

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DA SECREÇÃO ENDOMETRIAL DA
ÉGUA**

EDUARDO MALSCHITZKY

**PORTO ALEGRE
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DA SECREÇÃO ENDOMETRIAL DA
ÉGUA**

EDUARDO MALSCHITZKY

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. RODRIGO COSTA MATTOS

Co-Orientadora: Dr. MARIA INÊS MASCARENHAS JOBIM

**PORTO ALEGRE
2007**

M261a Malschitzky, Eduardo

Avaliação do perfil protéico da secreção endometrial da égua /
Malschitzky, Eduardo – Porto Alegre: UFRGS, 2007.

130f.; il. –Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2007.
Rodrigo Costa Mattos, Orient.

1. Égua 2. Proteínas 3. Secreção endometrial 4.
Eletroforese 5. Ciclo Estral I Mattos, Rodrigo Costa, Orient. II
Título

CDD 619.38

**Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Veterinária da UFRGS**

EDUARDO MALSCHITZKY

**AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTÉICO DA SECREÇÃO ENDOMETRIAL
DA ÉGUA**

APROVADA POR:

Prof. Dr. Carlos Antonio Mondino Silva

Prof. Dr. Cláudio Alves Pimentel

Prof. Dr. Maria Inês Mascarenhas Jobim

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos, pela amizade, pelo exemplo de liderança e de orientação e por me ensinar e estimular constantemente a olhar os fatos com curiosidade científica, nesta longa jornada desde a iniciação científica.

À Prof. Dra. Maria Inês Mascarenhas Jobim, pela amizade e alegria, pelo exemplo de tenacidade, por transmitir toda a sua experiência com a técnica e pelo acompanhamento na realização de todas as eletroforeses.

À Prof. Dra. Sandra Mara Encarnação Fiala, por todo o auxílio com as coletas de material no frigorífico.

À Profa. Dra. Ana Maria Telles Esmeraldino, pela realização dos exames histopatológico e imunohistoquímico.

À Prof. Dra. Vera Beatriz Wald, pela orientação e realização da análise estatística.

À Prof. Dra. Cristiane Salbego, por estar sempre disposta à auxiliar nos momentos de dúvida.

Ao Msc. tenente veterinário Rafael Rodrigues, pela recepção e auxílio com as coletas de material em São Borja.

Ao Exército Brasileiro, em especial à Coudelaria do Rincão, e seu corpo de oficiais veterinários, por ceder os animais e auxiliar nas coletas de material.

Ao Frigorífico Miramar, pela permissão para a realização das coletas nas éguas de abate.

Ao CNPq / PRONEX / FAPERGS, pelo financiamento do projeto.

Ao Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory, pelo apoio durante meus muitos anos de Reprolab.

Aos doutorandos, mestrados e bolsistas de iniciação e estagiários do Reprolab e à Raquel Ximenes, bolsista do Laboratório de Inseminação Artificial, pela ajuda e pelo coleguismo.

Ao Laboratório de Embriologia e ao Prof. Dr. José Luiz Rigo Rodrigues, pelo fornecimento alguns materiais para a realização das eletroforeses.

À Sofia, por ser minha motivação e alegria diárias, e por agüentar a fase final do trabalho.

À Adriane, pela ajuda e pela vida em conjunto.

Aos meus pais, pela vibração e pelo constante apoio.

RESUMO**AValiação DO Perfil Protéico DA secreção ENDOMETRIAL DA ÉGUA**

Tese de Doutorado

Autor: Eduardo Malschitzky

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

Co-Orientadora: Maria Inês Mascarenhas Jobim

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o perfil protéico da secreção uterina pura, através da eletroforese bi-dimensional, de éguas em diferentes fases do ciclo estral, com diferentes graus de alterações inflamatórias e degenerativas, e com diferente capacidade de resposta à cobertura. Para tanto se realizaram cinco experimentos. O primeiro objetivou caracterizar o perfil protéico da secreção endometrial de éguas e determinar se essas proteínas estão associadas ao ciclo estral. A hipótese a ser testada é que o perfil protéico das secreções endometriais varia entre o estro e o diestro. Conclui-se que a composição protéica da secreção uterina da égua em estro é diferente daquela de éguas em diestro, podendo as diferenças protéicas estarem associadas tanto ao processo de manutenção e desenvolvimento embrionário, como a uma necessidade de eventual resposta inflamatória. O segundo experimento objetivou comparar as taxas de prenhez e morte embrionária em éguas não lactantes cobertas no primeiro, ou em outros ciclos durante a temporada reprodutiva. Foi concluído que: (a) durante a temporada reprodutiva, a fertilidade de éguas solteiras é menor no 1º ciclo que nos ciclos subseqüentes; (b) que uma taxa de morte embrionária maior pode ser esperada em éguas falhadas cobertas no 1º ciclo do que nos demais e (c) que a menor fertilidade observada no 1º ciclo não está relacionada à incidência de endometrite persistente pós-cobertura. O terceiro experimento objetivou comparar o perfil protéico da secreção endometrial e a expressão de receptores para esteróides ovarianos no endométrio de éguas em diestro após a 1ª ovulação e após a 2ª ovulação da temporada. Conclui-se que o ambiente uterino é diferente no primeiro diestro da temporada reprodutiva, comparado aos ciclos subseqüentes. O quarto experimento objetivou comparar o perfil protéico da secreção endometrial de éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura, durante o estro. A

hipótese a ser testada é que o ambiente uterino da égua susceptível encontra-se alterado no estro prévio à cobertura. Conclui-se que a composição da secreção endometrial das éguas susceptíveis, antes da cobertura, é diferente daquela observada nas éguas resistentes, estando as proteínas observadas relacionadas ao processo inflamatório e à contratilidade uterina. O quinto experimento objetivou (a) comparar a composição protéica da secreção endometrial de éguas em estro com e sem fibrose e (b) avaliar o efeito da inflamação endometrial sobre o perfil protéico da secreção uterina de éguas em estro e em diestro. A hipótese é que a fibrose e a inflamação alteram a composição protéica do fluido uterino, podendo prejudicar o desempenho reprodutivo da égua. Conclui-se que nas éguas em estro a inflamação e a fibrose endometrial alteram apenas a quantidade de poucas proteínas no ambiente uterino. Durante o diestro, a presença da inflamação alterou o ambiente uterino, havendo maior quantidade de proteínas inflamatórias. Os resultados apresentados neste trabalho requerem a confirmação da identidade das proteínas, através de seqüenciamento ou imuno identificação. No entanto, várias informações puderam ser obtidas e muitas novas perguntas podem ser geradas, em especial a partir dos resultados com as éguas susceptíveis.

Palavras-chave: égua, proteína, secreção endometrial, eletroforese, ciclo estral.

ABSTRACT**PROTEIN PROFILE FROM THE ENDOMETRIAL SECRETION OF THE
MARE**

Thesis

Author: Eduardo Malschitzky

Adviser: Rodrigo Costa Mattos

Co-Adviser: Maria Inês Mascarenhas Jobim

The main objective from this study was the characterization of the protein profile by SDS-PAGE, from mares during the estrous cycle and mares with uterine inflammation, fibrosis and susceptibility to persistent post-mating endometritis. Five experiments were performed. The first aimed to evaluate the protein profile of endometrial secretions of mares and to determine if any of these proteins was associated with estrous cycle. It was concluded that protein profile from estrous mares is different from the profile from diestrous mares. This difference can be explained by requirements to support and develop the embryo or to an eventually inflammatory response. The second experiment aimed to compare pregnancy and embryo loss rates in non-lactating mares bred either in the first, or in other estrus cycles during the breeding season. It was concluded that: (a) during the breeding the fertility of non-lactating mares is lower in the 1st than in other estrus cycles season; (b) that a higher embryo loss rate may be expected in barren mares bred in the 1st than in other estrus cycles of the breeding season and (c) that the lower fertility rate observed during the 1st estrus cycle is not related to the incidence of post-breeding endometritis. The third experiment aimed to compare the protein profile of endometrial secretions and the steroid hormone receptor expression of the uterus from diestrous mares in the first, or in other estrous cycles during the breeding season. It was concluded that the uterine environment in the first diestrus of the breeding season is different in relation of the other diestrus. The fourth experiment aimed to compare the protein profile of endometrial secretions from estrous mares resistant or susceptible to persistent post-mating endometritis (PPME). The tested hypothesis was that before the insemination in susceptible mares the uterine environment is disturbed. It was concluded that there is a difference in the uterine environment

between resistant and susceptible mares to PPME, probably resulting from the inflammatory response and affecting the uterine contractility. The fifth experiment aimed (a) to compare the protein profile of endometrial secretions from estrous mares with and without fibrosis and (b) to estimate the effect of inflammation in the protein profile of endometrial secretion from mares in estrous and in diestrous. The tested hypothesis was that fibrosis and inflammation disturb the uterine environment modifying the protein profile of the endometrial secretion impairing the reproductive performance. It was concluded that inflammation and fibrosis in estrous influenced the protein profile in a low number of spots. During diestrous, the inflammation affect uterine environment with an expressive number of inflammatory proteins. The protein profile observed in the experiments must be confirmed by sequencing or immunoidentification. However, much information could be obtained but many others must be investigated, principally by the susceptible mare.

Key words: mare, protein, endometrial secretion, electrophoresis, estrous cycle

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO.....	37
3.1	ARTIGO 1. Avaliação do Perfil Protéico da Secreção Endometrial Pura da Égua Através da Eletroforese Bi-dimensional: Efeito do ciclo.....	37
3.2	ARTIGO 2. Taxa de prenhez e morte embrionária em éguas não lactentes cobertas no primeiro ou em outros ciclos durante a temporada reprodutiva	53
3.3	ARTIGO 3. Perfil Protéico da Secreção Uterina de Éguas no Primeiro e em Diestro Subseqüentes da Temporada Reprodutiva.....	65
3.4	ARTIGO 4. Perfil Protéico da Secreção Endometrial Pura em Éguas Resistentes e Susceptíveis á Endometrite Persistente Pós- cobertura.....	78
3.5	ARTIGO 5. Perfil Protéico da Secreção Uterina de éguas em Estro: Efeito da Inflamação e da Fibrose Endometrial.....	94
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.	109
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio do cavalo no Brasil é responsável pela geração de aproximadamente 3,2 milhões de empregos, dos quais seiscentos mil diretos, o que representa seis vezes a quantidade gerada pela indústria automotiva (CNA, 2006), sendo, portanto, uma atividade importante para a economia do País, tanto econômica como socialmente.

A espécie eqüina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo (GINTHER, 1992). Apesar da melhora em termos de desempenho reprodutivo, através da aplicação de novas técnicas de manejo, geradas a partir da intensa pesquisa nas últimas décadas, uma atenção especial é necessária para certos indivíduos, a fim de garantir um bom resultado.

O útero é um órgão central para a reprodução, permitindo e favorecendo o acesso do espermatozóide até o oviduto, sendo capaz de reagir à presença do sêmen e à contaminação causada pela cobertura e garantindo um ambiente capaz de manter o desenvolvimento do embrião e do feto, durante o longo período de gestação característico da espécie eqüina (ROSSDALE, 1997).

Proteínas do trato reprodutiva da égua participam em todas as etapas, sendo necessárias para a manutenção da viabilidade dos espermatozoides no oviduto e a eventos fundamentais para a fertilização, como a reação acrossômica. O embrião eqüino chega ao útero a partir do quinto dia após a fecundação, permanecendo sem fixação até aproximadamente 40 dias de gestação. Durante todo este período, as proteínas da secreção uterina são fundamentais para a nutrição e para garantir o desenvolvimento embrionário, através da indução da diferenciação celular. Mesmo após a placentação, as secreções uterinas são necessárias para manutenção da placenta e garantir o desenvolvimento fetal, culminando com as modificações necessárias ao parto.

Alterações uterinas podem ser morfológicas, inflamatórias ou degenerativas (KENNEY, 1975). A inflamação do útero é uma causa bem conhecida de redução da fertilidade na égua (HUGHES & LOY, 1975; TROEDSSON, 1997), sendo o terceiro problema clínico em frequência, para os veterinários de eqüinos (TROEDSSON,

1998). Alterações degenerativas estão relacionadas principalmente ao avanço da idade, sendo responsáveis por uma proporção significativa das falhas reprodutivas (RICKETTS & BARRELET, 2003).

A utilização de técnicas moleculares, como o PCR em tempo real (Reação em Cadeia de Polimerase com Transcrição Reversa), permitiu avaliar a expressão de RNA mensageiro para várias proteínas ligadas ao processo inflamatório, no endométrio da égua (FUMOSO et al. 2003). No entanto, embora permita a medida da expressão gênica, esta técnica não permite a quantificação de proteínas, além de apresentar dificuldades técnicas quanto à coleta e processamento (DASCANIO et al, 2006). A identificação e a quantificação de proteínas da secreção endometrial, através da eletroforese bi-dimensional, além de permitir comparações entre amostras de diferentes categorias de éguas e em diferentes fases reprodutivas, podem servir, também, como referência para a utilização do PCR. Em conjunto, estes estudos podem permitir uma melhor compreensão da patogenia das alterações e dos efeitos hormonais sobre o endométrio.

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o perfil protéico da secreção uterina pura, através da eletroforese bi-dimensional, de éguas em diferentes fases do ciclo estral, com diferentes graus de alterações inflamatórias e degenerativas, e com diferente capacidade de resposta à cobertura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Interações do espermatozóide com o trato reprodutivo da fêmea

2.1.1. Transporte espermático

O sêmen é depositado diretamente no útero devido a características anatômicas da cérvix da égua, que se encontra aberta durante o cio, e da completa adaptação desta ao processo uretral, exposto durante a ereção da glândula do pênis e à característica da ejaculação, que ocorre em jatos (PICKETT, 1989).

Em eqüinos em vida livre, a égua pode ser coberta várias vezes durante um mesmo estro, com intervalos curtos de tempo entre as coberturas. Estudos sobre comportamento demonstram haver grande variabilidade no comportamento e número de cópulas em uma mesma égua, mas é comum que ocorram entre 5 a 10 coberturas em um mesmo cio, com 3 coberturas ocorrendo num período de 24 horas (FRASER, 1992). Esta característica serviria para garantir que haja número de espermatozoides suficientes no momento da ovulação, uma vez que o estro da égua é muito variável, podendo durar vários dias (FRASER, 1992; SUAREZ, 2002). Observações contínuas do comportamento de 2 garanhões e suas éguas, por 42 e 28 dias, demonstraram respectivamente, médias de 6 e 5,7 coberturas por égua a cada cio, cuja duração média foi de 4,4 e 4,7 dias. As taxas de parição observadas para as duas manadas foram de 87% e 90% (STEINBJÖRNSSON & KRISTJANSSON, 1999).

Após a cobertura, os espermatozoides são transportados rapidamente até o oviduto, através das contrações uterinas, que auxiliam também na eliminação no excesso de células. Devido à reação uterina aos espermatozoides, o transporte até o oviduto deve ocorrer rapidamente (TROEDSSON, et al., 1998). KATILA et al. (2000) identificaram espermatozoides marcados com radioatividade, na ponta do corno uterino, já aos 8 minutos após a inseminação artificial. Espermatozoides foram observados no oviduto da égua a partir de 2 horas, com o maior número sendo observado 4 horas após a inseminação, (BADER, 1982). A realização de lavagens uterinas 4 horas após a inseminação artificial não resultou em queda na fertilidade, o que sugere que a partir deste momento, o transporte espermático está completo (BRINSKO et al, 1991). A maioria dos espermatozoides com anormalidades morfológicas não atinge a junção útero tubárica, ou não desenvolve interações

normais com o epitélio do oviduto, o que sugere um mecanismo de seleção durante o transporte espermático (SCOTT et al., 2000).

O transporte espermático e a capacitação espermática *in vivo* são interligados, e isto pode ser um ponto crítico para o controle da chegada no oviduto de células capazes de fertilização (YANAGIMACHI, 1994). O espermatozóide pode sobreviver vários dias no trato reprodutivo da égua, antes que ocorra a ovulação (GINTHER, 1992). Fertilizações ocorrendo com inseminações realizadas até 6 dias antes da ovulação foram relatadas por WOODS et al. (1990). A junção útero-tubárica funciona como um reservatório de espermatozóides (THOMAS et al., 1994; SCOTT et al., 2000), onde ocorre uma adesão com a superfície da porção inicial da tuba uterina, mediado por proteínas espermáticas que se ligam à glicoproteínas do oviduto (BALL et al., 2003). Os espermatozóides ligados às células do oviduto apresentam viabilidade prolongada e mantêm o cálcio intracelular em níveis basais, podendo prevenir a capacitação prematura (DOBRINSKI et al., 1996). Em estudos *in vitro*, Ellington et al (1993) observaram que os espermatozóides se aderem às células do epitélio do oviduto em poucos minutos de incubação, iniciando intensa atividade flagelar durante o 3º dia e sendo liberados gradualmente durante o 4º dia de cultura. Estes achados poderiam explicar os resultados de Clément et al. (2000), que demonstraram que após a realização de 2 ou 3 inseminações em um mesmo cio, a inseminação realizada 2 a 4 dias antes da ovulação resultou em um número maior de fertilizações (70%) do que aquelas realizadas 0-2 dias antes da ovulação.

A ligação do espermatozóide às células do epitélio do oviduto é influenciada pela fase do ciclo estral, sendo maior na região do istmo do que na ampola da tuba uterina, (THOMAS et al., 1995). Os efeitos do ciclo podem ser devido à produção de muco, esteróides endógenos ou do conteúdo protéico da secreção do oviduto (THOMAS et al., 1994). Nesta secreção, foram identificadas mais de 40 bandas protéicas (BATTUT et al., 1995). Os autores observaram variação na expressão de algumas destas proteínas, devido à fase do ciclo estral, e a fatores individuais em éguas na mesma fase do ciclo.

2.1.2. Capacitação espermática e reação acrossômica

A capacitação espermática é um processo preparatório para a reação acrossômica, sendo definida como a série de alterações que tornam possível que o

espermatozóide apresenta reação acrossômica (AMANN & GRAHAM, 1993). Uma outra modificação necessária é a alteração do padrão de motilidade espermática, que é chamada de hiper-ativação, ou hiper-motilidade. Durante a passagem pelo epidídimo, o espermatozóide adquire uma cobertura glicoprotéica que é adicionada de outras proteínas do plasma seminal, que são liberadas no momento da ejaculação. Essas proteínas têm a função de manter a integridade da membrana espermática durante sua passagem pelo trato reprodutivo feminino. Três classes principais de proteínas são reconhecidas no plasma seminal do garranhão, sendo responsabilizadas pela modulação da capacitação espermática, reconhecimento de gametas e fusão do espermatozóide com o oócito (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). A capacitação espermática é o processo em que essas proteínas são removidas, permitindo a exposição dos receptores de membrana da célula espermática, além da retirada de componentes que recobrem a cauda do espermatozóide e poderiam impedir a alteração do padrão da motilidade (NOYES, 1953). A desestabilização da membrana plasmática do espermatozóide é também necessária para sua capacidade fertilizante, e ocorre através da ligação do colesterol da membrana com proteínas da tuba uterina e de origem folicular (PARKS & EHRENWALD, 1990).

A reação acrossômica é um processo irreversível e é essencial para a fertilização. Este processo envolve a fusão e a formação de uma vesícula da membrana do acrossoma com a membrana plasmática da célula espermática, o que permite a liberação de suas enzimas hidrolíticas. A reação, no entanto, somente ocorre após a ligação do espermatozóide com a zona pelúcida, sendo parcialmente induzida por um componente glicoprotéico da zona pelúcida (YANAGIMACHI, 1994). Estudos *in vitro* demonstraram que, diferente de outras espécies, nas quais a reação acrossômica ocorre em mais de 80% dos espermatozoides imediatamente após a ligação com a zona pelúcida, na espécie eqüina apenas uma pequena proporção dos espermatozoides ligados à zona pelúcida (< 20%) apresentam reação 1 hora após a ligação (ELLINGTON et al., 1993; MEYERS et al., 1996). Essa baixa incidência de reação pode significar que, *in vivo*, componentes fisiológicos adicionais, como por exemplo, a progesterona presente no fluido folicular sejam necessários (CHENG et al., 1998). Estes autores sugeriram um efeito aditivo da progesterona do fluido folicular com proteínas da zona pelúcida na indução da reação acrossômica e demonstraram que a progesterona é o mais importante, senão o único, componente do

fluido folicular necessário para este evento na espécie eqüina. Este efeito, no entanto somente pode ser observado após a exposição dos receptores para progesterona na membrana do espermatozóide, o que ocorre após a capacitação.

2.1.3. *Inflamação uterina induzida pela cobertura*

2.1.3.1. *Mecanismos de defesa uterina*

O útero da égua é mantido livre de contaminação através de mecanismos físicos, mecanismos imunológicos e de um sistema linfático funcional. As barreiras físicas que impedem o acesso de microorganismos ao útero são a vulva (CASLICK, 1927; PASCOE, 1975), a prega vestíbulo-vaginal (HINRICHS et al, 1988) e a cérvice (LEBLANC et al, 1995).

Na espécie eqüina, independentemente do método de cobertura, o sêmen é depositado na luz uterina. Portanto, neste momento, as barreiras físicas são ultrapassadas, sendo o espermatozóide e, em menor grau, proteínas do plasma seminal e bactérias do sêmen e do pênis do garanhão, responsáveis pela indução de uma resposta inflamatória aguda (TROEDSSON, 1997).

O útero reage rapidamente à presença do sêmen, através de um aporte de neutrófilos, que já são identificados em 30 minutos após a cobertura (KOTILAINEN et al., 1994). Um dos objetivos desta resposta é a eliminação do excesso de espermatozoides e daqueles defeituosos ou mortos (TROEDSSON et al, 1998). Quando as coberturas, ou inseminações artificiais, são realizadas com intervalos inferiores a 36 horas, a fertilidade será beneficiada se os espermatozoides viáveis estiverem protegidos da fagocitose no útero, enquanto a eficiência do mecanismo responsável pela eliminação das células não viáveis é mantido (TROEDSSON et al, 2005).

Um mecanismo importantíssimo para a eliminação rápida do agente agressor, dos componentes e subprodutos inflamatórios é a contratilidade miometrial, que é imprescindível para a limpeza física da luz uterina (EVANS et al., 1987; LEBLANC et al., 1994; TROEDSSON et al, 1993a). Durante o estro, ocorrem períodos de atividade contrátil de aproximadamente 5 minutos, alternados com períodos equivalentes de repouso (JONES et al., 1991). A eficiência deste mecanismo requer o funcionamento simultâneo da cérvice (LEBLANC et al, 1989). A resposta à agressão ocorre rapidamente, com um aumento da intensidade das contrações. A eficiência é

tal, que estudos utilizando cintilografia mostram que, em éguas sadias, metade do radiocolóide infundido no útero, em conjunto com colônias de *Streptococcus zooepidemicus*, é eliminado já nos primeiros 60 minutos após a inoculação (LEBLANC et al., 1994). A limpeza física do útero tem um papel central na patogenia da endometrite persistente pós-cobertura (TROEDSSON, 1997). No entanto, através da indução de uma deficiência na contratilidade miometrial, pela administração de clenbuterol, em éguas sadias, Nikolakopoulos & Watson (1999) observaram que, apesar do acúmulo de fluido uterino e da presença marcada de neutrófilos ao exame citológico, 60% das éguas não apresentaram crescimento bacteriano 48 horas após a cobertura. Os autores concluíram que os demais mecanismos de defesa da égua são capazes de eliminar a infecção bacteriana mesmo quando a motilidade está prejudicada.

A ação destes mecanismos foi bem estudada nas décadas de 80 e 90 (ASBURY, 1984; LIU & CHENG, 1986; WATSON, 1988; PYCOCK & ALLEN, 1989; TROEDSSON et al., 1993b, 1993c).

Em situações em que o útero é invadido, é acionado o sistema complemento, em especial os componentes C3 e C5 que, em conjunto com imunoglobulinas produzidas pela mucosa uterina e provenientes do plasma sangüíneo, atraem e facilitam, a fagocitose por neutrófilos, a primeira e mais importante célula de defesa do útero (TROEDSSON, 1997). Neutrófilos já estão presentes na luz uterina 30 minutos após a cobertura. O pico inflamatório ocorre por volta das 12 horas e o processo deve ser visto como um evento fisiológico e necessário para a eliminação de espermatozóides mortos ou com anormalidades morfológicas, bactérias, células inflamatórias e subprodutos da inflamação (KATILA, 1995, TROEDSSON, 1997).

Alghamdi et al. (2004) demonstraram que num ambiente uterino inflamado, através de uma inseminação com espermatozóides mortos, a realização de uma segunda inseminação com sêmen fresco, num intervalo de 24 horas, resultou em uma taxa de prenhez significativamente menor quando o plasma seminal foi removido (5%), em comparação a taxa obtida das inseminações sem a remoção do plasma seminal (77%). Proteínas presentes no plasma seminal foram sugeridas como responsáveis por uma supressão da ligação de neutrófilos e da fagocitose de espermatozóides vivos, em comparação a células mortas e apoptóticas (TROEDSSON et al, 2006). Um efeito do plasma seminal, igualmente atribuído a

proteínas nele presentes, é a inibição da ativação dos componentes C5 e C3 do complemento, que atuam na quimiotaxia de neutrófilos e na opsonização da fagocitose (TROEDSSON et al, 2000). Proteínas aderidas à membrana espermática seriam, portanto, responsáveis pela opsonização seletiva e pelo reconhecimento de diferentes populações de espermatozóides que ocorre no trato genital feminino (TROEDSSON, 2006).

Fiala et al. (2007) observaram aumento significativo na contagem de neutrófilos uterinos, em relação a um grupo controle, 2, 4 e 24 horas após a infusão de plasma seminal, de leite desnatado ou de diferentes concentrações de espermatozóides. Apesar de o foco de grande parte dos estudos sobre a patogenia da endometrite terem sido as bactérias, atualmente, o espermatozóide é considerado o principal causador da inflamação que ocorre sempre após a cobertura (KOTILAINEN et al, 1994). Quando as éguas receberam a infusão de plasma seminal, a quantidade de neutrófilos coletados da luz uterina não foi diferente entre 2, 4 ou 24 horas (FIALA et al., 2002). Por outro lado, Kotilainen et al. (1994), comparando o efeito da inseminação com sêmen congelado, sêmen fresco e diluentes de sêmen, demonstraram que quanto maior a concentração e o número de espermatozóides da dose inseminante, mais intensa é a resposta leucocitária. Comparando doses inseminantes de 100 milhões, 500 milhões e 1 bilhão de espermatozóides em um volume de 20mL, Fiala et al. (2007) observaram que a quantidade de neutrófilos na luz uterina foi maior nas éguas inseminadas com 1 bilhão do que naquelas inseminadas com menos espermatozóides, nas 2 horas e 4 horas após a inseminação. Independente da dose inseminada, o número de neutrófilos coletados do útero nas 24 horas foi significativamente menor do que o observado nas coletas realizadas 4 horas após a inseminação, demonstrando o início da resolução da inflamação, que geralmente está completa após 48 horas (KATILA, 1995).

Através da avaliação histopatológica do endométrio, foi demonstrado que a reação inflamatória aguda observada no estrato compacto e no estrato esponjoso é semelhante àquela observada na luz uterina 2 e 4 horas após a inseminação artificial (FIALA et al, 2007). Nas 24 horas após a inseminação, já não foram observadas diferenças no número de neutrófilos entre as éguas inseminadas e aquelas do grupo controle.

Após a ovulação, quando a cérvix já está fechada, o sistema linfático tem uma importância grande na drenagem de subprodutos do processo inflamatório, logo. Para que o mecanismo de drenagem linfática exerça sua função, no entanto, é fundamental uma boa contratilidade miométrial (LEBLANC et al, 1995).

2.1.3.2. *Mecanismos e Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios*

Uma vez iniciado o processo inflamatório, entra em cena uma série de mediadores pró-inflamatórios, que são liberados pelos neutrófilos realizando fagocitose, pelas células do endotélio vascular e células endometriais lesadas e, mais tarde, pelos macrófagos ativados pela inflamação. As principais funções desses mediadores são atrair mais células de defesa para o local da inflamação, facilitar o acesso dessas células e melhorar a eficiência da eliminação do agente agressor. As prostaglandinas atuam induzindo alterações na permeabilidade vascular, as citocinas mantendo a inflamação ativa e as colagenases, elastases e gelatinases favorecendo o aporte de células e iniciando imediatamente o processo de reparação. O óxido nítrico (ON) é responsável pela lise de bactérias no interior do neutrófilos (McKAY, 2000).

A atividade de enzimas lisossomais foi demonstrada no endométrio da égua. A lisosima é uma potente opsonina para neutrófilos e é encontrada em alta concentração em locais de inflamação aguda. A plasmina é uma enzima fibrinolítica, que, ao exercer sua função, libera fragmentos peptídicos que são quimiotáticos para os neutrófilos (TIZARD, 1998). Nos granulócitos dos eqüinos, a atividade da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase) e da fosfatase ácida é alta, enquanto a da enzima β -glicuronidase (B-Gase) é menor, se comparada à dos leucócitos mononucleares. Um aumento da concentração total de proteína foi observado, dentro de 6 horas após a inoculação uterina com *Streptococcus* sp. (Reilas, 2001). A autora observou, simultaneamente, um aumento na concentração de plasmina e lisosima, mas não nas outras enzimas testadas (NAGase, B-Gase e fosfatase ácida), cuja atividade é afetada pelo nível de progesterona, mas não é alterada pela inflamação aguda. A concentração de lisosima observada por Katila (1990) foi muito alta, 12 horas após a inoculação uterina com bactérias, momento em que o número de neutrófilos foi máximo. A presença e a concentração de ON, 13 horas após a realização da inseminação artificial foram avaliadas por Alghambdi & Troedsson

(2002), que demonstraram haver diferença na concentração total entre éguas resistentes e susceptíveis à endometrite. Comparado aos níveis basais, a expressão de mRNA para Interleucina-1-beta (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral-Alfa (FTN- α) e Interleucina 6 (IL-6), aumentou 24 horas após a inseminação artificial, em éguas resistentes à endometrite pós-cobertura (Fumoso et al., 2003). A atividade da interleucina-8 (IL-8), uma citocina pró-inflamatória com potente efeito quimiotático sobre os neutrófilos (McKAY, 2000), também varia em resposta à inseminação artificial (FUMOSO 2006). Gelatinases (Metaloproteinase-9 (MMP-9) e Metaloproteinase 2 (MMP-2)) apresentaram um aumento na atividade 5 horas a inoculação uterina com *Streptococcus* sp., ou inseminação artificial (ODDOSDOTTIR et al, 2006).

Como a inflamação aguda pode levar a sério dano ao tecido, ela deve ser mantida sob controle. O mesmo estímulo que induz a liberação dos mediadores pró-inflamatórios, promove o aparecimento de mecanismos e moléculas que atuam encerrando o processo inflamatório, tão logo ele deixe de ser necessário. Essas moléculas atuam inibindo a produção de citocinas, bloqueando receptores celulares ou induzindo a morte celular. A Interleucina 10 (IL-10) tem a função exclusiva de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios. As células produzem um subtipo de IL-1, que não age como citocina, mas que bloqueia receptores para a IL-1 β , impedindo seus efeitos. A interleucina 6 (IL-6), que logo após a agressão é uma citocina pró-inflamatória, num estágio mais avançado, pode induzir a apoptose dos neutrófilos, que é uma forma de eliminar subprodutos inflamatórios sem o risco de que sejam liberados no próprio tecido (McKAY, 2000). A capacidade inibitória de tripsina (CIT) é uma forma de se medir a atividade do α 1-antitripsina, um importante inibidor de proteases. Embora tenha sido demonstrado que o endométrio não é capaz de produzir este inibidor, um aumento significativo de sua concentração foi observado em éguas em estro, comparado ao diestro (SCUDAMORE et al., 1994). Após a inoculação bacteriana, um aumento da CIT foi observado dentro de 6 horas, permanecendo alta até 24 horas após a infecção experimental (REILAS, 2001).

Em éguas jovens, a expressão de mRNA para a IL-6 durante o estro, é significativamente superior àquela observada no diestro (CADARIO et al., 2002). Recentemente, a atividade da IL-10 no endométrio da égua, nas diferentes fases do

ciclo estral, foi demonstrada por Fumoso et al. (2006). A atividade das metaloproteinases é controlada por inibidores produzidos pelos tecidos, denominadas inibidores de metaloproteinases (TIMPs). Embora não haja descrição da atividade destas moléculas anti-inflamatórias no endométrio da égua, no endométrio humano sua atividade é evidente e está sob controle, também, dos esteróides ovarianos (CURRY & OSTEEN, 2001).

2.1.3.3. *Susceptibilidade à endometrite*

Os hormônios esteróides influenciam os mecanismos de defesa uterina. Assim, sob o domínio estrogênico característico do cio, o útero apresenta-se edemaciado, com aumento da produção de muco. A hiperemia favorece o aporte de neutrófilos e as contrações miometriais ocorrem de forma rítmica, favorecendo a evacuação do conteúdo uterino através da cérvix, que nesta fase encontra-se aberta. Por outro lado, com altas concentrações de progesterona, a cérvix encontra-se fechada e a contratilidade miometrial passa a apresentar períodos longos de contração, com baixa amplitude, o que caracteriza o tônus uterino típico desta fase na égua. Todos estes fatores fazem com que a égua em diestro esteja menos apta a eliminar uma possível contaminação e inflamação uterina (EVANS et al, 1987; JONES et al., 1991).

