

ANA KARINA ARGUMEDO JIMÉNEZ

**INFLUÊNCIA NO PROTEINOGRAMA E NO ESTRESSE OXIDATIVO EM ÉGUAS
ACOMETIDAS E NÃO ACOMETIDAS COM ENDOMETRITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Leandro Abreu da Fonseca

Coorientadora: Bruna Waddington de Freitas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A694i
2021 Argumedo Jiménez, Ana Karina, 1990-
Influência no proteinograma e no estresse oxidativo em
éguas acometidas e não acometidas com endometrite / Ana
Karina Argumedo Jiménez. – Viçosa, MG, 2021.
1 dissertação eletrônica (75 f.): il.

Inclui apêndice.

Orientador: Leandro Abreu da Fonseca.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.384>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Éguas - Doenças. 2. Endometrite. 3. Especies reativas de
oxigênio. 4. Haptoglobinas. I. Fonseca, Leandro Abreu da,
1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.10898142

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

ANA KARINA ARGUMEDO JIMÉNEZ

**INFLUÊNCIA NO PROTEINOGRAMA E NO ESTRESSE OXIDATIVO EM ÉGUAS
ACOMETIDAS E NÃO ACOMETIDAS COM ENDOMETRITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de março de 2021.

Assentimento:



Ana Karina Argumedo Jiménez
Autora



Documento assinado digitalmente
LEANDRO ABREU DA FONSECA
Data: 26/06/2023 14:03:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Leandro Abreu da Fonseca
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus pela virtude da vida e por permitir mais essa conquista em minha vida.

A minha família, em especial a meus pais, meu irmão e Marge.

Ao Dante, meu companheiro de vida! e a sua família por me acolher.

A Sara e Luana, assim como a todas aquelas pessoas maravilhas que conheci no meu passo por Brasil.

Aos meus amigos da Colômbia Angie, Andrés, Adriana, Deisy, Camilo, Lina e Pifi, que sempre estiveram presentes com todo seu carinho e apoio constante.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Veterinária pela contribuição para minha formação profissional.

Aos professores e funcionários do Departamento de Veterinária, pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

Ao pessoal do LPPCV: Andrés, Lorraine, Thais, Fabricia, Polly e Wilson.

Ao professor Leandro Licursi, Alessandra, Amanda e Daniel pela ajuda e conhecimentos compartilhados.

A Cintia, Aécio, Yurandí, Carlos Matos, Giancarlo M., Mateus, Lidiany e todas as pessoas que fizeram possível meu trabalho.

Ao professor Leandro Abreu e a profa. Bruna Waddington por me orientar neste trabalho.

A Rosi, pela força e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

JIMÉNEZ, Ana Karina Argumedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2021. **Influência no proteinograma e no estresse oxidativo em éguas acometidas e não acometidas com endometrite.** Orientador: Leandro Abreu da Fonseca. Coorientadora: Bruna Waddington de Freitas.

A endometrite é a principal causa de subfertilidade e infertilidade nas éguas. O presente estudo teve o objetivo de analisar o proteinograma e o status oxidativo no soro e fluido uterino de éguas saudáveis e acometidas por endometrite. Foram utilizadas 15 éguas no estro, as quais foram divididas em dois grupos, éguas com endometrite (grupo doente, n=8) e éguas sem doenças reprodutivas (grupo sadio, n=7). Foram colhidas amostras de sangue e do fluido uterino para análise em eletroforese monodimensional em gel de poliacrilamida das proteínas presentes no soro e no fluido uterino, assim como se avaliou a atividade de substâncias oxidantes e antioxidantes. Foi observada diferença estatística significativa em sete das 10 proteínas avaliadas no soro de éguas acometidas com endometrite e éguas sadias neste estudo, entre elas a $\alpha 2$ – macroglobulina ($\alpha 2$ -macro); haptoglobina (Hp); e apolipoproteína A1 (Apo A1), quando $p < 0.05$. No fluido uterino, de identificaram bandas nos géis dos dois grupos, com diferentes pesos moleculares. As atividades antioxidante séricas de algumas enzimas tiveram diferenças estatísticas significativas. O óxido nítrico (NO) sérico teve diferença significativa entre os grupos (0,0003), tendo maior atividade no grupo sadio em comparação com o grupo doente. Entre os resultados promissórios nosso trabalho esteve a diminuição dos níveis de a Apo A1, no grupo doente quando comparado com o grupo sadio, o qual é um indicativo de um processo inflamatório maior no grupo com endometrite, devido a esta proteína de fase aguda (PFA), ser considerada uma PFA negativa. Pode-se concluir que os resultados batem os o esperado.

Palavras-chave: Inflamação. Haptoglobina. Transferrina. Ceruloplasmina. Espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

JIMÉNEZ, Ana Karina Argumedo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2021. **Influence on the proteinogram and oxidative stress in mares affected and not affected by endometritis.** Adviser: Leandro Abreu da Fonseca. Co-adviser: Bruna Waddington de Freitas.

Endometritis is the main cause of subfertility and infertility in women. The present study aimed to analyze the proteinogram and the oxidative status in the blood and uterine fluid of healthy and affected by endometritis females. Five females were used in cello, which were divided into two groups, females with endometritis (diseased group, n=8) and females without reproductive illnesses (healthy group, n=7). Samples of blood and uterine fluid were collected for analysis in monodimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins present in uterine serum and fluid, as well as the activity of oxidant and antioxidant substances. A statistically significant difference was observed in the series of the 10 proteins evaluated in the serum of mares affected with endometritis and healthy mares in this study, including α_2 – macroglobulin (α_2 -macro); haptoglobin (Hp); and apolipoprotein A1 (Apo A1), when $p < 0.05$. In the uterine fluid, bands were identified in the gels of both groups, with different molecular weights. The serum antioxidant activities of some enzymes showed statistically significant differences Nitric oxide (NO) serum showed a significant difference between the groups (0.0003), with greater activity in the healthy group compared with the sick group and the healthy group, which is indicative of a greater inflammatory process in the group with endometritis, due to this acute phase protein (APP) is considered a negative APP. It can be concluded that the results exceeded expectations.

Keywords: Inflammation. Haptoglobin. Transferrin. Ceruloplasmin. Reactive oxygen species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – $\alpha 2$ – macroglobulina ($\alpha 2$ –macro); ceruloplasmina (Cp); transferrina (Trf); albumina (alb); haptoglobina (Hp); glicoproteína ácida (GPA). Dados expressos em média \pm SD (* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$) 62

Figura 2 – $\alpha 1$ – antitripsina ($\alpha 1$ –antitrip); IgG de cadeia pesada (cp); glicoproteína ácida (GPA); IgG de cadeia leve; apolipoproteína A1 (Apo A1). Dados expressos em média \pm SD (* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$) 62

Figura 3 – Gel de poliacrilamida do soro dos grupos doente e grupo sadio. Grupo Doente: CPT F8; CPT F 12; CPT F16; CPT F 17; CPT F 22; CPT F 23; CPT F 28; CPT F 34. Grupo Sadio: CONTROL F 2; CONTROL F 3; CONTROL F 5; CONTROL F 6; CONTROL F 7; CONTROL F 8; CONTROL F 9; CONTROL F 10. PM: peso molecular; BSA: albumina de soro bovino; MALDI equino..... 63

Figura 4 – Mini gel de poliacrilamida do fluido uterino dos grupos controle e grupo sadio. (A): Grupo Doente: CPT F8; CPT F 12; CPT F16; CPT F 17 e Grupo Sadio: CONTROL F 2; CONTROL F 3; CONTROL F 5; CONTROL F 6. (B): Grupo Doente: CPT F 22; CPT F 23; CPT F 28; CPT F 34 e Grupo sadio: CONTROL F 7; CONTROL F 8; CONTROL F 9; CONTROL F 10. PM: peso molecular..... 63

Figura 5 – Análise dos níveis em soro de malondialdeído (MDA), capacidade de redução férrica (FRAP) e proteína carboniladas (C.P) 67

Figura 6 – Análise dos níveis em fluido uterino de malondialdeído (MDA), capacidade de redução férrica (FRAP) e proteína carboniladas (C.P)67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de referência de éguas com e sem endometrite e média e desvio-padrão ($p < 0,05$) dos exames admissionais (hematócrito, leucograma) do grupo sadio e grupo doente. 60

Tabela 2 – Média e desvio-padrão das proteínas do grupo sadio e doente (com endometrite)61

Tabela 3 – Médias \pm desvio padrão dos pesos moleculares (PM) das proteínas detectadas no fluido uterino de éguas sem endometrite.....64

Tabela 4 – Médias \pm desvio padrão dos pesos moleculares (PM) das proteínas detectadas no fluido uterino de éguas com endometrite.....65

Tabela 5 – Médias \pm desvio padrão dos marcadores de estresse oxidativo de em soro de animais do grupo sadio e grupo de éguas com endometrite..... 66

Tabela 6 – Médias estimadas \pm desvio padrão das concentrações de analitos do perfil oxidativo de em fluido uterino de animais do grupo sadio e grupo de éguas com endometrite.....67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Alb	Albumina
Apo A1	Apolipoproteína A1
ATP	Adenosina trifosfato
α 2 – macro	Alfa 2 macroglobulina
α 1 – antitrip	Alfa 1 antitripsina
CAT	Catalase
DAMP	Padrões Moleculares Associados a Danos teciduais
Cp	Ceruloplasmina
DAMP	Padrões Moleculares Associados a Perigo
EC	Escore de Condição Corporal
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
FRAP	Capacidade de redução férrica
GPA	Glicoproteína ácida
GST	Glutathione S-transferase
Hb	Hemoglobina
Hp:	Haptoglobina
IFN- α	Interferon tipo alfa
IFN- γ	Interferon-gama
IGF-1	Fator de Crescimento insulina-símile
tipo 1IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
mRNA	RNA mensageiro
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido Nítrico
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PM	Peso molecular
PMN	Polimorfonucleados
Ptn	carbonilada: Proteína carbonilada
EO	Estresse Oxidativo

SOD Superóxido Dismutase

TBARS Ácido Tiobarbitúrico

TNF- α Fator de Necrose Tumoral Alfa

Trf transferrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	12
1.1	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
	CAPITULO I	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Introdução	19
2.2	Classificação da Endometrite	20
2.2.1	Endometrite persistente pós-cobertura.....	20
2.2.2	Endometrite infecciosa	21
2.3	Diagnostico da endometrite	21
2.3.1	Diagnóstico clínico: histórico, exame físico e palpação retal	21
2.3.2	Ultrassonografia.....	22
2.3.3	Citologia.....	22
2.3.4	Cultura	23
2.3.5	Biópsia endometrial	23
2.4	Mediadores da resposta inflamatória na endometrite	24
2.4.1	Resposta inflamatória uterina	24
2.4.2	Ativação da resposta imune	24
2.4.3	Componentes da resposta imune avaliados em éguas com endometrite 25	
2.4.4	Proteínas de Fase Aguda	29
2.4.5	Estresse Oxidativo.....	34
2.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
	CAPITULO II	49
3	PROTEINOGRAMA E STATUS OXIDATIVO NO SORO E NO FLUIDO	

UTERINO DE ÉGUAS SADIAS E ACOMETIDAS POR ENDOMETRITE ..49

3.1	INTRODUÇÃO	49
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.3	RESULTADOS	55
3.4	DISCUSSÃO.....	62
3.5	CONCLUSÃO	70
3.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos líderes mundiais em biotecnologias reprodutivas em equinos, juntamente com a Argentina e os Estados Unidos (ALVARENGA, 2017). As biotecnias da reprodução buscam maximizar resultados e otimizar a vida reprodutiva dos animais melhorando o retorno financeiro de quem investe nesta atividade. Não obstante, existem algumas patologias reprodutivas que podem afetar o desempenho reprodutivo das éguas, sendo a endometrite, a principal causa de subfertilidade na fêmea equina. Essa enfermidade caracteriza-se pelo acúmulo de líquido no interior do útero, com a presença de células polimorfonucleares para o lúmen uterino, e aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios e, conseqüentemente, baixas taxas de fertilidade.

Os principais fatores predisponentes da endometrite nas éguas são defeitos anatômicos, partos distócicos, retenção de placenta, processos iatrogênicos e, fatores ligados à resposta imunológica uterina (WOODWARD; TROEDSSON, 2015). O útero da égua é mantido livre de contaminantes através de mecanismos físicos, imunológicos e de um sistema linfático funcional. Na espécie equina, independentemente do método de cobertura o sêmen é depositado na luz uterina, portanto, neste momento as barreiras físicas (vulva, prega vestibulo vaginal y cervix), são ultrapassadas, tornando-se o espermatozoide, proteínas do plasma seminal e microrganismos do sêmen e do pênis do garanhão, responsáveis pela indução de uma resposta inflamatória aguda (TROEDSSON, 1999). O útero reage rapidamente à presença do sêmen através do aporte de neutrófilos, que são identificados no útero 30 minutos após a cobertura (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020). Esta resposta objetiva a eliminação do excesso de espermatozoides e daqueles defeituosos ou mortos (FIALA et al., 2007).

Quando não ocorre a depuração de forma eficiente do conteúdo uterino, é iniciada um processo inflamatório fisiológico (CERÓN JOSÉ JOAQUÍN; ECKERSALL PETER DAVID; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). As variadas reações do hospedeiro, a lesão tecidual ou infecção promovem a denominada resposta de fase aguda e englobam uma ampla gama de respostas fisiopatológicas com efeitos locais e sistêmicos a fim de minimizar danos ao tecido e aprimorar o processo de reparação (JAIN; GAUTAM; NASEEM, 2011).

Em decorrência desse esforço para reestabelecer a homeostase uterina, efeitos locais e sistêmicos podem ser observados. Os efeitos locais são caracterizados pelo aumento de líquido intrauterino e efeitos sistêmicos incluem alterações como hipertermia, elevadas concentrações de cortisol, leucocitose, alterações metabólicas e alteração nas concentrações de proteínas plasmáticas, denominadas proteínas de fase aguda (PFA) (CERÓN JOSÉ JOAQUÍN; ECKERSALL PETER DAVID; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). Os neutrófilos que migram ao útero produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) como o anion superóxido ($O_2 \bullet^-$) e óxido nítrico ($NO \bullet$), pelas atividades da NADPHoxidase e do óxido nítrico sintase, respectivamente. Durante a fagocitose de organismos invasores, componentes antimicrobianos contidos em grânulos e ERO geradas na membrana do fagossomo são liberados dentro do fagossomo. A co-localização do patógeno e dos produtos citotóxicos liberados pelo neutrófilo facilita a morte intracelular do invasor (BONDIA-PONS; RYAN; MARTINEZ, 2012; D'AIUTO et al., 2010; VAZIRI; RODRÍGUEZ-ITURBE, 2006). O estresse oxidativo acontece quando há um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio e a defesa antioxidante do organismo, no qual ocorre um aumento na formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) aliado a um comprometimento do sistema antioxidante em células ou tecidos (CASTRO, 2010). Danos resultantes desse desequilíbrio incluem modificações oxidativas nas macromoléculas das células, necrose ou morte celular programada e danos estruturais aos tecidos (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007).

A avaliação do fluido endometrial por meio de lavados uterinos é uma ferramenta para o diagnóstico da endometrite (BASTOS et al., 2019; FIALA et al., 2007; KHAN; DIELE DE AMORIM; CHENIER, 2020; MALONEY et al., 2019). A análise proteômica do fluido uterino fornece uma estratégia minimamente invasiva para o estudo de mudanças no ambiente uterino (ITZE-MAYRHOFER; BREM, 2020). As proteínas de fase aguda tem sido objeto de pesquisa em patologias reprodutivas em diferentes animais e humanos. A ceruloplasmina (Cp) e a proteína C reativa (PCR) foram relacionadas um aumento da resposta inflamatória em mulheres após inseminação (PRABHU et al., 2009). A PCR, foi sugerida como um biomarcador local para avaliar a inflamação uterina em vacas (TANAI; ENDO; TANAKA, 2020)

O amiloide sérico (ASA) e a haptoglobina (Hp) foram úteis para o diagnóstico de inflamações genitais e uterinas, que poderiam levar a morte embrionária precoce,

segundo o Krakowski *et al.* (2011). Um estudo recente avaliou os padrões hemodinâmicos uterinos e o estresse oxidativo de éguas com endometrite, determinando um aumento significativo de metabólitos de processos oxidativos (malondialdeído [MDA] e metabólitos do óxido nítrico) (ABDELNABY, et al., 2020). Tirma *et al.* (2006) estudaram o status oxidativo de éguas com cistos uterinos, mediante a mensuração de MDA e antioxidantes (glutathiona [GSH], β -caroteno, vitamina E, glutathiona peroxidase [GSH-Px], catalase [CAT]).

Poucos estudos correlacionam o status oxidativo e as proteínas de fase aguda em éguas com doenças reprodutivas como a endometrite. Razão pela qual o objetivo deste trabalho é determinar o proteinograma sérico e do fluido uterino de éguas com endometrite, assim como determinar o status oxidativo do soro e do fluido uterino de éguas clinicamente saudáveis.

1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNABY, AB. A. et al. Uterine hemodynamic patterns, oxidative stress, and chromoendoscopy in mDELNABY, Eares with endometritis. **Theriogenology**, v. 158, p. 112–120, 2020.

BASTOS, H. B. A. et al. Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. **Theriogenology**, v. 125, p. 224–235, 2019.

BONDIA-PONS, I.; RYAN, L.; MARTINEZ, J. A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 701–711, 2012.

CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; FEDORKA, C. E. Persistent breeding-induced endometritis in mares - a multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, 2020.

CERÓN JOSÉ JOAQUÍN; ECKERSALL PETER DAVID; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85–99, 1 jun. 2005.

CHAN, J. P.-W. et al. Association of increased serum acute-phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 1, p. 72–78, 1 mar. 2010.

D'AIUTO, F. et al. Oxidative Stress, Systemic Inflammation, and Severe Periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 11, p. 1241–1246, 25 ago. 2010.

FIALA, S. M. et al. 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.

HEMBERG, E.; LUNDEHEIM, N.; EINARSSON, S. Retrospective Study on Vulvar Conformation in Relation to Endometrial Cytology and Fertility in Thoroughbred Mares. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 52, n. 9, p. 474–477, 1 nov. 2005.

ITZE-MAYRHOFER, C.; BREM, G. Quantitative proteomic strategies to study reproduction in farm animals: Female reproductive fluids. **Journal of Proteomics**, v. 225, p. 103884, 2020.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 3, n. 1, p. 118–127, jan. 2011.

KHAN, F. A.; DIEL DE AMORIM, M.; CHENIER, T. S. Qualitative analysis and functional classification of the uterine proteome of mares in oestrus and dioestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, n. August, p. 1–9, 2020.

KRAKOWSKI, L. et al. Serum Levels of Acute Phase Proteins: SAA, Hp and Progesterone (P4) in Mares with Early Embryonic Death. **Reproduction in Domestic**

Animals, v. 46, n. 4, p. 624–629, 1 ago. 2011.

LEBLANC, M.; CAUSEY, R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. SUPPL. 3, p. 10–22, 2009.

MALONEY, S. E. et al. A comparison of the uterine proteome of mares in oestrus and dioestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 3, p. 473–479, 2019.

OVERBECK, W.; WITTE, T. S.; HEUWIESER, W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1311–1318, 2011.

PRABHU, K. et al. Plasma protein thiols, ceruloplasmin, C-reactive protein and red blood cell acetylcholinesterase in patients undergoing intrauterine insemination. **Journal of human reproductive sciences**, v. 2, n. 1, p. 27–29, jan. 2009.

TANAI, S.; ENDO, N.; TANAKA, T. Quantifying the C-reactive protein concentrations of uterine lavage samples in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 217, p. 106455, 2020.

