade, alto volume de distribuição e uma meia vida
69 longa [27].

70 O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do firocoxib sobre a resposta
71 inflamatória uterina pós-inseminação artificial de éguas susceptíveis a EPPC, e se o
72 fármaco interferiu no mecanismo da ovulação nesses animais.

73

74 **2. Materiais e métodos**

75

76 Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, Universidade
77 Estadual Paulista - UNESP Botucatu, SP. Protocolo n° 165/2015.

78

79 **2.1. Seleção dos animais**

80

81 Para a realização desse estudo foram utilizadas 9 éguas sem raça definida, com
82 idade entre 12 e 22 anos. Os animais que participaram do estudo apresentavam boa
83 condição corporal (6,0 a 8,0) [28] e foram mantidos nas mesmas condições a pasto.

84 Anteriormente ao início desse estudo as éguas receberam avaliações reprodutivas
85 por acompanhamento ultrassonográfico, citologia e suab uterino para selecionar apenas
86 éguas que eram susceptíveis a EPPC. Todas as éguas selecionadas apresentavam cultura
87 uterina negativa e uma taxa <5% de neutrófilos na citologia uterina no momento anterior
88 a IA [29], e nas 48h após a IA apresentavam acúmulo de líquido intrauterino (coluna de
89 líquido > 2 cm) e infiltrado de PMNs no útero. Todas as fêmeas que participaram do
90 estudo apresentavam algum grau de degeneração endometrial [30].

91

92 **2.2. Coleta de sêmen e processamento das doses inseminantes**

93

94 Foi utilizado sêmen de apenas um garanhão de fertilidade conhecida. As coletas de
95 sêmen foram realizadas utilizando vagina artificial, a concentração espermática foi
96 determinada através de contagem de células em câmara de Neubauer, os padrões de
97 cinética espermática foram avaliados pelo de sistema computadorizado de análise
98 espermática (Hamilton Thorne Research, Danvers, USA). As doses inseminantes
99 preparadas durante o experimento apresentavam um total de 1×10^9 de espermatozoides
100 viáveis, o sêmen foi diluído em diluente a base de leite desnatado (Botusêmen,
101 Botupharma, Botucatu/SP, Brasil) até a concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL.

2.3. Protocolo de tratamento

Para realização do experimento foi utilizado o AINE firocoxib (Previcox® Merial Saúde Animal LTDA, Paulínea, SP, Brasil) na formulação de comprimidos mastigáveis para cães, com comprovada eficiência em equinos [31], na dose diária de 0,2 mg/Kg de peso vivo [32].

Todas as éguas participaram dos dois grupos experimentais em dois ciclos estrais consecutivos, sendo que cada égua foi o seu próprio controle. Em ambos os ciclos foi realizado o acompanhamento das éguas por palpação transretal e ultrassonografia, quando um folículo atingiu ≥ 35 mm de diâmetro e, o útero apresentava edema característico de estro realizou-se a indução da ovulação com a utilização de 1 mg de acetato de deslorelina (Sincrorrelin®, OuroFino, Cravinhos, SP, Brasil) por via intramuscular. As IAs foram realizadas com sêmen fresco (1×10^9 espermatozoides viáveis) 24 horas após a indução da ovulação.

No ciclo controle as éguas foram avaliadas diariamente e realizou-se apenas a IA. No ciclo tratado as éguas recebiam o firocoxib por via oral, a partir do dia da indução da ovulação até um dia após a IA, correspondendo a três dias de tratamento com intervalo de 24 h entre as administrações.

Após cinco dias das ovulações foi realizada a aplicação de PGF2 α para ocorrer a luteólise dos corpos lúteos.

2.4. Avaliações e coletas de amostras

2.4.1 Citologia uterina

A citologia esfoliativa uterina foi realizada 24 horas antes e 24 horas após a IA com a utilização de escova citológica descartável (Provar Comercial LTDA®), sendo as 24h pós-IA o momento adequado para avaliar éguas susceptíveis, como já é utilizado por outros pesquisadores [33,24]. Após a colheita do material e confecção dos esfregaços as lâminas foram coradas com panótico rápido. A leitura das amostras foi realizada pela microscopia óptica utilizando óleo de imersão (aumento de 1000X), pela contagem de 200 células de forma aleatória na lâmina e posteriormente calculou-se a porcentagem de neutrófilos [29, 12].

