

CLEIDE CARINE LAZAROTTO

**Caracterização da resposta inflamatória endometrial de jumentas
inseminadas com sêmen congelado asinino**

SÃO PAULO

2022

CLEIDE CARINE LAZAROTTO

**Caracterização da resposta inflamatória endometrial de jumentas
inseminadas com sêmen congelado de asininos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal – VRA

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4191 FMVZ	Lazarotto, Cleide Carine Caracterização da resposta inflamatória endometrial de jumentas inseminadas com sêmen congelado asinino / Cleide Carine Lazarotto. – 2022. 52 f. : il.
	Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.
	Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal. Orientadora: Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes.
	1. Equídeos. 2. Criopreservação. 3. Citologia. 4. Perfil oxidativo. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB-8/7070, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA ENDOMETRIAL DE JUMENTAS INSEMINADAS COM SÊMEN CONGELADO ASININO", protocolada sob o CEUA nº 3265290519 (ID 007280), sob a responsabilidade de **Cláudia Barbosa Fernandes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/12/2019.

We certify that the proposal "CHARACTERIZATION OF THE ENDOMETRIAL INFLAMMATORY RESPONSE IN JENNIES INSEMINATED WITH ASINOUS FROZEN SEMEN", utilizing 21 Equines (males and females), protocol number CEUA 3265290519 (ID 007280), under the responsibility of **Cláudia Barbosa Fernandes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 17/12/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2019** a **08/2020**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **5 a 20 anos**

N: **21**

Linhagem: **Equ:Quarto de Milha; Asininos:Pega**

Peso: **400 a 600 kg**

Local do experimento: Parte do estudo será realizado na Fazenda São Joaquim de Ponta Grossa PR, altitude média 975 metros, latitude 25º, 05'42" Sul e longitude 50º, 09'43" Oeste, clima subtropical úmido, aonde estarão alocadas 10 fêmeas asininas (*Equus asinus*), adultas, da raça Pêga, que estejam apresentandoaios regulares e sem problemas reprodutivos. Na Fazenda Chico Paula localizada no município de Imbituva PR, altitude média 968 metros, latitude 25º, 13'48" Sul e longitude 50º, 36'16" Oeste, clima subtropical úmido, permanecerão 10 fêmeas equinas (*Equus caballus*), adultas, da raça quarto de milha, também apresentandoaios regulares e livres de problemas reprodutivos. Para coleta e congelação de sêmen será utilizado um jumento Pêga (*Equus asinus*), adulto e de fertilidade comprovada com prenhez confirmadas em éguas e jumentas pertencente ao Criatório MF Três Pontos, localizado no município de Ponta Grossa PR, altitude média 975 metros, latitude 25º, 05'42" Sul e longitude 50º, 09'43" Oeste, clima subtropical úmido.

São Paulo, 25 de abril de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LAZAROTTO; Cleide Carine

Título: **Caracterização da resposta inflamatória endometrial de jumentas inseminadas com sêmen congelado de asininos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

A todos os meus alunos de graduação e a todos os pacientes que já atendi nessa vida, vocês são os reais motivos da continua busca por aprimoramento profissional, por isso, a vocês dedico.

AGRADECIMENTOS

Posso sem nem um centímetro de dúvidas dizer que está sendo um dos dias mais felizes da minha vida! Fazer esse mestrado foi um sonho para mim desde muito tempo, quando fui aceita pela orientadora que eu tanto admirava (e admiro) meu sonho começou a finalmente ser colocado em prática.

Com o início da realização de um sonho começam as dificuldades, aquelas que a gente nem imagina que poderão acontecer e o medo da sua não concretização dá lugar a uma sensação de aceitação, independentemente de quais os rumos que as coisas tomarem vai ficar tudo bem, repeti isso muitas vezes no decorrer desse período.

Na ocasião da minha qualificação minha maturidade para estar no mestrado foi questionada, num primeiro momento me senti triste e depois eu mesma me questionei, mas percebi que sim, que Deus não daria essa oportunidade de crescimento caso eu realmente não fosse merecedora.

Então começo meus agradecimentos citando Ele, que tem me acompanhado incansavelmente ao longo de minha vida. Quem nunca me desamparou e me deu segurança em todos os momentos que meu coração teve alguma dúvida.

Sigo agradecendo a ela, que acreditou em mim. A professora Dra Claudia Barbosa Fernandes que é um grande exemplo de que antes de um grande profissional sempre precisa existir um grande ser humano. Que trata seus “filhos” com a dureza e o carinho característico de toda boa mãe. Muito obrigada por ser esse exemplo constante.

Estendo meus agradecimentos a outro grande mestre que foi e sempre será um exemplo de professor, de caráter e de profissional para mim. A quem eu me atrevo a chamar de meu amigo Professor Dr Leandro Cavalcante Lipinski é impressionante como a vida volta a colocá-lo em meu caminho e como sempre você me recebe de braços abertos, muito obrigada! E falando de você, estendo meus cumprimentos a quem também foi meu professor na graduação e que esteve comigo no exame de qualificação me fazendo lembrar que eu sou muito melhor sorrindo do que chorando, obrigada por tanto nesse e em tantos outros momentos da minha vida Doc Rogério. Aproveito a oportunidade também para agradecer toda a equipe do laboratório do professor Leandro e os demais

laboratórios parceiros da UEPG. E, em especial, a professora Adriana e ao Junior sem vocês a passagem pela UEPG não teria sido a mesma.

Seguindo meus agradecimentos preciso falar da minha irmã de mestrado e da sua energia vital que contagia a todos que estão por perto, Juliana Izzo Octaviano, um dos melhores seres humanos que eu já conheci, muito obrigada por cada conversa e cada momento que dividimos e obrigada por ser a primeira revisora deste documento, conta comigo! Agradeço também aos meus demais colegas Leppeanos, em especial ao Ale que também dividiu comigo muitos momentos de angústia e de alegrias. E além do LEPPE a toda equipe do LA que sempre se puseram a disposição para ajudar em tudo que fosse necessário. Estendo meus agradecimentos a todos os professores e colaboradores que fazem da USP uma das principais instituições de ensino do mundo. Aprendi muito dentro e fora desse local vendo e ouvindo tudo que presenciei.

Agradeço grandemente aos clientes e amigos que emprestaram os animais e abriram as portas de suas propriedades para que eu entrasse e pudesse fazer a presente pesquisa, em especial a Carol e o Marcelinho que passaram a fazer parte do meu círculo de amigos mais próximos. Aproveitando a oportunidade gostaria de agradecer a confiança de vocês ao longo da minha vida profissional.

Agradeço a minha família que mesmo longe me apoia em todos os momentos da minha vida. Especialmente aos meus pais pela educação que me deram e por me mostrarem que não importa de onde eu vim o que importa é para onde eu vou. Vocês são os melhores pais que eu poderia ter tido, amo vocês com todas as forças do meu coração.