TIRMA, A. R. A. Ş. et al. Oxidant/antioxidant status of plasma in Arabian mares with uterine lymphatic cysts. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1–4, p. 244–247, 2006.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 461–471, 1999.

TUPPITS, U. et al. Influence of the uterine inflammatory response after insemination with frozen-thawed semen on serum concentrations of acute phase proteins in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 3–4, p. 182–186, 2014.

VAZIRI, N. D.; RODRÍGUEZ-ITURBE, B. Mechanisms of Disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 2, n. 10, p. 582–593, 2006.

WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. T. Inflammatory mechanisms of endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 4, p. 384–389, 2015.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNABY, AB. A. et al. Uterine hemodynamic patterns, oxidative stress, and chromoendoscopy in mares with endometritis. **Theriogenology**, v. 158, p. 112–120, 2020.

BASTOS, H. B. A. et al. Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. **Theriogenology**, v. 125, p. 224–235, 2019.

BONDIA-PONS, I.; RYAN, L.; MARTINEZ, J. A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 701–711, 2012.

CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; FEDORKA, C. E. Persistent breeding-induced endometritis in mares - a multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, 2020.

CERÓN JOSÉ JOAQUÍN; ECKERSALL PETER DAVID; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85–99, 1 jun. 2005.

CHAN, J. P.-W. et al. Association of increased serum acute-phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 1, p. 72–78, 1 mar. 2010.

D'AIUTO, F. et al. Oxidative Stress, Systemic Inflammation, and Severe Periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 11, p. 1241–1246, 25 ago. 2010.

FIALA, S. M. et al. 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.

HEMBERG, E.; LUNDEHEIM, N.; EINARSSON, S. Retrospective Study on Vulvar Conformation in Relation to Endometrial Cytology and Fertility in Thoroughbred Mares. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 52, n. 9, p. 474–477, 1 nov. 2005.

ITZE-MAYRHOFER, C.; BREM, G. Quantitative proteomic strategies to study reproduction in farm animals: Female reproductive fluids. **Journal of Proteomics**, v. 225, p. 103884, 2020.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 3, n. 1, p. 118–127, jan. 2011.

KHAN, F. A.; DIEL DE AMORIM, M.; CHENIER, T. S. Qualitative analysis and functional classification of the uterine proteome of mares in oestrus and dioestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, n. August, p. 1–9, 2020.

KRAKOWSKI, L. et al. Serum Levels of Acute Phase Proteins: SAA, Hp and Progesterone (P4) in Mares with Early Embryonic Death. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p. 624–629, 1 ago. 2011.

LEBLANC, M.; CAUSEY, R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. SUPPL. 3, p. 10–22, 2009.

MALONEY, S. E. et al. A comparison of the uterine proteome of mares in oestrus and dioestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 3, p. 473–479, 2019.

OVERBECK, W.; WITTE, T. S.; HEUWIESER, W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1311–1318, 2011.

PRABHU, K. et al. Plasma protein thiols, ceruloplasmin, C-reactive protein and red blood cell acetylcholinesterase in patients undergoing intrauterine insemination. **Journal of human reproductive sciences**, v. 2, n. 1, p. 27–29, jan. 2009.

TANAI, S.; ENDO, N.; TANAKA, T. Quantifying the C-reactive protein concentrations of uterine lavage samples in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 217, p. 106455, 2020.

TIRMA, A. R. A. Ş. et al. Oxidant/antioxidant status of plasma in Arabian mares with uterine lymphatic cysts. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1–4, p. 244–247, 2006.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 461–471, 1999.

TUPPITS, U. et al. Influence of the uterine inflammatory response after insemination with frozen-thawed semen on serum concentrations of acute phase proteins in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 3–4, p. 182–186, 2014.

VAZIRI, N. D.; RODRÍGUEZ-ITURBE, B. Mechanisms of Disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 2, n. 10, p. 582–593, 2006.

WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. T. Inflammatory mechanisms of endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 4, p. 384–389, 2015.

CAPITULO I

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Introdução

A endometrite é uma das principais afeções que prejudica a vida reprodutiva das éguas, refletindo em problemas para os médicos veterinários de equinos, e criadores. Esta doença é caracterizada pela inflamação do endométrio, condição que ocorrer como uma resposta à introdução de ar, urina, sêmen, bactérias, fungos ou leveduras no útero. A inflamação do endométrio é caracterizada por sinais histológicos de inflamação crônica, incluindo o desenvolvimento de agregados linfocitários (MILLER *et al.*, 2019).

A excessiva manipulação do trato reprodutivo em programas de inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), ou que são submetidas a monta direta, ocorre um aumento das desordens uterinas com conseqüente comprometimento da fertilidade. Como conseqüência, é comumente relatada a queda na taxa de concepção, aumento do número de serviço por concepção e sobrevivência embrionária prejudicada, levando a um grande prejuízo econômico aos criadores.

A resposta inflamatória apresenta uma série complexa de adaptações teciduais que envolvem principalmente os vasos sanguíneos, os componentes líquido e celular do sangue e o tecido conjuntivo, tendo como objetivo a destruição do agente agressor, seguida de uma série de eventos que visam reconstituir ou cicatrizar o tecido lesado. Embora havendo uma sucessão previsível de fenômenos, as características, extensão e gravidade das alterações teciduais são modificadas por muitos fatores relacionados com o animal e com a patogenicidade do agente agressor

Uma vez iniciado o processo inflamatório, uma série de mediadores pró-inflamatórios é liberada pelos neutrófilos durante a fagocitose, pelas células do endotélio vascular, por células endometriais lesadas e 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.

Nos anos recentes inúmeras pesquisas têm-se dedicado ao estudo de marcadores inflamatórios que possam brindar informação no diagnóstico, prognóstico e monitoramento da endometrites, entre eles tem-se estudado as proteínas de fase aguda e o estresse oxidativo. Se objetiva nesta revisão bibliográfica fazer uma

atualização sobre a endometrite, como é a resposta imunológica uterina na endometrite e o papel das proteínas de fase aguda e o estresse oxidativo nesta patologia.

2.2 Classificação da Endometrite

A endometrite equina possui várias classificações: endometrite aguda, aparecendo após cobertura ou associada a infecções venéreas, endometrite infecciosa crônica, endometrite persistente pós-cobertura e endometriose (endometrite degenerativa crônica). A endometrite segundo Watson (2000), pode ser categorizada como aguda, crônica, ativa, subclínica, pós-parto, bacteriana, fúngica, viral, induzida pela cobertura, persistente e outras. Diversos autores afirmam que é possível encontrar múltiplos agentes indutores de da inflamação endometrial num mesmo momento, numa égua, por tanto, é uma doença multifatorial, a qual pode iniciar como aguda, gerada pelo acúmulo de sêmen, e evoluir a uma endometrite infecciosa, isto como exemplo. Neste trabalho englobamos em dois tipos os fatores que predisõem a endometrites.

2.2.1 Endometrite persistente pós-cobertura

A endometrite persistente pós-cobertura (EPPC), é uma resposta inflamatória de tipo patológica onde o útero apresenta uma inflamação persistente e acúmulo de líquido uterino num tempo maior de 48hr, podendo interferir na chegada do embrião no corpo uterino, inviabilizando a prenhez (KHAN *et al.*, 2017; SIEMIENIUCH *et al.*, 2016; WOODWARD; TROEDSSON, 2015).

Um estudo recente demonstrara que éguas com EPPC, são caracterizadas por contratilidade uterina espontânea reduzida em comparação com éguas resistentes a endometrite, além de possuir defeitos anatômicos no trato reprodutivo, como são, má conformação vulvar, esfíncter vestibulo vaginal rasgado, saculação ventral do útero, contratilidade uterina comprometida, incompetência cervical e dobras endometriais atrofiadas. Animais que apresentam algumas destas características, têm maior probabilidade de aspirar ar ou acumular líquido ou urina na vagina e no útero, o que tornam a égua simultaneamente propensa a endometrite infecciosa (SIEMIENIUCH *et al.*, 2016). Estas éguas são classificadas como susceptíveis, devido que branqueamento do útero após acasalamento ou inseminação, acontece num tempo maior há 96 horas. Aquelas que eliminam eficazmente o excesso de sêmen do trato reprodutivo e os produtos inflamatórios num tempo menor que 48 horas são as éguas

resistentes.

2.2.2 Endometrite infecciosa

A classificação etiológica da endometrite é baseada nos resultados das provas realizadas como o cultivo uterino, a citologia, a avaliação da anatomia reprodutiva e a observação do conteúdo uterino após ultrassonografia (MENDONÇA, 2012). A endometrite pode ser infecciosa ou não infecciosa, sendo os agentes bacterianos comumente isolados nas éguas com endometrite: *Streptococcus zooepidemicus*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella pneumoniae*; *Staphylococcus spp*; *Taylorella equigenitalis*; *Enterobacter cloacae*; *Proteus spp*; (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2012; OVERBECK; WITTE; HEUWIESER, 2011; RASMUSSEN *et al.*, 2013). Os fungos comumente achados são: *Candida spp*; *Asperillus spp*; *Mucor spp*; (FERRIS, 2016; SCOTT, 2020).

Os órgãos reprodutivos podem sofrer traumatismo no momento do parto, que leva a perda do epitélio da superfície endometrial, que expõe as células estromais subjacentes a bactérias, e conseqüentemente a uma resposta inflamatória uterina (POTTER *et al.*, 2010). O sêmen do garanhão induz uma resposta inflamatória fisiológica no útero após inseminação ou acasalamento, este mecanismo começa após o reconhecimento do sêmen ou agentes patógenos pelos receptores Toll-like (TLR) nas células endometriais (MARTH *et al.*, 2016). Após a ativação do TLR, o fator nuclear kappa B (NF- κ B) é expresso, ativando citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e ciclooxigenase-2 (COX-2) (SIEMIENIUCH *et al.*, 2016). Essas moléculas regulam os sinais inflamatórios das células imunológicas. A resposta inflamatória varia entre éguas resistentes e éguas suscetíveis.

O endométrio de éguas suscetíveis expressa mais citocinas pró-inflamatórias e menos citocinas anti-inflamatórias para regular a inflamação aguda em comparação às éguas resistentes. A ativação inadequada da resposta imune uterina precoce interrompe a remodelação do tecido, atrasa a depuração bacteriana e prolonga a inflamação endometrial (MILLER *et al.*, 2019). Outro metabolito como o óxido nítrico tem sido avaliado, encontrando diferenças entre as concentrações no fluido uterino em éguas susceptíveis e éguas resistentes (KHAN *et al.*, 2018).

2.3 Diagnóstico da endometrite

2.3.1 Diagnóstico clínico: histórico, exame físico e palpação retal

O histórico de éguas com endometrite comumente indica uma diminuição do

ciclo estral, com breves períodos de diestro. Em algumas éguas, é por vezes mencionada uma fase diestral prolongada. Pode haver ausência de ovulação em éguas com endometrite crônica. A reduzida atividade folicular pode resultar em anestro e também pode ocorrer a persistência de corpo lúteo nesse grupo de animais (LEBLANC, 2003).

O exame físico deve ter alta prioridade no diagnóstico (ASBURY, 1984a). Antes do exame do trato reprodutivo, a condição física geral da égua deve ser avaliada. Qualquer problema sistêmico que possa alterar a fertilidade deve ser observado, pois a condição corporal da égua influencia diretamente na sua taxa de fertilidade. Além de uma avaliação geral, o períneo e conformação pélvica têm que ser examinado completamente (LEBLANC, 2003).

O exame do trato vaginal e da cérvix através do espéculo é de absoluta necessidade. Mudanças na cor da mucosa, presença de exudado, lesões traumáticas e defeitos de conformação devem ser detectados através deste procedimento (LEY, 2006). A palpação retal do útero e cérvix é menos eficiente na detecção de secreções, porém em algumas situações sugere acúmulo de fluido e lesões focais no útero (ASBURY, 1984a).

2.3.2 Ultrassonografia

A avaliação ultrassonográfica deve ser considerada como parte do exame reprodutivo da égua. A habilidade de examinar o útero e ovários não invasivamente permite informações sobre a função reprodutiva (MCKINNON; VOSS, 1993).

O exame ultrassonográfico do útero permite avaliar um aumento das dobras endometriais, com quantidade variável de fluido livre no órgão, o qual pode ter diferentes graus de ecogenicidade (CURNOW, 1991). A aparência ultrassonográfica do útero e das estruturas reprodutivas presentes nos ovários muda durante o ciclo estral. Estas mudanças, em conjunto com outras observações, ajudam a determinação da fase do ciclo estral (McKINNON; VOSS, 1993). O uso do ultrassom tem um importante papel em diagnosticar a endometrite. A habilidade em identificar patologias uterinas através da ultrassonografia é indispensável no manejo de éguas inférteis (GUINThER, 1995).

2.3.3 Citologia

A presença de neutrófilos no lúmen uterino, detectada pela citologia, é um indicador absoluto de inflamação (ASBURY; GORMAN; FOSTER, 1984; CAUSEY et

al., 2006), porém não determina a etiologia do processo (NIELSEN, 2005). Se somente poucos neutrófilos são encontrados, vários autores têm aplicado o critério semiquantitativo para distinguir se a égua tem ou não endometrite. Esses métodos incluem a contagem de neutrófilos por campo, neutrófilos por lâmina, número de neutrófilos em relação às células epiteliais, ou a porcentagem de neutrófilos: >1 neutrófilo por campo em 240x; >5 neutrófilos por 10 campos em 400x; proporção de neutrófilos: células epiteliais: >1%.; >2%; >10% (AGUILAR et al., 2006).

Quando o processo é severo o grau de celularidade é facilmente visível através do exame citológico ou mesmo pela presença de pus nas secreções uterinas. Quando o processo é sutil, a única evidência é o aumento do número de células nas preparações para interpretação dos resultados citológicos. Alguns autores usam o sistema positivo-negativo, enquanto outros quantificam o grau de inflamação (CARD, 2005).

2.3.4 Cultura

Os exames bacteriológicos representam somente um teste indireto para o diagnóstico, sendo o swab uterino protegido o método de coleta de eleição. Deve-se levar em consideração que o isolamento de determinado microrganismo não representa necessariamente a presença de endometrite, pois ocorrem resultados falsos positivos devido à contaminação do ambiente (JACOB et al., 2002; LANGONI et al., 1994), genitália externa e vagina (LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007). Também podem ocorrer culturas falso-negativas, que são associadas com amostra inadequada, pois o swab somente tem contato com uma área do endométrio de 1-2 cm, diretamente cranial a cérvix (Ibid.).

A detecção da bactéria por si só não é um critério adequado para concluir o diagnóstico porque os organismos envolvidos são na maioria das vezes comensais e podem facilmente contaminar a cultura. Esta proporciona informações úteis no diagnóstico de infecções uterinas se usada em conjunto com a citologia uterina, pois ajuda na detecção de culturas falso-positivas (CAUSEY et al., 2006). Organismos comensais (contaminantes), isolados incluem, *Moraxella spp.*, *Neisseria spp.*, *Streptococcus spp.* (α hemolítico e não hemolítico), *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus albus*, *Anthracooides spp.* (RICKETTS; YOUNG; MEDICI, 1993).

2.3.5 Biópsia endometrial

A biópsia endometrial é um procedimento confiável e seguro para o diagnóstico

e prognóstico de distúrbios endometriais relacionados à infertilidade na égua (SCHOON et al., 1997 apud KELLER et al., 2004). É indicada para qualquer égua não prenhe com suspeita de patologia uterina (DOIG; MCKNIGHT; MILLER, 1981). A biópsia endometrial concluiu que a técnica é estabelecida com segurança e efetividade em avaliar o status reprodutivo do útero das éguas e que isto ajuda ao clínico na interpretação do histórico, e de achados físicos e laboratoriais, contribuindo para a escolha terapêutica.

2.4 Mediadores da resposta inflamatória na endometrite

2.4.1 Resposta inflamatória uterina

A inflamação é a resposta inicial e não específica do organismo a estímulos mecânicos, químicos ou microbianos. É uma resposta rápida e ampliada, controlada pelo sistema imune humoral e celular (polimorfonucleares (PMN), complemento, citosinas, quimosinas) e desencadeada por a ativação conjunta de fagócitos e células endoteliais. É uma resposta benéfica se mantiver o equilíbrio entre células e mediadores.

A resposta imune celular é exercida por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, mastócitos, e células *Natural Killer* (NK), a função principal dessas células é a inativação e eliminação das estruturas autólogas e estranhas que alteram a homeostase do organismo (ROMERO et al., 2007). Os PMN agem como reguladores em diferentes processos, mediante a liberação de citocinas, ativação ou inibição de células adjacentes, e na expressão de moléculas de superfície como os padrões moleculares associados a perigo (DAMPs) e os padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMMs). Trabalhos em bovinos demonstraram que neutrófilos e linfócitos tem a capacidade de produzir mediadores do ácido araquidônico em quantidades iguais (Nkuuhe 1982). Pycock (1990) determinou que éguas com endometrite apresentavam neutrófilos derivados do útero com resposta quimiotática reduzida e capacidade fagocítica e letal, quando eram comparadas com éguas sadias.

2.4.2 Ativação da resposta imune

O contato das células endometriais, incluídas as células imunes (macrófagos, células dendríticas e monócitos), com agentes indutores (infeciosos ou não infeciosos), desencadeia reações específicas dependendo o tipo de receptores de reconhecimento de padrões (RRP), produzindo uma grande variedade de

mediadores químicos (WOODWARD; TROEDSSON, 2015). Quando os RRP são ativos por indutores endógenos como sinais químicos liberados pelos tecidos mortos ou lesionados, são mediados por Padrões Moleculares Associados a Perigo (DAMPs), estes mediadores se unem a receptores *Toll-like* (TLRs). Os receptores tipo TLRs, são proteínas que se podem encontrar na membrana celular ou no citoplasma das células imunes (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas).

Na endometrite equina tem se identificado receptores tipo *Toll-like* que atuam na resposta inflamatória induzida por agentes infecciosos e não infecciosos. Siemieniuch e colaboradores (2016) imuno-localizaram a TLR2 e TLR4 no epitélio luminal e glandular e nas células do estroma de éguas com endometrite clínica e subclínica, assim como em éguas sem endometrite. Os receptores TLR2 respondem a PAMPs de peptidoglicanos e TLR4 a lipopolissacarídeos. Nash (2010) determinou a expressão genica endometrial de TLR4 como possível biomarcador da resposta inflamatória em éguas com endometrite pós-cobertura (EPC) e éguas com endometrite persistente pós-cobertura (EPPC). Atli (2019) determinou que há presença de TLR4 durante todo o ciclo estral da égua e ele diminuí nos primeiros dias da gestação. Schöniger (2017) identificou no endométrio da égua mediante imunohistoquímica os receptores TLR2, TLR4 e TLR6, sendo eles localizados em mastócitos e nos epitélios glandulares eluminais. Em outro trabalho Schöniger (2017) estudou a expressão genica de NOD1 e NOD2 em endométrios de éguas com doenças uterinas e éguas sem antecedentes de problemas uterinos, já que, estas proteínas exercem um papel importante na resposta inflamatória agindo contra patógenos intracelulares, e sua expressão exacerbada pode gerar inflamação dos tecidos e fibroses, sendo reportado em mulheres e outras espécies. Estes sensores intracelulares pertencem a família do receptor *Nod-like* (NLR) de proteínas que atuam na resposta imune inata (MUKHERJEE *et al.*, 2019; SCHÖNIGER *et al.*, 2017).