2.4.2 Biopsia uterina

As biopsias uterinas foram realizadas 24h antes e 24h após a IA com a utilização de pinça de biopsia. As amostras foram retiradas da região da bifurcação dos cornos uterinos e posteriormente armazenadas em formol tamponado a 10%.

As lâminas histológicas foram preparadas, os fragmentos uterinos foram parafinizados, cortados, as lâminas foram montadas e coradas com hematoxilina e a eosina (HE). Cinco campos íntegros do estrato compacto foram analisados aleatoriamente por amostra, em microscopia óptica (aumento de 400X). A contagem de PMNs nos campos foi realizada por um único avaliador à cegas, e posteriormente uma média do número de células foi calculada.

Para a realização da Imunohistoquímica foi utilizada a técnica descrita por Vilés [25]. A quantidade de proteína COX-2 foi medida utilizando a técnica convencional de estreptavidina-avidina-biotina-peroxidase. O número de células positivas à COX-2 foi avaliado por microscopia óptica (Primo Star, Zeiss, Brasil) (aumento de 400X) em cinco campos selecionados aleatoriamente do epitélio e estrato compacto endometrial. Um sistema de pontuação modificado proposto por Jiwakanon [34] foi utilizado para registrar conjuntamente o número de células marcadas, a intensidade da marcação e a localização das células marcadas (0 - negativo para COX - 2, 1 - presença fraca de células positivas, 2 - presença moderada de células positivas; 3 - presença grave de células positivas), posteriormente realizou-se uma média da pontuação.

2.4.3 Ultrassonografia

Foram realizados exames ultrassonográficos 24h antes e 24 horas após a IA a fim de detectar a presença de fluído uterino acumulado na região da bifurcação dos cornos uterinos, o qual foi mensurado em cm^2 , pela aferição da altura e largura da coluna de líquido.

Com a utilização da ultrassonografia também foi detectado o dia da ovulação.

2.4.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram representados como média e erro padrão. Para realizar a análise estatística foram feitas as comparações entre os grupos de acordo com os

170 momentos avaliados. Após a avaliação da normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov
171 (K-S) os dados foram submetidos a análise ao teste T pareado (variáveis paramétricas) ou
172 Mann-Whitney (variáveis não paramétricas), atribuindo um nível de significância de 5%.
173 Realizou-se a correlação dos dados de citologia, histopatologia e Imunohistoquímica pelo
174 coeficiente de Spearman. As análises foram realizadas pelo Programa GraphPad Prism
175 versão 6.0 para Windows (GraphPad software, LA Jolla, Califórnia, USA).

176

177 **2. Resultados**

178

179 **3.1 Citologia Uterina**

180

181 A porcentagem de PMNs no momento pré-IA ($0,7 \pm 0,1$ X $0,1 \pm 0,1$) e pós-IA ($41 \pm$
182 $6,5$ X $26,8 \pm 8,9$) do grupo controle e tratado respectivamente, mostrando diminuição das
183 células inflamatórias no momento 24h pós-IA no grupo tratado com $p < 0,05$.

184

185 **3.2 Biópsia Uterina**

186

187 A média de PMNs avaliados na histopatologia no momento pré-IA ($2,3 \pm 1,3$ X $4,8$
188 $\pm 2,2$), e pós-IA ($20,4 \pm 2,6$ X $11,8 \pm 2,2$) do grupo controle e tratado respectivamente,
189 mostrando diminuição do infiltrado neutrofílico no momento 24h após a IA no grupo
190 tratado com $p = 0,05$ (Fig.1). Observou-se uma correlação moderada entre a porcentagem
191 e a média de PMNs registradas nas amostras de citologia e biópsia em todos os grupos (r
192 $= 0,707$, $p < 0,0001$). Todas as éguas utilizadas apresentavam classificação
193 histopatológica entre grau IIA e IIB segundo Kenney [30].