Agradeço também aos meus amigos que me apoiaram sempre no decorrer desse período e, aos meus colegas de profissão cujos muitos dos quais são uma fonte insaciável de inspiração para mim! E claro ao meu compadre Carlos e minha grande amiga Juliana por me ajudarem sempre.

E claro além de todos os seres humanos nomeados ou não, agradeço também aqueles que tem sido meus grandes companheiros e motivo das minhas lutas, os seres mais puros da terra, os animais, muito obrigada!

Pelo auxílio financeiro concedido através do processo nº2017/05425-0, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal.

RESUMO

LAZAROTTO, C. C. **Caracterização da resposta inflamatória endometrial de jumentas inseminadas com sêmen congelado asinino.** 2022. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

As biotecnologias reprodutivas estão cada vez mais difundidas nas diferentes espécies animais, o que contribui para um incremento no número de descendentes nascidos de diferentes reprodutores e matrizes. O sêmen congelado se destaca dentre as biotecnologias, permitindo o uso de animais de diferentes regiões e a manutenção da genética de um animal mesmo após a morte. Entretanto, esta biotecnologia tem limitado sucesso quando aplicada em asininos. Acredita-se que ocorra uma reação inflamatória uterina exacerbada quando o endométrio das jumentas é exposto ao sêmen congelado. Este trabalho teve por objetivo caracterizar a inflamação uterina de jumentas, comparando com éguas submetidas ao mesmo tratamento. Foram utilizadas 08 fêmeas asininas e 08 fêmeas equinas, todas foram inseminadas com sêmen congelado de asinino e avaliadas, durante o cio (pré inseminação), após 6 horas (n=4 fêmeas asininas e 4 fêmeas equinas) e 24 horas (n=4 fêmeas asininas e 4 fêmeas equinas) da Inseminação Artificial (IA) com sêmen congelado de asinino. Para caracterizar a inflamação endometrial foi realizada citologia, coletada com escova citológica para preparação de lâmina microscópica, e o microlavado uterino, para avaliar o perfil oxidativo, e a presença de óxido nítrico nos diferentes momentos. Para análise do perfil oxidativo foram analisadas as concentrações da enzima Glutathione Peroxidase (GPx), atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) e níveis de peroxidação lipídica pelo teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), além da concentração de óxido nítrico. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste Shapiro-Wilk não tendo distribuição normal. Portanto, a diferença entre os momentos em cada espécie foi avaliada com o teste de Wilcoxon e a diferença entre espécies em cada momento com o teste U de Mann-Whitney. Os testes foram considerados significativos quando $p < 0,05$, as análises foram realizadas no ambiente R. Quanto à análise da citologia uterina não houve diferença entre às espécies analisadas. Já em relação ao perfil oxidativo verificou-se diferença

quanto à presença aumentada da enzima GPx no cio das éguas em relação as jumentas ($p=0,0031$). E a atividade da enzima SOD aumentada no endométrio das jumentas ($p=0,0499$) também no momento do cio. Para a concentração de TBARS e óxido nítrico não houve diferença entre as espécies nos momentos analisados. A modulação da resposta inflamatória entre as duas espécies foi diferente somente no momento pré IA. Tal resultado evidencia a necessidade de realizar mais trabalhos para elucidar o tema e, contribui para discussões que citam outras causas além da inflamação endometrial para a diferença de resultados obtidos entre as duas espécies.

Palavras-chave: Equídeos, Criopreservação, Citologia, Perfil Oxidativo.

ABSTRACT

LAZAROTTO, C. C. **Characterization of the endometrial inflammatory response of jennies inseminated with frozen donkey semen.** 2022. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Reproductive biotechnologies are increasingly widespread in animal species, which contributes to an increase in the number of offspring born from different sires. The frozen semen stands out among the biotechnologies, allowing the use animals from different regions and maintenance of an animal's genetics even of death. However, this biotechnology has limited success when applied to donkeys. It is believed that an exacerbated uterine inflammatory reaction occurs when the endometrium of donkeys exposed to frozen semen. This study aimed to characterize the uterine inflammation in jennies, comparing to mares submitted to the same treatment. Eight jennies and eight mares inseminated with frozen donkey semen, were evaluated during estrus (pre insemination), after 6 hours (n=4 jennies and 4 mares) and 24 hours (n=4 jennies and 4 mares) after Artificial Insemination (AI) with frozen donkey semen. To characterize the endometrial inflammation, cytology was performed, collected with cytological brush for preparation of microscopic slide, and the uterine micro lavage, evaluate the oxidative profile, and the presence of nitric oxide at the different moments. To analyze the oxidative profile, the concentration of the Glutathione Peroxidase enzyme (GPx), the activity of the Superoxide Dismutase enzyme (SOD) and the levels of lipid peroxidation by the Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) test, and the concentration of nitric oxide were analyzed. The results obtained were submitted to statistical analysis by the Shapiro-Wilk test, and did not have normal distribution. Therefore, the difference between the moments in each species was evaluated with the Wilcoxon test and the difference between species in each moment with the Mann-Whitney U test. The tests were considered significant when $p < 0.05$, the analyses were performed in the R environment. As for the uterine cytology analysis, there was no difference between the analyzed species. Regarding the oxidative profile, there was a difference in the increased presence of the enzyme GPx in estrus of mares compared to jennies ($p = 0.0031$). Moreover, the SOD activity enzyme increased

in the endometrium of jennies ($p=0.0499$) also during estrus. For TBARS and nitric oxide concentration there was no difference between the species at the analyzed moments. The modulation of the inflammatory response between the two species was different only at the pre-AI moment. This result highlights the need for further studies to elucidate the subject and contributes to discussions that cite other causes besides endometrial inflammation for the difference in results obtained between the two species.

Key words: Equid, Cryopreservation, Cytology, Oxidative Profile.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** - Desenho esquemático do delineamento experimental realizado para caracterização dos momentos de coletas de amostras uterinas de jumentas e éguas, no cio, 06 horas e 24 horas após IA com sêmen congelado de asininos 34

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01**- Atividade da enzima SOD na espécie equina e asinina no momento da IA – 0 ($p=0,0499$), 6 horas ($p=0,6857$) e 24 horas ($p=0,6631$) pós IA com sêmen congelado asinino. Diferenças estatísticas que apareceram entre os grupos estão marcadas com asterisco 41
- Gráfico 02** - Concentração da enzima GPx na espécie equina e asinina no momento da IA – 0 ($p=0,0031$), 6 horas ($p=0,6631$) e 24 horas ($p=0,3429$) pós IA com sêmen congelado asinino. Diferenças estatísticas que apareceram entre os grupos estão marcadas com asterisco 42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** - Quantidade de PMN recuperados por citologia uterina no cio, 6 e 24 horas após a IA com sêmen congelado de jumento.....39
- Tabela 02** - Resultados obtidos para a atividade de SOD após análise do lavado endometrial de éguas (equino) e jumentas (asinino) no momento da IA – 0, 06 horas após e 24 horas após a IA com sêmen congelado asinino.....40
- Tabela 03** - Resultados obtidos para a concentração da enzima GPx após análise do lavado endometrial de éguas (equino) e jumentas (asinino) no momento da IA – 0, 06 horas após e 24 horas após a IA com sêmen congelado asinino.....41
- Tabela 04** - Resultados obtidos para a concentração de TBARS após análise do lavado endometrial de éguas (equino) e jumentas (asinino) no momento da IA – 0, 06 horas após e 24 horas após a IA com sêmen congelado asinino.....42
- Tabela 05** - Resultados obtidos para a presença de óxido nítrico após análise do lavado endometrial de éguas (equino) e jumentas (asinino) no momento da IA – 0, 06 horas após e 24 horas após a IA com sêmen congelado asinino.....43