Durante o cio, com o favorecimento dos mecanismos de defesa pelo efeito estrogênico, o processo inflamatório está completamente resolvido em 36-48 horas após a cobertura. As éguas nas quais isso ocorre são classificadas como sadias ou resistentes à endometrite persistente pós-cobertura. Porém, se ocorrer uma falha dos mecanismos de defesa, há condições para que as bactérias possam se aderir à mucosa uterina, levando a uma infecção bacteriana e à persistência da inflamação. A inflamação, por sua vez, favorece também à infecção do tecido endometrial, devido à perda da integridade da barreira mucosa. Nestes casos, a inflamação passa a ser patológica e este quadro é denominado endometrite persistente pós-cobertura (EPPC). A falha reprodutiva vem de um efeito direto de um ambiente uterino incompatível com a sobrevivência do embrião, ou da liberação constante de prostaglandina- $F_{2\alpha}$ ($PgF_{2\alpha}$) devido à inflamação, o que leva à lise do corpo lúteo e à falta de sustentação do nível de progesterona, necessária para a manutenção da gestação (LEBLANC, 2003).

Éguas nesta condição são denominadas de susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura, e são caracterizadas pela sua incapacidade de eliminar o processo inflamatório em até 48 horas após a cobertura. De um modo geral, éguas susceptíveis apresentam características em comum, como a idade avançada, histórico de falha reprodutiva em várias temporadas, histórico de episódios anteriores de endometrite e perdas gestacionais (TROEDSSON, 1997). Além disso, estas éguas apresentam um maior grau de lesões degenerativas, tanto do endométrio quanto dos vasos sanguíneos e linfáticos, o que pode dificultar a atividade dos hormônios circulantes alterar o aporte de células à luz do útero e dificultar a drenagem linfática (SCHOON et al 1997). Outra característica é o posicionamento do útero, que nestas éguas está projetado no interior da cavidade abdominal e apresenta uma angulação maior e um nível mais baixo em relação ao assoalho da pelve, se comparado com o de éguas jovens e sadias. Esta posição dificulta a drenagem do conteúdo uterino (LEBLANC et al, 1998). A maioria destas éguas apresenta ainda deficiência no fechamento vulvar (TROEDSSON, 1997).

Porém, o ponto central da susceptibilidade parece ser a menor capacidade de limpeza física uterina destas éguas em relação àquelas classificadas como resistentes. Elas apresentam um retardo de aproximadamente 2 horas em iniciar a resposta contrátil à presença de espermatozoides e bactérias em relação ao observado em éguas sadias. Nas éguas susceptíveis, esta atividade também é menos intensa e tem uma duração menor (TROEDSSON et al, 1993b). Em estudos *in vitro*, foi observado que a direção das contrações das fibras musculares é diferente entre as duas categorias de éguas. Enquanto em éguas sadias a contração ocorre a partir da ponta do corno uterino em direção à cérvix, nas éguas susceptíveis a contração não apresenta padrão rítmico e tende a contrair em direção à ponta do corno uterino, o que dificulta a eliminação de conteúdo do órgão (REITZENSTEIN *et al.*, 2002). Outra característica das éguas susceptíveis é a menor liberação de prostaglandina F_{2α}, em resposta à inseminação artificial ou à administração de ocitocina exógena, o que ajuda a explicar a menor capacidade contrátil destes animais (NIKOLAKOPOULOS *et al.*, 2001). O resultado final é um acúmulo de fluido na luz uterina, por vários dias após a cobertura, enquanto em éguas sadias não se observa fluido uterino além das 48 horas, acompanhado de um quadro inflamatório persistente e, na maioria dos casos, de uma infecção bacteriana (LEBLANC, 2003).

Esse acúmulo de fluido dificulta a fagocitose por neutrófilos, devido ao ambiente uterino hostil (TROEDSSON et al, 1993b), levando ao acúmulo de óxido nítrico liberado pelos neutrófilos degenerados e que, nessas condições, atuaria reduzindo a contratilidade da musculatura lisa uterina, gerando, assim, um ciclo vicioso (ALGHAMDI et al., 2002).

Fumoso et al. (2003), observaram que, antes de um estímulo antigênico, a expressão de mRNA para IL-1 β , FNT- α , IL-6 foi maior em éguas susceptíveis do que em éguas resistentes, durante o cio. Um quadro semelhante foi observado para a IL-8 (FUMOSO et al, 2006). Durante o diestro, a diferença foi significativa apenas para a IL-1 β . Nas 24 horas após a realização da inseminação artificial, a expressão de mRNA para as 3 citocinas foi significativamente superior nas éguas resistentes, em comparação ao nível de expressão observado nestas mesmas éguas, durante o cio em que não foi realizada a inseminação artificial. Nas éguas susceptíveis, embora uma tendência ao aumento da expressão destas citocinas tenha sido observada, a diferença em relação aos níveis basais não foi significativa. Nas amostras de endométrio coletadas no 7º dia após a ovulação, a expressão do mRNA para estes três mediadores pró-inflamatórios foi maior nas éguas susceptíveis (FUMOSO et al., 2003). A comparação entre éguas resistentes e susceptíveis, quanto à expressão da IL-1 β , FNT- α e IL-6, 24 horas após a realização da IA, não revelou diferença significativa na expressão de mRNA para qualquer das citocinas (FUMOSO et al., 2003). Porém, a expressão para IL-8 foi maior nas éguas susceptíveis do que nas resistentes, tanto nas amostras coletadas 24 horas após a IA, quanto naquelas coletadas no 7º dia após a ovulação deste mesmo ciclo (FUMOSO et al., 2006). Foi sugerido que um estímulo deveria ultrapassar certo limiar para induzir a uma transcrição coordenada de citocinas e que este limiar seria menor nas éguas susceptíveis do que nas resistentes (FUMOSO et al., 2003).

Em éguas com acúmulo de líquido uterino no 2º dia após a ovulação, a atividade proteolítica da plasmina, na secreção endometrial, não apresentou diferença em relação à de éguas que não acumularam líquido, enquanto que a CIT foi menor (REILAS, 2001). Por outro lado, a expressão de mRNA para a citocina anti-inflamatória, IL-10, foi menor nas éguas susceptíveis do que nas éguas normais (FUMOSO et al., 2006). A IL-6 é considerada como uma citocina de atividade tanto

pró-inflamatória, numa fase inicial, como anti-inflamatória, num estágio mais tardio (KAPLANSKI et al., 2003; McKAY, 2000). Tomados os resultados em conjunto, os autores atribuem parte da susceptibilidade à uma incapacidade dessas éguas em produzir citocinas para controlar a inflamação e à manutenção de um nível mais alto de duas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e FNT- α), mesmo sem que haja qualquer estímulo. Nas éguas resistentes, foi considerada uma capacidade plena de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, logo após a IA e regular seu nível de expressão através do controle por citocinas anti-inflamatórias após a ovulação (FUMOSO et al., 2003).

Em éguas susceptíveis, a administração imuno-moduladores, em dose única, no momento da inseminação, alterou a expressão de mRNA para citocinas em resposta à presença do espermatozóide. Após o tratamento, não foi observada diferença entre éguas susceptíveis e resistentes quanto à IL-1 β , FNT- α , IL-6 e IL-8, tanto 24 horas após a IA como no dia 7 do diestro. Além disso, comparado aos níveis de expressão observados nas éguas susceptíveis após a IA, mas sem tratamento com o imuno-modulador, uma redução de expressão de mRNA para a IL-1 β foi observada nas amostras coletadas 24 horas após a IA. Não foram encontradas diferenças para a expressão de FNT- α e IL-6 após a IA e no diestro. Por outro lado, a expressão de mRNA para a IL-10 foi significativamente superior àquela das éguas resistentes e também em relação ao estro em que foi realizada a IA, sem a administração de imuno-modulador. Nas amostras do diestro, não foram observadas diferenças entre éguas resistentes e susceptíveis, quanto à expressão de mRNA para esta citocina (FUMOSO et al., 2003; FUMOSO et al., 2006). A conclusão dos autores é de que é possível reduzir a diferença quanto à transcrição de citocinas entre éguas resistentes e susceptíveis, com a administração de um imuno-modulador.

Embora o efeito do imuno-modulador sobre a expressão de importantes citocinas tenha sido bem caracterizado, um efeito sobre a fertilidade de éguas susceptíveis não foi demonstrado. Por outro lado os resultados obtidos por Dell'Aqua Jr (2006) com o uso de corticóides no período peri-ovulatório, podem ser um indicativo. Com base no histórico de acúmulo de fluido uterino, 30 éguas resistentes e 15 susceptíveis foram submetidas a tratamento com acetato de prednisolona a cada 12 horas, iniciando 2 dias antes e continuando até 1 dia após a ovulação. Todas as éguas

foram inseminadas com sêmen congelado em dois ciclos reprodutivos, sendo o primeiro sem tratamento e o segundo com a utilização de corticóide. Enquanto em éguas sadias não se observou diferença nas taxas de prenhez de éguas tratadas e não tratadas (40% vs. 48%), em éguas com histórico de episódios sucessivos de EPPC, uma taxa de prenhez superior foi obtida nas éguas tratadas (67%) em relação ao controle (5%). Embora tenha sido observada uma redução na função dos neutrófilos coletados 2 horas após a IA no grupo tratado, uma redução no volume de fluido uterino e um aspecto mais límpido do fluido coletado foi descrito.

2.1.3.4. *Intensidade da resposta em relação à eficiência*

Aparentemente, uma reação mais intensa poderia favorecer uma recuperação mais rápida do endométrio. A avaliação de amostras coletadas 48 horas após a inseminação artificial, através de lavagem uterina com pequeno volume, de éguas resistentes à endometrite inseminadas com 20 bilhões de espermatozóides apresentaram significativamente menores número e percentual de neutrófilos do que aquelas inseminadas com 2 bilhões (NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 2000). Não foi observada a presença significativa de bactérias em nenhum dos grupos, levando à conclusão de que uma dose inseminante maior leva a uma maior estimulação dos mecanismos de defesa uterina, tornando a resolução da inflamação induzida pelo espermatozóide mais rápida. Foi observado que 24 horas após a inseminação não havia diferença no número de neutrófilos no estrato compacto nas éguas inseminadas com 1 bilhão de espermatozóides, em comparação ao grupo controle, enquanto o número de neutrófilos foi significativamente maior nas éguas inseminadas com 100 e 500 milhões de espermatozóides, também neste momento (FIALA et al, 2007). Além disso, os autores observaram que, enquanto não houve diferença entre éguas do grupo controle e éguas inseminadas, quanto ao número de linfócitos nos estratos compacto e esponjoso, a infusão de plasma seminal e leite desnatado resultou num aumento da contagem de linfócitos no estrato compacto 2 horas após a infusão. No estrato esponjoso, a infusão de plasma seminal resultou em aumento significativo dos linfócitos, em relação ao controle 2 horas após, mas não depois desse tempo, enquanto com o leite desnatado, um aumento do número de linfócitos somente foi observado 24 horas após a infusão, demonstrando uma resposta mais rápida à presença do plasma seminal do que ao leite desnatado.

Comparando o efeito de tratamentos após a inoculação com bactérias, sobre a inflamação endometrial avaliada por histopatologia, Keller et al. (2004) observaram que, em éguas resistentes, quanto maior o tempo de tratamento, maior o do número de neutrófilos em relação ao observado nas biópsias coletadas antes da inoculação. Nas éguas susceptíveis, este padrão não foi observado. Aparentemente, éguas susceptíveis que apresentaram uma endometrite aguda mais intensa, demonstrada por um aumento no número de neutrófilos em relação ao exame pré-infecção, conseguiram uma limpeza uterina mais rápida. Por outro lado, nas éguas que permaneceram infectadas, não houve uma neutrofilia prolongada, havendo predomínio de plasmócitos e linfócitos, sugerindo que uma inflamação aguda é mais eficiente na remoção do agente bacteriano da luz uterina e que a presença desta inflamação crônica pode influenciar negativamente a resposta aguda.

A CIT relativa ao conteúdo total de proteína é maior na inflamação aguda do que na endometrite persistente (REILAS, 2001). Quando a infecção persistiu, embora a CIT e a atividade da plasmina tenham se mantido elevadas, houve uma queda significativa em relação à fase inicial da inflamação.

2.2. Secreções uterinas e Interações do embrião com o trato reprodutivo da fêmea

O embrião eqüino somente chega ao útero após atingir um estágio de maturidade que lhe permita a secreção de Prostaglandina E2 (PGE₂), o que ocorre a partir do 5º dia após a ovulação. Este retardo pode ser necessário para que a chegada somente ocorra no momento em que o útero já esteja hormonalmente preparado para nutrir o embrião (ALLEN, 2001). A placentação na espécie eqüina somente inicia por volta dos 40 dias de gestação, sendo a mais tardia dentre as espécies domésticas (STEWART et al., 2000). Antes da formação da placenta, o concepto é embebido na secreção uterina, através da qual ele deve ser suprido com oxigênio e substratos metabólicos (ALLEN, 2001). Entre os dias 7 e 17 de gestação, o embrião eqüino apresenta uma fase de grande mobilidade, que é necessária para o reconhecimento materno da gestação (GINTHER, 1995). Neste período, e até o dia 22 da gestação, o embrião é recoberto por uma cápsula que, além de garantir a forma esférica que permite a mobilidade, acumula em sua superfície uma gama de proteínas e outros componentes da secreção endometrial. Pode-se supor que, nessa fase, esta seja a única forma de nutrição do embrião. A partir do 21º dia, a cápsula começa a ser

desintegrada, permitindo maior contato do embrião com as glândulas endometriais, mas é somente a partir dos 36 dias de gestação que as células do anel coriônico começam a invadir o epitélio glandular, dando início à formação dos cálices endometriais (ALLEN, 2001).

As taxas de fertilização de éguas normais e de éguas sub-férteis são altas ($\geq 90\%$), com base na taxa de recuperação de embriões do oviduto 2 dias após a ovulação (BALL et al., 1986). O período de maior risco de morte embrionária parece ser entre os 5 e 10 dias, com éguas normais (virgens e de pouca idade) apresentando uma taxa estimada de 8,5% neste período. Em éguas sub-férteis (múltiparas, com idade avançada e histórico de falha reprodutiva), a taxa de morte embrionária pode exceder 30% neste período (GINTHER, 1992). Chevalier & Palmer (1982) relataram que a principal alteração observada em embriões no início da gestação foi o tamanho reduzido em relação à idade gestacional e que, dos embriões alterados, 78% foram perdidos. Em éguas normais, a morte embrionária, na fase inicial da gestação poderia ser atribuída a uma falha na manutenção dos níveis de progesterona (GINTHER, 1992). Alterações na secreção uterina foram sugeridas por Ball (1993) como uma das principais causas de morte embrionária, em especial em éguas velhas e apresentando lesões degenerativas do endométrio.

Através de cromatografia, Zavy et al. (1979) registraram 5 frações protéicas, demonstrando que 3 delas foram afetadas pelo dia do ciclo, atingindo o nível máximo no final da fase lútea (16º dia do ciclo), caindo a níveis mínimos no dia 20 do ciclo. A possibilidade de transudação foi considerada, devido à semelhança de algumas frações protéicas da secreção endometrial com aquelas observadas com a análise do plasma sanguíneo. Uma alta na concentração de proteína total em amostras no 12º dia após a ovulação de éguas não cobertas, coletadas através de lavagem uterina com pequeno volume e submetidas à eletroforese bi-dimensional foi observada por Zavy et al. (1982). Uma queda acentuada foi demonstrada no dia 20 nestas éguas, enquanto em éguas prenhes, a concentração de proteína segue aumentando até o dia 20. Alguns polipeptídeos foram evidentes apenas no dia 12 do ciclo, enquanto outros permanecem até os dias 14, 16 ou 18.

Em éguas ovariectomizadas tratadas com progesterona ou uma combinação de progesterona e 17β -Estradiol, foram identificadas 17 bandas, as quais foram

observadas também no dia 12º dia após a ovulação em éguas prenhes e cíclicas (ZAVY et al., 1982). No entanto, enquanto a concentração se manteve alta nas amostras coletadas no dia 20 de éguas prenhes, nas éguas cíclicas a quantidade de proteína já foi menor a partir do 16º dia. Nas amostras de éguas tratadas somente com 17 β -Estradiol estas proteínas não foram evidenciadas. Por outro lado, uma proteína foi observada após a suplementação estrogênica. Os autores concluíram que o ambiente uterino da égua prenhe inclui uma série única de proteínas, cuja secreção é induzida pela progesterona e que provavelmente estas sejam responsáveis pela manutenção do embrião. Embora a progesterona exógena tenha aumentado o conteúdo protéico da secreção uterina, McDowel et al. (1987) sugeriram que o estrógeno atua de maneira sinérgica, elevando a proteína total e a quantidade de fosfatase ácida.

Durante a fase luteínica de éguas com ciclos normais, foram identificadas três bandas protéicas de 22, 17 e <6,5 kDa, através de eletroforese unidimensional (KREMER et al., 1993, BADER et al. 1997)). Duas das três bandas protéicas típicas da fase luteínica foram identificadas como uteroglobina (<6,5 kDa) e fosfolipase A2 (17 kDa). Crosset et al. (1996) consideraram que a terceira banda trata-se da proteína p19 eqüina, uma lipocalina de 19 kDa, cuja função não é bem conhecida, mas deve estar relacionada ao transporte de nutrientes do endométrio para o embrião (STEWART et al., 2000). Uma alta concentração de fosfatase ácida em éguas em diestro ou tratadas com progesterona exógena foi demonstrada por Zavy et al. (1982), quem sugeriu tratar-se da uteroferrina.

Bader et al. (1997) compararam o perfil protéico no diestro de 10 éguas consideradas subférteis e de 10 éguas com cria. Somente uma das éguas subférteis apresentou as bandas protéicas características da fase luteínica, enquanto que as demais apresentaram deficiências no aparecimento das bandas protéicas de 17kDa ou de 22kDa. Das éguas com cria, sete apresentaram o típico padrão protéico da fase lútea, sendo que, dessas, seis engravidaram. As outras três apresentaram perfil protéico atípico e nenhuma engravidou. Os autores concluíram que a identificação protéica das secreções uterinas pode servir de critério complementar para verificar a função endometrial. A expressão de lipocalina (P19), avaliada através de imunohistoquímica, não foi detectada em éguas em anestro, sendo observada com

pequena intensidade durante o estro (STEWART et al., 2000). Por outro lado, uma forte coloração foi observada nas éguas entre os dias 14 e 15 após a ovulação e, em éguas prenhes, até o 25º dia de gestação. No entanto, em ninhos glandulares, associados à endometrose em éguas subférties, a expressão da P19 não foi semelhante àquela observada em éguas sadias em diestro ou prenhes.

Trabalhando com histopatologia e imunohistoquímica do endométrio, Hoffmann et al. (2003) demonstraram que a secreção de uteroglobina, uteroferrina, calbidina e uterocalina mostrou um padrão típico durante o ciclo estral. No entanto, em comparação ao endométrio sadio, a maioria do epitélio com fibrose periglandular apresentou uma redução na intensidade de coloração da secreção. Os autores consideraram esta como uma das possíveis razões para alteração do micro-ambiente uterino que podem levar a queda da fertilidade em éguas com lesões degenerativas do endométrio.

3. Avaliação da atividade secretora do endométrio

3.1. Eletroforese Bi-dimensional

A eletroforese é utilizada para estudar o movimento de moléculas com carga em um campo elétrico e foi preconizada por Tiselius em 1948. Atualmente, há diferentes técnicas de eletroforese, as quais são amplamente utilizadas para o estudo de DNA e de proteínas.

Técnicas variadas de eletroforese bi-dimensional permitiram a análise da composição protéica das secreções do oviduto (BATTUT et al., 1995) e do útero (ZAVY et al., 1979; 1982).

A técnica de O'Farrel (1977), modificada por Rodnight et al. (1988), vem sendo utilizada em estudos sobre a composição protéica do plasma seminal de touros, carneiros e garanhões, tendo permitido a identificação de proteínas que podem ser utilizadas como marcadores de fertilidade e congelabilidade do sêmen (JOBIM et al., 2004, 2005, SCHMITT, 2002).

A eletroforese bi-dimensional é composta de duas etapas. A primeira dimensão envolve uma eletroforese de curta duração realizada em gel tubular de poliacrilamida, em um gradiente de pH não equilibrado (*nonequilibrium pH gradient electrophoresis* – NEPHGE), e que separa as proteínas de acordo com seu ponto isoeletrico (pI). Através desta técnica, uma grande gama de proteínas, tanto ácidas,

quanto básicas, podem ser separadas, com boa resolução (O'FARREL et al., 1977). A segunda dimensão consta de eletroforese em placas de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e tem por objetivo separar as proteínas segundo o seu peso molecular (PM).

3.2. *Histopatologia do endométrio*

O valor da biópsia endometrial como exame auxiliar na avaliação da saúde reprodutiva da égua é conhecida há muito tempo (KENNEY, 1975; RICKETTS, 1978). O exame histopatológico do endométrio permite avaliar alterações morfológicas e processos inflamatórios do endométrio, permitindo tanto o diagnóstico de endometrite como um prognóstico para a capacidade do útero de levar uma gestação a termo (KENNEY, 1975). Além disso, este exame permite caracterizar diferenças entre as fases decorrentes da estacionalidade reprodutiva e das fases do ciclo estral (KENNEY, 1975).

A resposta inflamatória observada na biópsia endometrial pode ser aguda, crônica ou uma combinação de ambas. Os neutrófilos polimorfonucleares são as células predominantes em casos de inflamação aguda, estando evidentes no estrato compacto e epitélio luminal, sendo observados muito raramente em camadas mais profundas. Em inflamações crônicas, infiltrações linfocitárias são a característica predominante, sendo menos comum a presença de plasmócitos, siderócitos e eosinófilos (KENNEY & DOIG, 1986).

Respostas moderadas a severas devem ser resolvidas antes que a égua seja coberta. Uma redução em 40 pontos percentuais na taxa de prenhez, em relação a éguas com endométrio não inflamado, e taxas de morte embrionária de 37%, comparado a 2%, foi observada por Asbury (1982) em éguas com inflamação endometrial ao exame histopatológico.

Em 119 éguas de rebanho comercial, consideradas genitalmente sadias, com base no histórico, exame clínico, observações de vaginoscopia e na ausência de bactérias patogênicas previamente ao envio para a cobertura, Mattos et al. (1984) encontraram 27 casos (22,7%) de endometrite aguda, que foram diagnosticados pelo exame histopatológico. Dos 30 casos, de endometrite aguda observados, em 29 (86,6%) o exame citológico foi positivo. Enquanto a taxa de prenhez das éguas com citologia negativa foi de 66,3%, nas éguas com citologia positiva, uma taxa menor (3,3%) foi observada. Neste mesmo estudo, dos 30 casos de endometrite, o exame

bacteriológico de 11 (36,6%) não revelou a presença de bactérias. Kenney & Doig (1986), por sua vez, observaram que com a melhora dos métodos de coleta de amostras para exames bacteriológicos, houve um aumento da incidência de quadros inflamatórios ao exame histopatológico, não associados à contaminação bacteriana do endométrio, levantando questões sobre a origem não infecciosa da inflamação. Por outro lado, Ricketts & Barrelet (1997), em um estudo retrospectivo de 4241 biópsias endometriais, identificaram inflamação aguda em 55% das amostras, enquanto sinais de degeneração glandular e fibrose do estroma foram observados em 56% das amostras avaliadas. Os autores observaram a presença de infiltração mononuclear em 92% das amostras, atribuindo o achado a estímulos antigênicos pelas proteínas do plasma seminal, micróbios e debris depositados durante a cobertura, chegando à conclusão de que esta infiltração não prejudicaria fertilidade e não requer tratamento, a menos que seja complicada por outros quadros.

Comparando biópsias de éguas resistentes e susceptíveis à endometrite, Keller et al. (2004) observaram que, enquanto nas éguas resistentes somente foi observado grau leve de inflamação, nas éguas susceptíveis foram encontrados somente graus moderados a severos. Uma nova biópsia foi coletada 5 dias após uma infecção experimental, tendo sido observado que todas as éguas susceptíveis apresentavam alterações inflamatórias, enquanto em 40% das éguas resistentes não foi mais possível observar alteração. Quadros de endometrite aguda foram observados em 43% e 37% das éguas susceptíveis e resistentes, respectivamente. Por outro lado, mais éguas susceptíveis ($p \leq 0,025$) apresentaram endometrite crônica (62,5%) do que éguas resistentes (16,1%). Além disso, nas éguas resistentes, os autores observaram neutrofilia e eosinofilia nas biópsias pós-infecção, em relação ao observado nas biópsias pré-infecção. Nestas mesmas éguas, não foi observada diferença entre as biópsias coletadas antes e depois da infecção experimental, quanto à presença e linfócitos e plasmócitos. Nas éguas susceptíveis, por sua vez, não foram observadas diferenças nos neutrófilos, plasmócitos e linfócitos antes e depois da infecção, sugerindo uma menor capacidade de resposta aguda à agressão.

As alterações glandulares relacionadas ao processo de fibrose são denominadas de endometrose (KENNEY, 1993). A formação de fibrose ocorre devido à alteração do depósito de colágeno no estroma - tanto do estrato compacto como do estrato esponjoso - na membrana basal do epitélio luminal, podendo levar à formação de

ninhos glandulares de tamanho variado. A severidade pode ser avaliada pelo número de camadas e pela frequência de aparecimento de focos fibróticos na amostra (KENNEY & DOIG, 1986). A amostra de biópsia coletada pelos equipamentos tradicionalmente utilizados representa aproximadamente 0,1% da área de endométrio (KENNEY & DOIG, 1986). Embora tenha sido demonstrado que uma única amostra é representativa de todo o endométrio (BERGMANN & KENNEY, 1975), Keller et al. (2006) levantam a suspeita de que uma única biópsia endometrial pode não ser representativa quando a fibrose endometrial é considerada isoladamente. Ao avaliar o efeito de sucessivas infecções experimentais no progresso da fibrose endometrial, os autores observaram uma grande variação no grau de endometrose, em períodos curtos de tempo. No período de 12 meses em que o estudo foi realizado, 9 éguas apresentaram variação de 2 graus no grau de biópsia e 10 apresentaram 3 graus de alteração. As alterações foram para graus piores ou melhores e algumas foram registradas em um intervalo de apenas 10 dias.

Como no caso da inflamação, quanto mais dispersa estiver a fibrose, independente do grau de severidade, menor será a capacidade do endométrio de levar a gestação à termo (KENNEY & DOIG, 1986). Uma alta correlação entre idade e endometrose foi observada por Ricketts & Alonso (1991), que concluíram que o processo é mais relacionado ao avanço da idade do que ao número de partições. Nenhuma correlação entre endometrose e o número de partições foi observada também por Schoon et al., 1997. A patogenia da endometrose ainda não é completamente conhecida, porém Hoffmann et al. (2003) descreveram características que permitiram diferenciar a endometrose em destrutiva e não destrutiva, as quais podem ocorrer simultaneamente.

Estudos em outros tecidos têm demonstrado que a expressão aumentada ou descontrolada de citocinas poderia estar envolvida no processo de formação da fibrose (CADARIO et al, 2002). Comparando a expressão de citocinas fibrinogênicas em éguas jovens (3 a 8 anos) e sem fibrose endometrial, com éguas mais velhas (15 a 22 anos) e com fibrose severa, estes autores não observaram diferença na expressão de IL-6, FNT - α e Fator de Crescimento Transformador beta (TGF- β) entre os dois grupos. Por outro lado, a atividade das gelatinases, MMP-2 e MMP-9, aumenta poucas horas após a realização de uma infecção experimental ou da realização de uma cobertura (ODDSDOTTIR et al., 2006). A atividade destas enzimas apresenta-se aumentada em outros processos degenerativos e inflamatórios dos eqüinos.

Em pacientes sintomáticos de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, uma atividade maior de MMP-9 do que em pacientes assintomáticos foi observada (RAULO et al., 2001) e poderia contribuir para quadros respiratórios que resultam em fibrose pulmonar (WILKINS, 2003), além de poder, através da liberação de fragmentos de matriz extra-celular, atrair neutrófilos e estimular a liberação de citocinas, como a IL-6 e o FNT- α (BRAZIL & MCGORUM, 2001). Em cartilagens apresentando osteo-artrite, ambas gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são encontradas em altas concentrações, em conjunto com outras proteinases (McILWRAITH, 2002).

Uma estreita relação entre lesões vasculares degenerativas do endométrio e endometriose foi demonstrada por Schoon et al. (1997). Os autores sugeriram a possibilidade de que lesões vasculares interfiram também na drenagem linfática e na resposta do útero a estímulos hormonais ou antigênicos, favorecendo, desta forma, o aparecimento de falhas nos mecanismos de defesa uterina, tais como a contratilidade miometrial e a migração quimiotóxica de neutrófilos.

A formação de ninhos não fibróticos é um achado geralmente observado em éguas em anestro ou fase transicional. A distensão de glândulas devido ao acúmulo de secreção engrossada é freqüentemente observada nas glândulas de ninhos fibróticos nesta fase (KENNEY & DOIG, 1986). Durante a fase transicional, uma dilatação glandular disseminada é comum, sem associação com fibrose. A tendência é de que este quadro desapareça com o início da temporada reprodutiva fisiológica (DOIG & WAELCHI, 1993). Porém se a condição persiste durante a temporada reprodutiva, deve ocorrer uma queda de fertilidade (KENNEY, 1975).

Durante o anestro, a ausência de hormônios esteóides leva a uma atrofia do endométrio. Durante a transição do anestro para a fase cíclica, o endométrio retoma gradualmente sua atividade (DOIG & WAELCHI, 1993). Estudando 87 éguas com alterações inflamatórias ou degenerativas mínimas, em diferentes estágios de atividade endometrial, foi observado que as éguas que apresentavam glândulas atroficas demoraram mais tempo para iniciar a temporada reprodutiva fisiológica e apresentarem condições para serem cobertas, em comparação àquelas nas quais foi observada uma maioria de glândulas ativas. Enquanto 54% das éguas em que se observou uma maioria de glândulas ativas já estavam em condições de serem cobertas 30 dias após o exame, apenas 5% das éguas com atrofia do endométrio estavam em condições para a realização de cobertura neste mesmo período. Apesar de que apenas

metade das éguas com glândulas atroficas foi coberta em até 60 dias, no momento em que um folículo ovulatório foi observado, a fertilidade pareceu não apresentar diferença em função do estágio de atividade endometrial no início do período observado (DOIG et al., 1981).

No entanto, Kenney & Doig (1986), observam que a exemplo do que ocorre nos ovários, também o endométrio apresenta um período de transição. O epitélio luminal e os ductos glandulares geralmente apresentam atividade mais cedo do que as áreas mais profundas das glândulas. Porém, em uma mesma amostra é possível a observação de áreas onde o epitélio glandular parece mais ativo do que o epitélio luminal (DOIG & WAELCHI, 1993). A duração deste período é muito variável entre indivíduos, sendo possível encontrar graus variados de atrofia em éguas que já tenham experimentado 1 a 2 ciclos ovulatórios. Embora a condição seja temporária, ela leva à falha reprodutiva, enquanto o endométrio não acompanhar o estágio de maturidade do ovário (KENNEY & DOIG, 1986). Um quadro semelhante foi demonstrado por Schoon et al. (1999), em éguas na temporada reprodutiva fisiológica, pertencente ao quadro de “má-diferenciação endometrial”, descrito por este grupo de pesquisadores.

Angiopatas do endométrio podem aparecer em éguas de pouca idade, independentemente do *status* reprodutivo (SCHOON *et al.*, 1999). Distúrbios na resposta endometrial aos hormônios sexuais, como diferenciação irregular, diferenciação assíncrona e hipoplasia endometrial podem ocorrer mesmo em éguas jovens classificadas como Categoria I segundo Kenney & Doig (1986), podendo levar a infertilidade temporária (SCHOON & SCHOON, 2003).

Através de eletroforese, diferenças na composição protéica da secreção endometrial devido à presença de diferentes graus de fibrose endometrial foram demonstradas por Bader et al. (1997). Deficiências na secreção de proteínas no útero e cérvix de éguas com endometrose moderada a severa também foram observadas (HEIN, 2000). Desvios no padrão de secreção do epitélio glandular de 4 proteínas de fase luteínica e do glicogênio foram identificados, através de imunohistoquímica, em áreas fibróticas, quando comparadas às glândulas não afetadas (HOFFMAN et al., 2003). Os autores sugeriram que esta alteração é um dos fatores responsáveis pela alteração do micro-ambiente uterino, estando ligada à queda de fertilidade associada a endometrose. Através da imunoidentificação, Stewart et al. (2000) demonstraram que

a lipocalina P19 está presente em grande quantidade nas glândulas endometriais durante o diestro e nos primeiros 25 dias da gestação, enquanto está ausente no endométrio das éguas em anestro e apresenta um padrão de secreção alterado, em relação ao endométrio sadio, nas glândulas de ninhos. Uma alta proporção de glândulas com atividade assíncrona poderia ser um dos fatores causadores da menor fertilidade de éguas com endometrose. Além disso, em éguas com fibrose endometrial, a placentação é muitas vezes inadequada (BRACHER et al, 1997). Esta placentação insuficiente poderia ser causada pela ausência de expressão epitelial de mRNA para Fator de crescimento da Epiderme (EGF) em glândulas dilatadas e naquelas de ninhos fibróticos, e em áreas de inflamação crônica (GERSTENBERG et al., 1997).