194

195 A marcação de COX-2 avaliados pela imunohistoquímica nas células do endométrio
196 nas 24h pré-IA ($0,9 \pm 0,2$ X $0,8 \pm 0,2$), e nas 24h pós-IA ($2,6 \pm 0,2$ X $1,7 \pm 0,2$) do grupo
197 controle e tratado respectivamente, mostrando a diminuição da marcação de COX-2 nas
198 24h pós-IA, no grupo tratado com $p < 0,05$. A COX-2 correlacionou-se com a
199 porcentagem de PMNs das amostras de citologia ($r = 0,625$, $p < 0,0001$).

200

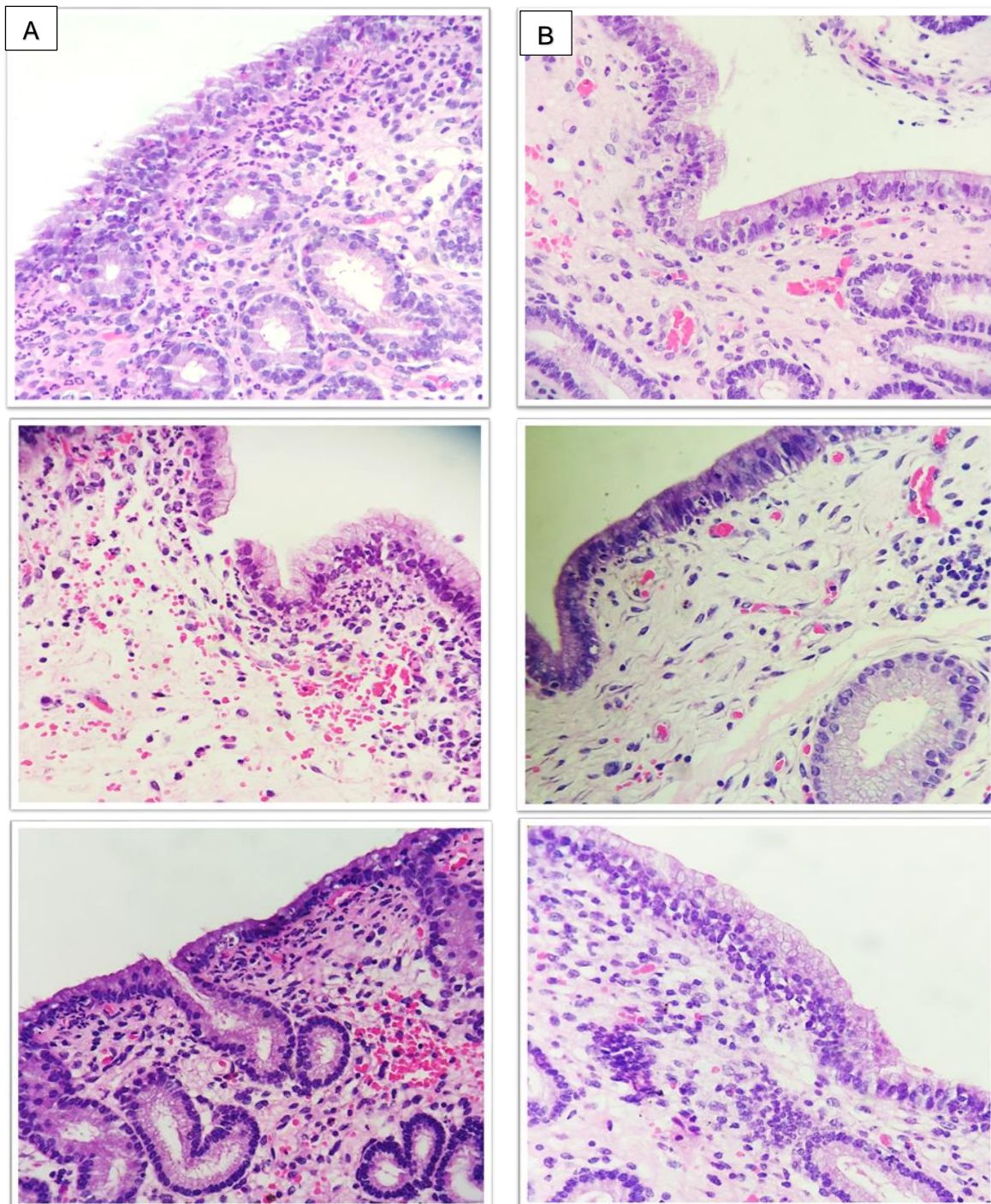
200 **3.3 Líquido Uterino e ovulações**

201

202 As médias de área de líquido (cm^2) no momento 24h pré-IA ($1,1 \pm 0,49$ / $4,5 \pm 1,82$),
203 no momento 24 horas pós-IA ($10,9 \pm 3,9$ / $8,7 \pm 2,8$), respectivamente para o grupo

204 controle e para o grupo tratado. Não foi observada diferença estatística nas comparações
205 entre os grupos.

206 Todas as fêmeas ovularam em até 48h após da indução da ovulação, independente do
207 grupo que participaram.



208 Fig.1 Imagem mostrando secções de biópsias coradas com hematoxilina eosina no
209 aumento de 400X. A coluna (A) representa três éguas do grupo controle nas 24h pós-IA
210 e a coluna (B) representa as mesmas éguas quando participaram do grupo tratado com
211 firocoxib nas 24h pós-IA.

212 3. Discussão

213

214 Sabe-se que após a IA ou monta natural ocorre a inflamação uterina fisiológica nas
215 éguas, uma parcela dessas fêmeas não consegue conter essa inflamação adequadamente,
216 acarretando a diminuição da fertilidade [7]. O uso de anti-inflamatórios esteroidais no
217 tratamento de EPPC tem demonstrado bons resultados no controle da inflamação uterina
218 [19], contudo esses medicamentos apresentam diversos efeitos indesejados, como úlceras
219 gástricas e laminite nos equinos [22]. Os AINEs são uma nova opção terapêutica para o