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Reagentes utilizados para preparar a solução base para a reação de Griess, utilizada para verificação de nitratos e nitritos presentes na amostra de líquido proveniente de lavado endometrial.....	37
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

hCG – Gonadotrofina Coriônica humana

IA – Inseminação Artificial

PMN – Polimorfosnucleares

Cox 2 – Cicloxigenase 2

AINE – Antiinflamatório não esteroidal

EROs – Espécies reativas ao oxigênio

ERN – Espécies reativas ao nitrogênio

mL – mililitros

°C – graus Celsius

GPx – Glutathione Peroxidase

SOD – Superóxido Dismutase

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

LA – Laboratório de Andrologia

EPPC – Endometrite persistente pós cobertura

SNP – Nitropussiato de sódio

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 USO DE SÊMEN CONGELADO EM ASININOS.....	22
2.2 INFLAMAÇÃO UTERINA PÓS COBERTURA	23
3 HIPÓTESE	29
4 OBJETIVO	30
5 MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 ANIMAIS.....	31
5.2 CONGELAÇÃO DE SÊMEN	31
5.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E COLETA DAS AMOSTRAS UTERINAS ...	33
5.4 ANÁLISES LABORATORIAIS	35
5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
6 RESULTADOS	39
6.1 CITOLOGIA ENDOMETRIAL.....	39
6.2 PERFIL OXIDATIVO	40
6.3 ÓXIDO NÍTRICO	42
7 DISCUSSÃO	44
8 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os equídeos são mamíferos pertencentes a família Equidae e ao gênero *Equus*, sendo as espécies domésticas representadas pelos equinos (*Equus caballus*, 2n:64), asininos (*Equus asinus*, 2n:62) e pelos híbridos muar e bardoto, resultado do acasalamento das duas espécies anteriores (NEVES; MIRANDA; TORTORELLA, 2010) (RIBEIRO, *et al.*, 2017).

O Brasil possuía cerca de 5.962.126 cabeças de equinos e em torno de 1.252.029 cabeças de asininos e muares em 2014 (FAO, 2014). Apesar da criação de jumentos e sua participação na produção de muares crescer anualmente, algumas raças de asininos estão ameaçadas de extinção, como o jumento Catalão na Espanha e o Martina Franca na Itália (FAO, 2014)(ALMEIDA JÚNIOR, 2013). No setor, além da receita de mais de 16 bilhões de reais, emprega-se em torno de 3 milhões de pessoas de maneira direta ou indireta no Brasil (FAO, 2014).

Além de serem utilizados de maneira tradicional como animais de transporte e tração, a manutenção de criatórios para produção de leite de jumentas também tem destaque principalmente na Europa e na Ásia, onde é usado para produção de queijo que possui um alto valor comercial, e é consumido por pessoas que possuem intolerância alimentar múltipla (RANGEL, *et al.*, 2015). Ademais, é sabido também do interesse pela carne e, principalmente, pele desses animais pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas chinesas (EL PAIS, 2019).

No Brasil temos um rebanho comercial focado principalmente no jumento Pêga, raça desenvolvida no estado de Minas Gerais pelo padre Manoel Maria Torquato de Almeida de 1810 até 1847, por meio do cruzamento de animais italianos e egípcios, seleção continuada pelo Coronel Eduardo José de Rezende no município de Lagoa Dourada - MG, buscando associar rusticidade, andar marchador, tamanho médio, beleza e delicadeza dos animais (ALMEIDA JÚNIOR, 2013).

Além do crescimento no número de jumentos, o mercado desta espécie também é bastante aquecido pelo aumento na procura de híbridos, em especial mulas e burros para trabalho de campo, diferentes modalidades esportivas e de lazer, devido a sua já comprovada resistência e conforto quando cruzada com

raças de equinos marchadores, para uso em longos passeios e cavalgadas (REVISTA HORSE, 2021).

Levando em consideração as características do mercado para a espécie asinina a busca por animais se tornou cada vez maior, e conseqüentemente, o uso de biotecnologias reprodutivas, que possam aumentar o número de animais nascidos e o melhoramento/variabilidade genética dentro das raças, sendo o sêmen congelado uma excelente alternativa para sanar essa demanda (VIDAMENT, *et al.*, 2009).

Apesar do crescente aumento de publicações sobre reprodução assistida e biotecnologias aplicáveis na espécie asinina, este ainda é baixo quando comparado a espécie equina. Sendo que em uma primeira busca na plataforma de pesquisa PubMed, no dia 01/04/2020 quando usamos as palavras “donkey reproduction” os primeiros trabalhos datam de 1945 e aparecem 7242 resultados, mas após a classificação de títulos restam somente 137 publicações. Dentre estas encontram-se publicações sobre as características de gestação, feto, hematológicas, endócrinas, colostrais e biotecnologias da reprodução de maneira geral. Mesmo que as palavras de pesquisa tenham sido amplas o que se percebe que quando comparado com equinos, os grupos que trabalham com jumentos ainda são poucos (PubMed, busca em 01/04/2020).

Quando se considera o uso de biotecnologias reprodutivas, grande parte do que se faz em asininos é adaptado de equinos, sem levar em consideração as particularidades e diferenças das duas espécies (PEÑA-ALFARO, *et al.*, 2012).

O incremento genético na criação de asininos é limitado, principalmente pelo número relativamente baixo de reprodutores jumentos em uma mesma região (CANISSO, 2008).

Este problema poderia ser minimizado com o uso das técnicas de refrigeração e congelação de sêmen, com conseqüente aumento de diversidade genética entre indivíduos de uma população, favorecido pelo transporte de sêmen entre diferentes regiões do país e do mundo (CONTRI, *et al.*, 2012).

Apesar da demanda por novas tecnologias envolvendo o processo de congelação do sêmen asinino ter aumentado nos últimos anos, ainda é grande a limitação de informações, principalmente quanto a utilização de sêmen congelado de asininos na inseminação de jumentas. Ao que tudo indica, as

jumentas podem apresentar uma reação inflamatória uterina exacerbada frente ao sêmen congelado, no entanto, esta questão precisa ser melhor elucidada (OLIVEIRA, *et al.*, 2006).