2.4.3 Componentes da resposta imune avaliados em éguas com endometrite

Os mediadores do ácido araquidônico são um grupo de mediadores químicos que participam da resposta inflamatória uterina de éguas com endometrite. O ácido araquidônico (AA) se encontra na membrana das células do endométrio. Quando se estabelece um processo inflamatório por lesão celular, o ácido araquidônico é liberado e oxigenado por duas vias que conduz à liberação de subprodutos que mediam e modulam a resposta inflamatória (SAMUELSSON, 1991). As prostaglandinas como a

PGE₂, a prostaciclina (PGI₂) e os tromboxano A₄ são produzidos por a via da ciclooxigenase. Os leucotrienos (LT) são formados a partir da via da lipooxigenase e são sintetizados principalmente por leucócitos. Os efeitos biológicos dos LT são mediados por dois tipos de receptores acoplados na proteína G: BLT1–BLT2 para LTB₄ e cysLT1 – cysLT2 para cys-LT.

Os metabolitos do AA participam na regulação de processos fisiológicos no trato reprodutivo como a maturação dos ovócitos, a ovulação, a regulação da vida útil do corpo lúteo, a vascularização do endométrio entre outros. Trabalhos recentes estudaram prostaglandinas e Leucotrienos em éguas velhas, fazendo uma associação com estes metabolitos e os grãos de fibrose endometrial e a diminuição da capacidade de contractilidade uterina.

Gajos em (2015) determinou níveis de PGF_{2a} maiores em éguas com endometrite subclínicas de segundo grau que em éguas com endometrite subclínica de primeiro grau. Também determinou que existe uma correlação entre os níveis dos metabolitos do AA e o grau de fibrose em éguas maiores, sendo mais expressados os leucotrienos em éguas com maior grau de fibrose e os metabolitos da via ciclooxigenase são mais elevados em éguas com menores grau de fibroses. Esses achados são semelhantes aos reportados por Siemieniuch *et al.* (2017). Os níveis de PGE₂, 6- ketoPGF_{1α} e LTC₄ foram mais elevados em éguas maiores de 16 a 23 anos em comparação com éguas jovens.

Trabalhos em bovinos mostraram que neutrófilos e linfócitos produzem prostaglandinas em quantidades iguais. Mas, Pycocock, (1990) determinou que as características de neutrófilos derivados do útero e de neutrófilos periféricos eram diferentes, tendo eles uma resposta quimiotáctica reduzida e uma capacidade fagocítica letal para os agentes invasores de éguas com endometrite induzida.

É de conhecimento que as prostaglandinas (PGs), especialmente a prostaglandina E (PGE), são importantes na afluência de proteínas séricas e glóbulos brancos ao sitio de inflamação. As concentrações de PGs (PGFI e PGE) foram medidas em meios de cultivo de células endometriais e vasos sanguíneos que drenam o útero, demonstrando que o endométrio sintetiza produtos do metabolismo do ácido araquidônico. As prostaglandinas participam na regulação do ciclo estral e no estabelecimento da prenhez. Foi demonstrado que na presença de infecção uterina as

concentrações plasmáticas de PGFk estão aumentadas.

Alguns componentes do sistema do complemento têm sido estudados por serem amplificadores da resposta inflamatória. O sistema do complemento é formado por um grupo de proteínas que interagem entre si para criar uma cascata de reações enzimáticas por diferentes vias (a clássica, a via alternativa e a ligada a manose).

Na via clássica, é ativada quando o C1 se fixa ao anticorpo (IgM ou IgG) que está combinado com o antígeno, em éguas resistentes e susceptíveis a endometrite se observou nas primeiras 24h após infusão bacterina no útero, níveis baixos de IgG e do fator de clivagem C3, não obstante, nas 36 h depois, os níveis de IgG e C3, aumentaram em éguas resistente e continuaram baixos em éguas susceptíveis, o qual poderia dar-se pela continua opsonização a bactérias (TROEDSSON; LIU; THURMOND, 1993).

A via alternativa pode ser iniciada por moléculas da superfície microbiana, como endotoxinas ou LPS. Watson (1987), avaliou os câmbios na deposição de fragmentos de C3 nas secreções uterinas de éguas com blastosforas de levedura, concluído que na não presença de um anticorpo específica, a via alternativa do complemento é ativada. Outro experimento pretendia identificar o papel central do complemento na fagocitose do *Streptococcus zooepidemicus* por neutrófilos no fluido uterino equino, concluindo que a fagocitose é um processo dependente do complemento (ASBURY; GORMAN; FOSTER, 1984).

As células no endométrio produzem uma ampla variedade de citocinas que tem a capacidade modular funções de outros tipos celulares, elas estão envolvidas na resposta imune aguda e crônica. A produção de citocinas pelas células imunes e endoteliais é rápida em resposta a agentes patógenos e outros estímulos; são fabricados principalmente por macrófagos, células dendríticas e células NK. Estas citocinas podem ser classificadas segundo sua ação na célula alvo e se promovem ou inibem a inflamação (KATO *et al.*, 2019; TURNER *et al.*, 2014).

No estudo da endometrite tem se avaliado a expressão de diferentes citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A interleucina – 1 (IL-1) é foco de estudo na endometrite equina por seu papel pró-inflamatório, a IL-1 β é reconhecida como um potente pirógeno endógeno e tem um efeito estimulador nas células CD4+ e promove

a diferenciação de células T auxiliares (Th17) (KATO *et al.*, 2019).

As proteínas do plasma seminal podem gerar uma resposta inflamatória com a expressão endometrial em maior volume de IL-1 β em comparação de outras citocinas pro-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e IL-8 em éguas susceptíveis a endometrite (FEDORKA *et al.*, 2017). Fumoso (2003) determinou que houve uma maior expressão de IL-1 β , TNF- α e IL-6 em éguas susceptíveis a endometrite em comparação a éguas resistentes durante o estro.

No diestro as citocinas IL-1 β e TNF- α foram maiores expressadas em éguas susceptíveis que resistentes. Após inseminação, no estro, não se observou diferença entre os grupos de éguas, mas, no diestro houve uma menor expressão de mRNA de IL-1 β e TNF- α significativamente menor do que em éguas susceptíveis. As vias de ação destas três citocinas pro-inflamatórias e os receptores são diferentes, as principais fontes do TNF- α são as células T e os macrófagos e sua função principal é a ativação de células fagocitárias. O papel das citocinas TNF- α e IL-6 é estudado na endometrite equina devido a serem mediadores inflamatórios potentes.

O Fator de Necrose tumoral alfa (TNF- α) é um importante mediador da resposta inflamatória inata, ele induz a produção de outras citocinas, participa na ativação ou expressão de moléculas de adesão e estimulação do crescimento. O TNF também estimula a proliferação de células normais, e exerce atividade citolítica ou citostática contra as células tumorais, causa efeitos inflamatórios, antivirais e imunorreguladores. A interleucina – 6 (IL-6) é expressada por fagócitos mononucleares, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos e células da medula óssea. Esta interleucina participa na hematopoiese e é crítica na maturação final das células B em células plasmáticas produtoras de anticorpos, ativação de células T, diferenciação e regulação dos fenótipos Th2 e Treg (DE HOLANDA *et al.*, 2019). Em cooperação com a IL-1 estimulam a secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado.

A IL-10 desempenha um papel importante na eliminação de células indesejáveis e detritos celulares de forma silenciosa (DE HOLANDA *et al.*, 2019). Suen (2014) investigou o efeito modulador da IL-10 no desenvolvimento da endometriose em humanos, achando níveis séricos maiores de IL-10 em pacientes com endometriose que em pacientes saudáveis. De Holanda (2019) determinou

por imunohistoquímica uma associação entre as interleucinas IL-6 e IL-10 e células inflamatórias com lesões endometriais em éguas no diestro.

As quimiocinas são citocinas com propriedades quimioatraentes, que atuam principalmente estimulando o recrutamento dos leucócitos na inflamação e controlando a migração normal das células através dos vários tecidos. Marth relatou o incremento de quimiocinas 3 h após a inoculação com *E.coli* em éguas com endometrite induzida, o aumento foi persistente até as 48 h (MARTH *et al.*, 2016). A Interleucina 8 (IL-8) é uma quimiocina neutrófila, esta interleucina promove a migração direcional de neutrófilos e linfócitos T, tem um papel na inflamação aguda e promove a angiogênese (ABOU MOSSALLAM *et al.*, 2015). Christoffersen *et al.*, 2012; Fedorka *et al.*, 2017; Mette *et al.*, 2010, estudaram o papel da IL-8 em éguas com endometrite.

2.4.4 Proteínas de Fase Aguda

A síntese de proteínas de fase aguda ocorre principalmente no fígado sob estímulo das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α . O padrão de síntese de proteínas pelo fígado é drasticamente alterado, resultando em um aumento de algumas proteínas do sangue (SACO *et al.*, 2016). Estas proteínas podem agir como indicadores da evolução em situações patológicas ou de estresse, assim como em condições fisiológicas normais, como a gestação, além do que a síntese de proteínas plasmáticas com função protetora no útero tendo importância para a manutenção da homeostase em diferentes estágios da reprodução.

As proteínas de fase aguda (PFAs) são parte da resposta de fase aguda sistêmica e componentes do sistema imunológico inato. Uma série de respostas do próprio organismo é iniciada no local da invasão por microrganismos ou no local da lesão do tecido, por exemplo (BLACKBURN, 1994; CERÓN, 2019; GRUYS *et al.*, 2005; MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004; OMPLICATION *et al.*, 2006). As citocinas pró-inflamatórias são liberadas e o sistema vascular e as células inflamatórias são ativadas. Essas respostas, por sua vez, estão associadas à produção de mais citocinas e outros mediadores inflamatórios que se difundem para o compartimento do fluido extracelular e circulam no sangue poucas horas após a infecção, o padrão de síntese de proteínas pelo fígado é drasticamente alterado, resultando em um aumento de algumas proteínas do sangue, as PFAs positivas e ou diminuição das PFAs negativas (SACO *et al.*, 2016).

Na medicina Equina, as proteínas de fase aguda são consideradas importantes marcadores em vários processos patológicos, incluindo infecções bacterianas, virais e parasitárias, artrite, queimaduras, intervenções cirúrgicas, obesidade, mortalidade embrionária precoce, ou estresse (CARVALHO FILHO *et al.*, 2020; GIRARDI *et al.*, 2019; JACOBSEN *et al.*, 2005; KRAKOWSKI *et al.*, 2011; METTE *et al.*, 2010; SOUTO *et al.*, 2019).

As proteínas de fase aguda apresentam propriedades opsonizantes, aumentando a fagocitose contra patógenos que penetram no útero durante o acasalamento ou inseminação, a presença destas proteínas e de citocinas no útero, viabiliza o desenvolvimento da prenhes (KRAKOWSKI *et al.*, 2011; ROUSE *et al.*, 2018).

Diferentes estudos correlacionaram PFAs com a gravidade de patologias reprodutivas em animais, como a metrite (CHAN *et al.*, 2010), endometrite (KAYA *et al.*, 2016), piometra (JONES *et al.*, 2020) e como marcadores dos processos inflamatórios do período periparturiente (GREGUŁA-KANIA *et al.*, 2020). Danos aos tecidos uterinos devido ao aumento da atividade miometrial, relaxamento subsequente e dilatação do colo do útero e da parte caudal do canal do parto durante a expulsão fetal, são alguns dos processos que influenciam a expressão das PFAs (KOVÁČ *et al.*, 2008). Lancheros-Buitrago (2020) realizou a análise por 2D-PAGE do fluido uterino ao 5º dia após ovulação de éguas inseminadas e éguas cíclicas, permitindo identificar diferenças no perfil proteico dos grupos estudados, identificando-se uma abundância maior de proteínas de fase aguda em éguas inseminadas que em éguas cíclicas, as PFAs mais abundantes foram a ceruloplasmina, serotransferrina e albumina.

Segundo Bastos (2019) existe uma diferença no perfil proteico do fluido uterino de éguas grávidas e éguas cíclicas no 7º dia após ovulação, as proteínas identificadas nas éguas grávidas estão relacionadas ao transporte de lipídios pela cápsula do conceito, motilidade uterina, metabolismo e geração de ATP, tolerância imunológica materna, proliferação e diferenciação celular, angiogênese, e podem ser importantes para o desenvolvimento do conceito e reconhecimento materno-fetal equino (BASTOS *et al.*, 2019; LANCHEROS-BUITRAGO *et al.*, 2020). Krakowski (2011), correlacionou a mortalidade embrionária precoce em éguas com níveis de proteínas de fase aguda (ASA e Hp), concluindo que as PFAs podem ser úteis para

monitorar o desenvolvimento normal da gravidez e para o diagnóstico de inflamações genitais subclínicas.

As proteínas de fase aguda têm sido classificadas de acordo com sua concentração plasmática, quanto ao seu modo de ação, assim como também quanto ao mecanismo de síntese (CERÓN JOSÉ JOAQUÍN; ECKERSALL PETER DAVID; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005; GIRARDI *et al.*, 2019; JAIN; GAUTAM; NASEEM, 2011). As proteínas de fase aguda negativa são aquelas que após o estímulo inflamatório o fígado responde com a diminuição da produção delas (CERÓN JOSÉ JOAQUÍN; ECKERSALL PETER DAVID; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005; JAIN; GAUTAM; NASEEM, 2011; KRAKOWSKI *et al.*, 2011). As proteínas de fase aguda positivas são aquelas que seus níveis sanguíneos aumentam após uma produção excessiva do fígado como resposta ao estímulo inflamatório (CERÓN JOSÉ JOAQUÍN; ECKERSALL PETER DAVID; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005; CRAY, 2012; CRAY; ZAIAS; ALTMAN, 2009; KRAKOWSKI *et al.*, 2011).

Estudos recentes descrevem o proteoma uterino de éguas no estro e no diestro, relacionando a identificação de proteínas de fase aguda negativas, as quais participam no sistema de defesa endometrial por meio de papéis na inflamação, imunidade ou atividade antimicrobiana (KHAN; DIEL DE AMORIM; CHENIER, 2020; MALONEY *et al.*, 2019). Wolf (2012) e colaboradores reportaram alterações proteômicas no fluido uterino endometrial de éguas com infecção uterina, observando-se um aumento ou diminuição nas concentrações de PFAs.

O amiloide sérico A (ASA), é uma proteína de fase aguda positiva, com um peso molecular de 14 Kda (SOUTO *et al.*, 2019). Descrita como uma das PFAs com mais valor diagnóstico nos equinos, sendo um marcador altamente sensível (HULTÉN *et al.*, 1997, 1999). O ASA, é da família das apolipoproteínas multifuncionais que estão envolvidas no transporte e metabolismo do colesterol e na modulação de numerosas respostas imunológicas durante a inflamação e a resposta de fase aguda (RFA) à infecção, trauma ou estresse (JENSEN; WHITEHEAD, 1998; URIELI-SHOVAL; LINKE; MATZNER, 2000). ASA é produzida em primeiro lugar nos hepatócitos após a indução por citocinas, mas a expressão extra-hepática da fase aguda e das proteínas SAA constitutivas foi demonstrada (MARHAUG; DOWTON,

1994). O amiloide sérico tem sido objeto de estudo na medicina equina, sendo útil marcador em casos de síndrome abdominal agudo, doenças respiratórias, estresse pós exercício, trauma pós-cirúrgico, entre outras (BELGRAVE *et al.*, 2013; JACOBSEN *et al.*, 2006; JACOBSEN; ANDERSEN, 2007; JACOBSEN; THOMSEN; NANNI, 2006; SOUTO *et al.*, 2019; VANDENPLAS *et al.*, 2005; VINER *et al.*, 2017; WITKOWSKA-PIŁASZEWICZ *et al.*, 2019). Christoffersen e colaboradores (2012), reportaram a secreção de isoformas de ASA pelas células do endométrio após indução de endometrite infecciosa, o que poderia indicar a participação do ASA na formação da resposta imune local. Trabalhos em outras espécies reafirmaram a importância do ASA na saúde uterina e a reativação reprodutiva pós parto (ADNANE *et al.*, 2017; KAYA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2018).

A ceruloplasmina é uma PFA positiva, produzida no fígado que transporta mais de 95% do cobre do plasma sanguíneo. Sua função é oxidar ferro ferroso em ferro férrico - uma reação que requer cobre para permitir o transporte de ferro (HELLMAN; GITLIN, 2002). No útero a ceruloplasmina pode fazer parte de um sistema de transporte de cobre para o feto (THOMAS; SCHREIBER, 1989). A associação entre a retomada da atividade ovariana pós-parto e a secreção de proteínas de fase aguda em vacas holandesas, foi estudada por Krause (2014), achando que as vacas que retomavam a atividade ovariana mais rápida tinham níveis de albumina e ceruloplasmina maiores. Kayac (2016) determinou que os níveis séricos de ceruloplasmina pudessem ser usados no diagnóstico em vacas com diferentes graus de endometrite, sendo uma alternativa aos níveis de Hp e ASA.

A haptoglobina (Hp) se liga à hemoglobina livre que pode ser liberada durante várias doenças autoimunes, infecciosas ou hereditárias, é uma proteína de fase aguda positiva a qual é liberada vários dias após o estímulo inflamatório (AMETAJ *et al.*, 2014; CRAY, 2012; EL-DEEB *et al.*, 2020; GODSON *et al.*, 1996; RICCI *et al.*, 2017). Huzzey *et al.*, em (2009) demonstraram que vacas com concentração de haptoglobina de mais de 1,0 g/L em 3 dias após o parto tinham 7 vezes mais chance de desenvolver metrite. Ametaj e colaboradores (2014) associaram a Hp com infecções uterinas. Em 2013, Dabrowski determinou que as concentrações séricas de Hp diferissem entre a gravidade e o tipo de piometra em cadelas, sendo uma proteína de fase aguda que permitiria monitorar a inflamação durante o curso da piometra (DĄBROWSKI; KOSTRO; SZCZUBIAŁ, 2013). Polh *et al.* (2015) associou

níveis elevados de Hp com metrite puerperal aguda em ruminantes.

Um estudo no periparto em suínos, determinou que os níveis mais elevados de PFAs (Hpe PCR) foram uma semana pós-parto (KOVÁČ *et al.*, 2008). Chan (2010) estudou o potencial da haptoglobina (Hp) e a amiloide sérica A (ASA) para indicar infecção uterina, principalmente devido à endometrite subclínica. Nesse trabalho se concluiu que concentrações séricas de Hp e ASA podem ser usadas para reconhecer a infecção uterina em vacas no pós-parto. A associação entre valores elevados de Hp e o número de dias abertos sugere que a Hp também pode ser um indicador útil de mau prognóstico para o desempenho reprodutivo.

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína não glicosilada, composta por cinco subunidades que se liga aos lipopolissacarídeos presentes nas paredes celulares de bactérias e fungos, é considerada uma PFA positiva, a qual tem alto valor diagnóstico em algumas espécies de mamíferos. A PCR é sintetizada principalmente no fígado, tendo reportes das sínteses dela em outros órgãos em vertebrados. Esta proteína tem sido associada a processos inflamatórios sistêmicos infecciosos ou não infecciosos, recentemente tem sido objeto de estudo em patologias de órgãos específicos como o útero em caninos, cerdos, bovinos e humanos, sendo abundante no fluido uterino e no soro destas espécies.

Algumas PFAs negativas tem sido objeto de pesquisa em doenças reprodutivas, após apresentar alterações nos valores sanguíneos das espécies estudadas. Wolf (2012), concluiu que a ApoA-1 e a transtirretina (TT) apresentaram alterações no fluido uterino de éguas com endometrite infecciosa quando foram comparadas com éguas sem doenças reprodutivas. Maloney *et al.* (2019) descreveram a presença abundante de serotransferrina e ApoA-1 no estro de éguas sem histórico de endometrite. No diestro, a imunoglobulina alfa-1, o fator I do complemento e a uterocalina, foram as proteínas mais abundantes. A lipoproteína A1 (ApoA-1), é descrita como uma proteína com papel multifuncional na imunidade, participa na resposta inflamatória, no processo de apoptose nas infecções virais e bacteriana (AMJADI *et al.*, 2015). Alguns estudos em mulheres associam esta proteína com a receptividade endometrial em pacientes com síndrome dos ovários policísticos (AMJADI *et al.*, 2015; BROSENS *et al.*, 2010; OMPPLICATION *et al.*, 2006). A serotransferrina (TF) é uma PFA portadora de ferro. Garante o transporte de ferro dos locais de absorção para os locais de armazenamento e metabolismo.