220 controle de inflamações destacando os COX-2 seletivos, por promoverem uma maior
221 segurança para o animal durante o tratamento, estes não atuam na via fisiológica COX-1,
222 evitando desta forma o aparecimento de efeitos colaterais indesejáveis [23].

223 Na tentativa de controlar a inflamação uterina pós-IA utilizamos o AINE firocoxib
224 por apresentar alta seletividade para COX-2, o qual mostrou-se capaz de atuar de forma
225 eficaz no útero das éguas, provavelmente devido a suas características farmacocinéticas,
226 como seu alto volume de distribuição ($1,69 \pm 0,53L/Kg$) e sua meia-vida terminal longa
227 ($29,6 \pm 7,5h$) [27] [35].

228 Tanto na citologia como na histopatologia uterina observou-se a diminuição de
229 PMNs no endométrio, demonstrando que o AINE atuou diminuindo a migração das células
230 de defesa para o local da inflamação, corroborando com os resultados encontrados por
231 Aurich quando utilizou o AINE vedaprofen no tratamento de éguas susceptíveis a
232 endometrite pós-cobertura [24]. Uma das possíveis explicações para o firocoxib ter
233 modulado a resposta inflamatória uterina com a diminuição de PMNs é que o bloqueio
234 farmacológico da COX-2 em modelos animais de câncer promove também um controle
235 da enzima indoleamina 2,3- dioxigenase (IDO1), mostrando uma inter-relação entre esses
236 alvos moleculares em doenças inflamatórias e auto-imunes. Acredita-se que a inibição da
237 IDO1 pelo bloqueio COX-2 possa controlar respostas imunes indesejadas [36]. Em um
238 modelo experimental de ratos com artrite, a IDO se mostrou elevada no início da doença,
239 e quando realizou-se um tratamento com inibidor da IDO, o 1-metil triptofano, ocorreu
240 redução significativa da gravidade da doença [37].