Os índices de fertilidade obtidos na inseminação de jumentas com sêmen congelado de asininos se mantêm em torno de 11%, enquanto em éguas chega a alcançar índices de 40% quando utilizado o mesmo sêmen e seguidos os mesmos protocolos (OLIVEIRA, *et al.*, 2006). Segundo alguns pesquisadores os resultados obtidos nas avaliações do sêmen asinino após descongelamento, principalmente no que diz respeito a morfologia espermática, deveriam proporcionar resultados de fertilidade melhores do que é obtido em outras espécies, ou seja, exatamente o contrário do que se observa na prática (CANISSO, 2008).

Desta forma, o presente estudo foi idealizado, com o objetivo de contribuir para o entendimento da participação da inflamação uterina pós cobertura, com sêmen congelado asinino, comparando a reação uterina de éguas e jumentas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÍNDICES REPRODUTIVOS COM O USO DE SÊMEN CONGELADO EM ASININOS

A taxa de prenhez com uso de sêmen congelado aceitável para equinos está em torno de 40%. Esse índice também é alcançado quando se utiliza sêmen congelado de asininos para inseminação de éguas, entretanto, quando se utiliza sêmen congelado de asininos para inseminação artificial de fêmeas da mesma espécie esses índices na média, caem consideravelmente (OLIVEIRA, *et al.*, 2006).

Taxas de prenhez de 47,36% com sêmen refrigerado e 11% com sêmen congelado foram obtidas na inseminação de jumentas por Rozas 2005. Resultados semelhantes, de 11% (1/9) de taxa de prenhez em jumentas inseminadas com sêmen congelado foram obtidos em 2005 por CASTEJÓN. Como tentativa de melhorar os índices reprodutivos com sêmen congelado em asininos, Oliveira, *et al.*, em 2006 sugeriram, sem sucesso, o aumento da dose inseminante. Vidament, *et al.* em 2009, compararam os índices de gestação de jumentas e éguas submetidas ao mesmo protocolo de inseminação, e obtiveram 45% de taxa de prenhez com sêmen de jumento refrigerado tanto no grupo de jumentas, como no grupo de éguas; 36% e 11% quando éguas e jumentas, respectivamente, foram inseminadas com sêmen congelado de jumentos. Estes números demonstram uma coerência nos resultados obtidos, ou seja, logo após a colheita ou refrigeração do sêmen, os jumentos produzem bons índices de fertilidade, se mantendo com índices de prenhez ao redor de 45% para éguas e jumentas inseminadas. Após o processo de congelação e descongelação, a despeito das manutenções das características microscópicas, o índice de prenhez é diferente entre éguas (40%) e jumentas (10%) (VIDAMENT, *et al.*, 2009).

Quando foi realizada a inseminação artificial de jumentas 40 horas após a indução da ovulação com 1000 UI de Gonadotrofina Coriônica humana (hCG), acrescentando plasma seminal ao sêmen congelado e fazendo uma lavagem uterina com 1000 mL de ringer lactato 10 e 24 horas após a inseminação, índices satisfatórios de prenhez foram alcançados (64%) por Rota, *et al.*, 2012. Demonstrando a necessidade de tratamento diferenciado para incrementar os

resultados da técnica (ROTA, *et al.*, 2012) porém tais índices não tiveram repetibilidade. Em 2016, Oliveira e colaboradores, utilizando sêmen criopreservado de jumentos acrescido de 70% de plasma seminal após a descongelação associado a lavagem uterina 10 horas após o procedimento de IA em jumentas, relataram a probabilidade de resultados 8,7 vezes maiores na taxa de prenhez (OLIVEIRA, 2015).

Acredita-se que o sêmen congelado de asinino cause uma resposta inflamatória exacerbada no útero das fêmeas asininas (OLIVEIRA, *et al.*, 2016), e que o plasma seminal possa participar com proteínas pró e anti-inflamatórias capazes de modular essa resposta inflamatória uterina (FEDORKA, *et al.*, 2017)(WOODWARD, *et al.*, 2013).

2.2 INFLAMAÇÃO UTERINA PÓS COBERTURA

No momento em que realiza-se a cobertura ou inseminação artificial em uma fêmea, uma considerável quantidade de substâncias entra no ambiente uterino. Podendo estas serem bactérias que estejam presentes na vagina, partículas que estão no material de manipulação ou no pênis do macho, bem como plasma seminal ou diluidor usado para manutenção espermática (HEMBERG; LUNDEHEIM; EINARSSON, 2005).

Todas essas substâncias desencadeiam um processo inflamatório fisiológico no ambiente uterino, chamado de endometrite transitória (HEMBERG; LUNDEHEIM; EINARSSON, 2005). Essa resposta inflamatória nas éguas tem um pico de 4 a 6 horas após a monta natural ou IA, e deve ser totalmente controlada após 24 horas (CHRISTOFFERSEN; TROEDSSON, 2017).

É sabido que o trânsito no oviduto dos embriões nos equídeos é de 5 a 6 dias, assim inflamações uterinas que duram mais de 96 horas após a ovulação interferem nas condições do endométrio e conseqüentemente na viabilidade embrionária (LEBLANC; CAUSEY, 2009).

A resposta uterina acontece pela ação conjunta de barreiras físicas como a musculatura da região perineal, vulva, vagina e cérvix, pelo sistema imunológico que faz a liberação de neutrófilos e macrófagos para o lúmen uterino e, por um sistema linfático funcional que deverá drenar esse excesso de conteúdo para fora do ambiente uterino (KATILA, 2012).

Uma possível explicação para a inflamação endometrial pós IA em jumentas, quando comparadas a éguas, é a diferença da anatomia entre as duas espécies. Como característica mais marcante podemos citar a cérvix, este órgão é significativamente mais longo e apresenta um tônus muito mais acentuado em jumentas do que em éguas o que pode dificultar a limpeza uterina pós IA (VENDRAMINI, *et al.*, 2014).

Um fato interessante que pode ser observado em jumentas é a presença de eosinófilos, além de neutrófilos no lúmen uterino (MIRÓ; PAPAS, 2018). Eosinófilos só são vistos em éguas que apresentam endometrite fúngica, pneumovagina ou reações anafiláticas. Mas estão presentes no endométrio de jumentas saudáveis em estro e também fazem parte da reação inflamatória uterina pós cobertura, evidenciando a diferença na resposta inflamatória que ocorre nas duas espécies (MIRÓ; PAPAS, 2018) (CANISSO, *et al.*, 2019). Um trabalho recente que verificou a presença de eosinófilos no endométrio de jumentas e éguas e, fez a correlação entre estes em relação a presença da interleucina 33 e, também de diferentes tipos de colágeno no endométrio, evidenciou uma diferença entre as duas espécies, no que diz respeito a quantidade de eosinófilos presentes e também a caracterização da fibrose endometrial em relação ao tipo de colágeno presente nas duas espécies (MIRÓ, *et al.*, 2020).