Lancheros-Buitrago et.al (2020) identificou uma abundância superior em éguas cíclicas que em éguas inseminadas no 5º dia após ovulação. Neste estudo, Lancheros-Buitrago também observou uma maior concentração de albumina (ALB) no fluido uterino de éguas cíclicas, as éguas inseminadas tinham níveis superiores de CP.

2.4.5 Estresse Oxidativo

A produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs) nos animais apresentam importante papel biológico, uma vez que estas espécies reativas são utilizadas durante a defesa do organismo frente à um agressor patogênico. Porém, a produção excessiva destas espécies pode desencadear diversos problemas biológicos, dado que estas espécies reagem com as mais diversas moléculas biológicas celulares, e são capazes de provocar danos a proteínas, lipídios e ao material genético, por isso, o organismo dispõe de uma vasta e eficiente cadeia de enzimas e moléculas antioxidantes, que visam prevenir os efeitos danosos da produção das EROs e ERNs (KIRSCHVINK; MOFFARTS; LEKEUX, 2008, Medeiros, 2017).

O organismo animal é provido por um complexo sistema de proteção antioxidante, como peça do sistema de defesa contra os radicais livres, que são produzidos no metabolismo celular normal e em diferentes eventos patológicos. Em excesso podem resultar na oxidação de estruturas biológicas. A desproporção entre o desafio oxidativo e a eficiente defesa antioxidante do organismo é intitulado de estresse oxidativo (Machado *et al.*, 2009). A produção de ROS, como O₂⁻, H₂O₂, óxido nítrico (NO) e radicais hidroxila (OH), imediatamente após a exposição ao estresse oxidativo e / ou hipóxia, resulta em processos complexos de ativação de citocinas e fatores de crescimento, angiogênese, proliferação e apoptose celular (FLETCHER *et al.*, 2013).

Os biomarcadores do estresse oxidativo mais utilizados nos equinos são o óxido nítrico -ON, superóxido dismutase-SOD, catalase-Cat, glutadiona-GSH, ácido úrico-AU e potencial redox (MARTINS *et al.*, 2005). O dano oxidativo é detectável sob condições fisiológicas normais em indivíduos saudáveis, o que sugere que as eficácias dos mecanismos antioxidantes e de reparo não podem evitar completamente a reação de oxidação mediada pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) (JONES, 2006).

Nos sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre a quantidade de EROs gerada e a quantidade removida pelo sistema antioxidante celular. Normalmente, o dano celular ocorre quando este equilíbrio é perturbado, levando a célula ao estresse oxidativo. Em princípio, o estresse oxidativo ocorre quando o sistema antioxidante de defesa celular não consegue eliminar o excesso de ROS produzidas.

A superabundância de EROs e ERNs, pode gerar um desequilíbrio no status oxidativo defêneas e uma alteração no desempenho reprodutivo (ABDELNABY, et al., 2020; HANAFI et al., 2008; KIRSCHVINK; MOFFARTS; LEKEUX, 2008). As espécies reativas participam em processos fisiológicos como a maturação do oócito, a ovulação, a fertilização, o desenvolvimento do embrião e a gravidez, assim como tem sido associada a patologias ovarianas, uterinas, embrionárias entre outras. Seus efeitos patológicos são exercidos por vários mecanismos, incluindo dano lipídico, inibição da síntese de proteínas e depleção de ATP (CARPENTER; BRABBS; MITCHINSON, 1991; KIRSCHVINK; MOFFARTS; LEKEUX, 2008). A presença de EROs e antioxidantes envolvidos em patologias reprodutivas tem sido estudada em animais e humanos. Na endometrite o sistema imunológico é ativado e pode levar a produção de radicais livres excessivos pelas células imunológicas e epiteliais do endométrio (GLEICHER *et al.*, 1987; SOLEILHAVOUP *et al.*, 2016; YARALIOGLU-GURGOZE *et al.*, 2005).

No sêmen de homens inférteis, é gerada uma grande quantidade de EROs comparada àquela produzida no sêmen de homens férteis, e os espermatozoides defeituosos ou não funcionais têm grande contribuição nessa geração (AITKEN, 1995). Segundo Zini *et al.* (2000), o plasma seminal de homens inférteis não é deficiente em enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e /ou catalase, e o alto nível de EROs presente no sêmen de alguns desses homens é atribuído à produção excessiva de EROs e não a uma deficiência nas defesas antioxidantes. No sêmen de garanhão, Ball *et al.* (2001b) observaram que os espermatozoides anormais presentes no sêmen geram, significativamente, maiores quantidades de H₂O₂ do que os normais.

O estresse oxidativo pode causar alterações locais e ou sistêmicas, principalmente pela liberação de substâncias citotóxicas (radicais livres derivados do oxigênio entre outras), oriundas da cadeia respiratória, ou de neutrófilos

polimorfonucleares e de células endoteliais (FLETCHER *et al.*, 2013; MAIA; BICUDO, 2009). O óxido nítrico (NO) derivado do endotélio é um fator parácrino que controla o tônus vascular, inibe a função plaquetária, previne a adesão de leucócitos e reduz a proliferação bacteriana. Além disso, o NO é um potente vasodilatador e desempenha papéis fundamentais como regulador da biologia e fisiologia do sistema reprodutivo. NO gerado pela NO sintase induzível, mata patógenos e células anormais, mas pode desempenhar um papel prejudicial ao danificar o tecido e as células normais do hospedeiro, especialmente quando a NO sintase induzível é persistentemente expressa.

O FRAP é um dos métodos mais usados para avaliar a capacidade de antioxidante no plasma ou outros líquidos do organismo. Desenvolvido por Benzie e Strain (Lim e Lim, 2013), o FRAP consiste numa dosagem colorimétrica baseada no princípio de redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) em tripiridiltriazina ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ) pelos antioxidantes de uma amostra em pH baixo (Benzie e Strain, 1996).

Entre os testes que permitem verificar a capacidade antioxidante, o FRAP se diferencia devido a sua capacidade de medir não somente um antioxidante específico, mas a capacidade de antioxidante total do organismo (LIM e LIM, 2013). É considerado um teste rápido e simples de executar. A principal desvantagem deste método reside no tempo de reação. Devido a isso, o FRAP não permite de medir alguns antioxidantes que contêm grupos tióis (RUBIO *et al.*, 2016).

O malondialdeído (MDA, $C_3H_4O_2$), é produto da peroxidação lipídica que pode ser utilizado como indicador da ação dos radicais livres no organismo. O MDA possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (FRANÇA *et al.*, 2013). Yaralioglu-Gurgoze *et al.* (2005) avaliou concentração plasmática de MDA em éguas saudáveis e éguas com endometrite, seus resultados mostraram um aumento acentuado no nível de MDA em éguas com endometrite, possivelmente relacionado com um aumento na produção de OH no processo inflamatório. Trabalhos em doenças uterinas em bovinos e bufalinos, os níveis de MDA séricos foram maiores em animais com endometrite e metrite que em animais sadios (BEHERA *et al.*, 2016; GURUNATHAN; CHOI; KIM, 2018; HANAFI *et al.*, 2008; KAYA *et al.*, 2016). El-Bahr

& El-Deeb (2016) acharam um aumento significativo de MDA no soro de éguas afetadas com piometra o é um indicador de peroxidação lipídica dos tecidos afetados.

Durante a explosão respiratória nos neutrófilos, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROs) (ERNs) (ânions superóxido, radical hidroxila, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio) são produzidas em grandes quantidades, os ROS e RNS causam oxidação de proteínas, geralmente os aminoácidos; lisina, arginina e prolina. O dano oxidativo pode afetar às proteínas e suas funções como receptores, enzimas, transporte ou proteínas estruturais, e gerar novos antígenos e provocar resposta imune (GABAI *et al.*, 2019). O uso de grupos de proteínas carboniladas (PC) como biomarcadores de estresse oxidativo tem algumas vantagens em comparação com a medição de outros produtos de oxidação por causa da formação precoce relativa e da estabilidade relativa das proteínas carboniladas. (DALLE- DONNE, ROSSI, GIUSTARINI, MILZANI & COLOMBO, 2003). A presença de proteínas carboniladas não é necessariamente indicativa de oxidação de resíduos de aminoácidos em proteínas. Para estabelecer se as proteínas carboniladas vêm da modificação direta ou indireta da cadeia lateral do aminoácido, métodos de ensaio adicionais devem ser empregados. Por exemplo, produtos de peroxidação lipídica podem ser detectados (DALVI *et al.*, 2013).

Os antioxidantes, são naturais ou sintéticos, possuem estabilidade elevada oxidativa em função de sua estrutura molecular e, por isso, desempenham papel fundamental na prevenção da oxidação resultante da ação dos radicais livres. Estas enzimas são responsáveis pela remoção do ânion superóxido (O_2^-), hidroperóxidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente, já o sistema antioxidante nãoenzimático relaciona-se com um grupo de antioxidantes que podem ser congregados em compostos obtidos *in vivo*, como é o caso da glutatona, da ubiquinona e do ácido úrico, e em composto obtido diretamente da dieta tais como o α -tocoferol (vitamina-E), β - caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (FRANÇA *et al.*, 2013).

O sistema antioxidante enzimático inclui uma superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GSH-PX), glutatona redutase (GSH-Rd), glutatona S-

transferases (GSTs), e a catalase (CAT). A enzima superóxido dismutase (SOD) presente no citoplasma (Cu, Zn – SOD) e na mitocôndria (MnSOD) é responsável pela dismutação de duas moléculas do ânion superóxido (O_2^-) em uma de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto enzimas como a catalase e a glutathione peroxidase (GPx) catalisam a redução do H_2O_2 a água e O_2 (EL-BAHR; EL- DEEB, 2016).

A catalase é enzima presente na maioria dos peroxissomas e nas hemácias dos mamíferos. É molécula com quatro cadeias de polipeptídios idênticas, cada uma composta por mais de 500 aminoácidos em subunidades, com grupos heme porfirínicos e NADPH. Em altas concentrações remove o H_2O_2 e catalisa a formação de água e oxigênio molecular (ARBO *et al.*, 2006; FERRO *et al.*, 2010; FLETCHER *et al.*, 2013). A produção de catalase nos eventos oxidativos e a proteção celular dependem da quantidade de H_2O_2 que chega a mitocôndria e da rapidez com que são gerados e desta reserva antioxidante s. Vários grupos de pesquisa já demonstraram que a administração de catalase na mitocôndria oferece proteção melhor do que a encontrada, habitualmente no citosol, quando existem lesões induzidas por H_2O_2 (MAIA; BICUDO, 2009).

Estudos evidenciaram que a catalase e a glutathione peroxidase são sistemas eficazes de defesa porquanto catalisam a inativação do peróxido de hidrogênio e de outros hidroperóxidos orgânicos (FLETCHER *et al.*, 2013). Atividade enzimática de glutathione S-transferases (GSTs), enzimas que atuam em rotas de excreção de substâncias endo e xenobióticas, protegendo as células contra toxicidade química e estresse, em diferentes tecidos (glândula salivar, ovário e gânglios) (FREITAS; VAZ JUNIOR; MASUDA, 2008).

A glutathione S-transferases (GSTs), que pertencem a uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da molécula de glutathione a várias outras moléculas, e possuem um papel fundamental em mecanismos de detoxificação intracelular de compostos endo e xenobióticos (CHELVANAYAGAM *et al.*, 2001). GSTs desempenham vários papéis fisiológicos, tais como sequestro e transporte de compostos hidrofóbicos endógenos, os quais incluem hormônios esteróides, heme, bilirrubinas, ácidos da bile e seus metabólitos (SALINAS; WONG, 1999). A classificação das GST é bastante complexa e sujeita a discussão, mas muitos autores usam pelo menos nove grandes classes: quatro classes de GSTs de

mamíferos -Alfa, Mu, Pi e Teta (MANNERVIK; WIDERSTEN, 1995); as classes presentes em humanos Kappa (PEMBLE *et al.*, 1996) e Zeta (BOARD *et al.*, 1997); as classes Sigma em cefalópodes e artrópodes, a classe Fi de plantas, e a classe Delta de insetos (também referida como classe Teta) (BOARD *et al.*, 1997).

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNABY, AB. A. et al. Uterine hemodynamic patterns, oxidative stress, and chromoendoscopy in mDELNABY, Eares with endometritis. **Theriogenology**, v. 158, p. 112–120, 2020.

ABOU MOSSALLAM, A. A. et al. Characterization of buffalo interleukin 8 (IL-8) and its expression in endometritis. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 71–77, 2015.

ADNANE, M. et al. Profiling inflammatory biomarkers in cervico-vaginal mucus (CVM) postpartum: Potential early indicators of bovine clinical endometritis? **Theriogenology**, v. 103, p. 117–122, 2017.

AMETAJ, B. N. et al. Intravaginal administration of lactic acid bacteria modulated the incidence of purulent vaginal discharges, plasma haptoglobin concentrations, and milk production in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 2, p. 365–370, 2014.

AMJADI, F. et al. Apolipoprotein A1 as a novel anti-implantation biomarker in polycystic ovary syndrome: A case-control study. **Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 20, n. 11, p. 1039–1045, nov. 2015.

ARBO, M. D. et al. Efeito tóxico dos praguicidas maneb e paraquat sobre a atividade da enzima antioxidante catalase em ratos. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 57–61, 2006.

ASBURY, A. C.; GORMAN, N. T.; FOSTER, G. W. Uterine defense mechanisms in the mare: Serum opsonins affecting phagocytosis of *Streptococcus zooepidemicus* by equine neutrophils. **Theriogenology**, v. 21, n. 2, p. 375–385, 1984.

ATLI, M. O.; KOSE, M. Expression patterns of TLR4 mRNA and protein in the equine endometrium during early pregnancy. **Veterinarni Medicina**, v. 64, n. 5, p. 237–243, 2019.

BASTOS, H. B. A. et al. Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. **Theriogenology**, v. 125, p. 224–235, 2019.

BEHERA, B. K. et al. Relationship between endometritis and oxidative stress in the follicular fluid and luteal function in the buffalo. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 5, p. 844–847, 1 out. 2016.

BELGRAVE, R. L. et al. Assessment of serum amyloid A testing of horses and its clinical application in a specialized equine practice. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 243, n. 1, p. 113–119, 20 jun. 2013.

BLACKBURN, W. D. J. Validity of acute phase proteins as markers of disease activity. **The Journal of rheumatology. Supplement**, v. 42, p. 9–13, out. 1994.

BONDIA-PONS, I.; RYAN, L.; MARTINEZ, J. A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 701–711, 2012.

BROSENS, J. J. et al. Proteomic analysis of endometrium from fertile and infertile patients suggests a role for apolipoprotein A-I in embryo implantation failure and endometriosis. **Molecular human reproduction**, v. 16, n. 4, p. 273–285, abr. 2010.

BURFEIND, O. et al. Receiver operating characteristic curve analysis to determine the diagnostic performance of serum haptoglobin concentration for the diagnosis of acute puerperal metritis in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 3, p. 145–151, 2014.

CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; FEDORKA, C. E. Persistent breeding-induced endometritis in mares - a multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, 2020.

CARPENTER, K. L. H.; BRABBS, C. E.; MITCHINSON, M. J. Oxygen radicals and atherosclerosis. **Klinische Wochenschrift**, v. 69, n. 21–23, p. 1039–1045, 1991.

CARVALHO FILHO, W. P. DE et al. Profile of Acute-Phase Proteins of Horses Submitted to Low-Level Show Jumping Classes. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 91, p. 103105, 2020.

CERÓN JOSÉ JOAQUÍN; ECKERSALL PETER DAVID; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85–99, 1 jun. 2005.

CERÓN, J. J. Acute phase proteins, saliva and education in laboratory science: an update and some reflections. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 197, 2019.

CHAN, J. P.-W. et al. Association of increased serum acute-phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 1, p. 72–78, 1 mar. 2010.

CHRISTOFFERSEN, M. et al. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. **BMC Veterinary Research**, v. 8, 2012.

CRAY, C. Chapter 5 - Acute Phase Proteins in Animals. In: CONN, P. M. B. T.-P. IN M.

B. AND T. S. (Ed.). . **Animal Models of Molecular Pathology**. [s.l.] Academic Press, 2012. v. 105p. 113–150.

CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: A review. **Comparative Medicine**, v. 59, n. 6, p. 517–526, 2009.

D'AIUTO, F. et al. Oxidative Stress, Systemic Inflammation, and Severe Periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 11, p. 1241–1246, 25 ago. 2010.

DĄBROWSKI, R.; KOSTRO, K.; SZCZUBIAŁ, M. Concentrations of C-reactive protein, serum amyloid A, and haptoglobin in uterine arterial and peripheral blood in bitches with pyometra. **Theriogenology**, v. 80, n. 5, p. 494–497, 2013.

DALVI, S. M. et al. Nitric oxide, carbonyl protein, lipid peroxidation and correlation between antioxidant vitamins in different categories of pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. **The Malaysian journal of medical sciences : MJMS**, v. 20, n. 1, p. 21–30, jan. 2013.

DE HOLANDA, A. G. B. et al. Expression of interleukins 6 and 10 and population of inflammatory cells in the equine endometrium: diagnostic implications. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 2, p. 2485–2491, abr. 2019.

EL-BAHR, S. M.; EL-DEEB, W. M. Acute-phase proteins, oxidative stress biomarkers, proinflammatory cytokines, and cardiac troponin in Arabian mares affected with pyometra. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1132–1136, 2016.

EL-DEEB, W. et al. Use of procalcitonin, neopterin, haptoglobin, serum amyloid A and proinflammatory cytokines in diagnosis and prognosis of bovine respiratory disease in feedlot calves under field conditions. **Acta Tropica**, v. 204, p. 105336, 2020.

FEDORKA, C. E. et al. **The effect of select seminal plasma proteins on endometrial mRNA cytokine expression in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis** *Reproduction in Domestic Animals*, 2017.

FERRIS, R. A. Endometritis: Diagnostic Tools for Infectious Endometritis. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 481–498, 2016.

FERRO, C. DE O. et al. **Atividade da catalase no pulmão, rim e intestino delgado não isquemiado de ratos após reperfusão intestinal** *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões* scielo , , 2010.

FIALA, S. M. et al. 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.

FLETCHER, N. M. et al. Uterine fibroids are characterized by an impaired antioxidant cellular system: potential role of hypoxia in the pathophysiology of uterine fibroids. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 7, p. 969–974, 2013.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199–206, 2013.

FREITAS, D. R. J. DE; VAZ JUNIOR, I. DA S.; MASUDA, A. Expressão e atividade enzimática de glutathione s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 99–104, 2008.

FUMUSO, E. et al. Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 1–2, p. 31–41, 2003.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 6, p. 448–454, 11 fev. 1999.

GAJOS, K. et al. Altered secretion of selected arachidonic acid metabolites during subclinical endometritis relative to estrous cycle stage and grade of fibrosis in mares. **Theriogenology**, v. 84, n. 3, p. 457–466, 2015.

GIRARDI, F. M. et al. Influence of Obesity on Serum Concentrations of Acute-Phase Proteins in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 83, p. 102810, 2019.

GLEICHER, N. et al. Is endometriosis an autoimmune disease? **Obstetrics and gynecology**, v. 70, n. 1, p. 115–122, 1987.

GODSON, D. L. et al. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 51, n. 3–4, p. 277–292, jun. 1996.

GREGUŁA-KANIA, M. et al. Acute-phase proteins, cortisol and haematological parameters in ewes during the periparturient period. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 3, p. 393–400, 1 mar. 2020.

GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University: Science**, v. 6 B, n. 11, p. 1045–1056, 2005.