241 Estudos anteriores indicam que a relação entre os AINEs COX-2 seletivos e o controle
242 da migração de leucócitos se deve pela diminuição da produção de PGE, a qual tem um
243 papel dominante na promoção da inflamação e atua liberando peptídeos quimiotáticos
244 [38,39], e também pela diminuição da PGI que é um potente vasodilatador, que auxilia a
245 passagem dos leucócitos pelo vaso até o local da inflamação, e ainda é responsável pela

246 formação do edema [40,41]. Provavelmente, essa diminuição local de células
247 inflamatórias leva a uma menor produção de citocinas inflamatórias, as quais se
248 expressam de forma alterada em éguas com EPPC. Koblichke [42] utilizando o ácido
249 meclofenâmico e o flunixin meglumine para evitar a inflamação uterina após a realização
250 da transferência de embriões, não observou diferença na expressão de citocinas pró-
251 inflamatórias, alegando que esse fato se deve a avaliação ter sido realizada tardiamente,
252 4 dias após a transferência de embrião. As citocinas inflamatórias são reguladas dentro
253 de 12h após o início do processo inflamatório [43].

254 Ocorreu a diminuição da marcação de COX-2 nas células endometriais pós-IA no
255 grupo que recebeu tratamento, confirmando conforme o esperado que o firocoxib foi
256 eficaz em modular a expressão de COX-2. Esses achados corroboram com os resultados
257 obtidos por Koblichke [42] com a utilização de ácido meclôfenamico e flunixin
258 meglumine, e também com Vilés [25] com o uso de cetoprofeno em jumentas.

259 Nas avaliações de presença de fluido uterino não houve diferença estatística em
260 nenhuma das comparações, em ambos os grupos as éguas mantiveram fluido no interior
261 do útero nas 24h pós-IA. Nosso resultado é contraditório aos resultados obtidos por
262 Leblanc [44], quando utilizou o AINE fenilbutazona, o qual observou um aumento do
263 acúmulo de fluido uterino, e por Dell'Aqua [19] que quando utilizou acetato de
264 prednisolona encontrou uma diminuição no acúmulo de fluido uterino. A diferença entre
265 o modo de ação desses fármacos pode explicar os resultados obtidos por esses estudos.
266 Possivelmente a falha na eliminação do fluido uterino não teve relação com a
267 farmacocinética do firocoxib, e sim devido a problemas na contratilidade uterina. Sabe-
268 se que as fêmeas com atraso na drenagem uterina podem apresentar contrações
269 insuficientes ou irregulares impedindo a eliminação correta do fluido em direção a cérvix
270 [45], e também é observado modificações anatômicas do trato reprodutivo que ocorrem
271 ao longo da vida, como o posicionamento uterino que passa a ser pendular dificultando a
272 drenagem do fluido [11].

273 A utilização de drogas ecbólicas juntamente com o uso de AINEs demonstrou bons
274 resultados no controle da inflamação uterina pós-cobertura em éguas [24], podendo ser
275 um adjuvante no tratamento de EPPC, auxiliando a drenagem do fluido uterino,
276 diminuindo assim a quimiotaxia para o local da inflamação.

277 Não foi observado nenhuma interferência do tratamento com o AINE no processo da
278 ovulação. Todas as fêmeas ovularam até 48h após a aplicação do indutor da ovulação,
279 mostrando que o fármaco na dose de 0,2 mg/kg/dia não foi capaz de interromper a

280 produção de PGs que são responsáveis pela ovulação. Estes resultados corroboram com
281 estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa foi avaliado a taxa de ovulação e
282 de fertilidade de éguas doadoras de embrião com bom histórico reprodutivo utilizando o
283 firocoxib, não foi observado falha no processo da ovulação e a taxa de fertilidade se
284 manteve similar ao grupo controle [46], mostrando que o AINE não interferiu na ovulação
285 e na viabilidade embrionária na fase inicial, mesmo sabendo que a ovulação e a migração
286 dos espermatozoides intra uterina para o oviduto é dependente da ação das PGs [47,48].
287 Existem resultados controversos aos encontrados em nosso estudo utilizando o AINE
288 flunixin meglumine na dose de 1,7mg/Kg em éguas no momento pré-ovulatório, em que
289 ocorreu a formação de folículos anovulatórios quando o tratamento começou $\leq 24h$ após
290 a indução da ovulação com hCG e foi mantido a cada 12h até $\geq 36h$ [49]. Esses achados
291 podem ser explicados devido a esse anti-inflamatório atuar tanto na COX-1, bloqueando
292 a síntese de PGF 2α , como na COX-2, bloqueando a síntese da PGE 2 , ambas PGs são
293 responsáveis por sintetizar enzimas que atuam no colapso da parede folicular [50]. Devido
294 ao firocoxib ser um AINE seletivo para COX-2, possivelmente houve um bloqueio parcial
295 da produção dessas prostaglandinas não interrompendo a produção pela via da COX-1 e,
296 consequentemente não interferindo no processo da ovulação nesses animais