Para que ocorra a drenagem uterina acontece um processo de polarização e despolarização da musculatura uterina, que em fêmeas saudáveis inicia do sentido interno do útero levando o conteúdo em direção a cérvix e, conseqüentemente eliminação via vaginal. Já em fêmeas que não estejam com a funcionalidade uterina normal essas contrações ocorrem de maneira desordenada (REITZENSTEIN, *et al.*, 2002). Diferentes fatores podem alterar a funcionalidade da atividade linfática, dentre eles idade da fêmea, número de gestações e fatores que alteram a liberação de ocitocina e prostaglandina local ou sistêmica (KATILA, 2012). Além disso, alterações anatomopatológicas, como fibroses endometriais, falha de relaxamento cervical podem contribuir para o acúmulo de líquido intrauterino e manutenção da inflamação (CHRISTOFFERSEN, *et al.*, 2017).

As respostas celulares que ocorrem após a cobertura irão controlar a intensidade da resposta inflamatória (OLIVEIRA, *et al.*, 2006). As primeiras células que chegam até o lúmen uterino após o insulto da inseminação são os

polimorfonucleares (PMN), neutrófilos, que aparecem em torno de 30 minutos após a cobertura ou IA, atuando no processo de limpeza uterina por meio de fagocitose (KATILA, 1996). Além deles, o leucotrieno B₄, a prostaglandina E, prostaglandina F₂ alfa (KATILA, 2012)(ALGHAMDI; TROEDSSON, 2002) citocinas, quimiocinas e outros mediadores que juntos irão formar a resposta celular (ZERBE, *et al.*, 2003). O principal papel dos mediadores inflamatórios é atrair mais células de defesa para o local onde está ocorrendo o processo inflamatório (KATILA, 2012).

As citocinas também desempenham um importante papel nesta fase de inflamação aguda. A interleucina 6 produzida por mastócitos e macrófagos em resposta à presença de endotoxinas, promove a diferenciação das células B e das células T, além de estimular a produção de proteínas de fase aguda, e promover a regulação da transição de dominância dos neutrófilos para macrófagos (KATILA, 2012). A interleucina 12 induz a produção de interferon- γ e estimula as células Natural Killer e a interleucina 8 induz quimiotaxia dos polimorfo-nucleares promovendo migração para o lúmen uterino e degranulação das células fagocitárias com consequente liberação de várias enzimas que ajudam a completar a digestão celular (WOLF, *et al.*, 2012).

Além destes, outro importante mediador do processo inflamatório é o fator de necrose tumoral alfa que está presente de maneira ativa sendo responsável pela expressão de várias substâncias e alguns genes que atuam no processo inflamatório bem como pela liberação de prostaglandina F₂ alfa pelo endométrio (WOLF, *et al.*, 2012).

Pode se afirmar que em éguas suscetíveis a endometrite pós cobertura ocorre um aumento da interleucina 8 (pró inflamatória) e diminuição da interleucina 10 (anti inflamatória) 6 horas após a cobertura ou IA, com incremento na quantidade de interleucina 1, interleucina 6 e fator de necrose tumoral as 24 horas (KATILA, 2012).

Fêmeas que ultrapassam o período fisiológico de 24 horas para eliminação da inflamação transitória acumulam óxido nítrico (MACKAY, 2000). O óxido nítrico é produzido pela lise de bactérias no interior de neutrófilos e macrófagos (MACKAY, 2000). Tal substância promove o relaxamento da musculatura lisa, e quando em excesso pode dificultar a contratilidade uterina,

prejudicando a drenagem e a limpeza do útero (ALGHAMDI; TROEDSSON, 2002).

Em jumentas, as informações sobre a reação uterina pós-cobertura são mais escassas, foram avaliados os efeitos da adição de plasma seminal e lavado uterinos após a IA, e os resultados indicaram diminuição do número de neutrófilos no ambiente uterino (VILÉS, *et al.*, 2013)(OLIVEIRA, *et al.*, 2016)(ROTA, *et al.*, 2012). Além disso, Vilés, *et al.*, 2013 verificaram a maior expressão da enzima cicloxigenase-2 (Cox-2) em jumentas após IA sugerindo um aumento na resposta inflamatória endometrial. Estes mesmos pesquisadores (VILES, *et al.*, 2013), em outro trabalho realizaram a aplicação de cetoprofeno em fêmeas asininas no dia da IA e nos 5 dias subsequentes e encontraram uma diminuição do número de neutrófilos as 6 e 24 horas após a IA no grupo que recebeu o antiinflamatório não esteroideal (AINE). Além disso, a administração do AINE (cetoprofeno), interferiu também na expressão de Cox-2 no endométrio das jumentas tratadas, sugerindo que esse, e outros mediadores inflamatórios, podem estar presentes e controlarem a manifestação de PMN no útero pós IA (MIRÓ; PAPAS, 2017).

Outra avaliação que vem tendo destaque sobre as análises de inflamação é o perfil oxidativo. Concentrações baixas de espécies reativas têm importância na modulação de diversos processos fisiológicos do trato reprodutivo feminino, como na maturação oocitária, na atresia folicular, na função do corpo lúteo, na interação gamética, na fertilização, no desenvolvimento e na implantação embrionária. Porém, quando há um desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes (radicais livres) e os mecanismos antioxidantes de defesa do organismo, pode ocorrer o estresse oxidativo, que tem sido envolvido na etiopatogênese de diversas doenças reprodutivas e da infertilidade. Em mulheres altos índices de produtos do estresse oxidativo estão presentes em pacientes diagnosticadas com endometriose sendo estes associados a quadros de infertilidade (ANDRADE, *et al.*, 2010).

Nos últimos anos muitos estudos tem analisado os antioxidantes, devido as descobertas sobre os variados efeitos que os radicais livres têm sobre o organismo (GEORGE; OSHARECHIREN, 2009)(VELLOSA, *et al.*, 2013). A oxidação é fundamental na vida e nas reações aeróbicas, ou seja, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses

radicais podem ter um elétron desemparelhado nos átomos de oxigênio ou de nitrogênio e são denominados de EROs (espécies reativas de oxigênio) ou ERNs (espécies reativas de nitrogênio). Dentre as EROs temos os radicalares: hidroxila, superóxido, peroxila e alcoxila e os não radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Já nas ERNs temos óxido nítrico, ácido nitroso, nitritos, nitratos e peroxinitritos. Dentre estes alguns podem ser seriamente deletérios ao organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros apenas reagem sobre os lipídeos e, outros são poucos reativos ao organismo mas podem dar origem a espécies reativas danosas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A presença desses radicais no organismo se justifica porque os mesmos estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de algumas substâncias biológicas. Entretanto, o problema ocorre quando estão em excesso já que neste caso poderão causar a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão as proteínas dos tecidos e das membranas, enzimas, carboidratos e DNA (VELLOSA, *et al.*, 2013). Dessa forma podem estar envolvidos no desenvolvimento de diversas doenças e, ainda, agravar qualquer processo inflamatório do organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006) (VELLOSA, *et al.*, 2013).