GURUNATHAN, S.; CHOI, Y. J.; KIM, J. H. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles on endometritis caused by *Prevotella melaninogenica* and *Arcanobacterium pyogenes* in dairy cattle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, 2018.

HANAFI, E. M. et al. Effect of Clinical Endometritis on Ovarian Activity and Oxidative Stress Status in Egyptian Buffalo-Cows. **American-Eurasian journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 4, n. 5, p. 530–536, 2008.

HELLMAN, N. E.; GITLIN, J. D. Ceruloplasmin metabolism and function. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, n. 39, p. 439–458, 2002.

HEMBERG, E.; LUNDEHEIM, N.; EINARSSON, S. Retrospective Study on Vulvar Conformation in Relation to Endometrial Cytology and Fertility in Thoroughbred Mares. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 52, n. 9, p. 474–477, 1 nov. 2005.

HULTÉN, C. et al. The acute phase serum amyloid A protein (SAA) in the horse: isolation and characterization of three isoforms. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 57, n. 3, p. 215–227, 1997.

HULTÉN, C. et al. A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) – a clinically useful inflammatory marker in the horse. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, n. 2, p. 267–281, 1999.

HUZZEY, J. M. et al. Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 2, p. 621–625, 2009.

ITZE-MAYRHOFER, C.; BREM, G. Quantitative proteomic strategies to study reproduction in farm animals: Female reproductive fluids. **Journal of Proteomics**, v. 225, p. 103884, 2020.

JACOBSEN, S. et al. Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 6, p. 552–556, 1 nov. 2005.

JACOBSEN, S. et al. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 3, p. 325–330, 2006.

JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. H. The acute phase protein serum amyloid a (SAA) as a marker of inflammation in horses. **Equine Veterinary Education**, v. 19, n. 1, p. 38–46, 2007.

JACOBSEN, S.; THOMSEN, M. H.; NANNI, S. Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 10, p. 1738–1742, 1 out. 2006.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 3, n. 1, p. 118–127, jan. 2011.

JENSEN, L. E.; WHITEHEAD, A. S. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. **The Biochemical journal**, v. 334 (Pt 3, n. Pt 3, p. 489– 503, set. 1998.

JONES, A. R. E. et al. Bilateral ovariectomy as a treatment for chronic pyometra in four horses. **Equine Veterinary Education**, v. 32, n. 10, p. e189–e193, 1 out. 2020.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9– 10, p. 1865–1879, 2006.

KATO, T. et al. Interleukin-1/ β signaling pathways as therapeutic targets for endometriosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. AUG, p. 1–12, 2019.

KAYA, S. et al. Determination of ceruloplasmin, some other acute phase proteins, and biochemical parameters in cows with endometritis. **Veterinary World**, v. 9, n. 10, p. 1056–1062, 2016.

KHAN, F. A. et al. Dose-dependent inhibition of uterine contractility by nitric oxide: A potential mechanism underlying persistent breeding-induced endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 90, p. 59–64, 2017.

KHAN, F. A. et al. Endometrial nitric oxide synthase activity in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis and the effect of a specific iNOS inhibitor in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 718–724, 2018.

KHAN, F. A.; DIEL DE AMORIM, M.; CHENIER, T. S. Qualitative analysis and functional classification of the uterine proteome of mares in oestrus and dioestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, n. August, p. 1–9, 2020.

KIRSCHVINK, N.; MOFFARTS, B. DE; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. **Veterinary Journal**, v. 177, n. 2, p. 178–191, 2008.

KOVÁČ, G. et al. Acute phase proteins during the reproductive cycle of sows. **Acta Veterinaria**, v. 58, n. 5–6, p. 459–466, 2008.

KRAKOWSKI, L. et al. Serum Levels of Acute Phase Proteins: SAA, Hp and Progesterone (P4) in Mares with Early Embryonic Death. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p. 624–629, 1 ago. 2011.

KRAUSE, A. R. T. et al. Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 145, n. 1, p. 8– 14, 2014.

LANCHEROS-BUITRAGO, J. et al. Ceruloplasmin, serotransferrin and albumin presented different abundance in mares' uterine fluid five days after insemination. **Theriogenology**, v. 148, p. 194–200, 2020.

LEBLANC, M.; CAUSEY, R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. SUPPL. 3, p. 10–22, 2009.

MAIA, M.; BICUDO, S. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 183–193, 2009.

MALONEY, S. E. et al. A comparison of the uterine proteome of mares in oestrus and dioestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 3, p. 473–479, 2019.

MARHAUG, G.; DOWTON, S. B. Serum amyloid A: an acute phase apolipoprotein and precursor of AA amyloid. **Bailliere's clinical rheumatology**, v. 8, n. 3, p. 553–573, ago. 1994.

MARTH, C. D. et al. Oestrous cycle-dependent equine uterine immune response to induced infectious endometritis. **Veterinary Research**, v. 47, n. 1, p. 1–17, 2016.

MENDONÇA, V. Quantificação de proteínas de fase aguda em éguas doadoras de embrião da raça quarto de milha. **Aleph**, 2012.

METTE, C. et al. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 138, n. 1–2, p. 95–105, 2010.

MILLER, B. A. et al. Characterization of circulating plasma proteins in dairy cows with cytological endometritis. **Journal of Proteomics**, v. 205, n. February, p. 103421, 2019.

MUKHERJEE, T. et al. NOD1 and NOD2 in inflammation, immunity and disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 670, p. 69–81, 2019.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28–40, 2004.

NASH, D. M. et al. Markers of the uterine innate immune response of the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 119, n. 1, p. 31–39, 2010.

OMPLICATION, A. et al. No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title. **irtualm-vBiblioteca ep**, p. 1–92, 2006.

OVERBECK, W.; WITTE, T. S.; HEUWIESER, W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1311–1318, 2011.

PIHL, T. H. et al. Influence of Disease Process and Duration on Acute Phase Proteins in Serum and Peritoneal Fluid of Horses with Colic. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 651–658, 1 mar. 2015.

POHL, A.; BURFEIND, O.; HEUWIESER, W. The associations between postpartum serum haptoglobin concentration and metabolic status, calving difficulties, retained fetal membranes, and metritis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4544–4551, 2015.

POTTER, T. J. et al. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 127–134, 2010.

PRABHU, K. et al. Plasma protein thiols, ceruloplasmin, C-reactive protein and red blood cell acetylcholinesterase in patients undergoing intrauterine insemination. **Journal of human reproductive sciences**, v. 2, n. 1, p. 27–29, jan. 2009.

PYCOCK, J. F.; ALLEN, W. E. Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 6, p. 422–425, 1990.

RASMUSSEN, C. D. et al. Streptococcus equi subsp. zooepidemicus isolates from equine infectious endometritis belong to a distinct genetic group. **Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 26, 2013.

RICCI, A. et al. Subclinical endometritis in beef cattle in early and late postpartum: Cytology, bacteriology, haptoglobin and test strip efficiency to evaluate the evolution of the disease. **Theriogenology**, v. 94, p. 86–93, 2017.

ROMERO, R. et al. Inflammation in Pregnancy: Its Roles in Reproductive Physiology, Obstetrical Complications, and Fetal Injury. **Nutrition Reviews**, v. 65, n. SUPPL.3, 2007.

ROUSE, C. E. et al. Postpartum endometritis: development of a maternal outcome definition for international immunization research through the GAIA project. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 219, n. 6, p. 654–655, 2018.

SACO, Y. et al. C-reactive protein, haptoglobin and Pig-Major acute phase protein profiles of pigs infected experimentally by different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Veterinary Microbiology**, v. 183, p. 9–15, 2016.

SAMUELSSON, B. Arachidonic acid metabolism: role in inflammation. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v. 50 Suppl 1, p. 3–6, 1991.

SCHÖNIGER, S. et al. Expression of NOD1 and NOD2 transcripts in the healthy and diseased equine endometrium. **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, v. 33, n. 3, p. 216– 222, 2017.

SCHÖNIGER, S.; GRÄFE, H.; SCHOON, H.-A. Expression of Toll-like receptors 2, 4 and 6 in different cell populations of the equine endometrium. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 185, p. 7–13, 2017.

SCOTT, C. J. A review of fungal endometritis in the mare. **Equine Veterinary Education**, v. 32, n. 8, p. 444–448, 1 ago. 2020.

SIEMIENIUCH, M. J. et al. Type of inflammation differentially affects expression of interleukin 1 β and 6, tumor necrosis factor- α and toll-like receptors in subclinical endometritis in mares. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, 2016.

SIEMIENIUCH, M. J. et al. Advanced age in mares affects endometrial secretion of arachidonic acid metabolites during equine subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 103, p. 191–196, 2017.

SOLEILHAVOUP, C. et al. Proteomes of the female genital tract during the oestrous cycle. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 15, n. 1, p. 93–108, 2016.

- SOUTO, P. C. et al. Acute-Phase Proteins of Healthy Horses and Horses Naturally Affected by Colic Syndrome. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 80, p. 1–4, 2019.
- SUEN, J.-L. et al. Serum level of IL-10 is increased in patients with endometriosis, and IL-10 promotes the growth of lesions in a murine model. **The American journal of pathology**, v. 184, n. 2, p. 464–471, fev. 2014.
- TANAI, S.; ENDO, N.; TANAKA, T. Quantifying the C-reactive protein concentrations of uterine lavage samples in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 217, p. 106455, 2020.
- THOMAS, T.; SCHREIBER, G. The expression of genes coding for positive acute-phase proteins in the reproductive tract of the female rat. **FEBS Letters**, v. 243, n. 2, p. 381–384, 30 jan. 1989.
- TIRMA, A. R. A. Ş. et al. Oxidant/antioxidant status of plasma in Arabian mares with uterine lymphatic cysts. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1–4, p. 244–247, 2006.
- TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 461–471, 1999.
- 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 infection1. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 3, p. 502–506, 1 set. 1993.
- TUPPITS, U. et al. Influence of the uterine inflammatory response after insemination with frozen-thawed semen on serum concentrations of acute phase proteins in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 3–4, p. 182–186, 2014.
- TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 2014.
- URIELI-SHOVAL, S.; LINKE, R. P.; MATZNER, Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. **Current opinion in hematology**, v. 7, n. 1, p. 64–69, jan. 2000.
- VANDENPLAS, M. L. et al. Concentrations of serum amyloid A and lipopolysaccharide-binding protein in horses with colic. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 9, p. 1509–1516, 1 set. 2005.
- VAZIRI, N. D.; RODRÍGUEZ-ITURBE, B. Mechanisms of Disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 2, n. 10, p. 582–593, 2006.
- VINER, M. et al. Comparison of Serum Amyloid A in Horses With Infectious and Noninfectious Respiratory Diseases. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 49, p. 11–13, 2017.
- WATSON, E. D. et al. Concentrations of uterine luminal prostaglandins in mares with acute and persistent endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 1, p. 31–37, 1987.

WITKOWSKA-PIŁASZEWICZ, O. O. et al. Changes in serum amyloid a (SAA) concentration in arabian endurance horses during first training season. **Animals**, v. 9, n. 6, 2019.

WOLF, C. A. et al. Effect of corticotherapy on proteomics of endometrial fluid from mares susceptible to persistent postbreeding endometritis. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, p. 1351–1359, 2012.

WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. T. Inflammatory mechanisms of endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 4, p. 384–389, 2015.

YARALIOGLU-GURGOZE, S. et al. Changes in malondialdehyde concentrations and glutathione peroxidase activity in purebred Arabian mares with endometritis. **The Veterinary Journal**, v. 170, n. 1, p. 135–137, 2005.

ZHANG, S. et al. Endometrial expression of the acute phase molecule SAA is more significant than HP in reflecting the severity of endometritis. **Research in Veterinary Science**, v. 121, p. 130–133, 2018.

CAPITULO II

3 PROTEINOGRAMA E STATUS OXIDATIVO NO SORO E NO FLUIDO UTERINO DE ÉGUAS SADIAS E ACOMETIDAS POR ENDOMETRITE

3.1 INTRODUÇÃO

A endometrite fisiológica ou patológica é uma resposta inflamatória de origem infecciosa/ não infecciosa do endométrio, segundo Abdelnaby et al. (2020), ocorre como um processo de depuração do lume uterino à presença de ar, urina, sêmen, bactérias, fungos ou leveduras (FEDORKA *et al.*, 2017; WOLF *et al.*, 2012). As éguas têm sido classificadas como resistentes ou suscetíveis à endometrite, sendo as suscetíveis aquelas que tem maior possibilidade de apresentar resposta inflamatória exacerbada após acasalamento ou inseminação, dificultando a mobilidade do espermatozoide na tuba uterina e a implantação embrionária (CHOE *et al.*, 2010; HAYES *et al.*, 2012; MALONEY *et al.*, 2019; WOLF *et al.*, 2012). As éguas resistentes se caracterizam por depuração dos componentes seminais em menos de 48 horas, o que diminui o grau de inflamação endometrial (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020; TUPPITS *et al.*, 2014; WOODWARD; TROEDSSON, 2015).

Os mecanismos de defesa uterina são complexos, havendo interação das barreiras anatômicas, componentes celulares, imunoglobulinas, substâncias bactericidas e fatores mecânicos (TURNER; HEALEY; SHELDON, 2012). Os processos inflamatórios no útero são iniciados com uma resposta de fase aguda a qual se caracteriza pela liberação de mediadores inflamatórios (citocinas, quimosinas e interleucinas pro-inflamatórias), as quais induzem a produção de proteínas de fase aguda (PFAs), no fígado. As PFAs opsonizam microrganismos e ativam o complemento, enquanto outras eliminam resíduos celulares e radicais livres ou neutralizam enzimas proteolíticas (JACOBSEN *et al.*, 2006; MALONEY *et al.*, 2019; WOLF *et al.*, 2012).

Mediadores inflamatórios relacionados a endometrite, promovem a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), as quais participam como sinalizadores celulares. As EROs podem ser benéficas para o organismo, por prevenir o crescimento microbiano e facilitar a restaurar a hemóstase (GABAY; KUSHNER, 1999). No entanto, o aumento da geração de EROs e ERNs, implica um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, resultando em danos oxidativos e nitrosativos quando EROs e ERNs reagem

com lipídios celulares, proteínas e ácidos nucleicos (ALMANSA-ORDONEZ *et al.*, 2020; ARTIMANI *et al.*, 2018).

Em estudos recentes avaliaram os fluidos reprodutivos de diversas espécies, visando estabelecer informação sobre metabólitos inflamatórios e sua participação na fisiopatologia de algumas doenças reprodutivas e na hemóstase do trato reprodutivo de fêmeas e machos (ITZE-MAYRHOFER; BREM, 2020; MALONEY *et al.*, 2019; MILLER *et al.*, 2019). Maloney e colaboradores (2019), analisaram o componente proteômico do fluido uterino equino em no estro e no diestro, entre as proteínas de maior abundância encontraram-se a ceruloplasmina (Cp), e a proteína C reativa (PCR), as quais são proteínas de fase aguda. Prabhu *et al.*, (2009), estudo a resposta inflamatória após inseminação em mulheres, as quais apresentaram maiores níveis de Cp e PCR no soro. Em 2011 Krakowski *et al.*, indicou que o amiloide sérico (ASA) e a haptoglobina (Hp), foram úteis para o diagnóstico de inflamações genitais e uterinas, que poderiam levar à morte embrionária precoce.

Abdelnaby *et al.* (2020), avaliaram os padrões hemodinâmicos uterinos e o estresse oxidativo de éguas com endometrite, determinando aumento significativo de metabólitos de processos oxidativos (malondialdeído [MDA] e metabólitos do oxido nítrico). Tirma *et al.* (2006) estudaram o status oxidativo de éguas com cistos uterinos, mediante a mensuração de MDA e antioxidantes (glutathiona [GSH], β -caroteno, vitamina E, glutathiona peroxidase [GSH-Px], catalase [CAT]).

Poucos estudos correlacionam status oxidativo e proteínas de fase aguda em éguas com doenças reprodutivas como a endometrite. Por essa razão, o objetivo deste trabalho é determinar as proteínas de fase aguda séricas e presentes no fluido uterino de éguas com endometrite, assim como determinar o status oxidativo do soro e do fluido uterino de éguas clinicamente sadias.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O desenho experimental foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais/Universidade Federal de Viçosa e aprovado (registro número 50/2019).

3.2.1 Animais

Foram utilizadas quinze fêmeas equinas, com idade média de mínima de 4 anos e máxima de 14 anos, e um score corporal (SC) de 2.5 a 3, sem padrão racial definido. As éguas ficam em pasto aberto misto de capim estrela (*Cynodon nlemfuensis*), grama nativa (*Paspalum notatum*), quicuío (*Pennisetum clandestinum*) e

capim-milhã (*Paspalum conspersum*) com água e sal mineral *ad libitum*. Todas as éguas estavam ativas reprodutivamente, como critério de inclusão para o estudo, as éguas tinham que ter no mínimo ovulado duas vezes durante a estação de monta do ano 2019. A classificação dos grupos foi mediante exames reprodutivos (citologia endometrial, cultivo uterino, biopsia endometrial) (dados pertencem a outro trabalho de pesquisa), éguas diagnosticadas com endometrite (grupo doente), e éguas sem histórico de subfertilidade, e sem sinais de quaisquer patologias reprodutivas (grupo sadio).

3.2.2 Delineamento experimental

Coletaram-se dados da ficha clínica reprodutiva das éguas para determinar se tinham ou não histórico de subfertilidade, realizou-se exame clínico geral, exames laboratoriais e reprodutivo em todos os animais para descartar doenças inflamatórias concomitantes e reprodutivas.

Os animais foram distribuídos segundo os resultados do exame reprodutivo em dois grupos, o primeiro grupo de éguas com endometrite (grupo doente n=8) e o segundo grupo éguas sem problemas reprodutivos (grupo sadio n=7).

A coleta de sangue foi realizada em tubos de 4 ml com EDTA 10%, com prévia antissepsia através da venopunção da jugular, e 8 ml em tubos sem nenhum adicional ao frasco. As mostras de sangue sem EDTA foram centrifugadas no local a 3000 rotações por minuto, durante 10 minutos, alicotados em microtubos com 1 mL de soro para evitar degradação das proteínas e enzimas no processo de descongelamento, em seguida congeladas a -20°C para posterior análise no laboratório. Todos os materiais utilizados para as coletas eram estéreis. Os animais foram contidos em troncos próprios para contenção de equinos, minimizando os riscos de acidentes com os animais e com os profissionais envolvidos. Para a coleta do fluido uterino realizou-se avaliação ultrassonográfica com probe linear com frequência de 5MHz (SonoScape A5 VET®), para confirmação de estro. Todas as coletas ocorreram antes da ovulação. Éguas com edema uterino (grado II), cérvix relaxada e presença de ao menos um folículo com 35 mm ou de maior diâmetro na ausência de corpo lúteo (CL), foram submetidas à coleta de fluido uterino, mediante lavagem de baixo volume (LBV), utilizando 250 mL conforme descrito por Diel de Amorim et al., (2016).

Previamente à passagem de sonda estéril para o corpo uterino, foi realizada a antisepsia da zona perianal com solução antisséptica e posteriormente secada com toalhas de papel. Uma vez passada transcervicalmente a sonda pela cérvix, o útero foi infundido com 250 mL de solução de Hartmann. O líquido instaurado foi recuperado imediatamente pela mesma sonda, auxiliando-nos com a realização de uma massagem uterina via transretal.

Uma amostra de 50 mL do fluido recuperado da lavagem foi centrifugada a 1500g durante 10 minutos, para remoção de células e partículas. Uma alíquota de 2mL do sobrenadante foi recuperada e acondicionada em microtubos, os quais foram congelados à -20°C até a realização das análises.

3.2.3 Análise laboratorial

3.2.3.1 Obtenção das proteínas totais

As concentrações das proteínas totais do soro foram mensuradas pelo método de Biureto, com reagentes comerciais específicos e obtidas as leituras em espectrofotômetros (automático) no laboratório clínico. As amostras de soro para dosagem de proteínas totais estavam acondicionadas em frascos estéreis e congeladas à -20°C. Para a realização das dosagens as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente.