297 Baseado nos resultados obtidos, concluímos que o firocoxib reduz a migração de
298 PMNs para o endométrio e não interfere no mecanismo da ovulação, mostrando-se um
299 fármaco seguro que pode ser utilizado como adjuvante no tratamento da EPPC.

300

301

302 Referências

303

- 304 1. Troedsson MHT, Loset K, Alghamdi AM, Dahms B, Crabo BG. Interaction
305 between equine semen and the endometrium : the inflammatory response to semen.
306 Anim Reprod Sci. 2001;68:273–8.
307
- 308 2. Katila T. Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus. Reprod Domest
309 Anim. 2012;47(SUPPL. 5):31–41.
310
- 311 3. Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T. Sperm-induced leukocytosis in the equine
312 uterus. Theriogenology. 1994;41(3):629–36.
313
- 314 4. Katila T. Uterine defence mechanisms in the mare. Anim Reprod Sci.
315 1996;42(96):197–204.

316

- 317 5. Katila T. Onset and duration of uterine inflammatory response in mare after
318 insemination with fresh semen. *BiolReprod Mono.* 1995;1:515–8.
319
- 320 6. Leblanc MM. Persistent Mating-Induced Endometritis. Five Editi. *Current*
321 *Therapy in Equine Medicine: 5 ed.* Elsevier Inc.; 2003. 234-237 p.
322
- 323 7. Troedsson MHT, Woodward EM. Our current understanding of the
324 pathophysiology of equine endometritis with an emphasis on breeding-induced
325 endometritis. *Reprod Biol. Society for Biology of Reproduction & the*
326 *Institute of Animal Reproduction and Food Research of Polish Academy of*
327 *Sciences in Olsztyn;* 2016;16(1):8–12.
328
- 329 8. Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R. Development of
330 horse embryos up to twenty two days after ovulation observations on fresh
331 specimens. *J Anat.* 1982;135:191–209.
332
- 333 9. Troedsson MHT. Clearance and resistance to persistent endometritis in the mare.
334 *Theriogenology.* 1999;52(93):461–71.
335
- 336 10. Leblanc MM, Neuwirth L, Asbury a C, Tran T, Mauragis D, Klapstein E.
337 Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with
338 recurrent endometritis. *Equine Vet J.* 1994;26(2):109–13.
339
- 340 11. Leblanc MM, Neuwirth L, Jones L, Cage C, Mauragis D. Differences in uterine
341 position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance
342 detected by scintigraphy. *Theriogenology.* 1998;50(352):49–54.
343
- 344 12. Card C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares.
345 *Theriogenology.* 2005;64:580–8.
346
- 347 13. Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Squires EL, Troedsson MHT.
348 Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare:
349 Relationship to endometrial biopsy score and age , and variations between seasons.
350 *Theriogenology.* Elsevier Inc.; 2012;78(3):495–501.
351
- 352 14. Brinsko SP, Rigby SL, Varner DD, Blanchard TL. A practical method for
353 recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. *Proc Am Assoc*
354 *Equine Pr.* 2003;49:363–3.
355
- 356 15. Troedsson MHT. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis.
357 *Pferdeheikunde.* 1997;13:516–20.

358

359 16. Campbell MLH, England GCW. A comparison of the ecbolic efficacy of
360 intravenous and intrauterine oxytocin treatments. *Theriogenology*. 2002;58(2-
361 4):473–7.