Apesar de estudarmos separadamente as vias metabólicas e imunes do organismo, estas são interdependentes, ou seja, vários hormônios, citocinas, fatores de transcrição e proteínas de sinalização atuam em ambas as vias para manter a homeostasia do organismo (VELLOSA, *et al.*, 2013). A resposta inflamatória normal é acompanhada pela mobilização de estoques de energia, em especial dos lipídeos, na busca da eliminação do estímulo inflamatório na fase aguda (VELLOSA, *et al.*, 2013).

Existe um sistema de defesa antioxidante que depende do equilíbrio entre a ingestão e a depleção de antioxidantes. Caso essa intervenção não ocorra, o excesso dessas substâncias formadas a partir do estresse oxidativo podem promover a perda da integridade das membranas celulares e causar danos teciduais (GEORGE; OSHARECHIREN, 2009). Algumas situações, onde a produção de espécies reativas supera os sistemas de defesa antioxidante, pode levar a oxidação dos lipídios de membrana, desnaturando proteínas e

atacando ácidos nucléicos, fatos que constituem a base molecular de problemas relacionados a inflamação (VELLOSA, *et al.*, 2013).

3 HIPÓTESE

O uso de sêmen congelado asinino causa uma reação inflamatória exacerbada no endométrio das jumentas, quando comparadas as éguas, resultando em maiores índices inflamatórios e oxidativos no endométrio de jumentas pós IA com sêmen congelado de asinino.

4 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho é caracterizar e comparar a resposta inflamatória no endométrio de jumentas e éguas nos momentos pré, 6 horas e 24 horas após a inseminação artificial com sêmen congelado de asinino, sob as mesmas condições de tempo e desafio.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

O experimento foi conduzido em três propriedades de criação de equídeos localizados no município de Ponta Grossa na região dos Campos Gerais – PR, altitude média 975 metros, latitude 25°, 05'42" – Sul e longitude 50°, 09'43" Oeste, clima subtropical úmido, o experimento aconteceu nos meses de agosto e setembro de 2019, início da estação reprodutiva dos equídeos.

Parte do estudo foi realizado no Haras MJ, onde estavam alocadas 08 fêmeas asininas (*Equus asinus*), adultas, entre 3 e 9 anos de idade, da raça Pêga, que apresentavamaios regulares e sem problemas reprodutivos, destas apenas 03 jumentas já haviam parido, sendo que 02 delas haviam tido uma gestação e uma delas, uma única gestação apenas. No Rancho Manosso, outra propriedade do mesmo município, permaneceram 08 fêmeas equinas (*Equus caballus*), adultas, entre 5 e 8 anos de idade, da raça quarto de milha, também apresentandoaios regulares e livres de problemas reprodutivos, destas 02 éguas já haviam parido uma vez e as demais não tinham histórico de partos, eram usadas apenas como doadoras de embriões.

Para coleta e congelação de sêmen foi utilizado um jumento Pêga (*Equus asinus*), adulto e de fertilidade comprovada com prenhez confirmadas em éguas e jumentas pertencente ao Criatório MF Três Pontos, também localizado no município de Ponta Grossa – PR.

5.2 CONGELAÇÃO DE SÊMEN

A coleta de sêmen foi realizada com o auxílio de uma fêmea em estro e com uso de uma vagina artificial, modelo Botucatu, Botupharma®, Brasil.

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto: motilidade total, porcentagem de células que apresentaram motilidade para qualquer direção nos campos avaliados; Motilidade progressiva, porcentagem de células que apresentaram motilidade retilínea nos campos avaliados; vigor, avaliação subjetiva em microscópio, sendo considerados os valores obtidos em 5 campos de avaliação; volume; concentração, com a contagem na câmara de Neubauer com diluição de 1:20 (sêmen: água destilada). No momento da avaliação, logo

após a coleta, foi feita uma lâmina para posterior análise morfológica, onde foi colocado uma gota de sêmen e uma gota do corante BotuVital, Botupharma®, Botucatu Brasil, que permite a avaliação da morfologia espermática e da integridade de membrana das células.

Para congelamento foram utilizados ejaculados com motilidade total acima de 80%, motilidade progressiva acima de 60%, vigor igual ou superior a 3, escala de 1 a 5, que não ultrapassaram 20% de defeitos totais e com integridade de membrana plasmática acima de 80%. O ejaculado foi diluído com extensor a base de caseína (BotuSêmen Gold – Botupharma®, BR) para atingir a concentração de 50 milhões de células viáveis por mL, cálculo baseado na concentração inicial.

Após a diluição o ejaculado foi submetido ao processo de centrifugação, utilizando-se uma centrífuga com rotor móvel LS-Plus 3 da marca Celm® (400 G por 12 minutos). Após esse processo o pellet de sêmen obtido foi suspenso em meio de criopreservação, Botucio, Botupharma®, Botucatu, Brasil.

A partir da concentração inicial determinada com o uso de uma câmara de Neubauer foi feito o cálculo para obter 100 milhões de células viáveis para cada palheta de 0,5 mL, ou seja 200×10^6 spz/mL. Essas palhetas foram submetidas ao processo de congelamento manual fazendo a curva rápida, conforme descrito por (AMANN; SCIENCE, 1987), permanecendo 20 minutos em geladeira a 4° C, depois foram mantidas por mais 20 minutos em vapor de Nitrogênio a uma distância de 6 centímetros. Após esses 20 minutos as palhetas foram completamente mergulhadas no nitrogênio líquido para finalizar o processo de congelamento. Nessas condições a curva de refrigeração e congelamento ocorre da seguinte maneira: diminuição de 15°C/min entre +5°C e -60°C e diminuição de 4°C/min entre -60°C e -100°C.

No momento da utilização esse sêmen foi mergulhado em Banho Maria permanecendo 1 minuto na temperatura de 37°C e utilizado para inseminação das éguas e das jumentas quando manteve, pós descongelamento, motilidade progressiva igual ou superior a 40% e vigor igual ou superior a 2.

5.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E COLETA DAS AMOSTRAS UTERINAS