Kenney & Doig (1986) propuseram uma adaptação da classificação original de Kenney (1978). Visando levar em consideração o efeito do número de temporadas que a égua permaneceu vazia e utilizando a taxa de parição provável como o ponto final do prognóstico, foram criadas 4 categorias, de acordo com o grau de alterações inflamatórias e degenerativas observado. O número de temporadas vazias poderia determinar a migração para categorias com pior prognóstico de parição. Uma queda gradativa na taxa de parição à medida que aumenta a categoria da biópsia endometrial foi observada por vários autores, segundo revisão de Ginther (1992) e Doig & Waelchi (1993). Devido à facilidade de compreensão e da possibilidade de utilização desta classificação para a análise estatística, em estudos comparativos, esta classificação é utilizada e aceita internacionalmente (SCHOON & SCHOON, 2003). No entanto, fatores como a idade, o manejo reprodutivo e o número de temporadas que a égua permaneceu vazia podem influenciar o desempenho reprodutivo nas diferentes categorias (DOIG & WAELCHI, 1993).

A utilização da classificação histopatológica e da idade para classificar éguas resistentes e susceptíveis é largamente utilizada na pesquisa. No entanto, apresenta o risco de excluir algumas éguas susceptíveis da classificação. Angiopatias do endométrio podem aparecer em éguas de pouca idade, independentemente do *status* reprodutivo (SCHOON *et. al.*, 1999). Liu *et. al.* (1993) consideram que éguas cujas biópsias endometriais foram classificadas nos grupos I e III apresentam uma forte correlação com resistência e susceptibilidade à endometrite, respectivamente. Isto não ocorre nas éguas dos grupos IIa e IIb, categorias em que os fatores de manejo, o

histórico reprodutivo e, principalmente, a idade, parecem ter um efeito maior sobre as diferenças na taxa de parição do que nas categorias I e III (DOIG & WAELCHLI, 1993; SCHOON et al., 1997). Entretanto, Vieira *et al.* (2002) não encontraram nenhuma relação entre a presença de líquido e a classificação da biópsia quando utilizaram a presença de fluido uterino após a inseminação artificial como critério para classificar as éguas como resistentes (fluido ausente em até 48 h após a IA) e susceptíveis (presença de fluido além de 48 horas após a IA) à endometrite pós-cobertura.

3.3. *Imunohistoquímica*

O endométrio é composto de vários tipos celulares (epitélio glandular e luminal, estroma e vasos) que apresentam variação cíclica (BRUCKHORST, 1991). Juntamente com o miométrio, o endométrio é capaz de responder aos hormônios esteróides ovarianos (estrógeno e progesterona) circulantes, através da proliferação e diferenciação celular (CLARK, 1985). O que possibilita esta resposta são receptores de alta afinidade, cuja expressão é regulada pela concentração desses hormônios e pode ser avaliada através de técnicas de imunohistoquímica (TOMANELLI et al., 1991). O estímulo estrogênico leva a um aumento da expressão dos receptores de estrógeno e progesterona, enquanto altos níveis de progesterona coincidem com um período de pouca expressão dos receptores (WATSON et al., 1992). Além de alterar o nível de expressão, os esteróides sexuais controlam também o local da expressão dos receptores. A intensidade de coloração e o percentual de células reativas variaram de acordo com a fase do ciclo estral, mas manteve-se baixa nos ductos glandulares e no epitélio luminal durante todo o ciclo (AUPPERLE et al., 2000).

Com altas concentrações de 17β -estradiol, que ocorrem durante o cio, há um aumento da expressão de receptores para estrógeno e para progesterona, e a proliferação de células do estroma. O nível máximo de expressão dos receptores para estrógenos no estroma ocorreu no dia da ovulação (AUPPERLE et al., 2000). Durante o estro, os receptores para progesterona coraram mais intensamente também no estroma (Watson et al., 1992). Logo após a ovulação, no início do diestro, quando o nível de 17β -estradiol baixa e a concentração de progesterona está aumentando, a expressão dos receptores de hormônios esteróides é maior no epitélio glandular

(AUPPERLE et al., 2000; WATSON et al., 1992). No 5º dia após a ovulação, a intensidade dos receptores para estrógeno foi alto no epitélio das glândulas endometriais. Os receptores para progesterona tiveram sua expressão máxima no 5º dia após a ovulação, baixando até o final do diestro e aumentando novamente com o início do novo cio. Estroma e vasos apresentam baixa expressão de receptores ao longo de todo o diestro, com novo aumento ocorrendo a partir do início de um novo cio (Aupperle et al., 2000). No miométrio, a coloração dos receptores foi muito baixa no diestro, enquanto no estro, coraram fracamente (WATSON et al., 1992).

O antígeno Ki-67, um marcador de proliferação celular, apresentou um comportamento idêntico ao observado para os receptores de progesterona ao longo do ciclo, tanto quanto ao momento, como quanto ao local da expressão (AUPPERLE et al., 2000). Gerstenberger et al. (1999), demonstraram que a proliferação celular ocorre predominantemente na porção glandular do endométrio, desde o estro até o 3º dia do diestro. Entre os dias 3 a 7 após a ovulação, a atividade é mais intensa na porção secretória das glândulas, sendo que após este período, se mantém baixa até o início do estro. No estroma e nos vasos, a atividade proliferativa foi baixa ao longo de todo o ciclo, com leve aumento sendo observado no final do diestro (dia 13 após a ovulação) (AUPPERLE et al., 2000).

Durante o anestro invernal, o endométrio apresenta-se atrofiado, em resposta à ausência dos esteróides ovarianos (KENNEY & DOIG, 1987). Nesta fase, a expressão dos receptores para hormônios sexuais foi muito variável, não havendo sincronia entre a expressão nas células do estroma e do epitélio glandular. Não foi observado um padrão típico de expressão nesta fase, levando à conclusão de que a imunohistoquímica não é uma ferramenta diagnóstica na fase inativa fisiológica do endométrio (AUPPERLE et al., 2003).

Por outro lado, em 5 éguas apresentando diferenciação desigual, com endométrio inativo durante a temporada reprodutiva fisiológica, Aupperle et al (2003) observaram que os resultados de imunohistoquímica apresentam um padrão uniforme. Não foi observada a expressão do antígeno Ki-67 e a expressão de receptores para estrógeno e progesterona foi muito fraca nas células epiteliais e do estroma.

Comparado ao endométrio sadio, em áreas com fibrose endometrial foi possível observar diferenças tanto na expressão de receptores para estrógeno e progesterona, quanto na expressão do antígeno Ki-67 (AUPPERLE et al., 2000).

Além disso, Schoon et al. (1999) demonstraram que a avaliação da expressão de receptores hormonais e do antígeno Ki-67 são fundamentais para o diagnóstico de “mã-diferenciação endometrial”. Em áreas sem fibrose, os autores observaram três quadros distintos. Diferenciação desigual, na qual se observa, entre outras características, a formação de agrupamentos glandulares onde ocorre grande expressão de receptores para estrógeno, tanto no epitélio glandular como no estroma. Da mesma forma, a expressão do antígeno Ki-67 foi muito alta nestas áreas, enquanto foi muito baixa no endométrio normal. No endométrio apresentando diferenciação proliferativa irregular, foi observada uma expressão alta de receptores para estrógeno e do antígeno Ki-67, associada a uma expressão mínima, e patológica, dos receptores de progesterona. No terceiro quadro, denominado de diferenciação secretória irregular, a expressão de todos os receptores e do marcador de proliferação celular foi alta, mas houve grande variação dentro de uma mesma glândula, ou diferenças de uma glândula para a outra (SCHOON et al., 2000).

Em éguas com hidromucômetra, foi observada uma baixa concentração de progesterona circulante, que foi considerada como o ponto de partida na patogenia do quadro. O acúmulo de fluido no útero foi atribuído à ausência do efeito inibitório deste hormônio sobre a expressão dos receptores para estrógeno e progesterona - cuja expressão está aumentada nos animais afetados - o que gerou uma secreção exagerada das glândulas endometriais (ÖZGEN et al., 1997).

A imunohistoquímica foi utilizada também por Hoffmann et al. (2003), como ferramenta para a avaliação do efeito da endometrose na secreção de proteínas necessárias à manutenção do embrião eqüino na fase inicial da gestação. Em comparação à glândulas sadias, na maior parte das áreas do epitélio que apresentavam fibrose periglandular, foi observada uma menor intensidade de coloração para os produtos da secreção endometrial testados (uteroglobina, calbidina, uterocalina e glicogênio).

3. ARTIGOS

3.1. Artigo 1

Avaliação do Perfil Protéico da Secreção Endometrial Pura da Égua Através da Eletroforese Bi-dimensional: Efeito do ciclo¹

Eduardo Malschitzky^{1,2,2}, Sandra M. E. Fiala³, Maria Inês M. Jobim⁴, Ana Maria T. Esmeraldino², Ricardo Macedo Gregory^{1,5}, Rodrigo Costa Mattos^{1,5}

1 – Reprolab, Faculdade de Veterinária, UFRGS

2 – Curso de Medicina Veterinária, ULBRA

3 – Instituto de Biologia, UFPel

4 – Laboratório de Inseminação Artificial, Faculdade de Veterinária, UFRGS

5 – Pesquisador do CNPq

Resumo

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil protéico da secreção endometrial de éguas e determinar se essas proteínas estão associadas ao ciclo estral. A hipótese a ser testada e que o perfil protéico das secreções endometriais varia entre o estro e o diestro. Foram utilizadas 8 éguas em estro, de um rebanho comercial, e 4 éguas em diestro de um grupo de animais enviados para o abate. Nas éguas em estro coletou-se, por meio de tampão, uma amostra da secreção uterina e retirou-se uma biópsia endometrial quando se detectou a presença de um folículo pré-ovulatório. Nas éguas em diestro um tampão foi colocado, prévio ao abate para coleta da secreção uterina, e retirado após a remoção do útero, quando uma amostra de endométrio foi coletada. A secreção uterina obtida foi processada e submetida à eletroforese bi-dimensional. Foram observadas 33 bandas protéicas nas amostras de éguas em estro e 30 nas amostras de éguas em diestro. A fase do ciclo influenciou o perfil protéico da secreção uterina. Foram observadas diferenças significativas na densidade óptica relativa em 13 bandas, sendo 4 com maior expressão no estro e 9 no diestro. Concluiu-se que a composição protéica da secreção uterina da égua em estro é diferente

¹ Projeto financiado pelo CNPq/FAPERGS

² Autor para correspondência. E-mail: emalschitzky@ibest.com.br

daquela de éguas em diestro, podendo as diferenças protéicas, estarem associadas tanto ao processo de manutenção e desenvolvimento embrionário, como a uma necessidade de eventual resposta inflamatória.

Palavras-chave: éguas, estro, diestro, perfil protéico, secreção endometrial.

Abstract

Protein profile of endometrial secretions of mares: The estrous cycle effect

The aim of this study was to evaluate the protein profile of endometrial secretions of mares and to determine if any of these proteins were associated with estrous cycle. Experimental subjects were 8 breeding mares in estrous and 4 mares in diestrous selected from a population of horses sent to slaughter to an abattoir. In estrous mares endometrial secretion was collected when a pre-ovulatory follicle was observed using a regular vaginal tampon and immediately after the tampon removal an endometrial biopsy was obtained. In diestrous mares a regular vaginal tampon was intrauterine placed and removed after the slaughter when an endometrial sample was collected. Endometrial secretions were processed and submitted to 2D-PAGE. Thirty three protein spots were identified in the estrous mares and 30 in the diestrous mares. The protein profile from the endometrial secretion was influenced by estrous cycle. A higher relative protein content was observed in 9 spot from diestrous mares and in 4 spots from estrous mares. In conclusion, protein profile from estrous mares is different from the profile from diestrous mares. This difference could be explained by requirements to support and develop the embryo or to an eventually inflammatory response.

Key-words: mares, estrous, diestrous, protein profile, endometrial secretion.

Introdução

Durante a cobertura na espécie eqüina, o sêmen é depositado diretamente no útero (PICKETT, 1989), induzindo uma resposta inflamatória que visa a retirada de espermatozoides mortos e defeituosos, além de resíduos inflamatórios, garantindo que o ambiente uterino esteja compatível com a sobrevivência e manutenção do embrião, que deve chegar a partir do quinto dia após a ovulação (TROEDSSON, 1997).

Os mecanismos de defesa uterina são influenciados pelos níveis de hormônios esteróides. Durante o estro, os níveis de estrógeno aumentam, levando à abertura da cérvix e a um padrão de contratilidade uterina que, em conjunto com a abertura da cérvix e do aumento da produção de muco, favorecem a limpeza física do órgão (EVANS et al., 1987; JONES et al., 1991; LEBLANC, 1997). A hiperemia característica do cio favorece o aporte de imunoglobulinas e fatores do complemento, provenientes da corrente sangüínea, além de permitir a rápida chegada de leucócitos polimorfonucleados (KENNEY, 1978).

A atividade proliferativa das células endometriais, medida pelo antígeno K67, é maior nas células do estroma, no início do estro, aumentando depois na região glandular, o que poderia indicar uma preparação para a fase secretória, que ocorre a partir da ovulação (AUPPERLE et al., 2000).

O período no qual o embrião eqüino permanece no útero sem estar firmemente aderido ao endométrio é o mais longo dentre todas as espécies domésticas. O trofoblasto somente está completamente aderido em torno do 40º dia de gestação (FLOOD, 1993). Durante este período, o embrião é embebido na secreção uterina, através da qual ele deve ser suprido com oxigênio e substratos metabólicos. Até o 21º dia de gestação, o embrião é recoberto por uma cápsula, que, além de favorecer a mobilidade necessária ao reconhecimento materno da prenhez, acumula proteínas e outros componentes da secreção endometrial (ALLEN, 2001). A cápsula é permeável para proteínas com peso molecular inferior a 200 kDa, sendo resistente a vários agentes solubilizantes e algumas proteases (FLOOD, 1993).

Uma alta concentração de proteína foi observada por Zavy et al (1982), em amostras coletadas no 12º dia após a ovulação, sendo identificadas 17 bandas protéicas, tanto em éguas prenhes, quanto cíclicas e éguas ovariectomizadas tratadas com progesterona ou combinações de progesterona e estradiol. Enquanto na secreção

de éguas prenhes a concentração destas proteínas se mantém elevada até pelo menos o 20º dia após a ovulação, em éguas cíclicas, as proteínas desaparecem até o 16º dia do ciclo, o mesmo ocorrendo em éguas ovariectomizadas, tratadas com estradiol. Pelo menos quatro proteínas típicas da fase luteínica foram identificadas na égua (BEIER-HELLWIG et al., 1995; KREMER et al, 1993; STEWART et al., 2000; ZAVY et al., 1982), sendo responsáveis pelo transporte de vitaminas e minerais para o embrião em desenvolvimento.

O endométrio é capaz de responder aos hormônios esteróides ovarianos (estrógeno e progesterona) circulantes, mediados por fatores de crescimento, com a proliferação e a diferenciação celular, a angiogênese e a secreção, além de prepará-lo para a placentação (CLARK, 1985; SHARKEY, 1998). O que possibilita esta resposta são receptores de alta afinidade cuja expressão é regulada pela concentração desses hormônios e pode ser avaliada através de técnicas de imunohistoquímica (TOMANELLI et al., 1991). O estímulo estrogênico leva a um aumento da expressão dos receptores de estrógeno e progesterona, enquanto altos níveis de progesterona coincidem com um período de pouca expressão dos receptores (WATSON et al., 1992). Além de alterar o nível de expressão, os esteróides sexuais controlam também o local da expressão dos receptores. A intensidade de coloração e o percentual de células reativas variaram de acordo com a fase do ciclo estral, mas manteve-se baixa nos ductos glandulares e no epitélio luminal durante todo o ciclo (AUPPERLE et al., 2000).

Enquanto vários trabalhos demonstraram o efeito da progesterona sobre a secreção de proteínas pelo endométrio, pouco se conhece sobre a composição da secreção endometrial da égua em estro. Reilas (2001) analisou a concentração de proteínas da secreção coletada no início do estro, observando que a concentração média de proteína foi menor nas éguas com acúmulo de líquido uterino em comparação àquelas sem acúmulo. Entre éguas no cio do potro, a concentração de proteína foi significativamente maior do que nas amostras coletadas no diestro subsequente ou no estro de éguas não parturientes. Não há relatos quanto ao perfil protéico de éguas sadias, durante o estro.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil protéico da secreção endometrial de éguas e determinar se essas proteínas estão associadas ao ciclo estral.

A hipótese a ser testada é que o perfil protéico das secreções endometriais varia entre o estro e o diestro.

Material e métodos

Animais

Foram utilizadas 8 éguas em estro, de um rebanho comercial e 4 éguas em diestro de um grupo de animais enviados para o abate em frigorífico localizado em Pelotas, RS. As amostras foram coletadas entre os meses de janeiro de 2005 e fevereiro de 2006.

Coleta das amostras

A técnica de coleta foi uma adaptação do procedimento descrito por Reilas (2001). Uma atadura de gaze de 50 cm foi presa ao tampão vaginal (OB[®] - Johnson & Jonhson), que foi introduzido na luz uterina, utilizando a técnica da dupla luva. Esta técnica consiste em cortar a porção distal de uma luva de palpação retal na altura do pulso, formando um tubo plástico. Com uma outra luva de palpação, o operador colocava o tubo plástico sobre o braço enluvado e o tampão vaginal, fechando uma de suas pontas com os dedos. Introduzida a mão via vaginal e ao atingir a cérvix, o tubo plástico era liberado e o tampão introduzido na luz do útero, evitando seu contato com as secreções vaginais.

Manejo reprodutivo

As éguas em cio foram examinadas diariamente por palpação e ultrasonografia retal para avaliar o crescimento folicular, o grau de edema uterino e a presença de fluido intrauterino. A coleta da secreção endometrial foi realizada quando se detectou a presença de um folículo pré-ovulatório (>35 mm) e uma imagem ultrasonográfica característica de estro. A cauda da égua foi ligada, a região perineal limpa com água e iodo-povidine (Povidine Degermante, Johnson Divisão Hospitalar) e seca com papel toalha. Nestas éguas, o tampão permanecia no lúmen uterino por 30 minutos quando era retirado com a proteção de uma luva. Imediatamente após a retirada do tampão, uma biópsia endometrial foi coletada, para a realização de exames histopatológico e imunohistoquímico.

Nas éguas do grupo enviado para o frigorífico, o tampão foi introduzido no útero 30 minutos antes do abate. Nestas éguas, imediatamente após o abate, realizado de forma humanitária, o útero foi removido, sendo o tampão retirado. O útero foi aberto com auxílio de uma tesoura, sendo feita a coleta de uma amostra de endométrio para exames histopatológico e imunohistoquímico, na porção dorsal da bifurcação uterina. O grau de edema uterino foi avaliado pelo aspecto macroscópico do endométrio, e classificado em uma escala de 1 (edema pouco pronunciado) até 3 (edema pronunciado). Os ovários foram medidos com auxílio de um paquímetro e seccionados transversalmente, para a avaliação e medição das estruturas (foliculos, corpo lúteo, corpo hemorrágico e corpo albicans). As éguas foram diagnosticadas como estando em diestro com base na presença de corpo lúteo, ou corpo hemorrágico nos ovários, pela identificação de um colo uterino contraído e sem hiperemia e pela presença de edema pouco pronunciado.

Processamento das amostras da secreção endometrial

Após a sua retirada, o tampão foi colocado em uma seringa de 20 mL e comprimido com o auxílio do êmbolo para retirada da secreção absorvida. Uma alíquota de 2,0 mL da secreção foi colocada em um tubo estéril de 10 mL e imediatamente centrifugada a 1500 x g por 15 minutos, sendo o sobrenadante transferido para criotubo e armazenado em nitrogênio líquido.

Técnica de eletroforese

As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 10000 x g por 60 minutos a 4 °C e uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi armazenada em criotubos a -80 °C. A proteína total das amostras foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão albumina sérica bovina (1 mg/mL). A eletroforese bidimensional foi realizada pelo método de O'Farrel (1977) modificado por Rodnigh et al (1988), a qual é constituída de duas etapas de separação protéica.

A solução utilizada para a separação em primeira dimensão continha 9 M de uréia, 12,5 nM lisina, 7 nM SDS, 4% (v/v) Igepal e 2% (v/v) 2-mercaptoetanol. A primeira dimensão constituía-se de eletroforese não equilibrada em gel tubular de poliacrilamida a 3,5% (LENZ et al., 1997) com gradiente de pH de 2 a 10. Uma

quantidade de 100 µg de proteína foi aplicada em cada tubo e foi utilizado o Citocromo C (Sigma) como marcador de frente de corrida. Foi utilizada uma fonte EPS 3501 (Amersham, Pharmacia) com voltagem máxima de 800 V, amperagem máxima de 10 mA e potência de 0,125 W por tubo. A corrida era interrompida quando a banda de Citocromo C (visível) atingia 8 cm de migração. Os tubos capilares eram retirados da cuba, identificados e mantidos à -20°C, até o momento da transferência para a segunda dimensão.

Para a segunda dimensão foi utilizada eletroforese em placas de gel (SDS-PAGE), com 12% de acrilamida, com sistema de tampão descontínuo, que separa as proteínas pelo seu peso molecular.

Para a coloração, os géis eram mantidos em uma solução de 0,15% de Comassie Brilliant Blue R-250 (Amersham, Pharmacia), 53% de metanol e 7% de ácido acético por aproximadamente 12 horas. A fim de evidenciar as bandas, os géis eram descorados através de uma solução de 50% de metanol, 7% de ácido acético e água, por cerca de 6 horas. A seguir, os géis eram imersos em solução de secagem (50% de metanol, 1% de glicerol e água) por 2 horas e, posteriormente, secos entre duas folhas de celofane.

Quantificação das bandas protéicas

Os géis foram escaneados (Hewlet-Packard Scanjet 6100 C) e analisados pelo programa Optiquant Acquisition & Analysis (versão 02.00, Packard Instrument) para determinação da densidade óptica das bandas protéicas, expressas em *pixels*.

A densidade óptica das bandas protéicas é expressa em percentagem relativa, sendo que 100% representam o total de *pixels* de uma área definida, constante para todos os géis, e cada banda protéica correspondendo a uma percentagem do total.

Através do peso molecular e ponto isoelétrico (pI) aproximados, foi avaliada a correspondência das bandas protéicas analisadas a proteínas específicas já identificadas no equino.

Exame Histopatológico e Imunohistoquímico

As amostras de endométrio foram mantidas em formalina tamponada a 4% desde o momento da coleta até o seu processamento, sendo incluídas em parafina e

coradas com Hematoxilina-Eosina. As amostras foram processadas e classificadas de acordo ao descrito por Kenney e Doig (1986) modificado por Schoon et al. (1992), sendo consideradas as alterações inflamatórias e a fibrose endometrial, nas duas fases do ciclo estral, separadamente. Para as comparações foi considerada como presente qualquer evidência de alteração, independente do grau. Para a imunohistoquímica, foi utilizada a técnica da peroxidase-antiperoxidase (P.A.P), sendo utilizados como anticorpos primários anticorpos de camundongo contra receptores de estrógeno e progesterona humanos. Foram avaliadas três regiões de cada amostra, sendo estas o estroma, o epitélio luminal e do ducto glandular e a porção basal das glândulas. A intensidade de expressão dos receptores foi classificada segundo Özgen et al (1997) numa escala de 0 (ausência de coloração) até 3 (coloração muito forte).

Análise estatística

Os dados da densidade óptica relativa das diferentes bandas protéicas de éguas em estro e diestro foram analisados por ANOVA com significância de 95%. Um mínimo de dois géis de boa qualidade por égua foi analisado, sendo cada gel considerado como uma unidade amostral. O efeito da fase do ciclo estral foi avaliado com as éguas sendo divididas de acordo a fase em que foram realizadas as coletas de secreção endometrial (estro e diestro). A frequência relativa das diferentes bandas protéicas presentes nos géis de éguas nas diferentes fases do ciclo estral, foi avaliada pelo Qui Quadrado. A expressão dos receptores hormonais foi avaliada pelo teste T de Student.

Resultados:

Foram analisadas as secreções de 8 éguas em estro (19 géis) e 4 éguas em diestro (10 géis). Somente foram utilizadas secreções de éguas sem evidência de inflamação endometrial ao exame histopatológico.

Na secreção endometrial de éguas em estro, foram identificadas 33 bandas protéicas, com peso molecular (PM) variando entre 15 e 105 kDa e ponto isoelétrico (pI) entre 4,3 e 10,0 (Figura e Tabela. 1).

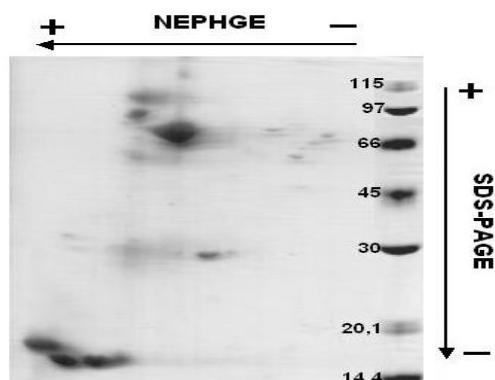


Fig 1. – Perfil eletroforético das proteínas da secreção endometrial da égua. Gel bi-dimensional SDS-PAGE a 12%, corado com Comassie Blue. Seta superior indica a direção do gradiente de pH não equilibrado (NHPHGE) na 1ª dimensão. Os marcadores de peso molecular com seus respectivos pesos encontram-se à direita.

Nas éguas em diestro, não foram observadas as bandas 23, 63, 65 e 67, enquanto nas amostras de éguas em estro estavam presentes em 84,2%, 73,7%, 63,2% e 68,4%, respectivamente (Tab. 1). Por outro lado, a banda 69 somente foi identificada em amostras de diestro (60% dos géis), não tendo sido observada em nenhuma amostra de estro. Não foi encontrada correspondência para estas cinco proteínas.

Tabela 1: Peso molecular, ponto isoelétrico e frequência relativa de expressão, das bandas protéicas identificadas por eletroforese bi-dimensional na secreção endometrial de éguas em estro e diestro.

Banda Protéica	Peso Molecular (kDa)	Ponto Isoelétrico	Frequência	
			Estro (%)	Diestro (%)
3	15 - 16	8.7 - 9.3	94,7	100
5	15 - 16	8.9 - 9.2	94,7	100
7	16 - 17	9.7 - 10.0	94,7	100
9	24 - 25	8.7 - 8.9	84,2	100
11	26 - 28	8.9 - 9.3	100	100
13	26 - 28	8.3 - 8.6	100	100
15	26 - 27	7.6 - 7.8	100	100
17	26 - 27	7.3 - 7.6	100	100
19	37 - 38	9.5 - 9.6	89,5	100
21	30 - 32	9.2 - 9.3	89,5	60
23	33 - 35	8.8 - 8.9	84,2	0
25	47 - 49	8.8 - 9.0	78,9	100
27	50 - 60	8.9 - 9.4	100	100
29	65 - 85	8.2 - 8.8	100	100
31	50 - 51	8.4 - 8.7	100	100
33	75 - 80	8.8 - 8.9	100	100
35	85 - 98	8.9 - 9.1	100	100
37	100 - 105	8.9 - 9.3	100	100
39	47 - 48	7.3 - 7.5	84,2	100
41	47 - 48	7.8 - 7.9	73,7	100
43	46 - 47	6.8 - 7.0	57,9	90
45	46 - 47	4.9 - 5.9	94,7	100
47	52 - 53	5.0 - 5.3	89,5	100
49	63 - 64	4.6 - 5.2	100	100
51	65 - 66	4.5 - 5.0	100	100
53	75 - 76	4.3 - 4.6	100	100
55	78 - 80	6.2 - 7.0	100	100
57	81 - 82	5.2 - 6.0	73,7	60
59	54 - 64	7.3 - 7.5	89,5	100
61	52 - 53	6.5 - 7.1	73,7	100
63	81 - 82	7.4 - 7.5	73,7	0
65	81 - 82	7.6 - 7.7	63,2	0
67	99 - 100	6.3 - 7.0	68,4	0
69	37,5 - 45	7,7 - 8,0	0	60

A fase do ciclo influenciou o perfil protéico da secreção uterina. Foram observadas diferenças significativas na densidade óptica relativa em 13 bandas. As

médias e desvios padrão das densidades ópticas das bandas em que se observou diferença entre as fases estão apresentadas nas figuras 2 e 3.

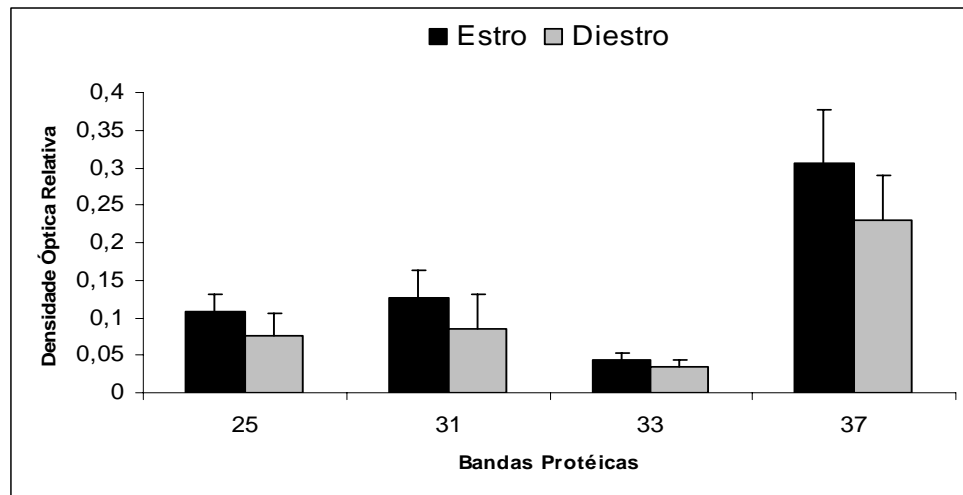


Figura 2: Média e desvio padrão da densidade óptica relativa de bandas protéicas com maior expressão na secreção endometrial de éguas estro

Nas amostras de éguas em estro, foi observada uma densidade óptica relativa maior ($P < 0,04$) em quatro bandas protéicas. Não foi encontrada correspondência, com base no peso molecular (PM) e peso isoelétrico (pI), com proteínas identificadas em eqüinos, nos bancos de informação disponíveis, para nenhuma das quatro bandas apresentadas na figura 2.

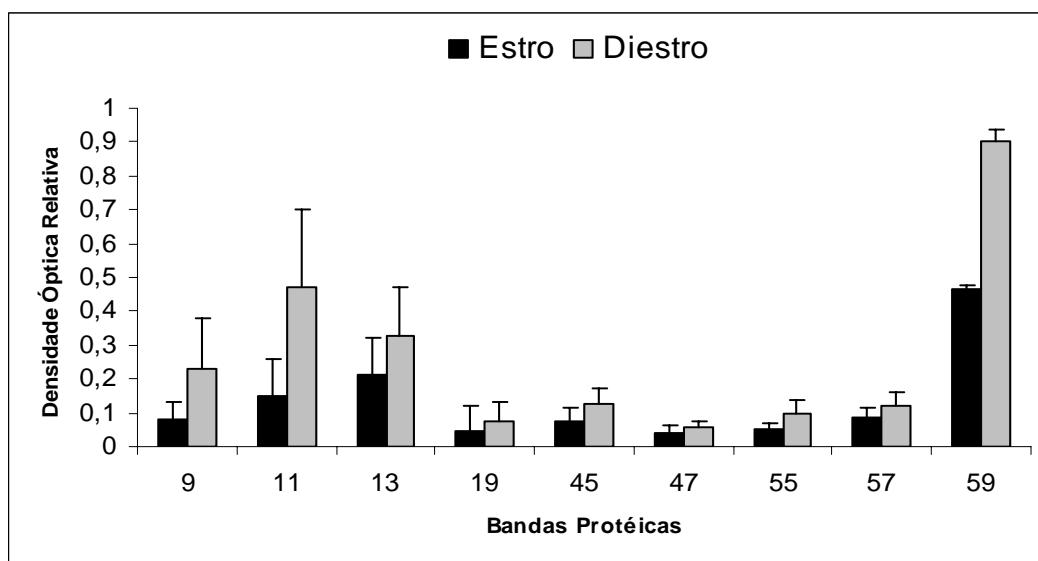


Figura 3: Média e desvio padrão da densidade óptica relativa de bandas protéicas com maior expressão na secreção endometrial de éguas diestro

Conforme se observa na figura 3, nas amostras de éguas em diestro, foi observada uma densidade óptica relativa superior ($P < 0,047$), comparada àquela verificada na secreção uterina de éguas em estro, em nove bandas protéicas. Baseado no PM e pI, a banda 9 poderia tratar-se do precursor do inibidor de metaloproteinase 3 (TIMP-3), a banda 11 poderia ser um fragmento do complexo de histocompatibilidade maior classe 2 (MHC-II), e a proteína 13, o fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Da mesma forma, a proteína 19 poderia ser um precursor do antígeno de superfície CD2 dos linfócitos T e a proteína 45 um precursor da Caspase 1 (CASP-1). A proteína 55 pode tratar-se de um receptor para o hormônio foliculo estimulante (FSH), a proteína 57 pode ser a Gelsolina e a banda 59 poderia ser proteína associada à resistência natural dos macrófagos 1 (NRANMP-1). Para a banda 47, não foi encontrada correspondência com proteínas já identificadas nos eqüinos, nos bancos de informação disponíveis.

Na Figura 4, estão apresentados os receptores para os hormônios esteróides ovarianos, estrógeno e progesterona, de acordo com a região do endométrio avaliada.