3.2.3.2 Análise proteômica das proteínas do soro e do fluido uterino

3.2.3.2.1 Eletroforese de proteínas séricas

O fracionamento proteico do soro, foi realizado mediante eletroforese vertical das amostras em gel de proliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), baseado no método descrito por Laemmli (1970), com algumas modificações.

As concentrações das frações proteicas e dos pesos moleculares foram determinadas por densitometria computadorizada (LabImage 1D, Loccus), a partir da digitalização dos géise leitura das bandas das proteínas. Foram utilizados pesos de 200; 116,2; 97,4; 66,2; 45; 31; 21,5; 14,4 e 6,5 kDa (Faixa ampla; Bio-Rad). A identificação das proteínas foi realizada por espectrometria de massa (tempo de dessorção por ionização de laserassistido por matriz de espectrometria de massa de voo [MALDI-TOF]), seguindo metodologias descritas na literatura (CARVALHO FILHO et al., 2020; GIRARDI et al., 2019; SOUTO et al., 2019).

Foi realizado a digestão enzimática seguindo o protocolo descrito por Shevchenko et al. (2006). As proteínas identificadas foram confirmadas como software BioTools, versão 3.2, (Bruker Daltonics) e Mascot Daemon (Matrix Science, Londres, Reino Unido) em comparação com o banco de dados de proteínas para a família de equinos obtidos no banco de dados UniProt (<http://www.uniprot.org>).

O resultado obtido pelo Mascot foi validado estatisticamente pelo aplicativo Scaffold, versão 3.6.4 (Proteome Software Inc, Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados, foi utilizado o algoritmo PeptideProphet (KELLER et al., 2002) e, para as proteínas, o algoritmo ProteinProphet (NESVIZHSKII et al., 2003). Como critério de aceitação, foram adotados os parâmetros que apresentavam probabilidade mínima de 90% de identificação tanto das proteínas quanto dos peptídeos, com a presença de pelo menos um único peptídeo para cada proteína identificada

3.2.3.2.2 Eletroforese de proteínas do fluido uterino

Para o fracionamento dos diferentes constituintes proteicos do fluido uterino, foi realizada corrida eletroforética das respectivas amostras em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970) modificada. Para a corrida, utilizou-se o sistema vertical de eletroforese (Mini - PROTEAN® Tetra System BIO-RAD).

Para à eletroforese foi utilizado gel de separação a 14% e gel de empilhamento a 4%. Para o preparo das amostras e fracionamento das proteínas, foi adicionado 15 µL do sobrenadante do fluido uterino diluídos em 3 µL de água Mili-Q e 6 µL de gel mix. Uma alíquota de 24 µL de cada amostra foi depositada em uma determinada cavidade do gel, tendo a primeira e a última amostra de cada gel em duplicata, além da amostra padrão (marcador de peso molecular) como referência. Inicialmente a cuba foi submetida a corrente elétrica de 20 mA, fornecido por uma fonte de energia apropriada. Após a passagem das amostras do gel de empilhamento para o gel de separação, a corrente elétrica foi aumentada em 25% do valor inicial, perfazendo um total de 40 mA. Terminada a corrida, a fonte elétrica foi desligada e o gel retirado da placa para ser corado durante duas horas em solução de azul de Coomassie 0,2% sob agitação horizontal constante para uma coloração uniforme. Em seguida, o gel foi submerso em solução descorante a base de metanol para retirar o excesso de corante até que todo o gel se apresentasse nítido.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (LabImage 1D, Loccus®), a partir do escaneamento das amostras. Para o cálculo do peso molecular se utilizaram marcadores de pesos moleculares de 200; 116; 97; 66; 55; 45; 36; 29; 24 e 20 kDa. Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas confeccionaram-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

3.2.3.3 Análises dos indicadores de estresse oxidativo

As análises para determinar o status oxidativo de éguas com e sem endometrite se realizaram no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia da Universidade Federal de Viçosa-Brasil.

3.2.3.3.1 Determinação da Oxidação de Lipídios e Proteínas

A peroxidação lipídica (LPO) foi estimada de acordo com os níveis totais de malondialdeído (MDA). A concentração de MDA foi determinada por ensaio de malondialdeído (MDA)/ensaio de tiobarbitúrico (TBARS) descrita por Wallin (1993).

Para determinar o dano as proteínas o ensaio de dosagem de proteínas carboniladas baseado na detecção de grupos carbonil das proteínas oxidadas, através da reação dos grupos carbonil com o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar 2,4-dinitrofenil-hidrazona (LEVINE et al., 1990).

3.2.3.3.2 Produção de Óxido Nítrico

A concentração de oxido nítrico nas amostras foi mesurado com os reagentes Griess, o qual baseia-se na reação química, que utiliza sulfanilamida e dicloridrato de N-1-naftil-etilenodiamina em condições ácidas (ácido fosfórico) Griess, P. (1879).

3.2.3.3.3 Atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi realizada baseado na capacidade desta enzima em catalisar a reação do superóxido O₂⁻ em peróxido de hidrogênio e água e assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (MARKLUND, 1974).

3.2.3.3.4 Atividade Catalase

A atividade enzimática da catalase foi mensurada determinado o consumo de peróxido de hidrogênio, após interrompida a reação com molibdato de amônio, este ensaio foi feito de acordo com Hadwan e Abed (2016).

3.2.3.3.5 Atividade da glutathione S-transferase

A atividade enzimática da glutathione S-transferase (GST) foi determinada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno (HABIG et al. 1974). A formação do CDNB ocorre de forma espontânea em reação não enzimática, sendo acelerada pela atividade das enzimas GST.

3.2.3.3.6 Capacidade antioxidante total-FRAP

A capacidade antioxidante total foi determinada por o método de capacidade de redução férrica modificada (FRAP), no ensaio de FRAP, utilizam-se Fe^{+3} em excesso e o fator limitante da formação de Fe^{+2} -TPTZ e, conseqüentemente, a intensidade da cor, é a capacidade de redução da amostra (FROIDURE et al., 2016).

3.2.4 Estadística

A análise estatística foi baseada na avaliação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Logo após, as variáveis paramétricas foram submetidas diretamente ao teste Two-tailed (T) e, quando não-paramétricos, os dados foram submetidos ao teste Mann-Whitney seguido do teste T. Os resultados de soro e fluido uterino foram expressos em média \pm desvio padrão (SD), sendo o nível de significância considerado de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism (versão 7.0).

3.3 RESULTADOS

Das 15 éguas utilizadas no presente estudo, todas estavam no estro. 8 (53%), animais foram diagnosticadas com endometrite, sendo incluídas no grupo doente (GD). Os animais tinham uma idade média de $10,62 \pm 3,12$ anos (média e desvio-padrão), e um score corporal de $2,87 \pm 0,18$. Os parâmetros hematológicos do grupo sadio (GC) e o grupo doente (GD) estavam dentro dos valores de referência descritos por Weiss e Wardrop (2010) (Tabela 1). No leucograma, os valores observados do grupo sadio estão dentro do intervalo de referência.

No presente estudo foram identificadas 10 bandas proteicas com pesos moleculares de 182 kD a 27 kD, sendo alfa 2 macroglobulina ($\alpha 2$ – macro), ceruloplasmina (Cp), transferrina (Trf), albumina (Alb), alfa 1 antitripsina ($\alpha 1$ – antitrip), imunoglobulina G cadeia pesada (IgGcp), haptoglobina (Hp), glicoproteína ácida (GPA), imunoglobulina G cadeia leve (IgG cl), apolipoproteína A1 (Apo A1) (Tabela 2).

Tabela 1 – Valores de referência de éguas com e sem endometrite e média e desvio-padrão ($p < 0,05$) dos exames admissionais (hematócrito, leucograma) do grupo sadio e grupo doente.

	Valores de referência	Sadio (n=7)	Doente (n=8)	P
Hematócrito (%)	24- 53*	33,50±4,95 ^a	29,95±3,65 ^a	0,13
Leucócitos (/mm ³)	6.000–12.000*	10143,0±1591,	9038,0±1645,	0,21
Neutrófilos (/mm ³)	2.100–9.000*	4972,0±1150,0 ^a	4664,0±577,8 ^a	0,51
Linfócitos (/mm ³)	900–6.000*	4200,0±1676,0 ^a	3637,0±1447,	0,49
Monócitos (/mm ³)	120–1.200*	215,7±117,1 ^a	278,0 ± 176,6 ^a	0,44
Eosinófilos (/mm ³)	120–1.440*	623,9±466,2 ^a	399,9±265,9 ^a	0,26
Basófilos (/mm ³)	0–360*	49,14±91,70 ^a	32,75±45,87 ^a	> 0,9999
Bastonetes (/mm ³)	0 – 240*	82,00 ± 118,9 ^a	25,75 ± 72,83 ^a	0,1795

^{a, b} Letras diferentes indicam diferença estatística entre o grupo sadio (GC) e grupo doente (GD) pelo teste de Tukey. *(WEISS e WARDROP, 2010).

Tabela 2 – Média e desvio-padrão das proteínas do grupo sadio e doente (com endometrite).

Proteínas (mg/dL)	Sadio (n=7)	Doente (n=8)	P Média ± SD
α2 – macro (182 kD)	417,10± 134,2a	210,1± 68,01a	0,002
Cp (157 kD)	146,30 ± 46,52a	92,32± 28,02a	0,016
Trf (89 kD)	813,2± 359,2 ^a	465,2± 213,1 ^a	0,037
Alb (66 kD)	2544± 551,8 ^a	2513± 279,5 ^a	0,88
α1 – antitrip (60 kD)	671,5± 127,7 ^a	671,3 ± 398,1 ^b	0,991
IgGcp (60 kD)	1706± 416,8 ^a	1006 ± 473,5 ^a	0,009
Hp (45 kD)	544,0±132,9 ^a	223,3±108,1 ^a	0,0002
GPA (42 kD)	288,3±161,9 ^a	139,9±60,19 ^b	0,0422
IgG cl (30 kD)	1637±560,1 ^a	1584±334,8 ^a	0,8254
Apo A1 (27 kD)	740,8±210,9 ^a	548,8±89,13 ^b	0,0349

α2 – macroglobulina (α2-macro); ceruloplasmina (Cp); Trf (transferrina); albumina (alb); α1 – antitripsina (α1-antitrip); IgG de cadeia pesada (cp); haptoglobina (Hp); glicoproteína ácida (GPA); IgG de cadeia leve; apolipoproteína A1 (Apo A1). Dados expressos em média ± SD ($p < 0,05$). ^{a, b} Letras diferentes indicam diferença estatística entre o grupo sadio (GC) e grupo doente (GD) pelo teste de Tukey.

Foi observada diferença estatística significativa em sete das 10 proteínas

avaliadas neste estudo, como se pode observar nas imagens 1 e 2. Sendo altamente significativas as proteínas $\alpha 2$ – macroglobulina ($\alpha 2$ –macro); haptoglobina (Hp); IgG de cadeia pesada (IgGcp), quando $p < 0.01$. e estatisticamente significativas ceruloplasmina (Cp); transferrina (Trf); glicoproteína ácida (GPA); e apolipoproteína A1 (Apo A1), quando $p < 0.05$.

Figura 1 – $\alpha 2$ – macroglobulina ($\alpha 2$ –macro); ceruloplasmina (Cp); transferrina (Trf); albumina (alb); haptoglobina (Hp); glicoproteína ácida (GPA). Dados expressos em média \pm SD (* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$).

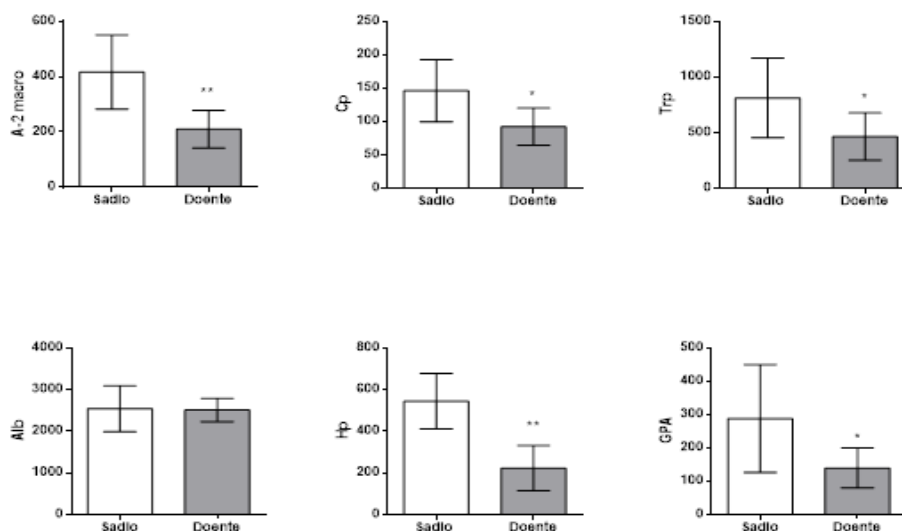
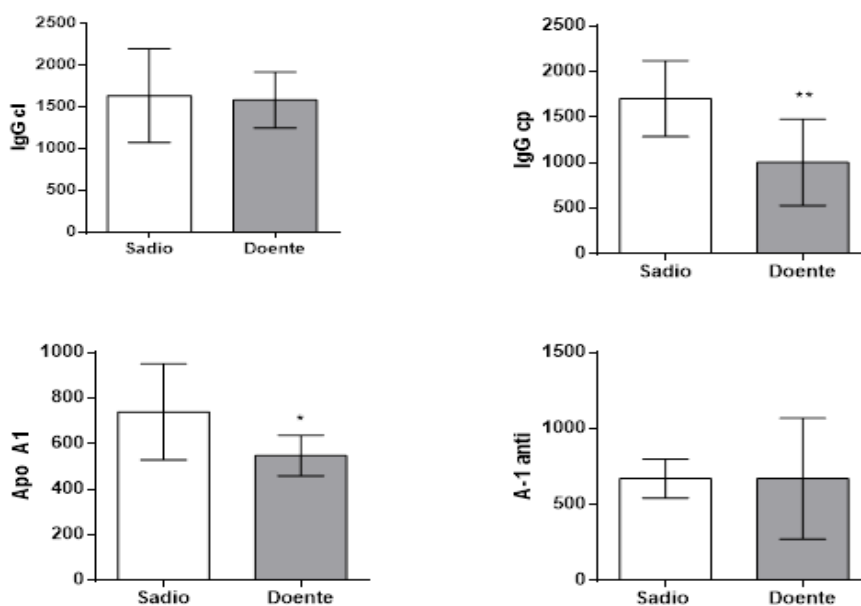
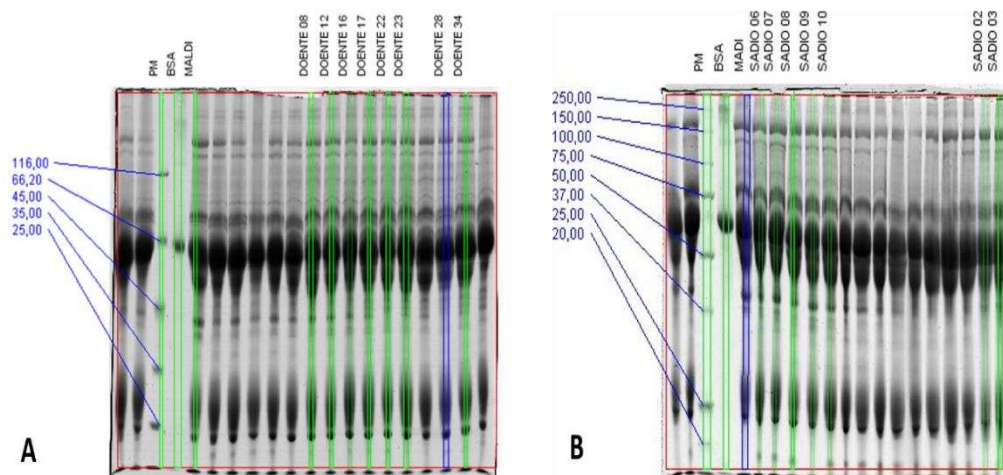


Figura 2 – $\alpha 1$ – antitripsina ($\alpha 1$ –antitrip); IgG de cadeia pesada (cp); glicoproteína ácida (GPA); IgG de cadeia leve; apolipoproteína A1 (Apo A1). Dados expressos em média \pm SD (* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$).



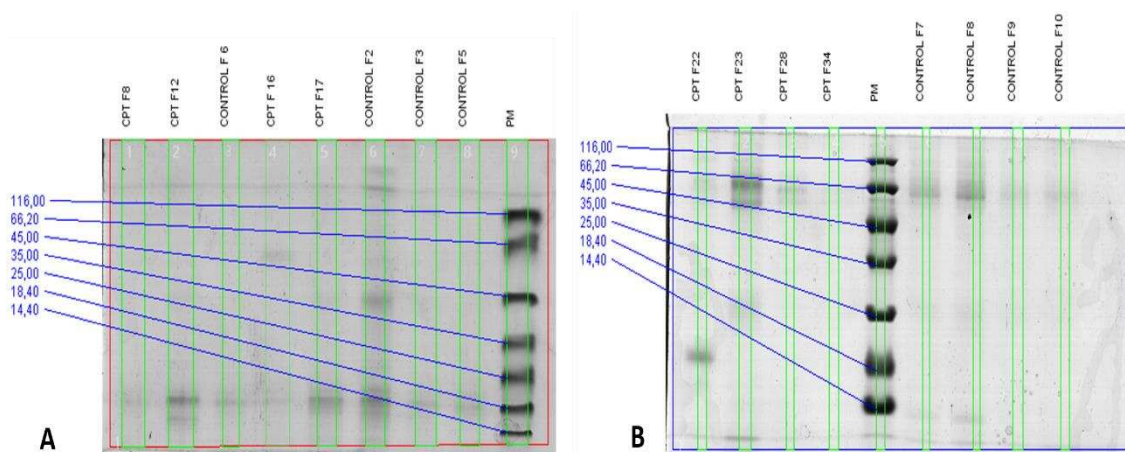
Os padrões eletroforéticos dos géis do soro de éguas do grupo doente e do grupo sadio são semelhantes, como se pode observar nas figuras 3A e 3B.

Figura 3 – Gel de poliacrilamida do soro dos grupos doente e grupo sadio. Grupo Doente: CPT F8; CPT F 12; CPT F16; CPT F 17; CPT F 22; CPT F 23; CPT F 28; CPT F 34. Grupo Sadio: CONTROL F 2; CONTROL F 3; CONTROL F 5; CONTROL F 6; CONTROL F 7; CONTROL F 8; CONTROL F 9; CONTROL F 10. PM: peso molecular; BSA: albumina de soro bovino; MALDI equino.



O perfil proteico no grupo de éguas com endometrite foi semelhante ao observado no grupo sadio. Esse fato foi demonstrado nos padrões eletroforéticos do fluido uterino. Foram obtidas 12 bandas diferentes em ambos grupos (Fig. 4A e 4B). A banda proteica de 20-25 kDa foi observada em 71% das éguas do grupo sadio e 62% no grupo doente.

Figura 4 – Mini gel de poliacrilamida do fluido uterino dos grupos controle e grupo sadio. **(A)**: Grupo Doente: CPT F8; CPT F 12; CPT F16; CPT F 17 e Grupo Sadio: CONTROL F 2; CONTROL F 3; CONTROL F 5; CONTROL F 6. **(B)**: Grupo Doente: CPT F 22; CPT F 23; CPT F 28; CPT F 34 e Grupo sadio: CONTROL F 7; CONTROL F 8; CONTROL F 9; CONTROL F 10. PM: peso molecular.