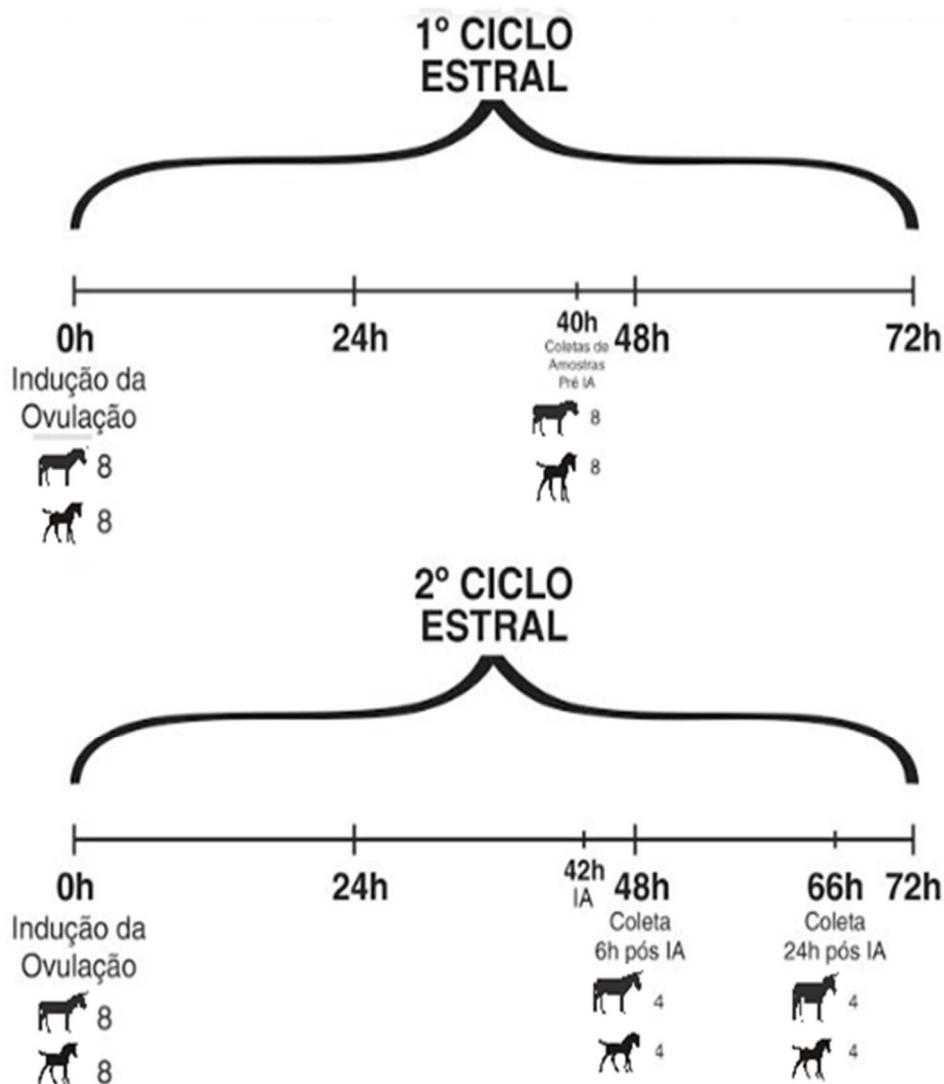
Foram utilizadas 08 éguas Quarto de Milha (E) e 08 jumentas Pêga (A), que tiveram seu ciclo estral acompanhado por palpação retal e ultrassonografia. Quando foi detectada a presença de um folículo dominante acima de 35 mm e edema uterino igual ou superior a 2, em uma escala de 0 a 5, foi realizada a aplicação de um indutor de ovulação a base de acetato de histrelina na dose de 1 mg por animal, Strelin, Botupharma®, Botucatu, Brasil. Após 40 horas da aplicação do indutor de ovulação foram realizadas as primeiras coletas de amostras sendo que neste momento nenhuma das fêmeas estavam ovuladas (grupos:E0 e A0).

No segundo ciclo estral, seguindo o mesmo protocolo de acompanhamento e indução de ovulação todas as fêmeas foram inseminadas com sêmen descongelado de jumento na dose de 800×10^6 de espermatozoides totais, por meio de uma pipeta Provar® e despositado no corpo do útero, nenhuma das fêmeas inseminadas estava ovulada antes da IA.

Em 4 fêmeas equinas (E6) e 4 fêmeas asininas (A6) as amostras foram coletadas após 6 horas da inseminação artificial, enquanto para outras 4 fêmeas equinas (E24) e 4 fêmeas asininas (A24), a coleta de amostras aconteceu 24 horas após a inseminação artificial, conforme representado no desenho esquemático (Figura 1).

Previamente às coletas de material uterino todas as fêmeas passaram por um processo de higienização da região perineal com água e sabão neutro e secagem com papel toalha.

Figura 01 - Desenho esquemático do delineamento experimental realizado para caracterização dos momentos de coletas de amostras uterinas de jumentas e éguas, no cio, 06 horas e 24 horas após IA com sêmen congelado de asininos.



Fonte: LAZAROTTO, C. C., 2019.

Para caracterizar a inflamação uterina das fêmeas, nos diferentes momentos, foram realizados os seguintes procedimentos:

Citologia uterina: a recuperação das células presentes no endométrio foi realizada com o auxílio de um coletor citológico para éguas descartável da marca Provar®, que foi introduzido até a passagem da cérvix protegido por uma camisa sanitária, quando o coletor já havia ocupado o espaço uterino a ponta protegida foi liberada e com a extremidade externa foram feitos movimentos circulares para estimular o contato da escova citológica com a superfície do endométrio. Depois desse processo o coletor foi retirado novamente protegido pelo aparato externo

que compõe o material. A confecção das lâminas para posterior análises em microscópio foi realizada com a passagem com leve pressão das escovas citológicas sobre as lâminas para deposição celular, que após estarem secas foram coradas com panótico rápido para posterior leitura.

Microlavado uterino: para realização do micro lavado foi realizada uma infusão de 200 ml de Ringer com Lactato no endométrio com o uso de um cateter de foley estéril de 32mm. Após a infusão o útero foi devidamente massageado para certificar o contato do líquido com toda superfície uterina, depois desse procedimento o líquido foi recuperado por gravidade em tubos falcon. Estes foram congelados a -20° e posteriormente a -80° para mensuração de óxido nítrico (WOLF, *et al.*, 2016). O mesmo conteúdo líquido recuperado deste lavado também foi usado para se analisar o perfil oxidativo local. Para essa caracterização o líquido foi submetido a diferentes análises laboratoriais para verificação da concentração da enzima Glutathione Peroxidase (GPx), atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) e níveis de peroxidação lipídica pelo teste das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbiturico (TBARS).

5.4 ANÁLISES LABORATORIAIS

Citologia uterina: as lâminas confeccionadas a partir da coleta uterina e coradas com panótico rápido foram analisadas em microscópio em aumento de 100 X e com uso de óleo de imersão. Foram analisadas 200 células e estas foram divididas em células endometriais e PMN (neutrófilos e eosinófilos). A leitura dessas lâminas foi realizada por três diferentes profissionais que desconheciam os animais e a qual grupo as amostras pertenciam, depois das 3 leituras foi feita a média dos resultados obtidos para as células encontradas.

Lavado endometrial: o líquido recuperado pelo micro lavado uterino foi processado no Laboratório de Andrologia – LA, pertencente ao Departamento de Reprodução Animal da Universidade de São Paulo. Onde foram feitas as seguintes análises:

GPx: para sua quantificação foi utilizado 10,15014g da solução Na_2HPO_4 (PM = 141,96) dissolvida em 500 mL de água Mili Q; 1,973257g da solução NaH_2PO_4 (PM = 137,99) dissolvida em 100 mL de água Mili Q; 1,172556g de EDTA (6,3 mM) e tampão fosfato de sódio (143 mM) dissolvido em

400 mL de solução de Na_2HPO_4 , com adição de 100 mL de solução de NaH_2PO_4 e ajustando o pH para 7,5. Foram feitas 50 amostras de 0,0162g do reagente azida sódica (0,25 M; PM = 65,01) dissolvidas em 1 mL de tampão fosfato de sódio (143 mM); 10 amostras de 0,002g do reagente NADPH (0,2 mM) dissolvidas em 10 mL de tampão fosfato de sódio (143 mM) que foram colocadas em recipientes âmbar; 500 amostras de 0,3050g do reagente glutathiona reduzida – GSH (20 mM) dissolvidas em 50 mL de água Mili Q colocadas em recipientes âmbar; 50 amostras de 4,1 μl da enzima glutathiona redutase – GSSG diluídas em 958 μl de tampão fosfato de sódio (143 mM) colocadas em recipientes âmbar; e 90 amostras de 20 μl do reagente t-Butilhidroperóxido – tBPH diluídas em 8670 μl de água Mili Q colocadas em um recipiente âmbar.