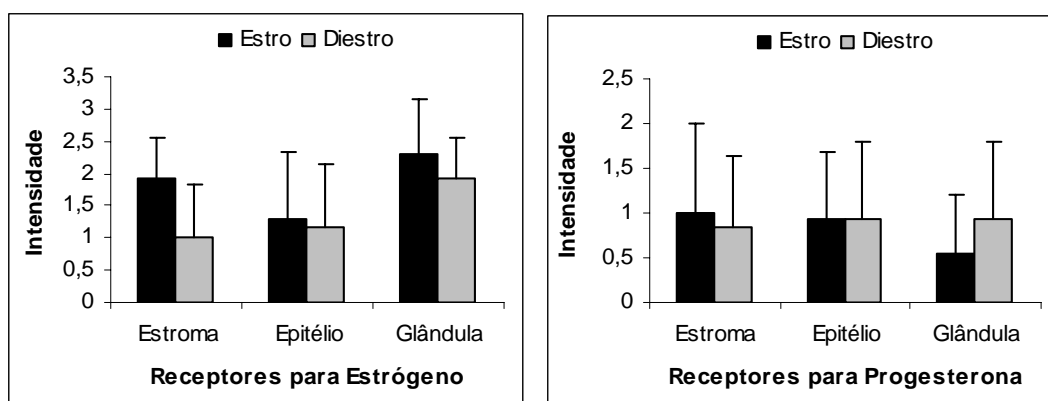


Figura 4: Intensidade de coloração, no exame imunohistoquímico do endométrio, dos receptores para estrógeno e progesterona nas regiões do estroma, epitélio luminal e glandular.

Conforme pode ser observado na Figura 4, a expressão dos hormônios esteróides somente apresentou diferença significativa nos receptores para estrógeno, na região do estroma ($P = 0,02$). Na região do epitélio luminal e do ducto glandular e na região basal das glândulas endometriais não foram observadas diferenças significativas tanto para receptores de estrógeno, como para receptores de progesterona. Para estes últimos, não houve diferença também na região do estroma ($P = 0,36$).

Discussão:

Existem fortes evidências da participação de citocinas e fatores de crescimento na implantação, além de sua participação, através da ação autócrina e parácrina, como reguladores do desenvolvimento embrionário antes da placentação. No entanto, devido à forma complexa e à redundância do trabalho das citocinas, definir um papel único para alguma delas é difícil, sendo que nenhum fator de crescimento sozinho mostrou-se também essencial à sobrevivência do embrião (SHARKEY, 1988).

A proteína 13, com alta expressão nas amostras de éguas em diestro, possivelmente seja um fator de crescimento transformador beta (TGF- β), que se origina nas plaquetas, macrófagos ativados e neutrófilos, entre outros. Esta classe de citocina pode ter efeitos tanto inibidores, através da redução da expressão de alguns receptores de interleucinas e do bloqueio de efeitos citotóxicos, como

potencializadores da resposta imune, através da quimiotaxia de neutrófilos e monócitos (TIZARD, 1998). Membros da superfamília TGF- β são necessários para a proliferação do endométrio e para a implantação embrionária em humanos (JONES et al., 2006). Já a banda 9 provavelmente trata-se do inibidor de metaloproteinase 3 (TIMP-3), que se liga, numa proporção 1:1, preferencialmente à MMP-9, inibindo sua ação. Metaloproteinases e seus inibidores, além do processo inflamatório, estão relacionados à manutenção do embrião, são necessárias à invasão do trofoblasto no processo de implantação e placentação (CURRY & OSTEEN, 2001).

Durante o diestro, devido aos efeitos da progesterona sobre os mecanismos de defesa uterino, as éguas estão mais predispostas ao estabelecimento de uma infecção uterina, especialmente devido ao fechamento da cérvix e ao padrão da contratilidade uterina (EVANS et al., 1987; JONES et al., 1991). Por outro lado, não há relatos quanto à diminuição da ação dos mecanismos imunológicos nas diferentes fases do ciclo estral.

A proteína 19, possivelmente trata-se de um precursor do antígeno CD2 da superfície das células T. Estas células de adesão atuam melhorando a ligação dos linfócitos T auxiliares as moléculas do MHC-II (JANEWAY et al., 1999). As moléculas MHC-II, classe a qual provavelmente pertença à proteína 11, tem como função a apresentação de antígenos aos linfócitos, estando presentes constitutivamente nos linfócitos T auxiliares (TIZARD, 1998). No endométrio da égua, os linfócitos são as células predominantes na endometrite crônica (KENNEY & DOIG, 1986). Por meio de imunohistoquímica, foi observada a atividade de linfócitos CD4 positivos (*T* auxiliares), no endométrio da égua, com uma tendência a maior expressão em éguas inférteis (TUNÓN et al., 1997). A banda 45 provavelmente seja o precursor da caspase 1 (CASP-1), que é a enzima responsável pela ativação da IL-1 β , citocina pró-inflamatória cuja produção está aumentada no endométrio de éguas susceptíveis, comparada ao de éguas resistentes. (FUMOSO et al, 2003). Uma vez que somente foram avaliadas as secreções de éguas que não apresentavam inflamação endometrial ao exame histopatológico, o aumento de moléculas pró-inflamatórias observado no presente trabalho, poderia representar uma forma de compensar os efeitos da progesterona sobre a contratilidade. Por outro lado, compreender as interações que ocorrem entre o embrião e o endométrio, no nível molecular, ainda é um desafio (SHARKEY, 1998). Embriões humanos no período pré-implantação, por

exemplo, secretam IL-1 α e IL1- β . Não é possível, portanto, descartar efeitos das citocinas observadas na manutenção da gestação.

As gonadotrofinas desempenham outras funções, além daquelas tradicionalmente conhecidas (SHEMESH, 2001). Sítios de ligação para o hormônio luteinizante (LH) têm sido demonstrados no útero de bovinos, suínos e humanos. A ativação de receptores de LH no endométrio, por exemplo, são associados a aumento na secreção de prostaglandina F. Em todas as espécies estudadas, a expressão de receptores de LH está associada à fase do ciclo estral (SHEMESH, 2001). Com base no PM e pI, a banda 55 poderia tratar-se de um receptor para o hormônio folículo estimulante (FSH). Na musculatura uterina de vacas, a ativação dos receptores de FSH poderia ser uma das vias para a secreção de prostaglandina E2 (PGE2), levando ao relaxamento característico da fase luteínica. Na égua, o padrão de contratilidade do útero sob o domínio da progesterona apresenta uma característica diferentes daquela do estro, levando ao tônus aumentado típico da égua em diestro (GINTHER, 1992). Ainda que não haja estudos quanto à expressão de receptores para as gonadotrofinas no trato genital da égua, a observação de um provável receptor para FSH, no presente trabalho, permite admitir uma interferência direta das gonadotrofinas sobre o útero.

A proteína 59, que apresentou maior expressão nas éguas em diestro, pode ser a Proteína associada à resistência natural dos macrófagos 1 (NRANMP-1), a qual está envolvida na eliminação de agentes fagocitados (NEVO & NELSON, 2006). Por outro lado, esta proteína pertence a uma família de transportadores de íons minerais, em especial alguns microminerais que atuam como cofatores para várias enzimas. A banda 57, por sua vez, deve tratar-se da Gelsolina, uma proteína pertencente à superfamília das proteínas de ligação da actina, que está implicada na regulação da mobilidade celular, transdução de sinais, alterações do citoesqueleto e estímulo à apoptose (McGOUGH et al., 2003). Uma função para estas proteínas, no útero, não está estabelecida.

A expressão dos receptores hormonais no endométrio apresentou um comportamento típico nas éguas em estro. Nas éguas em diestro, sua expressão foi característica daquela descrita para início da fase secretória, que vai até os 7 dias (AUPPERLE et al., 2000). É possível que mais diferenças entre as fases e outras proteínas sejam observadas num estágio mais avançado do diestro.

Por outro lado, nenhuma das proteínas que tiveram maior expressão no estro, apresentou correspondência com proteínas identificadas nos eqüinos. Uma vez que o estro é um período em que a imunidade local está estimulada, pode-se supor que estas proteínas estejam ligadas ao processo inflamatório.

Conclui-se que a composição protéica da secreção uterina da égua em estro é diferente daquela de éguas em diestro, podendo as proteínas, estarem associadas tanto ao processo de manutenção e desenvolvimento embrionário, como a uma necessidade de eventual resposta inflamatória.

3.2. Artigo 2 - Pregnancy and embryo loss rates in non-lactating mares bred in the first or in other estrus cycles during the breeding season. *Pferdeheilkunde*. v.19, n.6, p. 641-645, 2003.

Taxa de prenhez e morte embrionária em éguas não lactantes cobertas no primeiro ou em outros ciclos durante a temporada reprodutiva³

Eduardo Malschitzky^{1,2,4}; Alexandre Schilela¹; Ana Luiza G. Mattos²; Petra Garbade¹; Ricardo Macedo Gregory^{1,3}; Rodrigo Costa Mattos^{1,3}

1 – Reprolab, Faculdade de Veterinária, UFRGS

2 – Curso de Medicina Veterinária, ULBRA

3 – Pesquisador do CNPq

Resumo

O objetivo deste estudo foi comparar as taxas de prenhez e morte embrionária em éguas não lactantes cobertas no primeiro, ou em outros ciclos durante a temporada reprodutiva. Um total de 179 éguas falhadas e 145 éguas virgens foi estudado. Todas as éguas foram examinadas, de 15 de julho até 31 de julho, sendo classificadas em dois grupos, de acordo com os achados: Primeiro ciclo - tônus uterino reduzido, ovários pequenos ou com atividade folicular irregular, e ausência de copo lúteo (CL); segundo ciclo – presença de CL. A partir do dia 1º de agosto, todas as éguas em cio passaram a ser examinadas, a fim de avaliar o crescimento folicular, o grau de edema uterino e a presença de líquido intra-uterino (LIU). As éguas foram cobertas quando um folículo pré-ovulatório e uma redução do grau de edema foram identificados. Um novo exame foi realizado 36-48 horas após a cobertura, visando confirmar a ovulação e detectar LIU. As éguas virgens apresentaram menor taxa de prenhez e as éguas falhadas apresentaram menor taxa de prenhez e maior taxa de morte embrionária quando cobertas no 1º estro da temporada em comparação às cobertas nos ciclos subsequentes. O grau de edema uterino e a incidência de LIU, durante o estro das

^{3 3} Projeto financiado pelo CNPq/FAPERGS

³ Autor para correspondência. E-mail: emalschitzky@ibest.com.br

éguas virgens e falhadas, não diferiu entre o primeiro e os ciclos subsequentes. Foi concluído que: (a) durante a temporada reprodutiva, a fertilidade de éguas solteiras é menor no 1º ciclo que nos ciclos subsequentes; (b) que uma taxa de morte embrionária maior pode ser esperada em éguas falhadas cobertas no 1º ciclo do que nos demais e (c) que a menor fertilidade observada no 1º ciclo não está relacionada à incidência de endometrite persistente pós-cobertura.

Palavras-chave: éguas, prenhez, morte embrionária, ciclo estral.

Abstract

Pregnancy and embryo loss rates in non-lactating mares bred in the first or in other estrus cycles during the breeding season

The aim of the present study was to compare pregnancy and embryo loss rates in non-lactating mares bred either in the first, or in other estrus cycles during the breeding season. Experimental subjects were 179 barren mares and 145 maiden mares. All the mares were examined, from July 15th to July 31st, in order to be classified, according to the findings, into two groups: 1st estrus –reduced uterine tonus, small sized ovaries or ovaries with irregular follicular activity, lacking evidence of pre-ovulatory follicle and presence of a corpus luteum (CL); 2nd estrus –presence of a CL. From August 1st on, all mares in estrus have been examined in order to evaluate follicular growth, grade of uterine edema and presence of intra-uterine fluid (IUF). Mares have been bred when a pre-ovulatory follicle and low grade of uterine edema were found. A new examination was performed 36 to 48 hours after breeding to confirm ovulation and to detect IUF. Barren and maiden mares bred in the 1st estrus cycle showed lower ($p < 0,026$) pregnancy rates in comparison to mares bred during subsequent cycles. Barren mares bred during the 1st estrus cycle showed higher embryo loss rate than barren mares bred during other cycles. Grade of uterine edema and presence of IUF during estrus did not differ in barren and maiden mares bred either in the 1st, or in other cycles. It was concluded that: (a) during the breeding the fertility of non-lactating mares is lower in the 1st than in other estrus cycles season; (b) that a higher

embryo loss rate may be expected in barren mares bred in the 1st than in other estrus cycles of the breeding season and (c) that the lower fertility rate observed during the 1st estrus cycle is not related to the incidence of post-breeding endometritis.

Key-words: mare, pregnancy, embryo loss, estrus cycles

Introdução

A égua apresenta poliestria estacional, com um período de inatividade ovariana, denominado anestro, durante os meses de inverno. Entre este período e a temporada de atividade cíclica, ocorre um período conhecido como fase transicional. Esta fase é caracterizada por um período longo de cio, no qual, devido a uma quantidade insuficiente de Hormônio Luteinizante (LH), ocorre o crescimento e atresia de vários folículos, antes que ocorra a 1^a ovulação (GINTHER, 1992). Em consequência deste crescimento folicular irregular, ocorre um longo período de cio, no qual a égua pode ser coberta por um número de vezes maior do que em ciclos regulares (ROSER et al.,1997). Fatores ambientais, em especial o aumento do fotoperíodo, são responsáveis pelo aumento da frequência e amplitude dos pulsos de GnRH, induzindo a um aumento nos níveis circulantes de LH. Por outro lado, situações ambientais estressantes são capazes de reduzir os níveis de LH, através da inibição causada pela liberação de opióides endógenos (IRVINE & ALEXANDER, 1994).

A onda de LH, o hormônio responsável pela maturação final do folículo, a ovulação e a formação e manutenção do corpo lúteo (IRVINE & ALEXANDER, 1994) apresenta uma magnitude menor na 1^a ovulação do ano, se comparada às ovulações subseqüentes, sugerindo que o eixo hipotálamo hipófise, no que diz respeito ao LH, não está completamente livre da inibição gerada por fatores ambientais, como a pouca luminosidade, quando ocorre a 1^a ovulação (GINTHER, 1992). Uma forte correlação positiva entre as concentrações de LH e de Progesterona, entre os dias 5 e 28 da gestação foi demonstrada (NETT et al, 1979), o que reforça a importância desta gonadotropina na formação e manutenção do corpo lúteo. O aumento inicial de LH é também responsável pela secreção de estradiol pelo folículo (IRVINE & ALEXANDER, 1994).

Com base no grau de edema uterino, avaliado por ultra-sonografia, Hayes et al. (1985) sugeriram que a concentração média de estrógeno é menor durante o cio

que antecede a 1ª ovulação, em comparação às ovulações subseqüentes. Os efeitos do estrógeno sobre os mecanismos de defesa são bem conhecidos (HUGHES & LOY, 1975; EVANS et al., 1987), e um período longo de cio antes da primeira cobertura poderia favorecer a eliminação de fluido acumulado durante o período de baixo nível de esteróides e de pouco tônus uterino característicos do anestro invernal, especialmente em éguas mais velhas (IRVINE, 1994).

Com base nas diferenças dos níveis hormonais, relatadas na literatura, poderia-se esperar um efeito do período ovulatório sobre a fertilidade e sobre a susceptibilidade à endometrite pós-cobertura. O objetivo deste experimento foi comparar as taxas de prenhez e morte embrionária de éguas cobertas na 1ª ovulação da temporada reprodutiva com aquela das éguas cobertas em ovulações subseqüentes.

Material e métodos

O grupo de estudo foi composto por 324 éguas PSC não lactantes, sendo 179 éguas falhadas, com idade entre 4 e 24 anos e 145 éguas virgens, com idade entre 3 e 9 anos. Os animais foram mantidos em regime semi-intensivo, em boxes individuais durante a noite e soltas em pastagem durante o dia, numa central de garanhões na região sul do Brasil. Todas as éguas foram submetidas a um fotoperíodo artificial de 15 horas de luz / 9 horas de escuridão, a partir de 15 de maio ou desde a chegada ao estabelecimento.

A partir de 15 de julho, as éguas foram submetidas a exames regulares, a fim de determinar o estágio do ciclo estral. De acordo com os achados as éguas foram classificadas em 2 grupos:

G1 – 1ª Ovulação: As éguas foram incluídas neste grupo quando apresentavam útero com pouco tônus, ovários de pequeno tamanho, ou com atividade folicular irregular, sem evidência de um folículo pré-ovulatório e, especialmente, sem evidência de um corpo lúteo à ultra-sonografia.

G2 – ≥2ª ovulação: As éguas em que um corpo lúteo foi identificado em um dos exames realizados antes do início de agosto, receberam Prostaglandina⁵ no mínimo 5 dias após a sua identificação, a fim de induzir um novo cio.

Uma vez em cio, a partir de 1º de agosto, as éguas foram examinadas por palpação retal e ultra-sonografia do aparelho reprodutivo, a intervalos máximos de 48 horas, avaliando-se, em cada exame, além do crescimento folicular, o grau de edema uterino e a presença ou não de líquido na luz uterina (IUF). O grau de edema foi classificado numa escala de 1 (sem evidência de edema – característico de diestro) até 3 (edema uterino intenso - característico de estro) As éguas foram cobertas quando um folículo pré-ovulatório (>40mm) foi detectado, associado a uma redução do grau de edema uterino. Um novo exame era realizado 48 horas após a cobertura, a fim de confirmar a ovulação. Caso não fosse diagnosticada a ovulação, uma nova cobertura era realizada. Quando diagnosticada a presença de líquido na luz uterina 36-48 horas após a cobertura, as éguas eram tratadas com uma seqüência de no mínimo 3 lavagens uterinas (2 litros cada), seguido da infusão uterina de antibióticos (5000000 UI de Penicilina Potássica⁶ ou 1,6 g de Gentamicina⁷). As éguas que apresentaram fluido uterino no 3º dia após a ovulação, apesar do tratamento realizado, foram retiradas do experimento.

Foram utilizados 12 garanhões PSC de fertilidade comprovada. O diagnóstico de gestação foi realizado a partir do 12º dia após a ovulação, através de um aparelho de ultra-som de modo B, tempo real, com transdutor linear de 5 Mhz⁸. Detectada a presença de uma vesícula embrionária, era estabelecido um controle, no mínimo semanal, até os 45 dias de gestação. As gestações gemelares foram reduzidas manualmente até o 16º dia após a ovulação. Foram consideradas como morte embrionária perdas gestacionais ocorridas entre o primeiro diagnóstico positivo e os 42 dias após a ovulação.

Foi considerado como “Período de Adaptação” o intervalo entre o dia 1º de janeiro, ou o dia da entrada ao estabelecimento, e o dia do diagnóstico de ovulação do primeiro ciclo de cobertura. O intervalo de dias entre o início da temporada de

⁵ Lutalyse -

⁶ Aricilina- Ariston Indústria Química e Farmacêutica Ltda, Brazil

⁷ Gentaflex- Eurofarma Laboratórios, Ltda, Brazil

⁸ Aloka SS-210DX – Aloka Inc., Japão

coberturas (1º de agosto) e a data da ovulação do primeiro ciclo foi denominado “Período Inicial”.

As taxas de prenhez e morte embrionária foram comparadas através do Teste do Chi-Quadrado. Os resultados foram comparados através de análise de variância, tendo como variável dependente, a taxa de prenhez aos 14 e aos 42 dias e como variáveis não dependentes a idade, período de adaptação, período inicial, número de saltos por cio e o número de ciclos por prenhez. O software MULTIV 2000 (PILLAR, 2000) foi utilizado, sendo considerado um $P > 0,05$ como significativo.

Resultados

As taxas de prenhez e morte embrionária de éguas virgens e falhadas, cobertas na 1ª e $\geq 2^a$ ovulação da temporada reprodutiva, estão apresentadas nas tabelas 1 e 2:

Tabela 1: Taxas de prenhez e morte embrionária (M.E.) em éguas PSC virgens de acordo com a ovulação

Grupo	n	Prenhez 12 dias		Prenhez 42 dias		M.E.
		n	%	n	%	%
G1 – 1ª ovulação	69	44	63,7 ^a	40	57,9 ^c	9,1 ^e
G2 – $\geq 2^a$ ovulação	76	61	80,3 ^b	58	76,3 ^d	4,9 ^e

Letras diferentes (a, b) nas colunas indicam diferença significativa ($\chi^2 = 4,93$; $P = 0,03$)

Letras diferentes (c, d) nas colunas indicam diferença significativa ($\chi^2 = 5,55$; $P = 0,02$)

Letras iguais (e) nas colunas indicam não haver diferença significativa ($\chi^2 = 0,82$; $P = 0,36$)

Tabela 2: Taxas de prenhez e morte embrionária (M.E.) em éguas PSC falhadas de acordo com a ovulação

Grupo	n	Prenhez 12 dias		Prenhez 42 dias		M.E.
		n	%	n	%	%
G1 – 1ª ovulação	77	44	57,1 ^a	35	45,4 ^c	20,4 ^e
G2 – $\geq 2^a$ ovulação	102	75	73,5 ^b	69	67,6 ^d	8,0 ^f

Letras diferentes (a, b) nas colunas indicam diferença significativa ($\chi^2 = 5,28$; $P = 0,02$)

Letras diferentes (c, d) nas colunas indicam diferença significativa ($\chi^2 = 8,88$; $P = 0,01$)

Letras diferentes (e, f) nas colunas indicam diferença significativa ($\chi^2 = 3,90$; $P = 0,05$)

Conforme está demonstrado nas tabelas 1 e 2, uma taxa de prenhez significativamente menor foi observada nas éguas virgens e falhadas cobertas na 1ª

ovulação da temporada em comparação àquelas cobertas somente a partir da 2ª ovulação, tanto aos 14 como aos 42 dias. Além disso, uma maior taxa de morte embrionária ($P = 0,05$) foi observada entre as éguas falhadas cobertas na 1ª ovulação (20,4%) em comparação à de éguas cobertas nas ovulações subseqüentes (8%). Nas éguas virgens, não foi observada diferença significativa na taxa de morte embrionária dos dois grupos ($G1 = 9,1\%$; $G2 = 4,9\%$).

Na tabela 3, estão apresentadas as médias de idade, saltos por cio, ciclos por prenhez, período de adaptação.

Tabela 3: Médias de idade, ciclos por prenhez, saltos por cio e período de adaptação de éguas virgens e falhadas, de acordo com a ovulação.

Médias	Virgens		Falhadas	
	1ª ovulação	2ª ovulação	1ª ovulação	2ª ovulação
Idade (anos)	4,7 ^a	4,9 ^a	11,2 ^b	10,9 ^b
Período de adaptação (dias)	40,3 ^c	64,1 ^d	54,8 ^e	94,1 ^f
Intervalo 27 de julho/ovulação (dias)	24,3 ^g	23,6 ^g	28,8 ^h	20,6 ⁱ
Saltos/cio	1,5 ^j	1,3 ^j	1,9 ^k	1,3 ^l
Ciclos/prenhez	1,5 ^m	1,4 ⁿ	2,0 ^o	1,6 ^p

Letras iguais (a, b) na linha, indicam não haver diferença significativa ($p=0,47$; $P = 0,59$, respectivamente)

Letras diferentes (c, d) na linha, indicam diferença significativa ($P = 0,01$)

Letras diferentes (e, f) na linha, indicam diferença significativa ($P = 0,01$)

Letras iguais (g) na linha, indicam não haver diferença significativa ($P = 0,74$)

Letras diferentes (h, i) na linha, indicam diferença significativa ($P = 0,01$)

Letras iguais (j) na linha, indicam não haver diferença significativa ($P = 0,18$)

Letras diferentes (k, l) na linha, indicam diferença significativa ($P = 0,01$)

Letras diferentes (m, n) na linha, indicam diferença significativa ($P = 0,05$)

Letras diferentes (o, p) na linha indicam diferença significativa ($P = 0,01$)

Não houve diferença entre as médias de idade das éguas virgens e vazias do ano anterior cobertas no primeiro ciclo da temporada em comparação àquelas cobertas a partir da 2ª ovulação ($P > 0,05$). Éguas virgens cobertas na 2ª ovulação tiveram um número de ciclos/prenhez significativamente menor ($P = 0,05$) do que aquelas cobertas em sua primeira ovulação. Também entre as éguas falhadas, o

número de ciclos por prenhez foi menor ($P = 0,01$) nas éguas cobertas a partir da 2ª ovulação. Éguas virgens e falhadas cobertas a partir do 2º ciclo da temporada tiveram um período de adaptação mais longo. O intervalo médio entre o início da temporada e a cobertura foi mais curto nas éguas falhadas cobertas do 2º ciclo em diante ($P = 0,01$).

O grau de edema uterino durante o cio, nas diferentes ovulações, de éguas virgens e falhadas está demonstrado nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Grau de edema uterino no primeiro ciclo de coberturas em éguas PSC virgens, de acordo com a ovulação.

Grupo	n	Edema 1,5 - 2		Edema 2,5 - 3	
		n	%	n	%
G1 - 1ª ovulação	33	14	42,4 ^a	19	57,6 ^a
G2 - ≥2ª ovulação	37	21	56,7 ^a	16	43,3 ^a

Letras iguais (a) nas colunas indicam não haver diferença significativa ($\chi^2 = 1,432$; $P = 0,23$)

Tabela 5: Grau de edema uterino no primeiro ciclo de coberturas em éguas PSC falhadas, de acordo com a ovulação.

Grupo	n	Edema 1,5 - 2		Edema 2,5 - 3	
		n	%	n	%
G1 - 1ª ovulação	40	16	40 ^a	24	60 ^a
G2 - ≥2ª ovulação	29	8	27,6 ^a	21	72,4 ^a

Letras iguais (a) nas colunas indicam não haver diferença significativa ($\chi^2 = 1,15$; $P = 0,28$)

Com relação ao grau máximo de edema uterino durante o cio, não foram observadas diferenças significativas entre éguas cobertas no 1º ciclo ou no 2º ciclo em diante, tanto nas éguas virgens ($P = 0,23$), quanto nas éguas falhadas ($P = 0,28$).

Nas tabelas 6 e 7 está apresentada a freqüência de aparecimento de líquido intra-uterino durante o cio e 36-48 horas após a última cobertura do ciclo, em éguas virgens e falhadas, cobertas na 1ª ovulação da temporada e naquelas cobertas somente a partir da 2ª ovulação.

Tabela 6: Frequência de aparecimento de líquido intra-uterino em éguas PSC virgens, de acordo com a ovulação

Grupo	n	Líquido cio		Líquido 36 – 48 h pós-cobertura	
		n	%	n	%
G1 - 1 ^a ovulação	33	4	12,1 ^a	6	18,2 ^b
G2 – ≥2 ^a ovulação	37	4	10,8 ^a	10	27 ^b

Letras iguais (a) nas colunas indicam não haver diferença significativa ($\chi^2 = 0,03$; $P = 0,98$)

Letras iguais (b) nas colunas indicam não haver diferença significativa ($\chi^2 = 0,771$; $P = 0,68$)

Tabela 7: Frequência de aparecimento de líquido intra-uterino em éguas PSC falhadas, de acordo com a ovulação.

Grupo	n	Líquido cio		Líquido 36 – 48 h pós-cobertura	
		n	%	n	%
G1 - 1 ^a ovulação	40	7	17,5 ^a	11	27,5 ^b
G2 – ≥2 ^a ovulação	29	11	37,9 ^a	15	51,7 ^c

Letras iguais (a) nas colunas indicam não haver diferença significativa ($\chi^2 = 3,631$; $P = 0,06$)

Letras (b,c) nas colunas indicam diferença significativa ($\chi^2 = 4,193$; $P = 0,04$)

Uma maior incidência ($p=0,04$) de LIU foi encontrada 36-48 horas após a cobertura em éguas falhadas cobertas na 2^a ovulação (51,7%) em comparação com as éguas cobertas na 1^a ovulação (27,5%). O mesmo não ocorreu em éguas virgens, entre as quais nenhuma diferença foi observada ($P = 0,68$) quanto à presença de LIU após a cobertura (G1: 18,2% vs G2: 27,0%). A presença de LIU durante o estro também não foi diferente entre as éguas dos dois grupos.

Não foi observada diferença significativa ($P = 0,28$) na proporção de éguas que apresentaram grau de edema máximo 2,5 – 3 em função da ovulação. Por outro lado, foi observada uma tendência ($P = 0,06$) a maior número de éguas cobertas em sua 2^a ovulação (37,9%) apresentarem acúmulo de fluido uterino no útero durante o cio, em comparação às éguas cobertas na 1^a ovulação (17,5%). Diferença

significativa foi observada em relação ao exame realizado 36 –48 horas pós-cobertura. As éguas apresentaram maior frequência de acúmulo de fluido uterino.

Discussão

A taxa de prenhez das éguas virgens cobertas na 1ª ovulação da temporada foi significativamente menor (63,7%) do que a das éguas cobertas a partir da 2ª ovulação (80,3%). As taxas observadas neste estudo foram similares àquelas apresentadas por Mattos et al. (1997 e 1999). Porém, nenhuma diferença foi observada nas taxas de morte embrionária entre os dois grupos de éguas. As taxas de morte embrionária estão de acordo com as apresentadas por Ginther (1992).

A baixa fertilidade observada no 1º ciclo da temporada pode ser atribuído a menores níveis de LH, o que pode ser devido à estação do ano ou à alterações ambientais. Os níveis de LH são menores no 1º do que nos demais ciclos da temporada (GINTHER, 1992), sugerindo que, no momento da 1ª ovulação, os efeitos do aumento do fotoperíodo ainda não atingiram o seu máximo e que o eixo hipotálamo-hipófise não está totalmente livre da inibição provocada pela glândula pineal. Este fato pode ser confirmado pelo menor número de dias de fotoperíodo artificial a que foram submetidas as éguas cobertas no 1º ciclo da temporada (44,2) em comparação às éguas cobertas no 2ª ovulação ou em ciclos subsequentes (64,1).

As éguas incluídas neste estudo foram mantidas em um estabelecimento comercial, sendo expostas à alterações ambientais, como clima adverso, necessidade de se re-adaptarem à vida em grupo a à hierarquia. Todos estes fatores são potencialmente capazes de influenciar a síntese de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e, conseqüentemente, o nível de LH, através da inibição gerada pelas β -endorfina (IRVINE & ALEXANDER, 1994). Éguas cobertas no 2º ciclo da temporada, ou mais tarde, podem ter sido beneficiadas por um período mais longo de adaptação ambiental em comparação àquelas cobertas no 1ª ciclo.

Nas éguas falhadas, foi observada uma diferença significativa na taxa de prenhez entre as éguas cobertas na 1ª (57,1%) e na 2ª (73,5%) ovulação da temporada. Além disso, uma maior taxa de morte embrionária ($p=0,048$) foi observada nas éguas cobertas na 1ª ovulação (20,4%) em relação à das éguas cobertas somente a partir da 2ª ovulação (8%).

Nesta categoria de éguas, encontra-se uma grande proporção de éguas sub-férteis, com idade avançada e histórico de endometrite, de forma que as perdas embrionárias, no período anterior à realização do diagnóstico de gestação, , poderiam estar associadas a patologia uterina e do oviduto (BALL et al., 1989; GINTHER, 1992).

Apesar da maior incidência endometrite persistente pós-cobertura (acúmulo de líquido 36 – 48 horas após a cobertura) observada nas éguas cobertas na 2ª ovulação, a taxa de morte embrionária foi maior nas éguas cobertas no 1º estro da temporada. Este resultado sugere que casos de endometrite persistente pós-cobertura provavelmente sejam mais relacionados às condições individuais do que ao ciclo de cobertura. Por outro lado, o melhor resultado de prenhez e a menor taxa de morte embrionária nas éguas cobertas a partir da 2ª ovulação, apesar da maior frequência de acúmulo de fluido uterino após a cobertura, podem refletir uma maior capacidade de responder a tratamentos pós-cobertura nestes ciclos em comparação ao 1º ciclo (1ª ovulação). Isto possivelmente se deva à injeção de ocitocina, que promove a secreção de $PgF_{2\alpha}$ pelo endométrio (NIKOLAKOPOULUS et al, 2000). Aparentemente, um “priming” de progesterona é necessário para a secreção de prostaglandina pelo endométrio (GINTHER, 1992). Um período de alta concentração de progesterona, que seria permitido às éguas cobertas somente a partir da 2ª ovulação, poderia ser benéfico a este mecanismo.

As éguas falhadas também foram expostas a condições ambientais que poderiam reduzir a atividade reprodutiva e apresentaram um período de adaptação mais curto. Portanto, a hipótese de que os resultados obtidos para as éguas cobertas na 1ª ovulação sejam devidos à quantidade reduzida de LH parece se aplicar a este grupo de éguas.

Não foi observada diferença significativa na proporção de éguas virgens e falhadas que apresentaram grau de edema máximo ou intermediário na 1ª e 2ª ovulações. Este resultado difere das observações de Hayes et al. (1985), que observaram um menor número de éguas apresentando grau máximo e intermediário de edema durante a 1ª ovulação. Uma correlação positiva entre o grau de edema e o acúmulo de fluido uterino foi observada por Reilas et al. (1997). A razão da não observação de diferença no grau de edema entre as ovulações não pode ser explicada com base nos resultados obtidos.

Apesar do maior período de adaptação, as éguas cobertas na 2ª ovulação apresentaram uma tendência a serem cobertas mais cedo dentro da temporada. Provavelmente, isto se deva ao momento em que o fotoperíodo artificial foi iniciado (15 de maio). Foi demonstrado que éguas submetidas a fotoperíodo artificial de 14,5 a 16h de luz por dia ovulam em média até 70 dias após o início da estimulação (PALMER & GUILLAUME, 1989). Iniciar o fotoperíodo em maio permite que a primeira ovulação ocorra antes do início da temporada oficial de coberturas, podendo-se utilizar 2ª ovulação, com melhores resultados de prenhez.