362

363 17. Christoffersen M, Woodward EM, Bojesen AM, Petersen MR, Squires EL, LEHN-
364 JENSEN H, et al. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial
365 inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares.
366 *Theriogenology*. 2012;78(March):991–1004.

367

368 18. Woodward EM, Christoffersen M, Horohov D, Squires EL, Troedsson MHT. The
369 effect of treatment with immune modulators on endometrial cytokine expression
370 in mares susceptible to persistent breeding-induced endometritis. *Equine Vet*
371 *Jouranl*. 2015;47:235–9.

372

373 19. Dell Aqua Jr JA, Papa FO, Lopes MD, Alvarenga MA, Macedo LP, Melo CM.
374 Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination
375 with equine frozen semen. *Anim Reprod Sci*. 2006;94:270–3.

376

377 20. Bucca S, Carli A, Buckley T, Dolci G, Fogarty U. The use of dexamethasone
378 administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating
379 induced endometritis. *Theriogenology*. 2008;70:1093–100.

380

381 21. Fioratti EG, Villaverde AISB, Melo CM, Tsunemi MH, Papa FO, Alvarenga MA.
382 Influence of Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Viability and Fertility of
383 Equine Semen. *J Equine Vet Sci*. 2012;32(12):771–5.

384

385 22. Bailey SR. Corticosteroid-Associated Laminitis. *Vet Clin North Am - Equine*
386 *Pract*. 2010;26(2):277–85.

387

388 23. Cook VL, Blikslager AT. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in
389 critically ill horses. *J Vet Emerg Crit Care*. 2015;25(1):76–88.

390

391 24. Aurich C, Rojer H, Walter I. Treatment of estrous mares with the non-steroidal
392 anti-inflammatory drug vedaprofen reduces the inflammatory response of the
393 endometrium to insemination. *Anim Reprod Sci*. 2010;121:104–6.

394

395 25. Vilés K, Rabanal R, Rodríguez-Prado M, Miró J. Effect of ketoprofen treatment
396 on the uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen.
397 *Theriogenology*. Elsevier Inc; 2013;79(7):1019–26.

398

399 26. Frisbie D, Donnell J. Use of firocoxib for the treatment of equine osteoarthritis.

- 400 Vet Med Res Reports [Internet]. 2014;Volume 5:159.
401
- 402 27. Koene M, Goupil X, Kampmann C, Hanson PD, Denton D, Pollmeier MG. Field
403 Trial Validation of the Efficacy and Acceptability of Firocoxib, a Highly Selective
404 Cox-2 Inhibitor, in a Group of 96 Lamé Horses. *J Equine Vet Sci*. Elsevier Ltd;
405 2010;30(5):237–43.
406
- 407 28. Henneke DR, Potter GD, Kreider JL, Yeates BF. Relationship between condition
408 score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Vet J*.
409 1983;15(4):371.
410
- 411 29. Brook D. Uterina Cytology. In: In: McKINNON, A O.; VOSS JL (ed). ER, editor.
412 Equine Reproduction. Philadelphia. Philadelphia:Lea e Febiger; 1993. p. 1993, 246–
413 53.
414
- 415 30. Kenney R. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by
416 biopsy, with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc*.
417 1978;172(3):241–62.
418
- 419 31. Barton MH, Paske E, Norton N, King D, Giguere S, Budsberg S. Efficacy of cyclo-
420 oxygenase inhibition by two commercially available firocoxib products in horses.
421 *Equine Vet J*. 2014;46(1):72–5.
422
- 423 32. Cox S, Villarino N, Sommardahl C, Kvaternick V, Zarabadipour C, Siger L, et al.
424 Disposition of firocoxib in equine plasma after an oral loading dose and a multiple
425 dose regimen. *Vet J*. Elsevier Ltd; 2013;198(2):382–5.
426
- 427 33. Alvarenga MA, Matos I. Utilização da escova ginecológica cytobrush na coleta de
428 material endometrial de éguas. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 1990;42:67–8.
429
- 430 34. Jiwakanon J, Persson E, Berg M, Dalin AM. Influence of seminal plasma,
431 spermatozoa and semen extender on cytokine expression in the porcine
432 endometrium after insemination. *Anim Reprod Sci*. Elsevier B.V.; 2011;123(3-
433 4):210–20.
434
- 435 35. Kvaternick V, Pollmeier M, Fischer J, Hanson PD. Pharmacokinetics and
436 metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in
437 horses. *J Vet Pharmacol Ther*. 2007;30(3):208–17.
438
- 439 36. Cesario A, Rocca B, Rutella S. The Interplay between Indoleamine 2 , 3-
440 Dioxygenase 1 (IDO1) and Cyclooxygenase (COX) -2 In Chronic Inflammation
441 and Cancer. *Current*. 2011;1:2263–71.
442