Os padrões eletroforéticos do fluido uterino de éguas sem doenças uterinas e com endometrite do nosso estudo, estão demonstrados nas figuras 4A e 4B. Nas éguas sem endometrite esses padrões foram caracterizados principalmente por duas bandas observadas num 71% dos animais e estavam localizados nas faixas de peso molecular de 15-20 kDa e 20-25 kDa (Tabela 3). Uma terceira banda na faixa de 10-15 kDa foi observada em 57% dos animais (Tabela 3) e, por fim, em alguns fluidos uterinos, uma banda de médio peso molecular foi observada localizada na faixa de 55- 60 kDa (Tab. 3). 41,6% das proteínas do fluido uterino tinham meio peso molecular, e o restante era de médio a alto peso molecular.

Tabela 3 – Médias \pm desvio padrão dos pesos moleculares (PM) das proteínas detectadas no fluido uterino de éguas sem endometrite.

PM (kDa)	Sadio (n=7)	PM (kDa) Média \pm SD
10-15	4	12,91 \pm 0,56
15-20	5	18,97 \pm 0,45
20-25	5	22,43 \pm 0,80
25-30	2	25,14 \pm 0,05
40-45	1	44,95
45-50	1	45,13
50-55	2	52,36 \pm 1,56
55-60	3	57,77 \pm 1,66
60-65	2	62,53 \pm 1,36
90-95	1	93,84
160-165	1	162,87
185-190	1	189,66

PM: peso molecular; kDa: kilo daltons

As proteínas da faixa de 20 a 25 kDa foram observadas em 5 éguas com endometrite (Tab. 4). Bandas nas faixas de 15-20 kDa e 55-60 kDa também foram observadas, em 3 delas (Tab. 4). Embora o aparecimento de bandas na faixa de alto peso molecular foi mantido, os pesos moleculares foram diferentes (75-80 kDa, 80-85 kDa e 120-125 kDa) (tab. 4), em comparação as bandas identificadas no grupo sadio (90-95 kDa, 160-165 kDa e 185-190 kDa) (Tab. 3). Por fim, as proteínas de médio

peso molecular representaram 50% no grupo com endometrite e o restante das proteínas apresentou peso molecular baixo e alto, sendo 25% pra cada um.

Tabela 4 – Médias \pm desvio padrão dos pesos moleculares (PM) das proteínas detectadas no fluido uterino de éguas com endometrite.

PM (kDa)	Doente (n=8)	PM (kD) Média \pm SD
15-20	3	17,49 \pm 1,64
20-25	5	20,58 \pm 0,56
25-30	2	28,20 \pm 1,65
40-45	1	44,95
45-50	1	47,96
50-55	3	54,14 \pm 0,15
55-60	2	57,47 \pm 0,82
60-65	1	63,19
65-70	1	66,2
75-80	2	72,39 \pm 1,03
80-85	2	81,14 \pm 0,36
120-125	1	122,79

PM: peso molecular; kDa: kilo daltons

Os indicadores de estresse oxidativo avaliados em éguas com endometrite e éguas sem endometrite (grupo sadio), foram superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), óxido nítrico (NO), malondialdeído (MDA), capacidade de redução férrica (FRAP), e proteína carbonilada (Ptn. Carbonilada), estas enzimas analisaram-se em amostras de soro e fluido uterino (Tab. 5 e 6).

Dados expressos em média \pm SD ($p < 0,05$). ^{a, b} Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos sadio e doente. Teste T. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutathione S-transferase; NO: óxido nítrico; MDA: malondialdeído; FRAP: capacidade de redução férrica; Ptn. carbonilada: proteína carbonilada

Tabela 5 – Médias \pm desvio padrão dos marcadores de estresse oxidativo de em soro de animais do grupo sadio e grupo de éguas com endometrite.

Soro	Sadio (n=7)	Doente (n=8)	p	Dados
SOD (U/mg protein)	3,36 \pm 4,75 ^a	6,38 \pm 3,80 ^a	0,09	
CAT (U/mg protein)	3199,0 \pm 52,1 ^a	218,5 \pm 100,3 ^b	<0,0001	
GST ($\mu\text{mol}/\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	98,09 \pm 19,33 ^a	151,7 \pm 48,09 ^b	0,01	
NO (μM)	1,56 \pm 1,49 ^a	0,04 \pm 0,00 ^b	0,0003	
MDA ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	0,01 \pm 0,004 ^a	0,01 \pm 0,004 ^a	0,63	
FRAP (μM)	0,10 \pm 0,03 ^a	0,54 \pm 0,10 ^b	<0,0001	
Ptn. carbonilada (nmol/mL-1)	11,58 \pm 3,22 ^a	32,18 \pm 11,26 ^b	0,001	

Expressos em média \pm SD ($p < 0,05$). ^{a, b} Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos sadio e doente. Teste T. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutationa S-transferase; NO: óxido nítrico; MDA: malondialdeído; FRAP: capacidade de redução férrica; Ptn. Carbonilada: proteína carbonilada.

As atividades antioxidante séricas de algumas enzimas tiveram diferenças estatísticas significativas como se pode observar na imagem 3. A CAT ($<0,0001$) e GST (0,01) tiveram diferença significativa, sendo maior a atividade no grupo sadio da CAT em comparação com o grupo doente (éguas com endometrite), a atividade antioxidante do GST foi maior no grupo doente que no grupo sadio. O oxido nítrico (NO) sérico teve diferença significativa entre os grupos (0,0003), tendo maior atividade no grupo sadio em comparação com o grupo doente. Os animais do grupo doente tiveram maior atividade sérica do FRAP ($<0,001$) em comparação com o grupo sadio.

Figura 5 – Análise dos níveis em soro de malondialdeído (MDA), capacidade de redução férrica (FRAP) e proteína carboniladas (C.P). Malondialdeído (MDA), capacidade de redução férrica (FRAP) e proteína carboniladas (C.P).

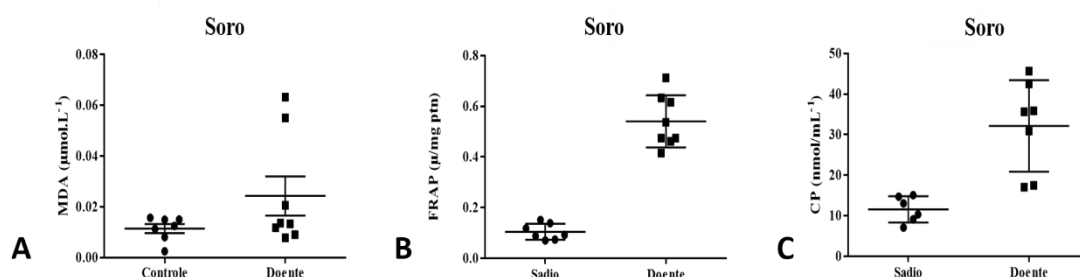
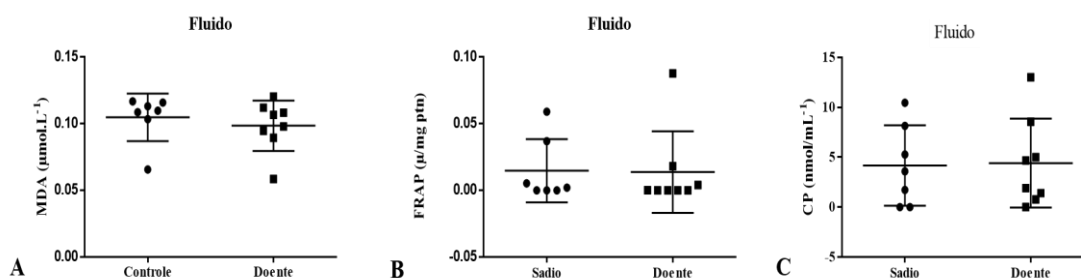


Figura 6 – Análise dos níveis em fluido uterino de malondialdeído (MDA), capacidade de redução férrica (FRAP) e proteína carboniladas (C.P). Malondialdeído (MDA), capacidade de redução férrica (FRAP) e proteína carboniladas (C.P).



No fluido uterino a atividade oxidante e antioxidante das diferentes enzimas avaliadas não apresentaram diferenças estatísticas significativa como se pode observar na tabela 5 e 6.

Tabela 6: Médias estimadas \pm desvio padrão das concentrações de analitos do perfil oxidativo de em fluido uterino de animais do grupo sadio e grupo de éguas com endometrite.

Fluído	Sadio (n=7)	Doente (n=8)	p
SOD (U/mg protein)	1,46 \pm 1,65 ^a	0,44 \pm 0,67 ^a	0,26
CAT (U/mg protein)	3217,0 \pm 7,39 ^a	3214,0 \pm 20,38 ^a	0,14
GST ($\mu\text{mol}/\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	154,0 \pm 20,58 ^a	164,7 \pm 31,61 ^a	0,45
MDA ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	0,11 \pm 0,005 ^a	0,09 \pm 0,018 ^a	0,13
FRAP (μM)	0,007 \pm 0,014 ^a	0,0007 \pm 0,001 ^a	0,39
Ptn. Carbonilada (nmol/mL-1)	4,16 \pm 4,03 ^a	4,41 \pm 4,46 ^a	0,91

Dados expressos em média \pm SD ($p < 0,05$). ^{a, b} Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos sadio e doente. Teste T. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GST: glutathione S-transferase; NO: óxido nítrico; MDA: malondialdeído; FRAP: capacidade de redução férrica; Ptn. Carbonilada: proteína carbonilada.

3.4 DISCUSSÃO

O presente estudo avalio o perfil proteico e o status oxidativo em éguas com endometrite e éguas sem doenças uterinas, encontrando diferenças quando à abundância de proteínas de fase aguda (PFAs), e marcadores do estresse oxidativo (EO), no fluido uterino e no soro. Proteínas de fase aguda apresentaram diferenças significativas, indicativo de processos inflamatórios ativos em éguas com endometrite,

assim, com uma maior atividade de enzimas antioxidantes nas éguas sem endometrite, diferente a o observado no grupo doente. A presença de bandas proteicas no fluido uterino nos sinala uma maior permeabilidade endometrial no estro, quando se realizou a comparação dos pesos das bandas proteicas, se identificou que algumas de elas estavam relacionadas com processos pro e anti-inflamatório.

Na endometrite, o útero apresenta um aumento significativo de líquido intrauterino, o qual se caracteriza pela presença de elevado número de células inflamatórias, isto ocorre pelo aumento da permeabilidade vascular, a qual está também relacionada com o aumento da atividade secretora endometrial que acontece durante o estro (BOLLWEIN et al., 2002; FEDORKA et al., 2017b).

O trabalho publicado por Elizabeth Maloney e colaboradores (2019) , relataram a presença de 172 proteínas no estro, destas, (TROEDSSON, 1999), 3 das 6 proteínas mais abundantes são descritas como PFAs negativas: Apolipoproteína A-1, a alfa-1B-glicoproteína e a serotransferrina. Khan e colaboradores (2020), detectaram abundância de proteínas no fluido uterino, não obstante, eles não acharam presença de PFA's. As proteínas de maior abundancia relatadas são proteínas de choque térmico (proteína 1a relacionada ao choque térmico de 70 kDa e proteína cognata de choque térmico de 71 kDa), as quais são diretamente relacionadas com o estro em espécies como a bufalina, (MUTHUKUMAR et al., 2014; SANKARGANESH et al., 2018) , uma das funções fisiológicas destas proteínas está relacionado com a proteção ao dano estrutural de outras proteínas por radicais livres.

Na endometrite, ocorre um extravasamento celular, caracterizado por inflamação do útero e aumento de líquido uterino com elevado número de neutrófilos (FEDORKA et al., 2017a; MENDONÇA, 2012; REILAS; KATILA, 2002; TURNER; HEALEY; SHELDON, 2012) . Alguns trabalhos sobre endometrite em éguas, nas suas metodologias estimulam a resposta inflamatória endometrial, após, desafio com agentes pro-inflamatórios como bactérias (REGHINI et al., 2015) , sêmen congelado (TUPPITS et al., 2014) , líquido seminal (TROEDSSON, 1999) , espermatozoides mortos (FUMUSO et al., 2003), entre outros. A resposta inflamatória relatada é devido ao aumento do foco inflamatório no útero, tendo maior liberação de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1, que servem como estímulo para a produção no fígado de proteínas de fase aguda e células inflamatórias para o útero (ARLAS et al., 2015; MALONEY et al., 2019; REILAS; KATILA, 2002).

Um estudo recente avaliou o perfil proteômica do fluido uterino de éguas no

estro e no diestro, e detectou abundância de proteínas no fluido uterino em ambos grupos, não obstante, assim como nosso estudo, eles não acharam presença de PFA's. As proteínas identificadas por eles, foram proteínas de choque térmico (proteína 1a relacionada ao choque térmico de 70 kDa e proteína cognata de choque térmico de 71 kDa), as quais são diretamente relacionadas com o estro em outras espécies (MUTHUKUMAR et al., 2014; SANKARGANESH et al., 2018), proteínas inibidoras de protease e membros do sistema complemento, incluindo C3. (KHAN; DEL DE AMORIM; CHENIER, 2020). Elizabeth Maloney e colaboradores realizaram a comparação também do proteoma uterino de éguas em diferentes momentos do ciclo estral, eles acharam 172 proteínas no estro, destas, 3 das 6 proteínas mais abundantes são descritas como proteínas de fase aguda negativas: Apolipoproteína A-1, a alfa-1B-glicoproteína e a serotransferrina (MALONEY et al., 2019)). Na endometrite, ocorre um extravasamento celular, caracterizado por inflamação do útero e aumento de líquido uterino com elevado número de neutrófilos (FEDORKA et al., 2017a; MENDONÇA, 2012; REILAS; KATILA, 2002; TURNER; HEALEY; SHELDON, 2012).

Os trabalhos sobre endometrite em éguas, nas suas metodologias estimulam a resposta inflamatória endometrial, após, desafio com agentes pro-inflamatórios como bactérias (REGHINI et al., 2015), sêmen congelado (TUPPITS et al., 2014)), líquido seminal (TROEDSSON, 1999), espermatozoides mortos (FUMUSO et al., 2003), entre outros. A resposta inflamatória relatada é devido ao aumento do foco inflamatório no útero, tendo maior liberação de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1, que servem como estímulo para a produção no fígado de proteínas de fase aguda e células inflamatórias para o útero (ARLAS et al., 2015; MALONEY et al., 2019; REILAS; KATILA, 2002). Nossa metodologia objetivou estudar a resposta inflamatória de fase aguda, mediante a mensuração de proteínas de fase aguda, e perfil oxidativo, em éguas no estro naturalmente acometidas com endometrite, devido a isso, a resposta inflamatória pode-se analisar como uma resposta fisiológica, com graus de inflamação diferente devido a presença ou ausência da enfermidade

Os pesos moleculares das proteínas obtidas neste trabalho, foram reportadas por outros trabalhos onde fizeram identificação delas por espectrometria de massa. Entre elas estão as bandas com peso molecular de 15 kDa, identificada como β -globina (HBB) por Maloney et. Al. (2019), e Khan et. Al. (2020)); estes autores também reportaram proteínas com pesos moleculares semelhantes aos achados nosso

trabalho, como a banda proteica com peso molecular de 21 kDa, a qual identificaram como IGLL1 (Polipeptídeo 1 de imunoglobulina semelhante a lambda), a proteína de peso molecular 28 kDa, a qual pode corresponder a apolipoproteína A-1 (Apo A-1); a banda com peso 43 kDa é identificada como glicoproteína ácida (GLA); foi identificada também uma proteína de 66 kDa a qual é nomeada como albumina (ALB); por último, foi identificada uma banda proteica com um peso molecular de 80 kDa, a proteína já descrita com este peso é a Transferrina (TF).

Alguns trabalhos descrevem uma associação entre a endometrite e o aumento das concentrações séricas de proteínas de fase aguda (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020; CHAN et al., 2010; CHRISTOFFERSEN et al., 2012; MALONEY et al., 2019). Nossos resultados foram discordaram aos reportados por Tuppits e colaboradores em 2014, eles não encontraram diferenças nas concentrações de PFA's antes e depois da inseminação artificial, assim como em 2012 Christoffersen et al, não encontraram alterações nas concentrações plasmáticas de SAA após a inoculação com doses menores de E. coli durante o estro e essas diferenças parecem ser tanto dependentes da dose quanto relacionadas à fase do ciclo. No entanto, estudos como o de Krakowski (2011) sugeriram que altas concentrações de SAA e Hp antes da ovulação e inseminação podem ser um indicador de endometrite subclínica latente, que não pode ser diagnosticada por ultrassonografia. Isso sugere a necessidade de examinar a utilidade dos níveis de PFA como uma ferramenta adicional para o diagnóstico de endometrite subclínica (SIKORA, 2015). Lobo et al. em 2012 avaliaram o efeito da corticoterapia na presença de infecção e o aumento da α 1 -antitripsina (AAT), transtirretina (TT), e a actina, e redução de imunoglobulina (Ig) G. Quando há infecção intra-uterina observou-se aumento da haptoglobina (Hp) e apolipoproteína A-1 (ApoA-1) e diminuição da transferrina (TF). Bastos et al. em 2019 encontraram proteínas relacionadas ao transporte de lipídios através da cápsula embrionária, motilidade uterina, geração de ATP, tolerância imunológica materna, proliferação celular, diferenciação, metabolismo e angiogênese.

Os resultados de Christoffersen et al, (2010) diferiram com resultados obtidos no presente estudo, eles observaram aumento transitório da concentração de ASA após infusão intra-uterina com uma alta dose de Escherichia coli durante o diestro.

O uso direcionado de fluido uterino da fêmea equina pode ter efeitos de apoio em processos reprodutivos, assim como, na regulação da homeostase uterina. Os mecanismos de defesa uterino são complexos, havendo interação das barreiras

anatômicas, componentes celulares, imunoglobulinas, substâncias bactericidas e fatores mecânicos (WOODWARD, E. M., & TROEDSSON, M. H. T. 2015). O útero da égua é mantido livre de contaminantes através de mecanismos físicos, imunológicos e de um sistema linfático funcional. As barreiras físicas que impedem o acesso de microrganismos ao útero são a vulva (CASLICK, 1937; PASCOE, 1979), a prega vestibulo-vaginal e a cérvix (LEBLANC ET AL., 1995). Na espécie equina, independentemente do método de cobertura, o sêmen é depositado na luz uterina, portanto, neste momento, as barreiras físicas são ultrapassadas, sendo o espermatozoide, 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 são identificados no útero 30 minutos após a cobertura (KOTILAINEN et al., 1994). Esta resposta objetiva a eliminação do excesso de espermatozoides e daqueles defeituosos ou mortos (TROEDSSON et al., 1997). A contratilidade miométrial é um importante mecanismo para a eliminação rápida do agente agressor e dos componentes e subprodutos inflamatórios, que é imprescindível para a limpeza física da luz uterina (EVANS et al., 1987; LEBLANC et al., 1994; TROEDSSON et al., 1993a).

Nossos resultados foram discordaram aos reportados por Tuppits e colaboradores em 2014, eles não encontraram diferenças nas concentrações de PFA's antes e depois da inseminação artificial, assim como em 2012 Christoffersen et al, não encontraram alterações nas concentrações plasmáticas de ASA após a inoculação com doses menores de *E. coli* durante o estro e essas diferenças parecem ser tanto dependentes da dose quanto relacionadas à fase do ciclo. No entanto, estudos como o de Krakowski (2011) sugeriram que altas concentrações de amiloide sérico A (ASA) e Hp antes da ovulação e inseminação podem ser um indicador de endometrite subclínica latente, que não pode ser diagnosticada por ultrassonografia. Isso sugere a necessidade de examinar a utilidade dos níveis de PFA como uma ferramenta adicional para o diagnóstico de endometrite subclínica (SIKORA, 2015). Lobo et al. em 2012 avaliaram o efeito da corticoterapia na presença de infecção e o aumento da α 1 -antitripsina (AAT), transtirretina (TT), e a actina, e redução de imunoglobulina (Ig) G. Quando há infecção intra-uterina observou-se aumento da haptoglobina (Hp) e apolipoproteína A-1 (ApoA-1) e diminuição da transferrina (TF). Bastos et al. em 2019 encontraram proteínas relacionadas ao transporte de lipídios

através da cápsula embrionária, motilidade uterina, geração de ATP, tolerância imunológica materna, proliferação celular, diferenciação, metabolismo e angiogênese.