Pode-se concluir que: 1) A fertilidade da 1ª ovulação de éguas não lactantes é menor do que aquela de ovulações subseqüentes; 2) Uma maior taxa de morte embrionária pode ser esperada em éguas fálhadas cobertas na 1ª ovulação da temporada e 3) A menor fertilidade da 1ª ovulação não está relacionada com a incidência de endometrite persistente pós-cobertura.

3.3. Artigo 3

Perfil Protéico da Secreção Uterina de Éguas no Primeiro e em Diestro Subseqüentes da Temporada Reprodutiva⁹

Eduardo Malschitzky^{1,2, 10}, Sandra M.E. Fiala³, Ana Maria T. Esmeraldino², Maria Inês M. Jobim⁴, Ricardo Macedo Gregory^{1,5} e Rodrigo Costa Mattos^{1,5}

1 – Reprolab, Faculdade de Veterinária, UFRGS

2 – Curso de Medicina Veterinária, ULBRA

3 – Instituto de Biologia, UFPel

4 – Laboratório de Inseminação Artificial, Faculdade de Veterinária, UFRGS

5 – Pesquisador do CNPq

Resumo

O objetivo deste estudo foi comparar o perfil protéico da secreção endometrial e a expressão de receptores para esteróides ovarianos no endométrio de éguas em diestro após a 1ª ovulação e após a 2ª ovulação da temporada. Em um grupo de éguas enviadas para abate, foi colocado um tampão vaginal intra-uterinamente para coleta da secreção uterina. Imediatamente após o abate, o útero foi removido sendo o tampão retirado e uma amostra de endométrio coletada para exame imunohistiquímico. As éguas foram divididas em 2 grupos: G1 – 1ª ovulação: éguas nas quais se observou a presença de um único corpo lúteo, sem evidência de corpo albicans recente (n=6) e G2 éguas nas quais se identificou, além do corpo lúteo ou corpo hemorrágico, a presença de pelo menos um corpo albicans recente (n=7). Para efeito de comparação da expressão de receptores hormonais, também foram coletadas amostras de endométrio de 17 éguas na fase transicional. A secreção uterina obtida foi processada e submetida à eletroforese bi-dimensional. Foram identificadas 30 bandas protéicas nas amostras. O ciclo da temporada reprodutiva influenciou o perfil protéico da secreção uterina. Uma maior densidade óptica relativa foi observada em cinco bandas protéicas nas éguas coletadas no 1º diestro da temporada em comparação àquelas coletadas a partir da 2º diestro. Foram observadas diferenças significativas na expressão dos receptores para progesterona e estrógeno entre as

⁹ Projeto financiado pelo CNPq/FAPERGS⁹

¹⁰ Autor para correspondência. E-mail: emalschitzky@ibest.com.br

éguas G2 e aquelas em fase transicional. Conclui-se que o ambiente uterino é diferente no primeiro diestro da temporada reprodutiva, comparado aos ciclos subsequentes.

Palavras-Chave: Éguas, diestro, perfil protéico, eletroforese.

Abstract

Uterine protein profile in mares in the first or in subsequent diestrous in the breeding season

The aim of this study was to compare the protein profile of endometrial secretions and the steroid hormone receptor expression of the uterus from diestrous mares in the first, or in other estrus cycles during the breeding season. Experimental subjects were mares in selected from a population of horses sent to slaughter in an abattoir. Endometrial secretion were collected using a regular vaginal tampon placed intrauterine. Immediately after the slaughter the tampon was removed and an endometrial sample was collected, processed and evaluated by immunohistochemistry. Mares were divided in two groups: G1 – first ovulation: mares with the presence of a corpus luteum without the evidence of a corpus albicans (n = 6) and G2 mares with the presence of a corpus luteum or corpus hemorrhagicum and the presence of at least one recent corpus albicans (n = 7). To compare the steroid hormone receptor expression endometrial samples from 17 mares in transitional phase were collected. Endometrial secretions was processed and submitted to 2D-PAGE. Thirty protein spots were identified in the samples. A higher relative protein content was observed in five spots from G1 when compared with G2. A significant difference in the steroid hormone receptor expression was detected between mares from G2 and mares in transitional phase. In conclusion, the uterine environment in the first diestrous of the breeding season is different in relation of the other diestrous.

Key-words: mares, diestrous, protein profile, electrophoresis.

Introdução

A égua apresenta poliestria estacional, com um período de inatividade ovariana, denominado anestro, durante os meses de inverno. Entre este período e a temporada de atividade cíclica, ocorre um período conhecido como fase transicional. Esta fase é caracterizada por um período longo de cio, no qual, devido a uma quantidade insuficiente de Hormônio Luteinizante (LH), ocorre o crescimento e atresia de vários folículos, antes que ocorra a 1ª ovulação (GINTHER, 1992).

A onda de LH, o hormônio responsável pela maturação final do folículo, a ovulação e a formação e manutenção do corpo lúteo (IRVINE & ALEXANDER, 1994) apresenta uma magnitude menor na 1ª ovulação da temporada reprodutiva, se comparada às ovulações subseqüentes. Isto sugere que o eixo hipotálamo hipófise, em relação ao LH, não está completamente livre da inibição gerada por fatores ambientais quando, ocorre a 1ª ovulação (GINTHER, 1992). Entre os dias 5 e 28 da gestação, foi demonstrada uma forte correlação positiva entre as concentrações de LH e de Progesterona (NETT et al, 1979), o que reforça a importância desta gonadotropina na formação e manutenção do corpo lúteo. O aumento inicial de LH é também responsável pela secreção de estradiol pelo folículo (IRVINE & ALEXANDER, 1994).

Os folículos da fase transicional apresentam uma menor capacidade de produção de hormônios esteróides quando comparados aos folículos do 2º ou 3º ciclos da temporada, possivelmente como conseqüência da menor expressão de receptores foliculares para LH e da menor concentração de LH circulante no início da temporada reprodutiva. (WATSON et al., 2003). Da mesma forma, e baseado no grau de edema uterino, avaliado por ultra-sonografia, Hayes et al. (1985) sugeriram que a concentração média de estrógeno é menor durante o cio que antecede a 1ª ovulação, em comparação às ovulações subseqüentes. Os efeitos do estrógeno sobre os mecanismos de defesa uterina são bem conhecidos (HUGHES & LOY, 1975; EVANS et al., 1987), e um período longo de cio antes da primeira cobertura poderia favorecer a eliminação de fluido acumulado durante o período de baixo nível de esteróides e de pouco tônus uterino, característicos do anestro invernal, especialmente em éguas mais velhas (IRVINE, 1994). Além disso, um estímulo inicial de progesterona (*priming*) parece ser necessário para a secreção de prostaglandina pelo endométrio (GINTHER, 1992). A falta de uma exposição prévia à alta concentração

de progesterona na 1ª ovulação da temporada, poderia reduzir a resposta miometrial à ocitocina, a qual é mediada pela secreção de $\text{PgF}_{2\alpha}$ pelo endométrio (NIKOLAKOPOULOS et al, 2000), aumentando a predisposição à endometrite persistente pós-cobertura neste momento.

Em um estudo com 324 éguas não lactantes de um rebanho comercial, Malschitzky et al. (2003) observaram que a taxa de prenhez das éguas virgens e falhadas, cobertas na 1ª ovulação da temporada (63,7% e 57,1%, respectivamente) foi significativamente menor do que a das éguas cobertas a partir da 2ª ovulação (virgens: 80,3%; falhadas: 73,5%). Nas éguas falhadas, uma maior taxa de morte embrionária foi observada nas éguas cobertas na 1ª ovulação (20,4%) em relação à das éguas cobertas somente a partir da 2ª ovulação (8%). Não foram observados efeitos negativos do número de saltos por cio, nem da incidência de endometrite persistente pós-cobertura, sendo a menor fertilidade atribuída a um menor nível de LH, resultando em falha na formação e manutenção do corpo lúteo na 1ª ovulação e, portanto, numa menor concentração de progesterona no 1º diestro da temporada reprodutiva.

Kenney & Doig (1986), observam que a exemplo do que ocorre nos ovários, também o endométrio apresenta um período de transição. Além disso, durante o anestro invernal e a fase de transição, a expressão dos receptores para hormônios sexuais é muito variável, não havendo sincronia entre a expressão nas células do estroma e do epitélio glandular. Não foi observado um padrão típico de expressão desses hormônios nesta fase (AUPPERLE et al., 2003).

Foram observadas 17 bandas protéicas na secreção endometrial de éguas ovariectomizadas suplementadas com progesterona ou uma combinação de progesterona e 17β -Estradiol (ZAVY et al., 1982). As mesmas bandas também foram observadas no dia 12 do diestro em éguas cíclicas e em éguas prenhes, demonstrando a influência da progesterona sobre a composição protéica da secreção uterina. Diferenças significativas na densidade óptica relativa de 18 bandas protéicas foram observadas entre amostras da secreção endometrial de éguas em estro e diestro (MALSCHITZKY et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi comparar o perfil protéico da secreção endometrial e a expressão de receptores para esteróides ovarianos no endométrio de éguas em

diestro após a 1ª ovulação da temporada reprodutiva, com éguas em diestro após a 2ª ovulação, ou subseqüentes. A hipótese é que as diferenças relatadas nos níveis de LH entre os dois ciclos e a existência de um período de transição no endométrio provocam modificações na composição protéica do ambiente uterino, que poderiam explicar a menor fertilidade das éguas cobertas na 1ª ovulação.

Material e métodos

Animais e Coleta das amostras

Foram utilizadas éguas de uma população de eqüinos enviados para abate, em um frigorífico localizado no paralelo 32° Sul, em Pelotas, RS, nos meses de agosto de 2005 e fevereiro de 2006. Em um grupo de éguas, foi colocado intra-uterinamente um tampão vaginal (OB[®] - Johnson & Jonhson) pela técnica descrita por Reilas et al. (1997). Imediatamente após o abate, realizado de forma humanitária, o útero foi removido sendo o tampão retirado. O útero foi aberto com auxílio de uma tesoura, sendo feita a coleta de uma amostra de endométrio para exame imunohistiquímico, na porção dorsal da bifurcação uterina. O grau de edema uterino foi avaliado pelo aspecto macroscópico do endométrio, e classificado em uma escala de 1 (edema pouco pronunciado) até 3 (edema pronunciado). Os ovários foram medidos com auxílio de um paquímetro e seccionados transversalmente, para a avaliação e medição das estruturas (foliculos, corpo lúteo, corpo hemorrágico e corpo albicans). As éguas foram diagnosticadas como estando em diestro com base na presença de corpo lúteo, ou corpo hemorrágico nos ovários, pela identificação de um colo uterino contraído e sem hiperemia e pela presença de edema pouco pronunciado.

De acordo com a época do ano em que foram realizadas as coletas e com os achados macroscópicos, as éguas foram divididas em 2 grupos:

G1 – 1ª ovulação: éguas coletadas entre os meses de agosto e novembro, nas quais se observou a presença de um único corpo lúteo, sem evidência de corpo albicans recente (n=6).

G2- ≥2 ovulação: éguas coletadas entre setembro e fevereiro, nas quais se identificou, além do corpo lúteo ou corpo hemorrágico, a presença de pelo menos um corpo albicans recente (n=7).

Para efeito de comparação da expressão de receptores hormonais, também foram coletadas amostras de endométrio na região dorsal da bifurcação uterina de 17

éguas em fase transicional, com base na ausência de um corpo lúteo, ou corpo albicans, associado à presença de vários folículos no ovário, sendo o diâmetro de pelo menos um deles superior a 23 mm. Foi considerada também a época do ano em que estas amostras foram coletadas para a classificação. Todas as amostras foram coletadas no período entre 15 de setembro e 5 de outubro.

Exame Imunohistoquímico

As amostras de endométrio foram mantidas em formalina tamponada a 4% desde o momento da coleta até o seu processamento. Para a imunohistoquímica, foi utilizada a técnica da peroxidase-antiperoxidase (P.A.P), sendo utilizados como anticorpos primários anticorpos de camundongo contra receptores de estrógeno e progesterona humanos (Novacastra Laboratories, New Castle, UK). Foram avaliadas 3 regiões de cada amostra, sendo estas o estroma, o epitélio luminal e o ducto glandular e a porção basal das glândulas. A intensidade de expressão dos receptores foi classificada numa escala de 0 (ausência de coloração) até 3 (coloração muito forte) adaptada da descrita por Özgen et al. (1997).

Processamento das amostras da secreção endometrial

Após sua retirada, o tampão foi colocado em uma seringa de 20 mL e comprimido com o auxílio do êmbolo para retirada da secreção absorvida. Uma alíquota de 2,0 mL da secreção foi colocada em um tubo estéril de 10 mL e imediatamente centrifugada a 1500 x g por 15 minutos, sendo o sobrenadante transferido para criotubo e armazenado em nitrogênio líquido.

Técnica de eletroforese

As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 10000 x g por 60 minutos a 4 °C e uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi armazenada em criotubos a -80 °C. A proteína total das amostras foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão albumina sérica bovina (1 mg/mL). A eletroforese bidimensional foi realizada pelo método de O'Farrel (1977) modificado por Rodnigh et al (1988), a qual é constituída de duas etapas de separação protéica.

A solução utilizada para a separação em primeira dimensão continha 9 M de uréia, 12,5 mM lisina, 7 mM SDS, 4% (v/v) Igepal e 2% (v/v) 2-mercaptoetanol. A

primeira dimensão constituía-se de eletroforese não equilibrada em gel tubular de poliacrilamida a 3,5% (LENZ et al., 1997) com gradiente de pH de 2 a 10. Uma quantidade de 100 µg de proteína foi aplicada em cada tubo e foi utilizado o Citocromo C (Sigma) como marcador de frente de corrida. Foi utilizada uma fonte EPS 3501 (Amersham, Pharmacia) com voltagem máxima de 800 V, amperagem máxima de 10 mA e potência de 0,125 W por tubo. A corrida era interrompida quando a banda de Citocromo C (visível) atingia 8 cm de migração. Os tubos capilares eram retirados da cuba, identificados e mantidos à -20°C, até o momento da transferência para a segunda dimensão.

Para a segunda dimensão foi utilizada eletroforese em placas de gel (SDS-PAGE), com 12% de acrilamida, com sistema de tampão descontínuo, que separa as proteínas pelo seu peso molecular.

Para a coloração, os géis eram mantidos em uma solução de 0,15% Comassie Brilliant Blue R-250 (Amersham, Pharmacia), 53% de metanol e 7% de ácido acético por aproximadamente 12 horas. A fim de evidenciar as bandas, os géis eram descorados através de uma solução de 50% de metanol, 7% de ácido acético e água, por cerca de 6 horas. A seguir, os géis eram imersos em solução de secagem (50% de metanol, 1% de glicerol e água) por 2 horas e, posteriormente, secos entre duas folhas de celofane.

Quantificação das bandas protéicas

Os géis foram escaneados (Hewlet-Packard Scanjet 6100 C) e analisados pelo programa Optiquant Acquisition & Analysis (versão 02.00, Packard Instrument) para determinação da densidade óptica das bandas protéicas, expressas em *pixels*.

A densidade óptica das bandas protéicas é expressa em percentagem relativa, sendo que 100% representam o total de *pixels* de uma área definida, constante para todos os géis, e cada banda protéica correspondendo a uma percentagem do total.

Através do peso molecular e ponto isoelétrico (pI) aproximados, foi avaliada a correspondência das bandas protéicas analisadas a proteínas específicas já identificadas no equino.

Análise estatística

Os dados da densidade óptica relativa das diferentes bandas protéicas das

éguas em diestro foram analisados por ANOVA com significância de 95%, através de um modelo em blocos casualizados. Um mínimo de dois géis de boa qualidade por égua foi analisado, sendo cada gel considerado como uma unidade amostral. O efeito do ciclo foi avaliado com as éguas sendo divididas de acordo com a ovulação que originou o diestro (G1 e G2). A frequência relativa das diferentes bandas protéicas presentes nos géis de éguas do G1 e G2 foi avaliada pelo Qui Quadrado. A expressão dos receptores hormonais foi avaliada pelo teste T de Student.

Resultados

Após a coloração e secagem dos géis, foram identificadas 30 bandas protéicas nas amostras de éguas em diestro (Fig 1), com peso molecular variando entre 15 e 105 kDa e ponto isoelétrico variando entre 4,3 e 10,0. Das 13 éguas estudadas, 6 (14 géis) foram consideradas como estando em seu 1º diestro da temporada (G1) e 7 (19 géis) em seu 2º diestro, no mínimo (G2).

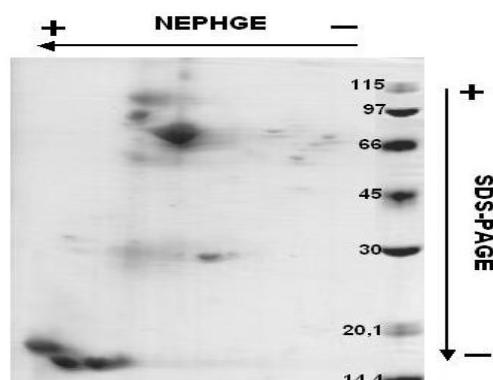


Fig 1. – Perfil eletroforético das proteínas da secreção endometrial da égua. Gel bidimensional SDS-PAGE a 12%, corado com Comassie Blue. A seta superior indica a direção do gradiente de pH não equilibrado (NHPHGE) na 1ª dimensão. Os marcadores de peso molecular com seus respectivos pesos encontram-se à direita.

O ciclo da temporada reprodutiva influenciou o perfil protéico da secreção uterina das éguas em diestro. Das 30 bandas protéicas identificadas, 26 bandas foram observadas em todas as amostras. Em 5 bandas, cujas médias e desvios padrão estão apresentadas na tabela 1, foram observadas diferenças significativas na densidade óptica relativa de proteínas entre as amostras de G1 e G2,

Tabela 1 - Peso molecular, ponto isoelétrico e densidade óptica relativa das proteínas da secreção endometrial de éguas em diestro que apresentaram diferenças nos grupos testados

Banda	Peso Molecular (kDa)	Ponto Isoelétrico	G1	G2	<i>P</i>
			Média ± Desvio Padrão	Média ± Desvio Padrão	
13	26 – 28	8,3 - 8,6	0,49 ± 0,19	0,41 ± 0,16	0,03
15	26 - 27	7,6 – 7,8	0,21 ± 0,06	0,16 ± 0,06	0,04
17	26 - 27	7,3 – 7,6	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04
39	47 - 48	7,3 – 7,5	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05
49	63 - 64	4,6 – 5,2	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,02

Conforme se observa na tabela 1, as bandas 13, 15, 17, 39 e 49 apresentaram uma maior densidade óptica relativa na secreção endometrial das éguas coletadas no 1º diestro da temporada (G1) em comparação àquelas coletadas a partir do 2º diestro (G2).

Baseado no peso molecular e no ponto isoelétrico, as bandas protéicas 13, 39 e 49 correspondem ao Fator de Crescimento Transformador β , ao precursor do componente C9 do sistema complemento e ao receptor tipo II para a Interleucina-1, respectivamente. Nos bancos de informação disponíveis, não foram encontradas proteínas com peso molecular e ponto isoelétrico que se assemelhassem às proteínas 15 e 17.

Não se observaram diferenças significativas na frequência relativa das diferentes bandas protéicas presentes nos géis de éguas do G1 e G2.

Uma expressão significativamente superior dos receptores para estrógeno no estroma foi observada nas éguas do G1 ($P = 0,02$) em comparação às éguas do G2 enquanto que no epitélio luminal e no ducto glandular observou-se apenas uma tendência para a maior expressão nas éguas do G1 ($P = 0,08$). Nenhuma diferença foi observada entre as éguas de G1 e G2, tanto para os receptores de estrógeno nas glândulas endometriais, como para os receptores de progesterona em todas as regiões estudadas ($P > 0,15$).

Na figura 2, estão apresentados os valores médios de expressão dos receptores para estrógeno e progesterona nas éguas do G1 (1ª ovulação) e G2 (2ª ovulação), e em 17 éguas de fase transicional.

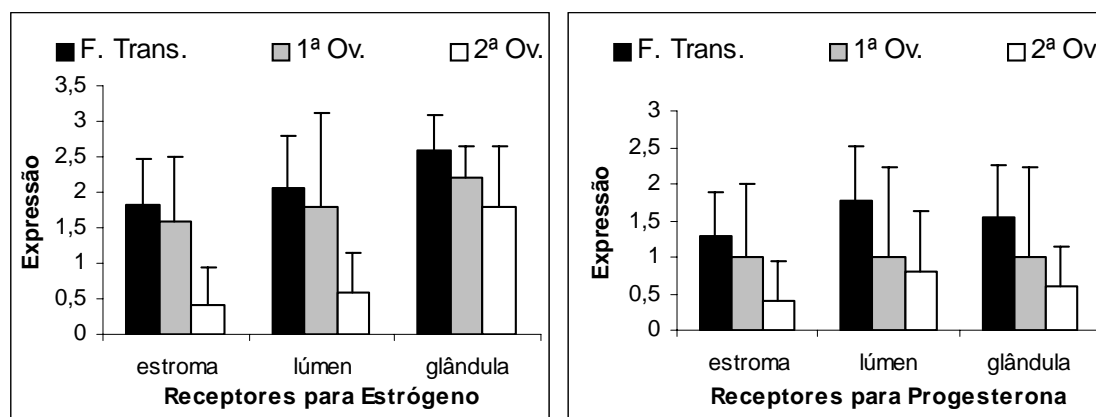


Figura 2 - Expressão de receptores para estrógeno e progesterona no endométrio de éguas em diferentes estágios reprodutivos

Não foram observadas diferenças significativas na expressão de nenhum dos dois receptores e em nenhuma das regiões estudadas entre as éguas do G1 e as éguas em fase transicional ($P > 0,05$). Por outro lado, quando foram comparadas as éguas em seu 2º diestro da temporada reprodutiva (G2) e aquelas em fase transicional, foram observadas diferenças significativas na expressão nas 3 regiões estudadas dos receptores para estrógeno (estroma: $P < 0,01$; lúmen: $P < 0,01$ e glândula $P < 0,01$), bem como para progesterona (estroma: $P < 0,01$; lúmen: $P < 0,03$; glândula: $P < 0,01$).

Discussão

Em éguas virgens e falhadas, foi observada uma menor taxa de prenhez nas éguas cobertas quando apresentaram a 1ª ovulação da temporada reprodutiva fisiológica, comparada à observada nas éguas cobertas a partir da segunda ovulação. Nas éguas falhadas, a taxa de morte embrionária das éguas cobertas ao final da fase transicional foi superior àquela das éguas cobertas a partir o 2º ciclo (MALSCHITZKY et al., 2003).

No presente estudo, foi observado um efeito do ciclo sobre o perfil protéico da secreção endometrial. Na secreção uterina das éguas coletadas no primeiro diestro da temporada reprodutiva, verificou-se uma maior densidade óptica em 5 bandas protéicas. Por correspondência com proteínas identificadas em eqüinos, verificou-se que pelo menos 3 das proteínas, que apresentaram no G1 densidade óptica superior, estão envolvidas em processos inflamatórios.

Nos eqüinos, como em outros mamíferos, o processo inflamatório envolve uma série de mediadores pró-inflamatórios, que são liberados pelos neutrófilos realizando fagocitose, pelas células do endotélio vascular e células teciduais lesadas e, mais tarde, pelos macrófagos ativados pela inflamação. As principais funções desses mediadores são atrair mais células de defesa para ao local da inflamação, facilitar o acesso dessas células e melhorar a eficiência da eliminação do agente agressor. Como a inflamação aguda pode causar sérios danos ao tecido, ela deve ser mantida sob controle. Assim, o mesmo estímulo que induz a liberação dos mediadores pró-inflamatórios, promove o aparecimento de mecanismos e de moléculas, que atuam encerrando o processo inflamatório, tão logo ele deixa de ser necessário (MACKAY, 2000).

Com base no peso molecular e pI aproximado, a banda protéica 49 pode tratar-se de um precursor do componente C9 do sistema complemento, cuja função é dependente da ativação dos componentes C5 e C3b (TIZARD, 1998), que são os dois principais componentes deste sistema no endométrio da égua (TROEDSSON, 1997). O componente C9 é uma proteína pertencente à família das perforinas, que está envolvido na formação de um poro transmembrânico chamado de complexo de ataque de membrana (CAM), resultando na morte da célula alvo (TIZARD, 1998).

Já a banda protéica 39 poderia corresponder ao precursor do receptor tipo II para a Interleucina 1 (IL-1 RII). Esta proteína é encontrada predominantemente em células B e neutrófilos (MANTOVANI et al., 2001) e funciona como um falso receptor para a interleucina 1 (IL-1), não participando na sinalização desta citocina (McMAHAN et al., 1991; SIMS et al., 1993). Uma rápida liberação do IL-1 RII ocorre a partir da exposição das células ao fator de necrose tumoral alfa (FNT- α), fatores de quimiotaxia e metaloproteases (COLOTTA et al., 1995; ORLANDO et al., 1997a; 1997b). A atividade destas moléculas pró-inflamatórias foi demonstrada no

endométrio da égua (FUMOSO et al., 2003; ODDOSDOTTIR et al., 2006). Estudos demonstraram a capacidade desses falsos receptores em bloquear a atividade da IL-1 *in vivo* e *in vitro* (DINARELLO, 1996; 2004; BOURKE et al., 2003). A liberação destes receptores solúveis é associada ao início do processo inflamatório, atuando no controle da severidade da inflamação (MACKAY, 2001).

A proteína 13, por sua vez, possivelmente seja um fator de crescimento transformador. Os fatores de crescimento transformadores, dentre os quais o beta (TGF- β), originam-se das plaquetas, macrófagos ativados e neutrófilos, entre outros. Esta classe de citocina pode ter efeitos tanto inibidores, através da redução da expressão de alguns receptores de interleucinas e do bloqueio de efeitos citotóxicos, como potencializadores da resposta imune, através da quimiotaxia de neutrófilos e monócitos (TIZARD, 1998).

As diferenças na densidade óptica observadas das proteínas no presente trabalho, entre, os ciclos estudados, podem ser explicadas pelos eventos associados ao retorno da égua à fase cíclica. Durante a transição do anestro invernal para a temporada reprodutiva, podem-se observar períodos de destruição celular não inflamatória (ROSZEL & FREEMAN, 1993). Por outro lado, a presença de neutrófilos polimorfonucleados (PMN) em esfregaços endometriais coletados de éguas em anestro e durante a fase transicional é um achado comum (WINGFIELD-DYGBY, 1978), podendo ser considerada uma das situações onde a presença desta célula não indica uma patologia. Em exames citológicos de éguas coletadas no dia da cobertura, muitas das quais no final da fase transicional, a presença de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) foi observada em 25,2% das amostras (MATTOS et al., 1984). Os autores observaram que, enquanto a taxa de prenhez das éguas com resultado negativo, quanto à presença de PMNs, foi de 66,3%, naquelas com citologia positiva, o resultado de prenhez foi significativamente inferior (3,3%).

A intensidade e o local da expressão dos receptores para os hormônios esteróides são regulados pelo nível circulante destes hormônios, sendo estimulada por altas concentrações de estrógeno e inibidas por altos níveis de progesterona (WATSON et al., 1992; AUPPERLE et al., 2000). Durante o diestro, uma alta expressão, tanto para receptores de estrógeno como de progesterona foi observada na região glandular. A partir do 5º dia após a ovulação, quando a progesterona atinge o

seu nível máximo, a expressão destes receptores diminui, até que um novo ciclo se inicie (AUPPERLE et al., 2000). Entre as éguas do G1 e G2, uma diferença foi observada apenas na expressão de receptores para estrógeno nas células do estroma. Por outro lado, enquanto não houve diferença quanto à expressão de receptores entre éguas em fase transicional e as do G1, em todas as regiões do endométrio analisadas, as éguas do G2 apresentaram uma menor expressão dos receptores para estrógeno e progesterona. Embora o intervalo entre a coleta e a ovulação não seja conhecido, pode-se concluir que durante o 1º diestro, o endométrio ainda está numa fase intermediária de resposta aos esteróides ovarianos. Estes achados estão de acordo com o citado por Donadeu & Watson (2007), de que folículos de fase transicional apresentam menor capacidade de produção de estrógeno e progesterona, e isto, poderia ser a causa dessa maior expressão dos receptores hormonais no endométrio. A composição protéica da secreção endometrial é influenciada pelo nível de progesterona (ZAVY et al., 1982). A densidade óptica das bandas protéicas 15 e 17, ainda não identificadas, poderia ter sido influenciada pelas diferenças na expressão dos receptores, ou estarem relacionadas também ao processo inflamatório.

Pelo menos 3, das 5 proteínas que apresentaram densidade óptica superior no 1º diestro, estão envolvidas em processos inflamatórios. É possível, que este ambiente uterino alterado se deva à permanência de um processo inflamatório da fase transicional. Por outro lado, a menor taxa de prenhez observada por Malschitzky et al (2003) em éguas cobertas em seu primeiro ciclo reprodutivo, comparada àquela do 2º ciclo ou subseqüentes, poderia estar associada a uma produção insuficiente de progesterona.

Conclui-se que o ambiente uterino é diferente no primeiro diestro da temporada reprodutiva, comparado aos ciclos subseqüentes. É necessária a identificação precisa das proteínas da secreção endometrial para confirmar a origem inflamatória proposta.

3.4. Artigo 4

Susceptibilidade à Endometrite Persistente Pós- cobertura: o papel da secreção uterina¹¹

Eduardo Malschitzky^{1,2, 12}, Sandra M.E. Fiala³, Ana Maria T. Esmeraldino², Petra Garbade¹, Maria Inês M. Jobim⁴, Ricardo Macedo Gregory^{1,5} e Rodrigo Costa Mattos^{1,5}

1 – Reprolab, Faculdade de Veterinária, UFRGS

2 – Curso de Medicina Veterinária, ULBRA

3 – Instituto de Biologia, UFPel

4 – Laboratório de Inseminação Artificial, Faculdade de Veterinária, UFRGS

5 – Pesquisador CNPq

Resumo

O objetivo deste estudo foi comparar o perfil protéico da secreção endometrial de éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura, durante o estro. A hipótese a ser testada é que o ambiente uterino da égua susceptível encontra-se alterado no estro prévio à cobertura. Foram utilizadas 17 éguas em estro. Quando se detectou a presença de um folículo pré-ovulatório, coletou-se, por meio de tampão, uma amostra da secreção uterina e retirou-se uma biópsia endometrial para exames histopatológico e imunohistoquímico. As éguas foram inseminadas 2 a 12 horas após a remoção do tampão. Um novo exame foi realizado 36 a 48 horas após a cobertura, a fim de confirmar a ovulação e identificar a presença de acúmulo de líquido uterino. De acordo com os achados deste exame, as éguas foram classificadas como resistentes (n = 11) ou susceptíveis (n = 6). A secreção uterina obtida foi processada e submetida à eletroforese bi-dimensional. Foram observadas 33 bandas. Das proteínas verificadas neste estudo, 12 apresentaram-se quantitativamente superiores, nas amostras de éguas susceptíveis, enquanto que 8 bandas protéicas mostraram uma maior frequência nas amostras deste grupo. A expressão dos receptores hormonais apresentou uma tendência à superioridade nas éguas susceptíveis, tanto para receptores de estrógeno no epitélio como para progesterona no estroma. Conclui-se que a composição da secreção endometrial das éguas susceptíveis, antes da cobertura,

¹¹ Projeto financiado pelo CNPq/FAPERGS

¹² Autor para correspondência. E-mail: emalschitzky@ibest.com.br

é diferente daquela observada nas éguas resistentes, estando as proteínas observadas relacionadas com o processo inflamatório e à contratilidade uterina.

Palavras-Chave: éguas, susceptíveis, secreção uterina, proteínas, eletroforese

Abstract

Persistent mating-induced endometritis susceptibility: the role of uterine secretion

The aim of this study was to compare the protein profile of endometrial secretions from mares in estrus resistant or susceptible to persistent post-mating endometritis (PPME). The tested hypothesis was that before insemination of susceptible mares the uterine environment is already disturbed. Experimental subjects were 17 mares in estrus. Endometrial secretion was collected when a pre-ovulatory follicle was observed using a regular vaginal tampon. Immediately after removal of the tampon, an endometrial sample for biopsy was obtained and evaluated by histopathology and immunohistochemistry. Mares were inseminated 2 to 12 hs after the removal of the tampon. Another examination was performed 36-48h after insemination to confirm ovulation and to detect intrauterine fluid accumulation (IUF). The mares were classified, according to the findings in resistant (n = 11) or susceptible (n = 6). Endometrial secretions were processed and submitted to 2D-PAGE. Thirty three protein spots were identified. In 12 spots, a higher relative protein content was observed in susceptible mares samples, compared to resistant mares. Relative frequency was higher in 8 spots in susceptible than in resistant mares. A tendency to a higher estrogen and progesterone receptor staining intensity in stromal and luminal epithelium cells in susceptible mares was also observed. There was a difference in the uterine environment between resistant and susceptible mares to PPME, probably affect the inflammatory response and the uterine contractility.