- 443 37. Muller AJ, Mandik-Nayak L, Prendergast GC. Beyond immunosuppression:
444 reconsidering indoleamine 2,3- dioxygenase as a pathogenic element of chronic
445 inflammation. *Immunotherapy*. 2010;2(3):293–7.
446
- 447 38. Higgs GA, Eakins KE, Mugridge KG, Moncada S, Vane JR. The effects of non-
448 steroid anti-inflammatory drugs on leukocyte migration in carrageenin-induced
449 inflammation. *Eur J Pharmacol*. 1980;66(1):81–6.
450
- 451 39. Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, Naiman BM, Wachtmann TS, Umland JP, et
452 al. Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible
453 prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(15):9044–9.
454
- 455 40. Caughey GE, Cleland LG, Gamble JR, James MJ. Up-regulation of endothelial
456 cyclooxygenase-2 and prostanoid synthesis by platelets. Role of thromboxane A2.
457 *J Biol Chem*. 2001;276(41):37839–45.
458
- 459 41. Noda M, Kariura Y, Pannasch U, Nishikawa K, Wang L, Seike T, et al.
460 Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-inflammatory
461 cytokine release from activated microglia. *J Neurochem*. 2007;101(2):397–410.
462
- 463 42. Koblishke P, Kindahl H, Budik S, Aurich J, Palm F, Walter I, et al. Embryo
464 transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be
465 prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology*.
466 2008;70(7):1147–58.
467
- 468 43. Palm F, Walter I, Budik S, Kolodziejek J, Nowotny N, Aurich C. Influence of
469 different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on
470 expression of IL-1 b , IL-6 , TNF- a and COX-2 mRNA in the equine endometrium.
471 2008;70:843–51.
472
- 473 44. Leblanc MM. Effects of oxytocin , prostaglandin and phenylbutazone on uterine
474 clearance of radiocolloid. *Pferdeheikunde*. 1997;3:483–5.
475
- 476 45. Reitzenstein M Von, Callahan MA, Hansen PJ, Leblanc MM. Aberrations in
477 uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after
478 administration of detomidine and oxytocin. *Theriogenology*. 2002;58:887–98.
479
- 480 46. Friso AM, Cyrino MA, Teoro MT, Alvarenga MA. Effect of firocoxib on ovulation
481 and fertility rates of embryo donor mares. *J Equine Vet Sci*. Elsevier Ltd;
482 2016;41:74.
483
- 484 47. Ginther O. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus.
485 *Equine Vet J*. 1985;Supplement(3):41–7.

486

487 48. Troedsson MHT, Liu IKM, Crabo BG. Sperm transport and survival in the mare.
488 Theriogenology. 1998;49(5):905–15.

489

490 49. Cuervo-Arango J. The effect of treatment with flunixin meglumine at different
491 times relative to hCG administration on ovulation failure and luteal function in
492 mares. Anim Reprod Sci. Elsevier B.V.; 2011;127(1-2):84–90.

493

494 50. Sirois J, Doré M. The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine
495 preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process.
496 Endocrinology. 1997;138(10):4427–34.

497

CAPÍTULO 3

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O firocoxib atuou controlando a migração de PMNs para o local da inflamação e não interferiu no processo da ovulação, mostrando-se um fármaco seguro que pode ser utilizado como adjuvante no tratamento da EPPC em éguas.