No proteinograma realizado neste trabalho, não foi possível identificar bandas correspondentes a ASA, para isso, era preciso géis de poliacrilamida de porosidades diferentes a os realizados neste estudo; não obstante, encontrar baixos níveis de ApoA-1 é um indicador promissório de o possível pro-inflamatório das éguas com endometrite. Pesquisas em humanos, tem reportado uma correlação positiva e independente entre o ASA e a ApoA-1, estes estudos indicam que uma diminuição da ApoA-1 e um aumento da ASA durante em período de inflamação aguda, A alteração dessas duas proteínas e se existe relação entre SAA e ApoA-I na endometrite equina é desconhecida, mas é um resultado promissor (WANG et al., 2013).

A ativação do sistema imunológico em resposta à endometrite associada à produção excedente de NO faz parte do mecanismo de defesa do corpo. O acúmulo de NO acelera a peroxidação lipídica, sendo que este último induz um processo oxidativo que agrava a inflamação, produz dano celular e, conseqüentemente, causa infertilidade. O aumento da produção de radicais livres leva à elevação do MDA. Os indicadores de estresse oxidativo avaliados neste trabalho foram superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), óxido nítrico (NO), malondialdeído (MDA), capacidade de redução férrica (FRAP), e proteína carbonilada (Ptn. Carbonilada), estas enzimas analisaram-se em amostras de soro e fluido uterino.

O conteúdo de proteínas carbonilada e a atividade do malondialdeído são utilizados como marcadores de oxidação de proteínas e lipídios e servem como indicadores de desequilíbrios oxidativo e antioxidante (BEHERA et al., 2016; SOUZA et al., 2018; YARALIOGLU-GURGOZE et al., 2005), nosso trabalho o conteúdo de proteína carbonilada e MDA mostraram diferença estatística significativa, não obstante, ao visualizar o comportamento por indivíduos se evidenciou uma maior atividade de MDA no soro de éguas com endometrite quando comparado com as éguas do grupo sadio. No momento da ativação de resposta imune uterina em éguas, tem-se associada a produção de NO como parte do mecanismo de defesa tecidual. O acúmulo de NO promove a peroxidação lipídica induzindo a produção de MDA (BEHERA et al., 2016; HANAFI et al., 2008; YARALIOGLU-GURGOZE et al., 2005). O aumento de radicais livres também aumenta o dano as proteínas, refletindo um aumento dos níveis de proteínas carboniladas (SOUZA et al., 2018). ABDELNABY. et al. (2020) um estudo publicado recentemente relataram aumento da atividade do MDA

em éguas com endometrite, assim como foi reportado por Sema et al. (2005), eles avaliaram a concentração plasmática de malondialdeído (MDA) e a atividade da glutathione peroxidase (GPx) eritrocitária, comparando éguas com endometrite e éguas saudáveis.

Mohamed et al. (2008) identificou que em fêmeas com endometrite a superprodução de radicais livres pode ser um fator contribuinte na redução do status antioxidante e no aumento do grau de peroxidação lipídica, já que, no seu estudo teve um aumento significativo em MDA, bem como uma diminuição de status antioxidante total (TAS). A produção excessiva de radicais livres e as moléculas liberadas no útero durante a inflamação podem interferir na sobrevivência do embrião (TROEDSSON, 1999). Sabe-se que na endometrite geram-se íons superóxidos e radicais hidroxila nos tecidos. Esses radicais, por sua vez, interagem com os lipídios e proteínas celulares, levando à oxidação em cadeia dos componentes celulares (DALLE-DONNE et al., 2003; JONES, 2006). Souza et al., (2018) relatou como as alterações moleculares por radicais livres podem afetar diretamente os sistemas de defesa antioxidante das células promovendo alterações morfológicas nos órgãos, estas modificações teciduais como inflamação local, aumento de células inflamatórias, distúrbios vasculares entre outras (OLIVEIRA et al., 2018).

A sobrecarga oxidativa do tecido uterino pode ser causada por uma redução nas atividades das enzimas antioxidantes (SOUZA et al., 2018). Antioxidantes enzimáticos, como SOD, CAT e GST, e não enzimáticos, como vitaminas (ácido ascórbico, α - tocoferol), carotenóides e glutathione são essenciais para manter o equilíbrio pró-oxidante-antioxidante e, assim, manter a homeostase celular (OLIVEIRA et al., 2018). A SOD é uma metaloproteinase envolvida na dismutação de O_2^- em O_2 e H_2O_2 , representando a primeira linha de defesa enzimática contra ROS, a CAT catalisa a decomposição de H_2O_2 em água e oxigênio, protegendo a célula de danos oxidativos gerados por H_2O_2 . O GST tem potencial de eliminação, uma vez que catalisa a conjugação da glutathione com várias espécies reativas (FRANÇA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2018; SOUZA et al., 2018).

Nos resultados deste trabalho, houve uma menor atividade de enzimas antioxidante no grupo doente, em comparação com o grupo sadio. A CAT, é uma enzima antioxidante que age tentando impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio, acoplado-se ao íon ferro, esta atividade reduzida da CAT, pode estar associada a uma diminuição dos níveis de ferro, assim como a diminuição da atividade do FRAP,

e proteínas associadas ao metabolismo do ferro, a transferrina, haptoglobina e a ceruloplasmina. Entre os mecanismos de resposta inata a agentes microbianos, está a liberação de proteínas de fase aguda pelo fígado (KHARE et al., 2010), não obstante, nos, nosso grupo de éguas doentes, não tinham, éguas com endometrite infecciosa, ao qual abjudicamos a não elevação de proteínas de fase aguda como haptoglobina e ceruloplasmina, as quais estão reportadas em trabalhos com éguas com endometrite infecciosa ((HIRVONEN et al., 1999; SIKORA et al., 2016; TUPPITS et al., 2014), estas proteínas faz parte dos mecanismos antimicrobianos do hospedeiro que reduz a disponibilidade de ferro para os patógenos.

O ferro desempenha papel fundamental nos danos induzidos por ROS nos tecidos e em processos inflamatórios, dado o papel desse metal na resposta à hipóxia, estresse oxidativo, proliferação e metabolismo celular (JOHNSON; WESSLING-RESNICK, 2012). Quando tem-se um aumento do ferro livre, dá-se um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, o ferro é necessário para o transporte de elétrons para função do citocromo na respiração aeróbica, quando é preciso o ferro pode ser liberado da ferritina, a qual é, uma das formas de armazenamento deste metal, para atender às demandas de transporte de oxigênio e metabolismo energético. Esse mecanismo limita o excesso de ferro livre que, de outra forma, geraria espécies reativas de oxigênio. A Transferrina circulante, que entrega ferro às células através da captação mediada por receptor, também fornece um segundo pool de armazenamento que é mais dinâmico por natureza do que o armazenamento de ferritina, distribuindo ferro de locais de armazenamento (por exemplo, fígado) para o útero, nosso trabalho a transferrina esteve diminuída no grupo doente em comparação com o grupo controle (LANCHEROS- BUITRAGO et al., 2020; THEIL, 2011; WANG; PANTOPOULOS, 2011).

Mette et. Al., (2010) descreveu que logo após a reprodução ou introdução de patógenos no lúmen uterino, os neutrófilos polimorfonucleados (PMNs) migram para o lúmen uterino e o fluido intrauterino contendo mediadores inflamatórios se acumula, dita, ativação do sistema imunológico inato atua em conjunto com a depuração mecânica para ajudar o lúmen uterino a limpar a resposta inflamatória local após o acasalamento (DIEL DE AMORIM et al., 2016). Esta interação entre componentes pro-inflamatórios e anti- inflamatórios, pode explicar nossos resultados.

Em patologias crônicas como a endometrite equina, tem se caracterizado por o aumento de polimorfonucleares após a copula ou inseminação, resultando na

inflamação do endométrio, os neutrófilos e células endoteliais desempenham um papel significativo na patogênese de lesões de mucosas, entre elas as uterinas, induzidas pôr os neutrófilos ativados que geram produtos que danificam o tecido, como espécies reativas de oxigênio, protease, collagenase e um complexo ferroso de ferro-ferritina (NAITO et al., 1998). A peroxidação lipídica mediada por radicais livres de oxigênio é considerada uma causa importante de destruição e danos às membranas celulares.

Em nosso trabalho, não foram identificadas as bandas proteicas dos minigéis, nem do soro, nem do fluido uterino, sem embargo, quando foi comparado os pesos moleculares das bandas analisadas por nós e, as bandas descritas por outros autores, podendo assumir, a possibilidade de ser aquelas proteínas, sendo assim, é possível, nos ter achado proteínas de choque térmico, estas proteínas são chaperones moleculares essenciais para manter as funções celulares, evitando o dobramento incorreto e a agregação de polipeptídeos nascentes e facilitando o dobramento de proteínas (ZENG et al., 2014). A abundância de estas proteínas, pode ter ralação com a pouca atividade das proteínas carboniladas.

3.5 CONCLUSÃO

Nosso estudo encontrou o resultado esperado, visto que pesquisas realizadas em éguas com endometrite apresentam níveis maiores de PFA's e marcadores de estresse oxidativo sérico e no fluido uterino. Appropriadamente a metodologia utilizada, o resultado é aceitável, mostra que as éguas ainda sendo diagnosticadas com endometrite apresentam uma resposta inflamatória maior após estímulo. Em nosso experimento as éguas não foram inseminadas nem desafiadas com agentes pro-inflamatórios, como fazem a maioria dos estudos publicados em éguas com endometrite.

Tanto éguas do grupo sadio como éguas com endometrite, apresentaram alterações do status oxidativo, essas alterações geram uma resposta inflamatória recorrente, a qual induz a mudanças na produção de proteínas de fase aguda pelo fígado. Neste trabalho se evidenciou uma diminuição nas PFA's ligadas ao metabolismo do ferro, assim como enzimas antioxidantes associadas a este íon.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNABY, AB. A. et al. Uterine hemodynamic patterns, oxidative stress, and chromoendoscopy in mDELNABY, Eares with endometritis. **Theriogenology**, v. 158, p.112–120, 2020.
- ALMANSA-ORDONEZ, A. et al. Oxidative stress in reproduction: A mitochondrial perspective. **Biology**, v. 9, n. 9, p. 1–21, 2020.
- ARLAS, T. R. et al. Proteomics of endometrial fluid after dexamethasone treatment in mares susceptible to endometritis. **Theriogenology**, v. 84, n. 4, p. 617–623, 2015.
- ARTIMANI, T. et al. Evaluation of pro-oxidant-antioxidant balance (PAB) and its association with inflammatory cytokines in polycystic ovary syndrome (PCOS). **Gynecological Endocrinology**, v. 34, n. 2, p. 148–152, 2018.
- BASTOS, H. B. A. et al. Proteomic profile of histotroph during early embryo development in mares. **Theriogenology**, v. 125, p. 224–235, 2019.
- BEHERA, B. K. et al. Relationship between endometritis and oxidative stress in the follicular fluid and luteal function in the buffalo. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 5, p. 844–847, 1 out. 2016.
- BOLLWEIN, H. et al. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2129–2138, 2002.
- BURFEIND, O. et al. Receiver operating characteristic curve analysis to determine the diagnostic performance of serum haptoglobin concentration for the diagnosis of acute puerperal metritis in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 3, p. 145– 151, 2014.
- CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; FEDORKA, C. E. Persistent breeding-induced endometritis in mares - a multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, 2020.
- CARVALHO FILHO, W. P. DE et al. Profile of Acute-Phase Proteins of Horses Submitted to Low-Level Show Jumping Classes. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 91, p. 103105, 2020.
- CHAN, J. P.-W. et al. Association of increased serum acute-phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 1, p. 72–78, 1 mar. 2010.
- CHOE, C. et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine endometrium with endometritis. **The Korean journal of physiology & pharmacology :official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 14, n. 4, p. 205–212, ago. 2010.
- CHRISTOFFERSEN, M. et al. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. **BMC Veterinary Research**, v. 8, 2012.

- DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1, p. 23–38, 2003.
- DIEL DE AMORIM, M. et al. Comparison of Clinical Signs, Endometrial Culture, Endometrial Cytology, Uterine Low-Volume Lavage, and Uterine Biopsy and Combinations in the Diagnosis of Equine Endometritis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 44, p. 54–61, 2016.
- FEDORKA, C. E. et al. The effect of select seminal plasma proteins on endometrial mRNA cytokine expression in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis **Reproduction in Domestic Animals**, 2017.
- FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreterologia**, v. 20, n. 5, p.199–206, 2013.
- FUMUSO, E. et al. Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 1–2, p. 31–41, 2003.
- GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 6, p. 448–454, 11 fev. 1999.
- GIRARDI, F. M. et al. Influence of Obesity on Serum Concentrations of Acute-Phase Proteins in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 83, p. 102810, 2019.
- HANAFI, E. M. et al. Effect of Clinical Endometritis on Ovarian Activity and Oxidative Stress Status in Egyptian Buffalo-Cows. **American-Eurasian journal of Agriculture & Environmental Science**, v. 4, n. 5, p. 530–536, 2008.
- HAYES, M. A. et al. Changes in various endometrial proteins during cloprostenol-induced failure of early pregnancy in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 9, n. 4, p. 723–741, 2012.
- HE Mohamed, 2008. Antioxidant Status and the Degree of Oxidative Stress in Dromedary (*Camelus dromedarius*) with or with endometritis. **Veterinary Research**, 2: 1-2. , [s.d.].
- HIRVONEN, J. et al. Acute-phase response in dairy cows with acute postpartum metritis. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p. 1071–1083, 1999.
- ITZE-MAYRHOFER, C.; BREM, G. Quantitative proteomic strategies to study reproduction in farm animals: Female reproductive fluids. **Journal of Proteomics**, v. 225, p. 103884, 2020.
- JACOBSEN, S. et al. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 3, p. 325–330, 2006.
- JOHNSON, E. E.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 3, p. 207–216, 2012.

- JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9–10, p. 1865–1879, 2006.
- KELLER, A. et al. Empirical Statistical Model To Estimate the Accuracy of Peptide Identifications Made by MS/MS and Database Search. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 20, p. 5383–5392, 1 out. 2002.
- KHAN, F. A.; DIEL DE AMORIM, M.; CHENIER, T. S. Qualitative analysis and functional classification of the uterine proteome of mares in oestrus and dioestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, n. August, p. 1–9, 2020.
- KHARE, S. et al. **Inflammasomes and their activation** **Critical Reviews in Immunology**, 2010.
- KRAKOWSKI, L. et al. Serum Levels of Acute Phase Proteins: SAA, Hp and Progesterone (P4) in Mares with Early Embryonic Death. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p. 624–629, 1 ago. 2011.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LANCHEROS-BUITRAGO, J. et al. Ceruloplasmin, serotransferrin and albumin presented different abundance in mares' uterine fluid five days after insemination. **Theriogenology**, v. 148, p. 194–200, 2020.
- MALONEY, S. E. et al. A comparison of the uterine proteome of mares in oestrus and dioestrus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 3, p. 473–479, 2019.
- MENDONÇA, V. Quantificação de proteínas de fase aguda em éguas doadoras de embrião da raça quarto de milha. **Aleph**, 2012
- METTE, C. et al. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 138, n. 1–2, p. 95–105, 2010.
- MILLER, B. A. et al. Characterization of circulating plasma proteins in dairy cows with cytological endometritis. **Journal of Proteomics**, v. 205, n. February, p. 103421, 2019.
- MUTHUKUMAR, S. et al. Buffalo Cervico-Vaginal Fluid Proteomics with Special Reference to Estrous Cycle: Heat Shock Protein (Hsp)-70 Appears to Be an Estrus Indicator1. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 5, 1 maio 2014.
- NAITO, Y. et al. Neutrophils, Lipid Peroxidation, and Nitric Oxide in Gastric Reperfusion Injury in Rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 3, p. 494–502, 1998.
- NESVIZHSKII, A. I. et al. A Statistical Model for Identifying Proteins by Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646–4658, 1 set. 2003.
- OLIVEIRA, J. M. et al. Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the Neotropical fruit-eating bat *Artibeus lituratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 684–692, 2018.
- POWELL, D. G.; TROPPEMAN, A.; TOBIN, T. PROCEEDINGS OF THE FIRST WORKSHOP ON Mare Reproductive Loss Syndrome. **Interpretation A Journal Of**

Bible And Theology, 2002.

PRABHU, K. et al. Plasma protein thiols, ceruloplasmin, C-reactive protein and red bloodcell acetylcholinesterase in patients undergoing intrauterine insemination. **Journal of human reproductive sciences**, v. 2, n. 1, p. 27–29, jan. 2009.

REGHINI, M. F. S. et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 516–522, 2015.

REILAS, T.; KATILA, T. Proteins and enzymes in uterine lavage fluid of postpartum and nonparturient mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 5, p. 261–268, 2002.

SANKARGANESH, D. et al. Heat shock protein(s) may serve as estrus indicators in animals: A conceptual hypothesis. **Medical Hypotheses**, v. 117, p. 47–49, 2018.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2006.

SIKORA, M. et al. The usefulness of uterine lavage and acute phase protein levels as a diagnostic tool for subclinical endometritis in Icelandic mares. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, n. 1, p. 1–10, 2016.

SOUTO, P. C. et al. Acute-Phase Proteins of Healthy Horses and Horses Naturally Affected by Colic Syndrome. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 80, p. 1–4, 2019.

SOUZA, A. C. F. et al. Arsenic aggravates oxidative stress causing hepatic alterations and inflammation in diabetic rats. **Life Sciences**, v. 209, p. 472–480, 2018.

TANAI, S.; ENDO, N.; TANAKA, T. Quantifying the C-reactive protein concentrations of uterine lavage samples in postpartum dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 217, p. 106455, 2020.

THEIL, E. C. Iron Homeostasis and Nutritional Iron Deficiency. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 4, p. 724S-728S, 1 abr. 2011.

TIRMA, A. R. A. Ş. et al. Oxidant/antioxidant status of plasma in Arabian mares with uterine lymphatic cysts. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1–4, p. 244–247, 2006.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 461–471, 1999.

TUNÓN, A.-M. et al. Ultrastructure of the secretory endometrium during oestrus in young maiden and foaled mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 27, n. 5, p. 382–388, 1 set. 1995.

TUPPITS, U. et al. Influence of the uterine inflammatory response after insemination with frozen-thawed semen on serum concentrations of acute phase proteins in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 146, n. 3–4, p. 182–186, 2014.

TURNER, M. L.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Immunity and inflammation in the uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL.4, p. 402–409, 2012.

WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochemical Journal**, v. 434, n. 3, p. 365–381, 24 fev. 2011.

WOLF, C. A. et al. Effect of corticotherapy on proteomics of endometrial fluid from mares susceptible to persistent postbreeding endometritis. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, p.1351–1359, 2012.

WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. T. Inflammatory mechanisms of endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 4, p. 384–389, 2015.

YARALIOGLU-GURGOZE, S. et al. Changes in malondialdehyde concentrations and glutathione peroxidase activity in purebred Arabian mares with endometritis. **The Veterinary Journal**, v. 170, n. 1, p. 135–137, 2005.

ZENG, T. et al. Effects of heat stress on antioxidant defense system, inflammatory injury, and heat shock proteins of Muscovy and Pekin ducks: evidence for differential thermal sensitivities. **Cell Stress and Chaperones**, v. 19, n. 6, p. 895–901, 2014.