Key-words: mares, susceptibility, endometrial secretion, proteins, electrophoresis

Introdução

Após cobertura, o útero reage rapidamente à presença do sêmen, através de um processo inflamatório (KOTILAINEN et al., 1994). Este processo deve ser visto como um evento fisiológico e necessário para a eliminação de espermatozoides mortos ou com anormalidades morfológicas, bactérias, células inflamatórias e subprodutos da inflamação, garantindo um ambiente compatível com a sobrevivência do embrião, que deve chegar ao útero a partir do 5º dia após a ovulação (KATILA, 1995, TROEDSSON, 1997).

Embora na maioria das éguas o processo inflamatório esteja completamente resolvido em 36-48 horas após a cobertura, falhas dos mecanismos de defesa permitem que as bactérias possam se aderir à mucosa uterina, levando a uma infecção bacteriana e à persistência da inflamação, quadro denominado endometrite persistente pós-cobertura (EPPC). A falha reprodutiva vem de um efeito direto de um ambiente uterino incompatível com a sobrevivência do embrião, ou da liberação constante de prostaglandina-F_{2α} (PgF_{2α}) devido à inflamação, levando à lise do corpo lúteo e à falta de sustentação do nível de progesterona, necessária para a manutenção da gestação (LEBLANC, 2003).

Éguas susceptíveis apresentam melhores resultados de prenhez quando submetidas a tratamentos pós-cobertura (LEBLANC, 2003). Tratamentos visando auxiliar a limpeza física do útero devem ser realizados entre 6 e 12 horas após a cobertura, antes do estabelecimento de uma infecção. A utilização de lavagem uterina e de agentes ecbólicos neste período resulta em melhores taxas de prenhez nas éguas diagnosticadas como susceptíveis (KNUTTI et al., 2000; MALSCHITZKY et al., 2002).

A presença de fluido uterino 48-96 horas após a cobertura, pode ser considerado como um parâmetro diagnóstico de EPPC. Éguas apresentando acúmulo neste momento apresentam taxa significativamente menor de prenhez e maior taxa de morte embrionária (NEWCOMBE, 1997). No entanto, o diagnóstico neste momento, embora definitivo, pode resultar em menos tempo para a realização, em maior custo e em menor sucesso com tratamentos pós-cobertura (MALSCHITZKY et al, 2002). Em muitas situações, examinar as éguas 12 horas após a cobertura identificando as éguas com líquido acumulado no útero, permitiria a realização do tratamento

(TROEDSSON, 1997), o que pode não ser viável na rotina clínica reprodutiva. Dados de histórico reprodutivo, resultados de exame histopatológico e a identificação de acúmulo de líquido na luz uterina são os parâmetros utilizados para classificar as éguas quanto a sua capacidade de debelar a inflamação induzida pela cobertura (TROEDSSON, 1997, LIU, 1993; PYCOCK et al, 1997; BRINSKO et al, 2003). Porém, não há um dado clínico definitivo para a identificação das éguas susceptíveis à EPPC antes da realização da cobertura. Liu *et. al.* (1993) consideram que nas éguas dos grupos IIa e IIb, categorias onde estão a maioria das éguas, os fatores de manejo, o número de partos anteriores, o número de temporadas em que a égua permaneceu vazia e, principalmente, a idade, parecem ter um efeito maior sobre as diferenças na taxa de parição do que nas categorias I e III (DOIG & WAELCHI, 1993; SCHOON et.al, 1997). Além disso, Vieira *et al.* (2002) não encontraram nenhuma relação entre o acúmulo de líquido e a classificação da biópsia quando utilizaram a presença de fluido uterino após a inseminação artificial como critério para classificar as éguas como resistentes (fluido ausente em até 48 h após a IA) e susceptíveis (presença de fluido além de 48 horas após a IA). Por outro lado, a forma recomendada por Troedsson *et al.* (1995), que considera como resistente a égua que, após a infecção experimental, consegue debelar a inflamação em até 96 horas nem sempre é possível em experimentos com rebanhos comerciais.

Conhecer o perfil protéico da secreção de éguas sadias e susceptíveis à EPCC pode permitir a identificação um possível marcador da susceptibilidade.

A expressão de RNA mensageiro para citocinas, no endométrio de éguas sadias e susceptíveis à EPCC, foi estudada através de PCR em tempo real (Reação em Cadeia de Polimerase com Transcrição Reversa) por Fumoso et al. (2003). Os autores observaram diferenças significativas entre as duas categorias, quanto ao nível basal e quanto à resposta à inseminação artificial, de 3 citocinas pró-inflamatórias. No entanto, embora permita a medida da expressão gênica, esta técnica não permite a quantificação de proteínas (DASCANIO et al, 2006). A identificação de proteínas características da secreção de éguas susceptíveis, através da eletroforese bi-dimensional, poderia servir como referência para a utilização do PCR.

O objetivo deste estudo foi comparar o perfil protéico da secreção endometrial de éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura, durante o estro. A hipótese a ser testada é que o ambiente uterino da égua susceptível encontra-

se alterado no estro prévio à cobertura. As possíveis diferenças na secreção endometrial podem auxiliar compreensão da patogenia da EPPC e assim, servir como marcadores de susceptibilidade, permitindo a seleção das éguas a serem submetidas aos tratamentos pós-cobertura.

Material e Métodos

Animais

Este experimento foi realizado em fevereiro de 2006 em um centro criatório do Sul do Brasil. Foram utilizadas 17 éguas em estro com idades variando entre 5 e 21 anos. Os animais encontravam-se a campo e eram suplementados com aveia e feno. Todas as éguas foram submetidas a exame ginecológico antes do início do experimento, com avaliação da conformação perineal, palpação retal e ultrasonografia do trato genital. Somente foram utilizadas éguas consideradas clinicamente sadias.

As éguas em cio foram examinadas diariamente por palpação e ultrasonografia retal para avaliar o crescimento folicular, o grau de edema uterino e a presença de fluido intrauterino. A inseminação artificial foi realizada com 500 milhões de espermatozoides num volume total de 40 mL, quando se detectou a presença de um folículo pré-ovulatório (>35 mm) e uma imagem ultra-sonográfica característica de estro. Somente foram inseminadas éguas que não apresentavam conteúdo na luz uterina no exame prévio à cobertura.

Coleta da amostra

Uma amostra da secreção endometrial foi coletada antes da inseminação artificial utilizando um tampão vaginal (OB – Johnson & Johnson). A cauda da égua foi coberta e a região perineal limpa com água e iodo-povidine (Povidine Degermante, Johnson Divisão Hospitalar) e seca com papel toalha.

A técnica de coleta foi uma adaptação do procedimento descrito por Reilas (2001). Uma atadura de gaze de 50 cm foi presa ao tampão vaginal, que foi introduzido na luz uterina, utilizando a técnica da dupla luva. Esta técnica consiste em cortar a porção distal de uma luva de palpação retal na altura do pulso, formando um tubo plástico. Com uma outra luva de palpação, o operador colocava o tubo plástico sobre o braço enluvado e o tampão vaginal, fechando uma de suas pontas com os

dedos. Introduzia a mão via vaginal e ao atingir a cérvix, liberava o tubo plástico e introduzia o tampão na luz do útero evitando seu contato com as secreções vaginais. O tampão permanência no lúmen uterino por 30 minutos quando era retirado com a proteção de uma luva.

Após sua remoção, o tampão foi colocado no interior de uma seringa de 20 mL e por compressão com o êmbolo a secreção absorvida foi colocada em um tubo estéril de 10 mL. Um alíquota de 2,0 mL da secreção endometrial foi centrifugada a 1500 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para criotubos e armazenado em nitrogênio líquido.

Manejo Reprodutivo

Logo após a remoção do tampão uma biópsia endometrial foi coletada para realização de exames histopatológicos e imunohistoquímicos. As éguas foram inseminadas 2 a 12 horas após a remoção do tampão. Um novo exame foi realizado 36 a 48 horas após a cobertura, a fim de confirmar a ovulação e identificar a presença de líquido uterino. De acordo com os achados deste exame, as éguas foram classificadas em 2 grupos

R- Resistentes: éguas que não apresentaram evidência de fluido acumulado na luz uterina (LIU) 36-48 horas após a inseminação artificial ;

S- Suscetíveis: éguas nas quais se observou a presença de LIU 36-48 h após a inseminação artificial. Qualquer quantidade de LIU foi diagnosticada como endometrite persistente pós-cobertura.

Técnica de eletroforese

As amostras de secreção uterina foram descongeladas e centrifugadas a 10000 x g por 60 minutos a 4 °C e uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi armazenada em criotubos a -80 °C. A proteína total das amostras foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão albumina sérica bovina (1 mg/mL). A eletroforese bidimensional foi realizada pelo método de O'Farrel (1977) modificado por Rodnigh et al (1988), a qual é constituída de duas etapas de separação protéica.

A solução utilizada para a separação em primeira dimensão continha 9 M de

uréia, 12,5 nM lisina, 7 nM SDS, 4% (v/v) Igepal e 2% (v/v) 2-mercaptoetanol. A primeira dimensão constituía-se de eletroforese não equilibrada em gel tubular de poliacrilamida a 3,5% (LENZ et al., 1997) com gradiente de pH de 2 a 10. Uma quantidade de 100 µg de proteína foi aplicada em cada tubo e foi utilizado o Citocromo C (Sigma) como marcador de frente de corrida. Foi utilizada uma fonte EPS 3501 (Amersham, Pharmacia) com voltagem máxima de 800 V, amperagem máxima de 10 mA e potência de 0,125 W por tubo. A corrida era interrompida quando a banda de Citocromo C (visível) atingia 8 cm de migração. Os tubos capilares eram retirados da cuba, identificados e mantidos à -20°C, até o momento da transferência para a segunda dimensão.

Para a segunda dimensão foi utilizada eletroforese em placas de gel (SDS-PAGE), com 12% de acrilamida, com sistema de tampão descontínuo, que separa as proteínas pelo seu peso molecular.

Para a coloração, os géis eram mantidos em uma solução de 0,15% Comassie Brilliant Blue R-250 (Amersham, Pharmacia), 53% metanol e 7% ácido acético por aproximadamente 12 horas. A fim de evidenciar as bandas, os géis eram descorados através de uma solução de 50% metanol, 7% ácido acético e água, por cerca de 6 horas. A seguir, os géis eram imersos em solução de secagem (50% metanol, 1% glicerol e água) por 2 horas e, posteriormente, secos entre duas folhas de celofane.

Quantificação das bandas protéicas

Os géis foram escaneados (Hewlet-Packard Scanjet 6100 C) e analisados pelo programa Optiquant Acquisition & Analysis (versão 02.00, Packard Instrument) para determinação da densidade óptica das bandas protéicas, expressas em *pixels*.

A densidade óptica das bandas protéicas é expressa em percentagem relativa, sendo que 100% representam o total de *pixels* de uma área definida, constante para todos os géis, e cada banda protéica correspondendo a uma percentagem do total.

Através do peso molecular e ponto isoelétrico (pI) aproximados, foi avaliada a correspondência das bandas protéicas analisadas a proteínas específicas já identificadas no equino.

Exame Histopatológico e Imunohistoquímico

As amostras de endométrio foram mantidas em formalina tamponada a 4% desde o momento da coleta até o seu processamento, sendo incluídas em parafina e coradas com Hematoxilina-Eosina. As amostras foram processadas e classificadas de acordo ao descrito por Kenney e Doig (1986) modificado por Schoon et al. (1992), sendo consideradas apenas as alterações inflamatórias. Para as comparações foi considerada como presente qualquer evidência de alteração, independente do grau. Para a imunohistoquímica, foi utilizada a técnica da peroxidase-antiperoxidase (P.A.P), sendo utilizados como anticorpos primários anticorpos de camundongo contra receptores de estrógeno e progesterona humanos. Foram avaliadas três regiões de cada amostra, sendo estas o estroma, o epitélio luminal e do ducto glandular e a porção basal das glândulas. A intensidade de expressão dos receptores foi classificada segundo Özgen et al (1997) numa escala de 0 (ausência de coloração) até 3 (coloração muito forte).

Análise estatística

Para o estudo das proteínas, o delineamento utilizado foi completamente ao acaso com repetições (géis), sendo considerado como fator de estudo a susceptibilidade (resistentes e susceptíveis). Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e, como teste complementar, o teste Tukey, com nível de significância de 5%. Para a comparação do número de bandas entre os grupos, conforme a susceptibilidade, foi utilizado o teste do qui-quadrado. A expressão dos receptores hormonais foi avaliada pelo teste T de Student.

Resultados:

Amostras de 17 éguas foram coletadas, sendo 11 éguas classificadas como resistentes (R) e 6 como susceptíveis (S). As amostras de 2 éguas classificadas como susceptíveis apresentaram concentração de proteína total insuficiente para a realização da eletroforese bidimensional. Foram avaliados 22 géis de éguas resistentes e 12 géis de éguas susceptíveis, tendo-se identificado 33 bandas protéicas,

com peso molecular (PM) variando entre 15 e 105 kDa e ponto isoelétrico (pI) entre 4,3 e 10,0.

Na figura 1, está demonstrado um gel de eletroforese bi-dimensional da secreção endometrial de uma égua susceptível, acompanhado da representação gráfica das bandas protéicas identificadas.

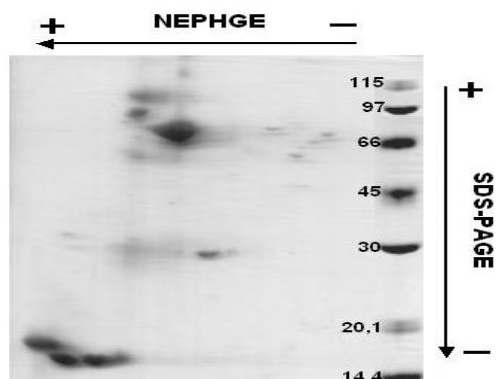


Fig 1. – Perfil eletroforético das proteínas da secreção endometrial da égua. Gel bidimensional SDS-PAGE a 12%, corado com Comassie Blue. A seta superior indica a direção do gradiente de pH não equilibrado (NHPHGE) na 1ª dimensão. Os marcadores de peso moleculares com seus respectivos pesos encontram-se à direita.

Foram observadas diferenças significativas na frequência e na densidade óptica, entre as amostras de éguas resistentes e susceptíveis. Em 12 bandas protéicas, uma maior densidade óptica foi encontrada nos géis de éguas do S, em comparação com as do R. As densidades ópticas das 12 bandas, de ambos os grupos, estão apresentadas na figura 2.

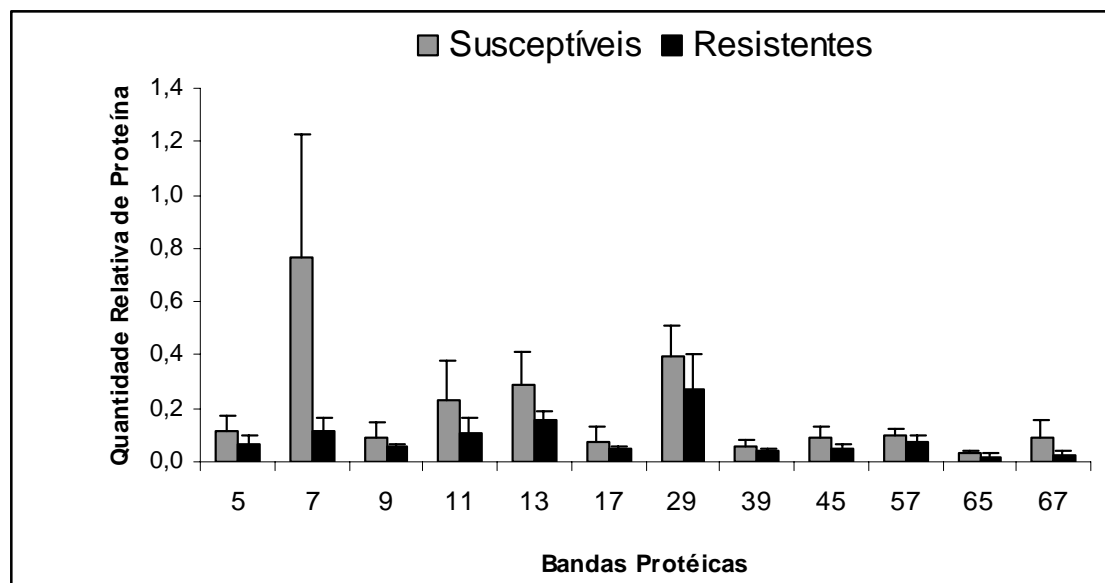


Figura 2: Média e desvio padrão da Densidade óptica de 12 bandas protéicas que apresentaram diferença quanto à susceptibilidade

Éguas susceptíveis apresentaram uma densidade óptica superior ($p > 0,04$) do que as éguas resistentes, em mais de um terço das bandas observadas nas amostras de éguas em estro. Em nenhuma das bandas protéicas foi observada densidade óptica ou frequência maior na secreção das éguas resistentes.

Não foi encontrada correspondência com proteínas de eqüinos, nos bancos de informação disponíveis, pra as bandas 17 (PM: 26 a 27 kDa; PI: 7,3 a 7,6), 65 (PM: 81 a 82 kDa; PI: 7,6 a 7,7) e 67 (PM: 99 a 100 kDa; PI: 6,3 a 7,0). Baseado no peso molecular e no ponto isoelétrico aproximados, foi possível encontrar correspondência para as demais bandas.

As bandas 7, 65 e 67, entre outras proteínas, também foram encontradas em uma proporção maior nas amostras de éguas susceptíveis do que naquelas de éguas resistentes, conforme pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1: Peso molecular (PM), ponto isoelétrico (pI) e frequência (%) das bandas protéicas na secreção endometrial de éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura.

Banda	P M (kDa)	pI	Susceptíveis (n=12) (%)	Resistentes (n=22) (%)	<i>p</i>
7	16 - 17	9,7 – 10,0	100	68,2	0,03
19	37 - 38	9,5 – 9,6	100	72,2	0,05
21	30 - 32	9,2 – 9,3	100	68,2	0,03
23	33 - 35	8,8 – 8,9	100	72,2	0,05
25	47 - 49	8,8 – 9,0	100	72,2	0,05
63	81 - 82	7,4 – 7,5	91,6	50	0,02
65	81 - 82	7,6 – 7,7	83,3	45,4	0,01
67	99 - 100	6,3 – 7,0	100	54,4	0,03

Na tabela 1, pode-se verificar que 8 bandas protéicas foram observadas com uma maior frequência nas amostras de éguas susceptíveis do que nas resistentes. Nenhuma banda foi detectada em maior proporção nas amostras de éguas resistentes.

Baseado no PM e pI, a proteína da banda 19 pode tratar-se do precursor do antígeno CD2 da superfície das células T. Não foi encontrada correspondência com proteínas já identificadas de eqüinos nos bancos de informação disponíveis para as proteínas 23, 25 e 63.

Em 44,4 % das éguas resistentes e em 50% das éguas classificadas como susceptíveis foi observada inflamação endometrial ao exame histopatológico, sem que houvesse diferença significativa entre R e S ($p > 0,5$).

Na figura 3, estão apresentadas as médias e desvios padrão da expressão dos receptores para estrógeno e progesterona no estroma, epitélio luminal e epitélio glandular no endométrio de éguas resistentes e susceptíveis.

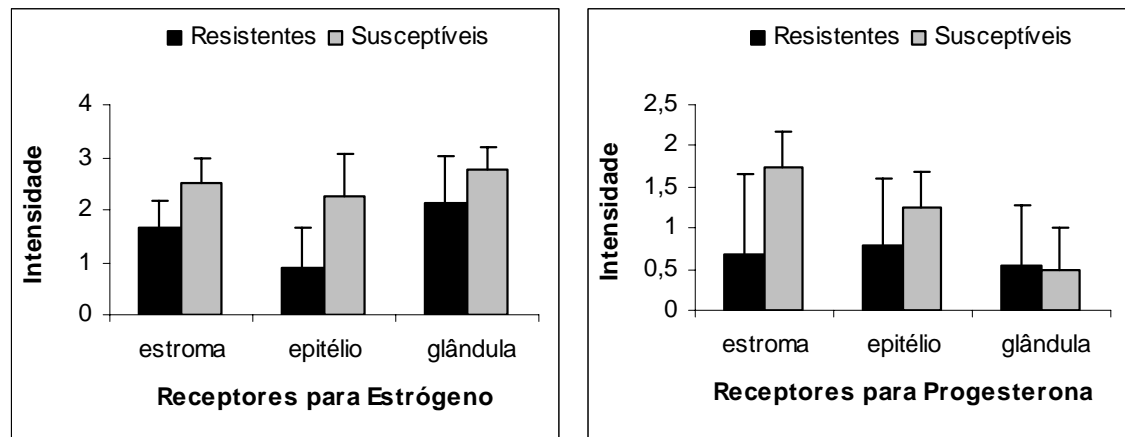


Figura 3: Média e desvio padrão da expressão de receptores para estrógeno e progesterona no endométrio, por meio da intensidade de coloração, de éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura.

A expressão dos receptores hormonais apresentou uma tendência à superioridade nas éguas susceptíveis, tanto para receptores de estrógeno no epitélio ($P < 0,07$), como para progesterona no estroma ($P < 0,07$). Para as demais áreas do endométrio avaliadas, nenhuma diferença foi observada na expressão dos receptores para estrógeno e progesterona ($P > 0,1$).

Discussão

O atraso na limpeza física do útero é considerado como ponto central da susceptibilidade à endometrite persistente pós-cobertura (TROEDSSON, 1997). Durante a síntese de prostaglandinas, a enzima cicloxigenase (COX) inicia a transformação do ácido aracdônico, transformando-o em prostaglandina H₂ (PgH₂). A prostaglandina E sintase (PgE sintase), que provavelmente corresponda à proteína da banda 7, é a enzima responsável pela etapa final da transformação da PgH₂ em prostaglandina E₂ (Pg E₂) (TIZARD, 1998). Aparentemente há um efeito conjunto da PgE sintase com a IL-1 β , que é capaz de induzir a secreção de prostaglandinas. Foi demonstrado um efeito direto da IL-1 β sobre a secreção de PgE₂ em células do miométrio de mulheres submetidas à cesariana (SOORANNA et al., 2006). A atividade da PgE sintase foi demonstrada também em todos os tipos celulares (estroma, epitélio luminal e glandular) do endométrio da vaca (PARENT &

FORTIER, 2005). A PgE2 é uma das moléculas responsáveis pela chegada do embrião equino ao útero (WEBER et al., 1992) e apresenta, também, um efeito direto sobre a atividade elétrica do miométrio (TROEDSSON et al., 1995) e sobre a contratilidade e o tônus uterino de éguas no 12º dia do diestro. Provavelmente seja, também, a responsável pelo aumento do tônus uterino observado nos dias 11 a 15 da gestação (GASTAL et al, 1998). O tônus uterino típico do diestro é caracterizado por períodos longos de contração, com baixa amplitude e este fator, entre outros, faz com que a égua em diestro esteja menos apta a eliminar uma possível contaminação e inflamação uterina (EVANS et al, 1987; JONES et al., 1991). Após a administração de ocitocina exógena, a secreção de prostaglandina F2 α é menor em éguas susceptíveis do que em éguas resistentes, podendo esta diferença contribuir para a menor capacidade de limpeza física do útero nas primeiras (NIKOLAKOPOLOUS et al., 2000). Os autores concluíram que a diferença não ocorre nos receptores para ocitocina, mas após a sinalização para a secreção da PgF2 α . Esta menor secreção de PgF2 α , poderia estar associada à maior quantidade de PgE sintase observada nas éguas susceptíveis no presente trabalho, que poderia levar a uma maior secreção de PgE2, já que ambas prostaglandinas se originam da PgH2. Esta alteração poderia resultar num padrão de contratilidade que reduz a capacidade de limpeza física do útero.

Por outro lado, Fumoso et al. (2003) observaram que éguas susceptíveis apresentam níveis maiores de expressão de mRNA para 4 citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , FNT- α , IL-6 e IL8), antes da realização da cobertura, quando comparado aos níveis observados nas éguas resistentes.

No presente trabalho, foi observada maior densidade óptica de 12 proteínas e maior frequências (em 8 bandas protéicas) nas amostras de éguas susceptíveis, do que nas de éguas resistentes. Das 11 bandas para as quais foi possível encontrar correspondência com proteínas já descritas para a espécie equina, 6 podem estar envolvidas no processo inflamatório.

A IL-4 (banda 5) atua na ativação de células B, melhorando a secreção de anticorpos e induzindo a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade classe 2 (MHC-II). As moléculas MHC-II, classe a qual provavelmente pertença à proteína 11, tem como função a apresentação de antígenos

aos linfócitos, estando presentes constitutivamente nos linfócitos T auxiliares (TIZARD, 1998). No endométrio da égua, os linfócitos são as células predominantes na endometrite crônica (KENNEY & DOIG, 1986). Por meio de imunohistoquímica, foi observada a atividade de linfócitos CD4 positivos (*T* auxiliares), no endométrio da égua, com uma tendência a maior expressão em éguas inférteis (TUNÓN et al., 1997). Estas células estão envolvidas na ativação de macrófagos e de células B, induzindo a secreção de anticorpos (JANEWAY et al., 1999), que podem estar em quantidades significativamente maiores nas éguas susceptíveis do que nas éguas resistentes (WIDDERS et al., 1984).

A proteína 19, possivelmente trata-se de um precursor do antígeno CD2 da superfície das células T. Estas células de adesão atuam melhorando a ligação dos linfócitos T Auxiliares às moléculas do MHC-II (JANEWAY et al., 1999).

A banda 45 provavelmente seja o precursor da caspase 1 (CASP-1), que é a enzima responsável pela ativação da IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória cuja produção está aumentada no endométrio de éguas susceptíveis, comparada ao de éguas resistentes. (FUMOSO et al., 2003). Também em humanos, a atividade aumentada da caspase-1 parece ser uma das causas da doença inflamatória crônica do intestino (SIEGMUND, 2002). Foi observado em eqüinos com osteoartrite, que a expressão da IL-1 β é um dos principais fatores para o início e manutenção da inflamação (McILWRAIGHT, 2002).

A proteína 39 poderia ser de um precursor do receptor tipo II para a Interleucina 1 (IL-1 RII). Esta proteína é encontrada predominantemente em células B e neutrófilos (MANTOVANI et al., 2001) e funciona como um falso receptor para a interleucina 1 (IL-1), não participando na sinalização desta citocina (McMAHAN et al., 1991; SIMS et al., 1993). Uma rápida liberação do IL-1 RII ocorre a partir da exposição das células ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fatores de quimiotaxia e metaloproteases (COLOTTA et al., 1995; ORLANDO et al., 1997a; ORLANDO et al., 1997b). A atividade destas moléculas pró-inflamatórias foi demonstrada no endométrio da égua (FUMOSO et al., 2003; ODDOSDOTTIR et al., 2006). Estudos demonstraram a capacidade desses falsos receptores em bloquear a atividade da IL-1 *in vivo* e *in vitro* (DINARELLO, 1996; 2004; BOURKE et al., 2003). A liberação destes receptores solúveis é associada ao início do processo

inflamatório, atuando no controle da severidade da inflamação. A liberação deles é induzida pelo mesmo estímulo que induz a IL-1 β (MACKAY, 2000). É possível, portanto, considerar a presença desses receptores também como um indício de atividade da IL-1 β , o que poderia ser devido, em parte, à maior atividade da Casp-1 nas éguas susceptíveis.

A proteína 13, possivelmente seja um fator de crescimento transformador. Os fatores de crescimento transformadores, dentre os quais o beta (TGF- β), origina-se das plaquetas, macrófagos ativados e neutrófilos, entre outros. Esta classe de citocinas pode ter efeitos tanto inibidores, através da redução da expressão de alguns receptores de interleucinas e do bloqueio de efeitos citotóxicos, como potencializadores da resposta imune, através da quimiotaxia de neutrófilos e monócitos (TIZARD, 1998).

Já a banda 9 provavelmente trata-se do inibidor de metaloproteinase 3 (TIMP-3), que se liga, numa proporção 1:1, preferencialmente à MMP-9, inibindo sua ação e, desta forma, regulando a intensidade da inflamação (LECO et al, 1994). A atividade MMP-9, uma colagenase que tem como função a destruição da matriz extra celular durante a inflamação, foi observada no endométrio da égua, em resposta à inoculação bacteriana e à inseminação artificial (ODDSDOTTIR et al., 2006). Estes resultados, associados ao fato de não haver diferença na incidência de inflamação entre as éguas dos dois grupos, reforçam a hipótese levantada por Fumoso et al. (2003), de que éguas susceptíveis apresentam um “limiar” de inflamação mais baixo do que éguas resistentes, especialmente quanto à liberação de citocinas pró-inflamatórias.

A utilização de prednisolona no período próximo à ovulação, resultou numa taxa superior de prenhez em éguas susceptíveis em comparação àquela observada nas éguas não tratadas (DELL'AQUA Jr. et al., 2006). A observação, no presente trabalho, de uma maior quantidade de proteínas envolvidas no processo inflamatório, como por exemplo, a IL-4, auxilia na compreensão dos resultados obtidos, com tratamento à base de corticosteróides em éguas susceptíveis, por Dell'Aqua Jr. et al. (2006). Os corticóides geram uma redução na expressão gênica de várias citocinas, dentre as quais IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-3, IL-5, IL8, desta forma reduzindo a inflamação. Outros efeitos, causados pela administração de glicocorticóides, são a redução da síntese de óxido nítrico (ON) e das enzimas responsáveis pela síntese de

prostaglandinas e leucotrienos, além de diminuir a atividade de moléculas de adesão, o que reduz a migração dos leucócitos dos vasos sanguíneos (JANEWAY et al., 1999).

A proteína 21, que foi verificada em todas as éguas susceptíveis, mas em uma proporção menor em éguas resistentes, provavelmente seja a proteína das Junções GAP $\beta 1$ (GAP $\beta 1$), ou conexina 32. Estas proteínas pertencem à família das conexinas, cuja função está relacionada a trocas de informação e de moléculas reguladoras da função celular, através da comunicação célula-célula (BRADY et al., 1995). Estes autores estudaram a expressão de junções GAP no endométrio de éguas no estro, no diestro e na fase inicial da gestação, e os resultados levaram à sugestão de que esta comunicação é importante para coordenar qualquer atividade secretora no endométrio. Um aumento da atividade das conexinas poderia estar relacionado à maior quantidade de outras proteínas observadas nas éguas susceptíveis, ou a um controle deficiente na secreção das glândulas endometriais. A maior secreção do útero de éguas susceptíveis poderia, por outro lado, estar relacionada à expressão de receptores para estrógeno e progesterona no endométrio. Uma alta expressão de receptores foi observada em éguas com hidromucômetra, e associada ao acúmulo de fluido uterino, devido a uma secreção exagerada das glândulas endometriais (ÖZGEN et al., 1997). A expressão de receptores para os hormônios ovarianos tendeu a ser maior nas éguas susceptíveis em comparação às resistentes, em duas das regiões estudadas, o que poderia afetar, também, a secreção das glândulas endometriais. Estudos com um número maior de amostras são necessários para a avaliação da expressão de receptores hormonais no endométrio de éguas susceptíveis à EPPC.

Conclui-se que a composição da secreção endometrial das éguas susceptíveis, antes da cobertura, é diferente daquela observada nas éguas resistentes, estando as proteínas observadas relacionadas ao processo inflamatório e à contratilidade uterina. Devido à grande interação entre as moléculas inflamatórias e suas diferentes funções (TIZARD, 1998), não é possível eleger proteínas isoladas como marcadoras de susceptibilidade. No entanto, pode-se averiguar a utilização de inibidores de caspase-1, a exemplo do que ocorre em doenças inflamatórias de humanos (DINARELLO, 2004), para o tratamento de éguas reconhecidamente susceptíveis à EPPC.

3.5. Artigo 5

Perfil Protéico da Secreção Uterina de éguas em Estro: Efeito da Inflamação e da Fibrose Endometrial¹³

Eduardo Malschitzky^{1, 2, 14}, Sandra M.E. Fiala³, Ana Maria T. Esmeraldino², Maria Inês M. Jobim⁴, Ricardo Macedo Gregory^{1,5} e Rodrigo Costa Mattos^{1,5}

1 – Reprolab, Faculdade de Veterinária, UFRGS

2 – Curso de Medicina Veterinária, ULBRA

3 – Instituto de Biologia, UFPel

4 – Laboratório de Inseminação Artificial, Faculdade de Veterinária, UFRGS

5- Pesquisador do CNPq

Resumo

Os objetivos deste trabalho foram (a) comparar a composição protéica da secreção endometrial de éguas em estro com e sem fibrose e (b) avaliar o efeito da inflamação endometrial sobre o perfil protéico da secreção uterina de éguas em estro e em diestro. A hipótese é que a fibrose e a inflamação alteram a composição protéica do fluido uterino, podendo prejudicar o desempenho reprodutivo da égua. Foram utilizadas 11 éguas em estro, de um rebanho comercial, e 13 éguas em diestro de um grupo de animais enviados para o abate. Nas éguas em estro coletou-se, por meio de tampão, uma amostra da secreção uterina e retirou-se uma biópsia endometrial quando se detectou a presença de um folículo pré-ovulatório. Nas éguas em diestro um tampão foi colocado, prévio ao abate para coleta da secreção uterina, e retirado após a remoção do útero, quando uma amostra de endométrio foi coletada. A secreção uterina obtida foi processada e submetida à eletroforese bi-dimensional. Foram observadas 33 bandas protéicas nas amostras de éguas em estro e 30 nas amostras de éguas em diestro. Em éguas sem evidência de fibrose endometrial, a densidade óptica de uma banda protéica foi maior do que a observada em amostras de éguas com fibrose. O perfil protéico da secreção, tanto de éguas em estro como em diestro,

¹³ Projeto financiado pelo CNPq/FAPERGS

¹⁴ Autor para correspondência. E-mail: emalschitzky@ibest.com.br

variou em função presença da inflamação endometrial. Conclui-se que nas éguas em estro a inflamação e a fibrose endometrial alteram apenas a quantidade de poucas proteínas no ambiente uterino. Durante o diestro, a presença da inflamação alterou o ambiente uterino, havendo maior quantidade de proteínas inflamatórias.

Palavras-chave: éguas, inflamação, fibrose, ciclo estral, perfil protéico

Abstract

Protein profile of the uterine secretion of the mare: effect of inflammation and endometrial fibrosis

The aim of this study was (a) to compare the protein profile of endometrial secretions from estrous mares with and without fibrosis and (b) to estimate the effect of inflammation in the protein profile of endometrial secretion from in estrus and in diestrus mares. The tested hypothesis was that fibrosis and inflammation disturb the uterine environment modifying the protein profile of the endometrial secretion impairing the reproductive performance. Experimental subjects were 11 breeding mares in estrus and 13 mares in diestrus selected from a population of horses sent to slaughter. In estrus mares endometrial secretion was collected when a pre-ovulatory follicle was observed using a regular vaginal tampon and immediately after remove of the tampon an endometrial biopsy was obtained. In diestrus mares a regular vaginal tampon was intrauterine placed and removed after the slaughter when an endometrial sample was collected. Endometrial secretions was processed and submitted to 2D-PAGE. Thirty three protein spots were identified in the estrous mares and 30 in the diestrous mares. A higher relative protein content was observed in one spot from mares without endometrial fibrosis. Inflammation influenced the protein profile from mares in estrus and diestrus. Inflammation and fibrosis in estrous influenced the protein profile in a low number of spots. During diestrous, inflammation affected uterine environment with an expressive number of inflammatory proteins.

Key-words: mares, inflammation, fibrosis, estrous cycle, protein profile

Introdução

A endometrose, também conhecida como endometrite crônica degenerativa, descreve uma fibrose periglandular ou do estroma do endométrio, o qual inclui alterações glandulares no foco fibrótico (HOFFMANN et al., 2003). A fibrose endometrial é uma causa importante de redução da eficiência reprodutiva na égua, sendo uma condição progressiva e irreversível, que tende a se agravar com o avanço da idade (RICKETTS & ALONSO, 1991).

A formação de fibrose ocorre devido à alteração do depósito de colágeno no estroma - tanto do estrato compacto como do estrato esponjoso - e na membrana basal do epitélio luminal, podendo levar à formação de ninhos glandulares de tamanho variado. A severidade pode ser avaliada pelo número de camadas e pela frequência de aparecimento de focos fibróticos na amostra (KENNEY & DOIG, 1986). Através de eletroforese, diferenças na composição protéica da secreção endometrial devido à presença de diferentes graus de fibrose endometrial foram demonstradas por Bader et al. (1997). Foram também observadas deficiências na secreção de proteínas no útero e cérvix e alterações no padrão de secreção de proteínas das glândulas endometriais de éguas com endometrose moderada a severa (HEIN, 2000; HOFFMAN et al., 2003).

A patogenia da endometrose ainda não é completamente conhecida, porém Hoffmann et al. (2003) observaram que nem a prenhez, nem variações endócrinas estacionais ou cíclicas parecem afetar o progresso da endometrose. A expressão aumentada ou descontrolada de citocinas poderia estar envolvida no processo de formação da fibrose. A atividade das gelatinases, MMP-2 e MMP-9, que se apresenta aumentada em outros processos degenerativos e inflamatórios dos eqüinos, aumenta poucas horas após a realização de uma infecção experimental ou da realização de uma cobertura (ODDSDOTTIR et al., 2006). Por outro lado, não foram observadas diferenças na expressão de citocinas fibrinogênicas (IL-6, FNT - α e TGF- β) em éguas jovens (3 a 8 anos) e sem fibrose endometrial, comparado com éguas mais velhas (15 a 22 anos) e com fibrose severa (CADARIO et al, 2002).

A exemplo da fibrose endometrial, a inflamação do útero é uma causa reconhecida de redução da fertilidade (TROEDSSON, 1997). As inflamações crônicas são caracterizadas predominantemente por infiltrações linfocitárias, sendo menos comum a presença de plasmócitos, siderócitos e eosinófilos (KENNEY & DOIG, 1986). Grande parte das éguas apresenta infiltrações mononucleares, que são atribuídas a estímulos gerados por proteínas do plasma seminal, micróbios e debris introduzidos no útero durante a cobertura (RICKETTS & BARRELET, 1997), ou devido a um fechamento vulvar deficiente (PASCOE, 1979)

Uma menor taxa de prenhez foi observada por Mattos et al. (1984) em éguas apresentando inflamação ao exame citológico antes da cobertura (3,3%), comparada à das éguas com citologia negativa (66,3%) demonstrando o efeito negativo da inflamação uterina sobre o desempenho reprodutivo. Por sua vez, Fumoso et al. (2003) observaram, antes da cobertura, que a expressão de mRNA para IL-1 β , FNT- α , IL-6 foi maior em éguas susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura do que em éguas resistentes.

A endometrite induzida pela cobertura é um evento fisiológico, sendo uma resposta à deposição intrauterina do sêmen (KOTILAINEN et al., 1994; FIALA et al., 2007). Esta reação inflamatória tem a função de eliminar o excesso de espermatozoides e a contaminação bacteriana que ocorre no momento da cobertura (KOTILAINEN et al., 1994; TROEDSSON et al., 1995). Porém, se a inflamação persiste, o ambiente torna-se incompatível com o estabelecimento da prenhez, sendo este um dos caminhos que levam à menor fertilidade em éguas susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura (TROEDSSON, 1997). Contudo, uma caracterização da composição protéica da secreção uterina de éguas em diestro, com e sem inflamação, não foi relatada. Da mesma forma, o efeito da inflamação e da fibrose na secreção endometrial de éguas em cio não foi demonstrado. Trabalhando com éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura, classificadas com base na presença de fluido uterino 36-48 horas após a cobertura, Malschitzky et al. (2007b) observaram uma quantidade de proteína significativamente maior em 12 bandas protéicas, na secreção de éguas susceptíveis, sem que houvesse diferença entre os dois grupos, quanto à presença de inflamação endometrial.

Os objetivos deste trabalho foram, por meio da eletroforese bi-dimensional, (a) comparar a composição protéica da secreção endometrial de éguas em estro com e

sem fibrose e (b) avaliar o efeito da inflamação endometrial sobre o perfil protéico da secreção uterina de éguas em estro e em diestro. A hipótese é que a fibrose e a inflamação alteram a composição protéica do fluido uterino, podendo prejudicar o desempenho reprodutivo da égua.

Material e Métodos

Animais

Foram utilizadas 11 éguas em estro, de um rebanho comercial e 13 éguas em diestro de um grupo de animais enviados para o abatedouro, localizado em Pelotas, RS. As amostras foram coletadas entre os meses de janeiro de 2005 e fevereiro de 2006.

Coleta das amostras

A técnica de coleta foi uma adaptação do procedimento descrito por Reilas (2001). Uma atadura de gaze de 50 cm foi presa ao tampão vaginal (OB[®] - Johnson & Jonhson), que foi introduzido na luz uterina, utilizando a técnica da dupla luva. Esta técnica consiste em cortar a porção distal de uma luva de palpação retal na altura do pulso, formando um tubo plástico. Com uma outra luva de palpação, o operador colocava o tubo plástico sobre o braço enluvado e o tampão vaginal, fechando uma de suas pontas com os dedos. Introduzia a mão via vaginal e ao atingir a cérvix, liberava o tubo plástico e introduzia o tampão na luz do útero evitando seu contato com as secreções vaginais.

Manejo reprodutivo

As éguas em cio foram examinadas diariamente por palpação e ultrasonografia retal para avaliar o crescimento folicular, o grau de edema uterino e a presença de fluido intra-uterino. A coleta da secreção endometrial foi realizada quando se detectou a presença de um folículo pré-ovulatório (>35 mm) e uma imagem ultra-sonográfica característica de estro. A cauda da égua foi ligada, a região perineal limpa com água e iodo-povidine (Povidine Degermante, Johnson Divisão Hospitalar) e seca com papel toalha. Nestas éguas, o tampão permanecia no lúmen uterino por 30 minutos quando era retirado com a proteção de uma luva.

Imediatamente após a retirada do tampão, um fragmento endometrial foi coletado, para a realização e exame histopatológico.

Nas éguas do grupo enviado para o frigorífico, o tampão foi introduzido no útero 30 minutos antes do abate. Nestas éguas, imediatamente após o abate, realizado de forma humanitária, o útero foi removido, sendo o tampão retirado. O útero foi aberto com auxílio de uma tesoura, sendo feita a coleta de uma amostra de endométrio para exame histopatológico, na porção dorsal da bifurcação uterina. O grau de edema uterino foi avaliado pelo aspecto macroscópico do endométrio, e classificado em uma escala de 1 (edema pouco pronunciado) até 3 (edema pronunciado). Os ovários foram medidos com auxílio de um paquímetro e seccionados transversalmente, para a avaliação e medição das estruturas (folicúlos, corpo lúteo, corpo hemorrágico e corpo albicans). As éguas foram diagnosticadas como estando em diestro com base na presença de corpo lúteo, ou corpo hemorrágico nos ovários, pela identificação de um colo uterino contraído e sem hiperemia e pela presença de edema pouco pronunciado.

Processamento das amostras da secreção endometrial

Após sua retirada, o tampão foi colocado em uma seringa de 20 mL e comprimido com o auxílio do êmbolo para retirada da secreção absorvida. Uma alíquota de 2,0 mL da secreção foi colocada em um tubo estéril de 10 mL e imediatamente centrifugada a 1500 x g por 15 minutos, sendo o sobrenadante transferido para criotubo e armazenado em nitrogênio líquido.

Técnica de eletroforese

As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 10000 x g por 60 minutos a 4 °C e uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi armazenada em criotubos a -80 °C. A proteína total das amostras foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão albumina sérica bovina (1 mg/mL). A eletroforese bidimensional foi realizada pelo método de O'Farrel (1977) modificado por Rodnigh et al (1988), a qual é constituída de duas etapas de separação protéica.

A solução utilizada para a separação em primeira dimensão continha 9 M de uréia, 12,5 nM lisina, 7 nM SDS, 4% (v/v) Igepal e 2% (v/v) 2-mercaptoetanol. A primeira dimensão constituía-se de eletroforese não equilibrada em gel tubular de

poliacrilamida a 3,5% (LENZ et al., 1997) com gradiente de pH de 2 a 10. Uma quantidade de 100 µg de proteína foi aplicada em cada tubo e foi utilizado o Citocromo C (Sigma) como marcador de frente de corrida. Foi utilizada uma fonte EPS 3501 (Amersham, Pharmacia) com voltagem máxima de 800 V, amperagem máxima de 10 mA e potência de 0,125 W por tubo. A corrida era interrompida quando a banda de Citocromo C (visível) atingia 8 cm de migração. Os tubos capilares eram retirados da cuba, identificados e mantidos à -20°C, até o momento da transferência para a segunda dimensão.

Para a segunda dimensão foi utilizada eletroforese em placas de gel (SDS-PAGE), com 12% de acrilamida, com sistema de tampão descontínuo, que separa as proteínas pelo seu peso molecular.

Para a coloração, os géis eram mantidos em uma solução de 0,15% de Comassie Brilliant Blue R-250 (Amersham, Pharmacia), 53% de metanol e 7% de ácido acético por aproximadamente 12 horas. A fim de evidenciar as bandas, os géis eram descolorados através de uma solução de 50% de metanol, 7% de ácido acético e água, por cerca de 6 horas. A seguir, os géis eram imersos em solução de secagem (50% de metanol, 1% de glicerol e água) por 2 horas e, posteriormente, secos entre duas folhas de celofane.

Quantificação das bandas protéicas

Os géis foram escaneados (Hewlet-Packard Scanjet 6100 C) e analisados pelo programa Optiquant Acquisition & Analysis (versão 02.00, Packard Instrument) para determinação da densidade óptica das bandas protéicas, expressas em *pixels*.

A densidade óptica das bandas protéicas é expressa em percentagem relativa, sendo que 100% representam o total de *pixels* de uma área definida, constante para todos os géis, e cada banda protéica correspondendo a uma percentagem do total.

Através do peso molecular e ponto isoelétrico (pI) aproximados, foi avaliada a correspondência das bandas protéicas analisadas a proteínas específicas já identificadas no equino.

Exame Histopatológico

As amostras de endométrio foram mantidas em formalina tamponada a 4% desde o momento da coleta até o seu processamento, sendo incluídas em parafina e coradas

com Hematoxilina-Eosina. As amostras foram processadas e classificadas de acordo ao descrito por Kenney e Doig (1986) modificado por Schoon et al. (1992), sendo consideradas as alterações inflamatórias e a fibrose endometrial, nas duas fases do ciclo estral, separadamente. Para as comparações foi considerada como presente qualquer evidência de alteração, independente do grau.

Análise estatística

Os dados da densidade óptica relativa das diferentes bandas protéicas de éguas com fibrose e inflamação, nos diferentes ciclos, foram analisados por ANOVA com significância de 95%. Um mínimo de dois géis de boa qualidade por égua foi analisado, sendo cada gel considerado como uma unidade amostral. O efeito da inflamação e da fibrose endometrial e suas interações, nas diferentes fases do ciclo estral (estro e diestro), foram avaliados com as éguas sendo divididas de acordo com a observação ou não cada uma destas alterações no exame histopatológico. A frequência relativa das diferentes bandas protéicas presentes nos géis de éguas com e sem inflamação, nas diferentes fases do ciclo estral, foi avaliada pelo Qui Quadrado.

Resultados

Foram analisadas as secreções de 11 éguas em estro (22 géis) e 13 éguas em diestro (33 géis). Das éguas em estro, 6 apresentavam evidência de endometrose sendo que, quatro delas apresentaram também inflamação. Foi observada inflamação no endométrio de 5 éguas em estro. Infiltrações mononucleares discretas foram encontradas em 2 éguas (18,2%) e infiltrações mistas em 3 (27,3%). Todas as éguas em diestro apresentaram algum grau de fibrose endometrial. Infiltrações mononucleares foram observadas em 2 (15,3%) das amostras, enquanto no endométrio de 7 éguas (54%) foi observada inflamação mista de grau discreto a moderado. Não se observou inflamação em 4 amostras (30,7%).

Foram observadas 33 bandas protéicas nas amostras de éguas em estro e 30 nas amostras de éguas em diestro. Na figura 1, pode ser observado um gel de eletroforese da secreção endometrial de égua em estro.

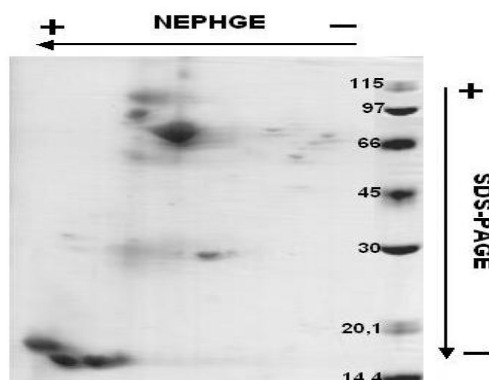


Fig 1. – Perfil eletroforético das proteínas da secreção endometrial da égua. Gel bideimensional SDS-PAGE a 12%, corado com Comassie Blue. A seta superior indica a direção do gradiente de pH não equilibrado (NHPHGE) na 1ª dimensão. Os marcadores de peso molecular, com seus respectivos pesos encontram-se à direita.

A presença de fibrose endometrial influenciou a densidade óptica das proteínas observadas na secreção uterina de éguas em estro. Em éguas sem evidência de fibrose endometrial, a densidade óptica da banda 5 foi maior ($P = 0,03$) do que a observada em amostras de éguas com fibrose, conforme pode ser observado na figura 2.

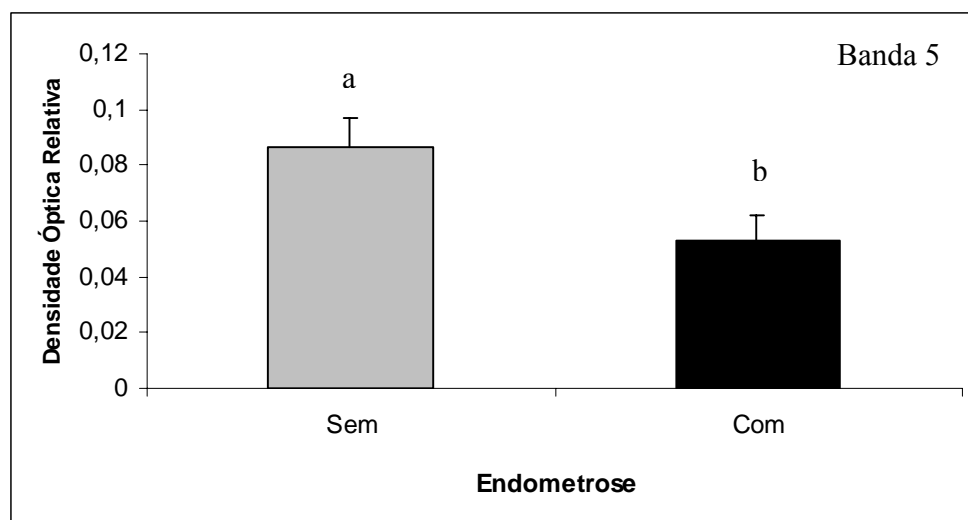


Figura 2: Quantidade relativa de proteína na banda 5, em éguas em estro, de acordo com a presença ou não de endometrose.

O perfil protéico da secreção, tanto de éguas em estro como em diestro, variou em função presença da inflamação endometrial no exame histopatológico. Na tabela 1, estão apresentadas as densidades ópticas relativas das bandas protéicas em que foi observada diferença significativa devido à inflamação.

Tabela 1: Densidade óptica relativa das bandas protéicas que apresentaram diferença significativa devido à inflamação endometrial, na secreção uterina de éguas em estro e diestro

Banda	PM	pI	Sem inflamação		Com Inflamação		<i>P</i>
			Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	
Estro							
5	15-16	8,9-9,3	0,056 ± 0,015	0,079 ± 0,040	0,014		
65	81-82	7,6-7,7	0,009 ± 0,005	0,022 ± 0,018	0,042		
Diestro							
11	26-28	8,9-9,3	0,469 ± 0,229	0,301 ± 0,154	0,008		
13	26-28	8,3-8,6	0,326 ± 0,144	0,498 ± 0,164	0,002		
41	47-48	7,8-7,9	0,049 ± 0,013	0,037 ± 0,011	0,018		
49	63-64	4,6-5,2	0,081 ± 0,015	0,095 ± 0,02	0,014		

Conforme se pode observar na tabela 1, a presença de inflamação influenciou a densidade óptica relativa em 2 bandas protéicas da secreção de éguas em estro e de 4 bandas na das éguas em diestro. Na secreção de éguas em estro, tanto na banda 5, quanto na banda 65, uma densidade óptica maior foi observada nas amostras de éguas apresentando inflamação endometrial, em comparação àquela das amostras de éguas sem inflamação. Com base no peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI), a banda 5 pode tratar-se do precursor da interleucina 4 (IL-4). Para a banda 65, não foi encontrada correspondência com nenhuma proteína identificada em eqüinos.

Não foi observada interação na densidade óptica relativa da banda 5 nas amostras de éguas em estro com inflamação e fibrose ($P = 0,132$).

Na secreção das éguas em diestro, nas bandas 11 e 41, foi observada uma densidade óptica maior nas amostras coletadas de éguas em diestro que não apresentavam inflamação endometrial, em comparação àquelas de éguas com inflamação. Por outro lado, nas bandas 13 e 49, foi observada maior densidade óptica nas amostras de éguas que apresentavam inflamação. Baseado nos PM e pI, a proteína da banda 11 poderia ser um MHC classe II, a banda 13 um fator de crescimento transformador beta (TGF- β), a banda 41 a Inibina β A e a banda 49 o precursor do componente C9 do sistema complemento.

A frequência relativa das diferentes bandas protéicas não foi influenciada pela fibrose nem pela inflamação endometrial, tanto no estro como no diestro.

Discussão

Através de eletroforese e imunohistoquímica, foram observadas alterações na secreção de proteínas da fase luteínica, em éguas com fibrose endometrial, (BADER et al., 1997; HOFFMANN et al., 2003).

Na secreção de éguas, em estro, que não apresentavam fibrose endometrial a proteína 5 apresentou densidade óptica superior, em comparação àquela de éguas com fibrose. Esta proteína provavelmente seja a IL-4, uma citocina, a qual, em certas situações, apresenta propriedades fibrinogênicas (SAKKAS, 2005). A atividade de citocinas pode ser regulada de várias formas diferentes – através da regulação da expressão de receptores, através de antagonistas de receptores, através de proteínas conjugadoras específicas e através de outras citocinas que exercem efeitos antagônicos (TIZARD, 1998). Uma ação de rotas inibitórias poderia ter levado à maior expressão de IL-4, nas secreções de éguas sem fibrose observada no presente trabalho.

A inflamação uterina afeta negativamente a fertilidade da égua. Éguas cobertas quando apresentavam endometrite aguda obtiveram uma taxa de prenhez menor do que aquelas cobertas sem evidência de inflamação endometrial (MATTOS et al., 1984). Um ambiente uterino incompatível à sobrevivência do embrião é considerada uma das formas pelas quais a endometrite persistente pós-cobertura leva a uma menor taxa de prenhez em éguas susceptíveis (LEBLANC, 2003). Após

infecção experimental, Keller et al. (2004) observaram uma neutropenia ao exame histopatológico em éguas susceptíveis com presença de bactéria e naquelas com inflamação crônica e permanência do agente, um predomínio de plasmócitos e linfócitos. Estes resultados levaram os autores a sugerir que a permanência do processo inflamatório, leva a uma refratariedade no recrutamento de novos neutrófilos. Diferenças na densidade óptica relativa foram observadas em quatro bandas protéicas, associadas ao processo inflamatório.

A banda 5 apresentou, também, uma maior densidade óptica relativa nas amostras de éguas em estro que apresentaram inflamação endometrial. Com base no PM e pI, esta proteína pode tratar-se de um precursor da IL-4, uma citocina produzida pelos linfócitos T e que atua na ativação de células B, melhorando a secreção de anticorpos e induzindo a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade classe 2 (MHC-II). A IL-4 exerce vários efeitos sobre a fisiologia dos neutrófilos, podendo retardar a apoptose e aumentar a fagocitose. Uma maior expressão desta banda protéica foi observada na secreção de éguas susceptíveis, antes da cobertura, em relação à de éguas resistentes (MALSCHITZKY et al., 2007b) sugerindo os autores que esta citocina apresenta um importante papel na indução da inflamação. Além de sua atividade pró-inflamatória, esta citocina pode estar envolvida em doenças alérgicas e possui, também, propriedades anti-inflamatórias, através da regulação da ação de proteínas supressoras da resposta às citocinas, cujo aumento de atividade pode estar relacionada a doenças inflamatórias (RATTHE, 2007). Sua ação anti-inflamatória pode ocorrer, também, pelo efeito inibitório que a IL-4 apresenta sobre a secreção da ciclooxigenase 2 (COX-2) (HONG et al., 2007).

Com base na correspondência de PM e pI, a proteína 49, com maior expressão nas éguas com inflamação, pode tratar-se de um precursor do componente C9 do sistema complemento, cuja função é dependente da ativação dos componentes C5 e C3b (TIZARD, 1998), que são os dois principais componentes deste sistema no endométrio da égua (TROEDSSON, 1997). O componente C9 é uma proteína pertencente à família das perforinas, que está envolvido na formação de um poro transmembrânico chamado de complexo de ataque de membrana (CAM), resultando na morte da célula alvo (TIZARD, 1998).

A proteína 13, com alta expressão nas amostras de éguas com inflamação no diestro, possivelmente seja um fator de crescimento transformador beta (TGF- β), que se origina nas plaquetas, macrófagos ativados e neutrófilos, entre outros. Esta classe de citocina pode ter efeitos tanto inibidores, através da redução da expressão de alguns receptores de interleucinas e do bloqueio de efeitos citotóxicos, como potencializadores da resposta imune, através da quimiotaxia de neutrófilos e monócitos (TIZARD, 1998). Em doenças inflamatórias crônicas, o TGF- β aumenta a indução do mRNA para a ciclooxigenase 2 (COX-2), da qual derivam as prostaglandinas (HONG et al., 2007). Uma maior quantidade do TGF- β foi observada em amostras de éguas susceptíveis à endometrite pós-cobertura, quando comparada àquela de éguas resistentes (MALSCHITZKY et al., 2007b). O TGF- β e a ativina β A induzem também a expressão de colágeno e outros componentes da matriz extracelular. Embora a deposição de colágeno seja necessária à reparação tecidual, ela representa uma forma comum de complicação da resposta inflamatória (SCHMIDT-WEBER & BLASER, 2004). A destruição da matriz extra-celular pode estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias, mantendo o processo inflamatório ativo por um período prolongado (MACKAY, 2000).

A proteína 41 provavelmente seja a Inibina β A, que pertence também à superfamília TGF- β (JONES et al., 2006), apresentou maior densidade óptica nas éguas sem inflamação. As inibinas são antagonistas das ativinas e, embora seus efeitos mais conhecidos ocorram no ovário, durante a diferenciação do folículo dominante, sua presença no endométrio humano foi demonstrada, através da imunohistoquímica e de cultivo celular (MYLONAS et al., 2004). A presença das inibinas no endométrio e em vários outros tecidos sugere que elas apresentem funções diversas. No endométrio, provavelmente exerça um efeito imuno-modulador, através da regulação local da função dos macrófagos (KEELAN et al., 2000). Embora a expressão da inibina não tenha sido descrita no endométrio da égua, sua importância em vários eventos reprodutivos em humanos, permite sugerir que a observação de uma maior densidade óptica da banda 41 nas éguas sem inflamação, pode refletir uma melhor capacidade de controle da inflamação, através do bloqueio dos efeitos da ativina. Por outro lado, a inibina é necessária durante a implantação do embrião humano no endométrio (JONES et al., 2006). Admitindo-se que seja necessária

também ao embrião equino, ainda que este apresente uma implantação tardia (STEWART et al., 2000), a presença de menor quantidade desta proteína nas éguas com inflamação endometrial pode ser um dos fatores determinantes do ambiente uterino incompatível com a sobrevivência do embrião, nas éguas que apresentam endometrite persistente pós-cobertura.

Com base no PM e pI, a proteína 11, com baixa expressão nas éguas com inflamação no diestro, poderia ser uma proteína pertencente às moléculas do complexo de histocompatibilidade maior tipo 2 (MHC-II). Estas moléculas têm como função a apresentação de antígenos aos linfócitos, estando presentes constitutivamente em praticamente todos os linfócitos T adultos em repouso dos equinos. As moléculas do MHC regulam a função imune, já que uma molécula somente pode estimular uma resposta depois de se conjugar ao MHC (TIZARD, 1998). Nas éguas com inflamação, foi observada uma menor densidade óptica na banda 11. O TGF- β liberado de tumores é capaz de inibir a expressão de moléculas do MHC-II, como forma de sobrepor os mecanismos de defesa do hospedeiro (WELLER & FONTANA, 1995). Um aumento da secreção de TGF- β parece também ser uma característica em doenças inflamatórias crônicas levando à fibrose, como a pneumonia intersticial dos humanos (COKER et al., 1997). Nas éguas que apresentaram inflamação, foi observado um possível aumento do TGF- β , e uma inibição poderia ser a causa da menor densidade óptica do MHC-II observada.

Estes resultados poderiam sugerir um efeito conjunto das proteínas durante o processo inflamatório no diestro. O componente C9 (proteína 49) auxiliaria o processo inflamatório, através da eliminação de agentes e células infectadas, enquanto que o nível elevado de TGF- β (proteína 13) poderia ser responsável pela manutenção do processo inflamatório, através da atração de neutrófilos e monócitos para o tecido inflamado. Porém, o nível elevado de TGF- β poderia estar causando a baixa expressão do MHC-II (proteína 41) nas éguas com inflamação endometrial, levando a uma menor eficiência na resposta inflamatória pelos linfócitos T. Por outro lado, a maior quantidade de inibina- β A (proteína 11) em éguas sem inflamação poderia ser atribuído ao seu efeito imuno-modulador.

Conclui-se que nas éguas em estro a inflamação e fibrose endometrial alteram apenas a quantidade de poucas proteínas no ambiente uterino. Por outro lado, durante

o diestro, a presença da inflamação alterou o ambiente uterino, havendo maior quantidade de proteínas inflamatórias, o que poderia também estar relacionado a uma menor capacidade de controle da inflamação por moléculas anti-inflamatórias.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eletroforese bidimensional possibilitou a avaliação da secreção endometrial pura da égua, permitindo observar que:

1 - A composição protéica da secreção uterina de éguas em diestro é diferente daquela de éguas em estro, podendo as proteínas estar envolvidas tanto na manutenção e desenvolvimento embrionário, quanto a um eventual processo inflamatório.

2 - Éguas não lactantes, cobertas no primeiro ciclo da temporada reprodutiva apresentam uma menor taxa de prenhez do que éguas cobertas a partir da 2ª ovulação. Esta redução da fertilidade pode estar relacionada a diferenças no ambiente uterino entre os dois ciclos, o que provavelmente esteja relacionado ao processo inflamatório da fase transicional.

3 - A secreção endometrial coletada antes da cobertura, de éguas susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura, é diferente daquela observada em éguas resistentes, estando as proteínas relacionadas ao processo inflamatório e a contratilidade uterina.

4 - O ambiente uterino de éguas em estro é pouco alterado pela inflamação e pela fibrose endometrial

5 - Durante o diestro, a composição protéica da secreção endometrial é alterada pela inflamação, havendo maior quantidade de proteínas inflamatórias, podendo indicar uma menor capacidade de controle da inflamação por moléculas com ação anti-inflamatória.

Os resultados apresentados neste trabalho requerem a confirmação da identidade das proteínas, através de seqüenciamento ou imuno identificação. No entanto, várias informações puderam ser obtidas e muitas novas perguntas podem ser geradas, em especial a partir dos resultados com as éguas susceptíveis.

Finalmente, embora seja possível, com novas tecnologias, conhecer mais profundamente os eventos moleculares que ocorrem no útero da égua, é fundamental, conforme recomenda Rosedale (1997), não deixar que este órgão passe a ser primariamente um assunto para pesquisa, mais que um órgão central à reprodução.

5. BIBLIOGRAFIA

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

ALLEN, W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**. V.121, p.513 – 527, 2001.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Sperm Function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993, p.715-745.

ASBURY, A.C. Some observations on the relationship of histologic inflammation in the endometrium of the mare to fertility. Proceedings of the 28th Annual convention of **AAEP**, p. 401-404, 1982.

AUPPERLE, H.; ÖZGEN, S.; SCHOON, H.-A.; SCHOON, D.; HOPPEN, H.-O.; SIEME, H.; TANNAPFEL, A. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. **Equine Vet. J.**, v.32, n.3, p.228-232, 2000.

AUPPERLE, H.; STEIGER, K.; REISCHAUER, A.; SCHOON, H.-A. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of the physiological and pathological inactivity of the equine endometrium. **Pferdeheilkunde**, v.19, n.6, p.629-632, 2003.

BADER, H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. **J Reprod Fertil**. v.32, p.59-64, 1982.

BADER, H.; KREMER, H.; VOGT, C.; SCHOON, H. A.; BEIER-HELLWIG, K. Investigations on the protein patterns of the equine uterine secretions as functional parameter of the endometrium. **Pferdeheilkunde**, v. 13, n. 5, p.13, 1997.

BALL, B.A.; LITTLE, T.V., HILLMAN, R.B. WOODS, G.L. Pregnancy rates at days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day in normal and subfertile mares, **Theriogenology**, v. 26, n. 5, p. 612-619, 1986.

BALL, B.A.; LITTLE, T.V.; WEBER, J.A.; WOODS, G.L. Survival of day-4 embryos from young, normal mares and aged subfertile mares after transfer to normal recipient mares. **J. Reprod. Fert.** v.85, n.1, p.187-194, 1989.

BALL, B.A.; SABOUER, K.; LABONTY, E. Characterization of a sperm protein responsible for sperm reservoir formation in the oviduct of the mare. **UCLA- Davis, Research Preview 2004-2005**, UC-Davis, p.29, 2003.

BATTUT, I.; PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Proteins synthesized and released by equine oviducts: Characterization, variations, and interactions with spermatozoa. **Biol Reprod Monov.**1, p. 131-140, 1995.

BEIER-HELLWIG, K.; KREMER, H.; BONN, B. LINDER, D.; BADER, H.; BEIER, H.M. Partial sequencing identification of three proteins of equine uterine secretion regulated by progesterone. **Reprod. Dom. Anim.**, n.30, p. 295-298, 1995.

BERGMAN, R.V.; KENNEY, R.M. Representativeness of a uterine biopsy in the mare. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, p. 355-361, 1975.

BOURKE, E.; CASSETTI, A.; VILLA, A.; FADLON, E.; COLOTTA, F.; MANTOVANI, A. IL-1 β scavenging by the type II IL-1 decoy receptor in human neutrophils, **J. Immunol.** v.170, p.5999–6005, 2003.

BRADY, H.A.; BLANCHARD, T.L.; EVANS, J.W.; VARNER, D.D.; BRUEMMER, J.E.; DAY, W.; SCHWAB, C.A.; RISEK, B.; GILULA, N.B.; BERGHARDT, R.C. Gap Junction expression in Equine Endometrium. **Biol Reprod Mono** v.1, p. 507-514, 1995.

BRAZIL, T.J.; MCGORUM, B.C. Molecules and mediators of inflammation in equine heaves: Mechanisms and markers of disease. **Equine Vet J.** v.33, n.2, p.113-115, 2001.

BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. A Practical Method for Recognizing Mares Susceptible to Post-breeding Endometritis. **49th Annual Convention of the AAEP**. New York, IVIS, 2003.

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

BRUNCKHORST, D.; SCHOON, H.-A.; BADER, H.; SIEME, H. Morphologische, enzym- und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus bei der stute. **Fertilität**, v.7, p.44-51, 1991.

CADARIO, M.E.; LOSINNO, L.; GIGUERE, S.; AGUILAR, J.; JACK, T.J.; MACPHERSON, M.; FITZPATRICK, C.; UHL, E.W. Uterine expression of fibrogenic cytokines in the mare. **Theriogenology**. v. 58, p.449-452, 2002.

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

CHENG, F.P.; GADELLA, B.M.; VOORHOUT, W.F.; FAZELI, A.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, B. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. **Biol Reprod**. v.59, n.4, p.733-742, 1998.

CHEUNG, A.T.W.; LIU, I.K.M.; WALSH, E.M.; MILLER, M.E. Phagocytic and killing capacities of uterine-derived polymorphonuclear leukocytes from mares resistant and susceptible to chronic endometritis. **American Journal of Veterinary Research**. v.46, n.9, p.1938-1940, 1985.

CHEVALIER, F.; PALMER, E. Ultrasonic ecography in the mare. **J. Reprod. Fert.** Supl. 32, p.423-430, 1982.

CLARK, J.H.; SCRADER, W.T.; O'MALLEY, B.W. Mechanisms of steroid hormone action. In: WITSON, J.D.; FORTEC, D.W. **Textbook of endocrinology** Philadelphia, W.B. Saunders, 1985. p. 33-75.

CLÉMENT, F.; VINCENT P.; MAHLA, R.; MERIAUX, J.C.; PALMER, E. Which insemination results in fertilization when several are performed before ovulation? **J. Reprod. Fert.**, v.56 (suplemento), p.579-585, 2000.

COKER, R.K.; LAURENT, G.J.; SHAHZEIDI, S.; LYMPANY, P.A.; DU BOIS, R.M.; JEFFERY, P.K.; MCANULTY, R.J. Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. **Am J Pathol.** v.150, n.3, p.981-991, 1997.

COLOTTA, F.; ORLANDO, S.; FADLON, E.J.; SOZZANI, S.; MATTEUCCI C.; MANTOVANI, A. Chemoattractants induce rapid release of the interleukin 1 type II decoy receptor in human polymorphonuclear cells, **J. Exp. Med.** v.181, p.2181–2186, 1995.

CROSSET, B.; ALLEN, W. R.; STEWART, F. A 19kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. **Biochem. J.**, n. 320, p. 137-143, 1996.

CURRY Jr, T.E.; OSTEEN, K.G. Cyclic Changes in the Matrix Metalloproteinase System in the Ovary and Uterus. **Biol. Reprod.** v.64, p.1285-1296, 2001.

DASCANIO, J.; TSCHETTER, J.; GRAY, A.; BRIDGES, K. Use of quantitative real-time polymerase chain reaction to examine endometrial tissue. **Animal Reproduction Science.** v.94, p.254-258, 2006.

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 Reproduction Science.** v.94 p.270–273, 2006.

DINARELLO, C.A., Biologic basis for Interleukin-1 in disease, **Blood.** v87, p.2095–2147, 1996.

DINARELLO, C.A. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation, **Curr. Opin. Pharmacol.** v.4, p.378–385, 2004.

DOBRINSKI, I.; SMITH, t. SUAREZ, S.; Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. **Biol Reprod**, Monography series, v.56, p. 861, 1995.

DOIG, P.A.; McNIGHT, J.D.; MILLER, R.B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. **Can. Vet. J.**, v. 22, p. 72-76, 1981.

DOIG, P.A.; WAELCHI, R.O. Endometrial Biopsy. IN: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. p. 225-233.

DONADEU, F.X; WATSON, E.D. Seasonal changes in ovarian activity: Lessons learnt from the horse. **Animal Reproduction Science** (2007), doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.12.001.

ELLINGTON, J.; BALL, B.A.; YANG, X. Binding of Stallion spermatozoa to the equine zona pellucida after coculture with oviductal epithelial cells. **J. Reprod. Fertil.** v.98, p.203-208, 1993.

ELLINGTON, J.E.; IGNOTZ, G.G.; VARNER, D.D.; MARCUCIO, R.S.; BALL, B.A. *In vitro* interaction between oviduct epithelia and equine sperm. **Archives of Andrology.** v.31, p.79-86, 1993.

EVANS, M.J.; HAMER, J.M.; GASON, L.M.; GRAHAM, C.S.; ASBURY, A.C.; IRVINE, C.H.C. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: effect of steroid hormone environment. **Theriogenology.** v.26, p.37-50, 1987.

FIALA, S.M.; PIMENTEL, C.A.; MATTOS, A.L.G.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare **Theriogenology.** v.67, n.3, p.556-562, 2007.

FIALA, S.M.; PIMENTEL, C.A.; STEIGER, K.; MATTOS, A.L.G.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Effect of skim milk and seminal plasma uterine infusions in mares. **Theriogenology.** v.58, n.2, p.491-494, 2002.

FLOOD, P.F. Fertilization, early development, and the establishment of the placenta. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993, p. 473-485.

FRASER, A.F. **The Behavior of the horse**. Oxon, Cabi Publishing, 1992. p.131-139.

FUMUSO, E.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; DAVID, O.; WADE, J.; ROGAN, D. Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. **Animal Reproduction Science**. v.94, p282-285, 2006.

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

GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L.; TORRES, C.A.A.; GINTHER, O.J. Effect of PGE2 on Uterine Contractility and Tone in Mares. **Theriogenology**, v.50, p.989-999, 1998

GERSTENBERG, C.; ALLEN, W.R. Development of equine endometrium glands: from fetal life to ovarian cyclicity. **Pferdeheilkunde**. v.13, p.549-550, 1997.

GERSTENBERG, C.; ALLEN, W.R.; STEWART, F. Proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. **J. Reprod. Fert.**, v.116, p.167-175, 1999.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic Imaging and Reproductive Events in Mare**. Cross Plains, WI: Equiservices, 1986, 378 pp.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects**, 2nd ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1992, 642 pp.

HAYES, K.E.N.; PIERSON, R.A.; SCRABA, S.T.; GINTHER, O.J. Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares. **Theriogenology**, v.24, p.465-477, 1985.

HEIN, K. Morpho-funktionelle Untersuchungen an der Cervix uteri und am Endometrium der Stute im Verlauf des Zyklus. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária), Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha. 2000.

HOFFMANN, C.; BAZER, F.W.; KLUG, J.; ALLEN, W.R.; AUPPERLE, H.; ELLENBERGER, C.; SCHOON, H.A. Morpho-funcional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions – preliminary results. **Pferdeheilkunde**. v. 19, n. 6, p. 666-669, 2003.

HONG, K.H.; CHO, M.L.; MIN, S.Y.; SHIN, Y.J.; YOO, S.A.; CHOI, J.J.; KIM, W.U.; SONG, S.W.; CHO, C.S. Effect of interleukin-4 on vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol*. v.147, n.3, p.573-579, 2007.

HUGHES, J.P.; LOY, R.G. The relation of infection to infertility in the mare and stallion. **Equine Vet. J.** v. 7, p.155-159, 1975.

IRVINE, C. H. G.: Hormonal causes of functional disorders of reproduction in the non-pregnant mare: their diagnosis and treatment. *ARS Veterinária*. v10, p.46-55, 1994.

IRVINE, C.H.G.; ALEXANDER, S.L. The role of environmental factors in reproduction in the mare. **ARS Veterinária**. v.10, n.2, p.33-41, 1994.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Immunobiology**. Fourth edition, Current Biology Publications, London, 1999, 635 pp.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G., HORN, A. P.; MATTOS, R. C. Bsp a1/a2-like proteins in ram seminal plasma. **Theriogenology**. v.63, p.2053 - 2062, 2005.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma and their relation with semen freezability. **Theriogenology**. v.61, p.255 - 266, 2004.

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

JONES, R.L.; STOIKOS, C.; FINDLAY, J.K.; SALAMONSEN, L.A. TGF- β superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. **Reproduction.** v.132, p.217 – 232, 2006.

KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO-JULIAN, F.; MANTOVANI, A.; FRANARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends Immunol.** v.24, p.25-29, 2003.

KATILA, T. Interactions of the uterus and semen. **Pferdeheilkunde**, v.13, n.5, p.508-511, 1997.

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

KATILA, T.; SANKARI, S.; MÄKELÄ, O. Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares, *J. Reprod. Fertil.* (2000) (Suppl. 56), pp. 571–578.

KEELAN, J.A.; ZHOU, R.L.; MITCHELL, M.D. Activin A exerts both pro- and anti-inflammatory effects on human term gestational tissues. **Placenta.** 2000 Jan;21(1):38-43

KELLER, A.; NEVES, A.P.; AUPPERLE, H.; STEIGER, K.; GARBADE, P.;SCHOON, H.-A.; KLUG, E.; MATTOS R.C. Repetitive experimental bacterial infections do not affect the degree of uterine degeneration in the mare **Animal Reproduction Science.** v.94 p.276–279, 2006.

KELLER, A.; NEVES, A. P.; AUPPERLE, H.; STEIGER, K.; SCHOON, H.- A.; KLUG, E.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais repetidas e cinco diferentes tratamentos:aspectos inflamatórios. **Acta Scientiae Veterinariae.** v.32, p.215 - 223, 2004.

KENNEY, R.M. Prognostic value of endometrial biopsy of the mare. **J. Reprod. Fertil.** v. 23 (suplemento), p 347-348, 1975.

KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on embryonic death. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.172, p.241-262, 1978.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine Endometrial Biopsy. IN: MORROW, D.A. **Current Therapy in Theriogenology**. 2 ed., p.723 - 729, 1986.

KNUTTI, B.; PYCOCK, J.F.; VAN DER WIJDEN, G.C.; KÜPFER, U. The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding **Equine Vet Educ** 12 (5): 2000, p.276-270.

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

KREMER, ET AL. Protein patterns of the equine uterine secretions as functional parameter of the endometrium. **Reprod. Dom. Anim.**, v.28, (suplemento), n.2, p.175, 1993.

LEBLANC, M.M. Effects of oxytocin, prostaglandin and phenylbutazone on uterine clearance of radiocolloid. **Pferdeheilkunde**. v.13, n.5, p.483-485, 1997.

LEBLANC, M.M. Persistent Mating Induced Endometritis. In: Robinson, N.E. **Current Therapy in Equine Medicine 5**. Philadelphia, W.B. Saunders, 2003, p.234-237.

LEBLANC, M.M., ASBURY, A.C.; LYLE, S.K. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. **Am. J. Vet. Res.**, v.50, n.6, 864-867, 1989.

LEBLANC, M.M.; NEUWIRTH, L.; ASBURY, A.C.; TRAN, T.; MAURAGIS, D.; KLAPSTEIN, E. Scintigraphic measurements of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Vet. J.**, v. 26, 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, p.49-54, 1998.

LECO, K.J.; KHOKHA, R.; PAVLOFF, N.; HAWKES, S.P.; EDWARDS, D.R. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. **J Biol Chem**. v. 269, p.9352–9360, 1994

LENZ, G.; MANOZZO, L.; GOTTARDO, S.; ACHAVAL, M.; SALBEGO, C.; RODNIGHT, R. Temporal profiles of the *in vitro* phosphorylation rate and immunocontent of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) after kainic acid induced lesions in area CA₁ of the rat hippocampus: demonstration of a novel phosphoprotein associated with gliosis. **Brain Res.**, v. 764, n. 1-2, p. 188-196, 1997.

LIU, I.K.M. The causes and significance of fluid accumulation in the uterus. J. P. Hughes Int. Workshop on Equine Endometritis. **Equine Vet J**. v.25, n.3, p.190, 1993.

LIU, I.K.M.; CHEUNG, A.T.W. Immunoglobulin and neutrophil defense against uterine infection in mares resistant and susceptible to chronic endometritis: a review. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.189, n.6, p.700-702, 1986.

LIU, I.K.M.; TROEDSSON, M.H.T.; MORAES, M.D. Correlations of endometrial biopsy with clinical response to intra-uterine bacterial inoculation. J. P. Hughes Int. Workshop on Equine Endometritis. **Equine Vet J**. v.25, n.3, p.188, 1993.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, W. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v.193, p.265-275, 1951.

MACKAY, R.J. Inflammation in Horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v.16, n.1, p.15-27, 2000.

MALSCHITZKY, E.; FIALA, S.M.; JOBIM, M.I.M.; ESMERALDINO, A.M.T.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C Avaliação do Perfil Protéico da Secreção Endometrial Pura da Égua Através da Eletroforese Bi-dimensional: Efeito do ciclo. In: MALSCHITZKY, E., Artigo 1, Avaliação do perfil protéico da secreção endometrial da égua. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias), UFRGS, 2007a.

MALSCHITZKY, E.; FIALA, S.M.; JOBIM, M.I.M.; ESMERALDINO, A.M.T.; GARBADE, P.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C Perfil protéico da secreção endometrial pura em éguas resistentes e susceptíveis á endometrite persistente pós-cobertura. In: MALSCHITZKY, E., Artigo 4, Avaliação do perfil protéico da secreção endometrial da égua. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias), UFRGS, 2007b.

MALSCHITZKY, E.; SCHILELA, A.; MATTOS, A.L.G.; GARBADE, P.; GREGORY, R.M., MATTOS, R.C. Effect of intra-uterine fluid accumulation during and after foal-heat and of different management techniques on the postpartum fertility of thoroughbred mares. **Theriogenology**. v. 58, p. 495-498, 2002.

MALSCHITZKY, E.; SCHILELLA, A.; MATTOS, A.L.G.; GARBADE, P.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Pregnancy and embryo loss rates in non-lactating mares bred in the first or in other estrus cycles during the breeding season. **Pferdeheilkunde**. , v.19, p.641 - 645, 2003.

MANTOVANI, A.; LOCATI, M.; VECCHI, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines, **Trends Immunol**. v.22, pp.328–336, 2001.

MATTOS, R. C.; MALSCHITZKY, E.; GREGORY, R. M. Effect of different postbreeding treatments on fertility of Thoroughbred mares. **Pferdeheilkunde**. v.13, n.5, p.512-515, 1997.

MATTOS, R.C., MATTOS, A.L.G.; GUNZEL, A.R.; KLUG, E. Bakteriologische und zytologische Untersuchungen von Uterusabstrichen beim Pferd. **Der Praktische Tierarzt**. v.65, p.809-814, 1984.

MATTOS, R. C.; MEIRELLES, L. S.; MALSCHITZKY, E.; NEVES, A. P.; MATTOS, A. L. G.; VIEIRA, M. J.; KELLER, A.; HÖTT, A. K.; GREGORY, R. M. Oxytocin, plasma containing leukocytes or combination of both as treatment of postbreeding endometritis. **Pferdheilkunde**. v.15, n.6, p.584-587, 1999.

MCGOUGH, A.M.; STAIGERB, C. J; MINA, J.K.; SIMONETTIA, K.D. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions **FEBS Letters**, v.552, p.75-81, 2003.

MCILWRAITH, C.W. Diseases of joints, tendons, ligaments and related structures. In: STASHAK, T.S. **Adam's Lameness in Horses**. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

MCMAHAN, C.J.; SLACK, J.L.; MOSLEY, B.; COSMAN, D.; LUPTON, S.D.; BRUNTON, L.L.; GRUBIN, C.E.; WIGNALL, J.M.; JENKINS, N.A.; BRANNAN, C.I.; COPELAND, N.G.; HUEBNER, K.; CROCE, C.M.; CANNIZZARRO, L.A.; BENJAMIN, D.; DOWER, S.K.; SPRIGGS, M.K.; SIMS, J.E., A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types, **EMBO J**. v.10, p.2821–2832, 1991.

MEYERS, S.A. Sperm Physiology. In: SAMPER, J.C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Philadelphia, W.B. Saunders, 2000. p.27-39.

MEYERS, S.A.; LIU, I.K.M.; OVERSTREET, J.W. Sperm-zona pellucida binding and zona-induced acrossome reactions in the horse: comparison between fertile and infertile males. **Theriogenology**. v.46, p.1277-1288, 1996.

MEYERS, S.A.; OVERSTREET, J.W.; LIU, I.K.; DROBNIS,. EZ. Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrossome reactions in fertile and subfertile males. **J Androl**. v.16, n.1, p.47-54, 1995.

MYLONAS, I.; JESCHKE, U.; WIEST, I.; HOEING, A.; VOGL, J.; SHABANI, N.; KUHN, C.; SCHULZE, S.; KUPKA, MS.; FRIESE, K. Inhibin/activin subunits alpha, beta-A and beta-B are differentially expressed in normal human endometrium throughout the menstrual cycle **Histochem Cell Biol**. v.122, n.5, p.461-471, 2004.

MYLONAS, I.; MAKOVITZKY, J.; HOEING, A.; RICHTER, D.U.; VOGL, J.; SCHULZE, S.; JESCHKE, U.; BRIESE, V.; FRIESE, K. Inhibin/activin subunits beta-A (-betaA) and beta-B (-betaB) are differentially localised in normal, hyperplastic and malignant human endometrial tissue. **Acta Histochem.** v.108, n.1, p.1-11, 2006.

NETT, T.M.; PICKETT, B.W.; SQUIRES, E.L. Effect of equimate (ICI-81008) on levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and progesterone during the oestrus cycle of the mare. **J.Anim.Sci.** v.48, p.69-75, 1979.

NEVO, Y.; NELSON, N. The NRAMP family of metal-ion transporters **Biochimica et Biophysica Acta** v.1763, p.609–620, 2006.

NEWCOMBE, J.R. The effect of the incidence and depth of intra-uterine fluid in early dioestrus on pregnancy rate in mares. **Pferdeheilkunde**, v.13, p.545, 1997.

NIKOLAKOPOULOS, E.; KINDAHL, H.; WATSON, E.D. Oxytocin and PGF-2 alpha release in mares resistant and susceptible to persistent mating induced endometritis. **J. Reprod. Fertil.** v.56 (Suplemento), p.363-372, 2000.

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

NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E.D. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. **Theriogenology.** v.52, n.3, p.413-423, 1999.

NOYES, W.R. The fertilizing capacity of spermatozoa. **West. J. Surg. Obstet. Gynecol.** v.61, p.342-349, 1953.

O'FARREL, P. Z.; GOODMAN, H. M.; O'FARREL, P. H. High resolution of two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell.** v.12, p.1133-1142, 1977.

ODDSDOTTIR, C.; RILEY, S.C.; LEASK, R.; WATSON, E.D. Activities of matrix metalloproteinases-9 and -2 are increased in acute equine endometritis. **Animal Reproduction Science**. v.94 p.280–281, 2006.

ORLANDO, S.; MATTEUCCI, C.; FADLON, E.J.; BUURMAN, W.A.; BARDELLA, M.T.; COLOTTA, F.; INTRONA, M.; MANTOVANI, A. TNF- α , unlike other pro- and anti-inflammatory cytokines, induces rapid release of the IL-1 type II decoy receptor in human myelomonocytic cells. **J. Immunol.** v.158, p.3861-3868, 1997a

ORLANDO, S.; SIRONI, M.; BIANCHI, G.; DRUMMOND, A.H.; BORASHI, D.; YABES, D.; MANTOVANI, A. Role of metalloproteases in release of the IL-1 type II decoy receptor. **J. Biol. Chem.** v.272, p.31764-31769, 1997b.

ÖZGEN, S.; RASCH, K.; KROPP, G.; SCHOON, H.A.; AUPPERLE, H.; SIEME, H.; KLUG, E. Aetiopathogenesis and Therapy of Equine Hydromucometra: Preliminary Data. **Pferdeheilkunde**. v.13, p.533-536, 1997.

PALMER, E.; GUILLAUME, D. Control Mechanisms of the Seasonal Ovarian Activity of the Mare. **Anais do IX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, p. 21- 33, 1989.

PARENT, J.; FORTIER, M.A. Expression and Contribution of Three Different Isoforms of Prostaglandin E Synthase in the Bovine Endometrium **Biol Reprod.** v.73, p.36 – 44, 2005

PARKS, J.E.; HAMMERSTEDT, R.H. Development changes occurring in the lipids of ram epididimal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v.32, p.653-668, 1985.

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

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P.; MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VOSS, J.L. **Management of the Stallion for maximum reproductive efficiency, II**. Fort Collins: Colorado State University, 1989.

PILLAR, V.D.P. **Multiv – Software para análise multivariada, auto-reamostragem boodstrap e testes de aleatorização**. Porto Alegre, Departamento de Ecologia, UFRGS, 2000.

PYCOCK, J.F.; PACCAMONTI, D.; JONKER, H.; NEWCOMBE, J.; VAN DER WEIJDEN, G.; TAVERNE, M. Can mares be classified as resistant or susceptible to recurrent endometritis? **Pferdeheilkunde**. v.13, n.5, p.431-436, 1997.

RATTHÉ, C.; PELLETIER, M.; CHIASSON, S.; GIRARD, D. Molecular mechanisms involved in interleukin-4 (IL-4)-induced human neutrophils: expression and regulation of suppressor of cytokines signaling (SOCS). **J. Leukocyte Biology**. v.81, p. 1-10, 2007.

RAULO, S.M.; SORSA, T.; TERVAHARTIALA, PIRILÄ, E.; MAISI, P. MMP-9 as a marker of inflammation in tracheal epithelial lining fluid (TELF) and in bronchialveolar fluid (BALF) in COPD horses. **Equine Vet. J.** v.33, n.2., p.128-137, 2001.

REILAS, T. Uterine luminal environment of the mare. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Helsinki, Finlândia. 2001.

REILAS, T.; KATILA, T.; MAKELA, O.; HUHTINEN, M.; KOSKINEN, T. Intrauterine fluid accumulation in oestrus mares. **Acta Vet Scand** v.38, n.1, 69-78, 1997.

RICKETTS, S.W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **J. Reprod. Fert**, v.23, p.341-345, 1975.

RICKETTS, S.W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Vet. J.**, v. 23, p.189-192, 1991.

RICKETTS, S.W.; BARRELET, A. A retrospective review of the histopathological features seen in a series of 4241 endometrial biopsy samples collected from UK Thoroughbred mares over a 25 year period. **Pferdeheilkunde**, v.13, n.5, p.525-530, 1997.

RICKETTS, S.W.; BARRELET, A. The ability of mares to respond to treatment for uterine abnormalities diagnosed by endometrial biopsy and some causes for failure to respond – A review of 1099 cases. **Pferdeheilkunde**, v.17, n.6, p.644-649, 2001.

RODNIGHT, R.; ZAMANI, R.; TWEEDALE, A. An investigation of experimental conditions for studying phosphorylation in micro-slices of rat brain by two-dimensional electrophoresis. **Journal of Neuroscience Methods**, v.24, p.27-38, 1988.

ROSER, J.F.; VALCHECK, D.E.; LASLEY, B.L.; LIU, I.K.M.; KOJUSNER, G.; TAYA, K. Minimizing the incidence of endometritis by predicting the first ovulation of the year. **Pferdeheilkunde**, v.13, p.539, 1997.

ROSSDALE, P. D. The uterus, an organ of many roles. **Pferdeheilkunde**, v.13, p.427-439, 1997.

ROSZEL, J.F.; FREEMAN, K. Citología endometrial equina. In: VAN CAMP, S. **Clínicas Veterinarias de Norteamérica: Practica Equina**. Buenos Aires, Inter.-medica, 1993. p.115-134.

SAKKAS, L.I. New Developments in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. **Autoimmunity**, v.38, n.2, p.113-116, 2005.

SCHMIDT-WEBER, C.B.; BLASER, K. The role of TGF-beta in allergic inflammation. **Immunol Allergy Clin North Am**. v.26, n.2, p.233-244, 2006.

SCHMITT, F. L. A concentração, a composição e a qualidade do plasma seminal na preservação do sêmen equino a +4°C. **Dissertação** (Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2002.

SCHOON, H.A.; SCHOON, D. The Category I mare (Kenney & Doig, 1986): Expected foaling rate 80-90% - Fact or fiction? **Pferdeheilkunde**, v.19, n.6, p.698-701, 2003.

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. **Pferdeheilkunde**. v.8, p.355-362, 1992.

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Die Endometrium biopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. **Pferdeheilkunde**. v.13, p.453-464, 1997.

SCHOON H.-A.; SCHOON, D.; WIEGANDT, I.; BARTMANN, C.P.; AUPPERLE, H. Endometrial Maldifferentiation – A clinically significant diagnosis in equine reproduction? **Pferdeheilkunde**, v.15, n.6, p.555-559, 1999.

SCHOON H.-A.; WIEGANDT, I.; SCHOON, D.; AUPPERLE, H; BARTMANN, C.P. Functional disturbances in the endometrium of barren mares; a histological and immunohistological study. **J. Reprod. Fert.** v.56 (suplemento), p. 381-391, 2000

SCOTT, M.A.; LIU, I.K.M.; OVERSTREET, J.W.; ENDERS, A.C. The structural morphology and epithelium association of spermatozoa at the uterotubal junction: A descriptive study of equine spermatozoa in situ, using scanning electron microscopy. **J. Reprod. Fertil.** Suppl 56, p.415-421, 2000.

SCOTT, M.A.; VARNER, D.D.; LIU, I.K.M.; ENDERS, A.C. Presumptive evidence of a preovulatory reservoir in the mare: morphological investigation using scanning electron microscopy. **Theriogenology**. v.58, p.639-642, 2002.

SCUDAMORE, C.L.; PEMBERTON, A.D.; MILLER, H.R.P.; MCDONNEL, A.M.; THOMSON, S.R.M.; DAWSON, A.; WATSON, E.D. Measurement by ELISA of equine alpha-1-proteinase inhibitor in uterine flushings of mares. **Res. Vet. Sci.** v.57, p.45-52. 1994.

SHARKEY, A. Cytokines and Implantation. **Reviews of Reproduction** v.3, p.52–61, 1998.

SHEMESH, M. Actions of gonadotrophins on the uterus. **Reproduction**, v.121, p.835–842, 2001.

SIEGMUND, B. Interleukin -1 β converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. **Biochemical Pharmacology**. v.64, p.1-8, 2002.

SIMS, J.E.; ACRES, R.B.; GRUBIN, C.E.; MCMAHAN, C.J.; WIGNALL, J.M.; MARCH C.J.; DOWER, S.K. Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.86, p.8946-8950, 1989.

SIMS, J.E.; GAYLE, M.A.; SLACK, J.L.; ALDERSON, M.R.; BIRD, T.A.; GIRI, J.G.; COLOTA, F.; RE, F.; MANTOVANI, A.; SHANEBECK, K.; GRABSTEIN, K.H.; DOWER, S.K. Interleukin-1 signaling occurs exclusively via the type 1 receptor. **Proc.Natl. Acad. Sci.** v.90, p.6155-6159, 1993.

SOORANNA, S.R.; GRIGSBY, P.L.; ENGINEER, N.; LIANG, Z.; SUN, K.; MYATT, L.; JOHNSON, M.R. Myometrial prostaglandin E2 synthetic enzyme mRNA expression: spatial and temporal variations with pregnancy and labour. **Mol Hum Reprod**. v.12, n.10, p.625-631, 2006.

STEINBJÖRNSSON, B.; KRISTJANSSON, H. Sexual behavior and fertility in Icelandhorse herds. **Pferdeheilkunde**. v.15, n.6, p.481-490, 1999.

STEWART, F.; GERSTENBERGER, C.; SUIRE, S.; ALLEN, W.R. Immunodetection of a novel endometrial protein (p19) in the pregnant mare. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 56, p.593-599, 2000.

SUAREZ, S.S. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation. **Biol Reprod**. v.58, p.1105 - 1107. 1998.

THOMAS, P.G.; BALL, B.A.; BRINSKO, S.P. Interaction of equine spermatozoa with oviductal epithelial cell expellant is affected by estrous cycle and anatomic origin of explants. **Biol Reprod**, v.51, n.2, p. 222-228, 1994

THOMAS, P.G.A.; BALL, B.A.; BRINSKO, S. Changes associated with induced Capacitation Influence the interaction between Equine spermatozoa and oviductal epithelial cell monolayers. **Biol Reprod Mono.** v.1, p. 697-705, 1995.

TIZARD, I. *Imunologia Veterinaria*. São Paulo, Roca, 1998. 545 pp.

TOMANELLI, R.N.; SERTICH, P.L.; WATSON, E.D. Concentrations of oestrogen and progesterone receptor in the endometrium of the mare. **J. Reprod. Fert.** v.44 (suplemento), p.267-273, 1991.

TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.159-170, 2005.

TROEDSSON, M.H.T. Uterine response to semen deposition in the mare. IN: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1995. Proceedings, San Antonio, Texas, p.130-134, 1995.

TROEDSSON, M.H.T. Diseases of the uterus. In: ROBINSON, N.E. **Current Therapy in Equine Medicine 4**. Philadelphia, W.B. Saunders, p.517-524, 1997.

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUGES, A.L.; HANSEN, P.J.; BUHI, W.C. Equine seminal plasma proteins protect live spermatozoa from PMN-binding and phagocytosis, while providing a mechanism for selective sperm elimination of apoptotic and dead spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.4, p. 60-61, 2006.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M. Uterine clearance of non-antigenic markers (⁵¹Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. **J. Reprod. Fert.** v.44 (Suplemento), p.283-288, 1991.

TROEDSSON, M.H.T; LIU, I.K.M.; CRABO, B.G. Sperm Transport and Survival in the Mare: A Review. **Theriogenology**, v.50, p.807-818, 1998.

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

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; THURMOND, M. Function of Uterine and Blood-Derived Polymorphonuclear Neutrophils in Mares Susceptible and Resistant to Chronic Uterine Infection: Phagocytosis and Chemotaxis. **Biol. Reprod.** v. 49, p. 507-514, 1993b.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; THURMOND, M. Immunoglobulin (IgG and IgA) and Complement (C3) concentrations in uterine secretion following an intrauterine challenge of *Streptococcus zooepidemicus* in mares susceptible to versus resistant to chronic uterine infection. **Biol. Reprod.** v.49, p.502-506, 1993c.

TROEDSSON, M.H.T., STEIGER, B.N., IBRAHIM, N.M., FOSTER, D.N. CRABO, B.G. Mechanism of sperm induced endometritis in the mare. **Biol. Reprod.** v.52(Suplemento), p.307, 1995.

TUNÓN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MGNUSSON, U. Distribution of T-cells in the endometrium of norma and subfertile mares during oestrus. **Pferdeheilkunde.** v.13, p.555-556, 1997.

VIEIRA, M. J.; HÖTT, A .K.; MALSCHITZKY, E.; KELLER, A.; WALD, V.B.; MATTOS, A.L.G.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Antimicrobial agents in extender and their effect on semen preservation and pregnancy rate of inseminated mares. **Theriogenology**, n.58, p.667-670, 2002.

WATSON, E.D. Uterine defense mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: a review. **Equine Vet J.** v.20, n.6, p.397-400, 1988.

WATSON, E.D.; BAE, S.E.; ARMSTRONG, D.G. Molecular and functional characteristics of dominant follicles during spring transition in mares: a review. **Pferdeheilkunde.** v.19, n.6, 613-618, 2003

WATSON, E.D.; SKOLNIK, S.B.; ZANECOSKY, H.G. Progesterone and Estrogen Receptor Distribution in the Endometrium of the Mare. **Theriogenology**, v.38, p.575-580, 1992

WEBER, J.A.; WOODS, G.L.; FREEMAN, D.A.; VANDERWALL, D.K. Prostaglandin E2-specific binding to the equine oviduct. **Prostaglandins.** v.43, n.1, p.61-65, 1992.

WELLER, M.; FONTANA, A. The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. **Brain Res Brain Res Rev.** v. 21, n.2, p.128-151, 1995

WIDDERS, P.R.; STOKES, C.R.; DAVID, J.S.; BOURNE, F.J. Quantitation of the immunoglobulins in reproductive tract secretions of the mare. *Res Vet Sci.* v.37, n.3, p.324-330, 1984.

WILKINS, P. A. Interstitial Pneumonia. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in Equine Medicine 5**. Philadelphia, W.B. Saunders, 425-429, 2003.

WINGFIELD DIGBY, N.J. The technique and clinical application of endometrial cytology in mares. **Equine Vet. J.** v.10, p167-170, 1978.

WOODS, G.L.; BERGFELT D.R.; GINTHER, O.J. Effect of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. **Equine Vet J.** v.22, p.410-415, 1990.

YANAGIMACHI, R. Mammalian Fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The Physiology of Reproduction**, 2 ed. New York, Raven Press, p.198-317, 1994.

ZAVY, M.T.; BAZER, W.F.; SHARP D.C.; WILCOX C. J. Uterine Luminal Proteins in the Cycling Mare **Biol Reprod**, v.20, p.689-698, 1979.

ZAVY, M.T.; SHARP, D.C.; BAZER, F.W; FAZLEABAS, A.; SESSIONS, F.; ROBERTS, R.M. Identification of stage-specific and hormonally induced polypeptides in the uterine protein secretions of the mare during the oestrus cycle and pregnancy. **J.Reprod. Fertil.** v.64, p.199-207, 1982.