SOD: para determinar sua atividade foram usadas 3,55g da solução Na_2HPO_4 (PM = 142,50 mM) dissolvida em 500 mL de água Mili Q; 0,344975g da solução NaH_2PO_4 (PM = 137,99; 50 mM) dissolvida em 50 mL de água Mili Q; 0,0204732g de EDTA (0,1 mM) e tampão fosfato de sódio (50 mM) dissolvido em 500 mL da solução de Na_2HPO_4 , com adição de 50 mL da solução de NaH_2PO_4 e ajustando o pH para 7,8; 0,04g da solução NaOH (0,001 M) dissolvida em 1 L de água Mili Q; 0,037224g de EDTA (0,1 mM) dissolvida em 1 L de água Mili Q. Foi feita 1 amostra de 0,0038g do reagente xantina dissolvida em 50 mL de solução de NaOH (0,001 M); 1 amostra de 0,0124g do reagente citocromo C dissolvida em 50 mL de tampão fosfato de sódio (50 mM) que foi colocada em um tubo âmbar; 1 amostra com 5 mL da solução de xantina adicionada nos 50 mL da solução de citocromo C mantida em um tubo âmbar; e 1 amostra de 2 μl do reagente xantina oxidase adicionada em 200 μl de solução de EDTA (0,1 mM) colocada em um tubo âmbar.

TBARS: incubou-se uma alíquota de 100 μl da amostra a 95° com ácido tiobarbitúrico a 0,8% acrescido de solução tampão de ácido acético num pH de 3,4 e dodecil sulfato de sódio 8,1%. Dessa maneira é possível contabilizar as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico por espectrofotometria de fluxo a um comprimento de onda de 535 nm.

Óxido Nítrico: a determinação da sua dosagem foi feita de maneira indireta pela concentração de nitratos e nitritos presentes na amostra. Com base na reação de Griess com analisador automatizado. Para iniciar o processo foram preparados os seguintes reagentes:

Quadro 01 - Reagentes utilizados para preparar a solução base para a reação de Griess, utilizada para verificação de nitratos e nitritos presentes na amostra de líquido proveniente de lavado endometrial.

REAGENTE	CÓDIGO	NÚMERO CAS
Ácido clorídrico (1 N)	150696.1000 (Sigma)	7647-01-0
Cloreto de vanádio III	208272 (Sigma)	7718-98-1
Sulfato de zinco	51072.01.AF	7446-20-0
Ácido fosfórico 85%	W290017 (Sigma)	7664-38-2
Sulfanilomida (SULF)	59251 (Sigma)	63-74-1
Dicloridrato de N-etilenodiamina (NED)	33461 (Sigma)	1465-25-4
Nitrato de sódio (NaNO₃)	15736 (Sigma)	7631-99-4

Legenda: Número CAS: código de reagente químico.

Fonte: LAZAROTTO, C. C., 2022

A partir desses reagentes fez-se o preparo das seguintes soluções (fórmula para o preparo de 3 placas com capacidade para 80 amostras e lidas em leitor automatizado BIOTEK EL 808^l no comprimento de onda de 540 nm):

Cloreto de Vanádio (8 mg/mL), 7,5 mL desse reagente são dissolvidos em 7,5 mL de 1 N de ácido clorídrico, deve ser preparado no dia do uso. 0,02 de NED foram dissolvidos em 20 mL de água Mili Q, 0,4g de SULF em 20 mL de solução a 5% de H₃PO₄ (1,176 mL de 85% H₃PO₄, 18,824 mL de água Mili Q e 20 mL de ácido clorídrico). Acrescentou-se ainda 30% de sulfato de zinco (2,25g em 7,5 mL de ácido clorídrico).

O preparo da curva padrão de nitrato de sódio foi feito com uma solução estoque de 100 mM de nitrato de sódio (pesou se 0,0085g e dilui-se em 1 mL para obter a concentração de 85 mg de nitrato de sódio). O nitrito é formado pela oxidação do óxido nítrico ($2NO + O_2 = 2NO_2$) e segundo a proporção estequiometrica ambos possuem concentrações equivalentes.

Para o protocolo de desproteinização são usados 100 mL de soro e 50 mL de sulfato de zinco a 30%. Essa solução passa pelo vortex e vai para o processo de centrifugação a 14500 RPM por 20 minutos. Então recupera-se 120 µl de sobrenadante.

Para a redução de nitratos em nitritos usa-se 50 µl de amostra desproteïnizada com 50 µl de cloreto de vanádio em tubo âmbar para fazer a curva padrão.

Para a reação de Griess foi adicionado em cada poço da placa 25 µl de sulfanilamida incubada por 10 minutos. Acrescenta-se mais 25 µl de NED e a placa é incubada a 37°C por 20 minutos. A placa foi lida no leitor de microplaca automatizado BIOTEK EL 808L no comprimento de onda de 540 nm. Onde foram completados 16 poços com amostras da curva padrão e 80 poços com as amostras a serem quantificadas. Todas as amostras foram feitas em duplicatas para calcular a média dos valores correspondentes de absorbância. Por fim utilizou-se uma equação linear gerada pela curva padrão para determinar a concentração de nitritos da amostra.

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Inicialmente, procedeu-se a análise descritiva dos dados com estimativa de média, mediana, desvio padrão, percentil 25% e 75% das variáveis de acordo com as espécies e momentos investigados. Em seguida, verificou-se a aderência das mesmas quanto à distribuição normal pelo teste Shapiro-Wilk e as mesmas não tiveram distribuição normal. Portanto, as comparações foram analisadas com abordagem não paramétrica. A comparação entre grupos e momentos e suas interações foi realizada inicialmente com uma implementação não paramétrica para dados longitudinais, análoga a variância (ANOVA) dois fatores, com o pacote “nparLD” no ambiente R (NOGUCHI, *et al*, 2012). Nesta análise verificou-se a presença de interações entre momentos e grupos.

A diferença entre os momentos em cada espécie foi avaliada com o teste de Wilcoxon e a diferença entre espécies em cada momento com o teste U de Mann-Withney. Para melhor visualização dos resultados, produziu-se gráficos do tipo boxplot. Os testes foram considerados significativos quando $p < 0,05$ e as análises foram realizadas no ambiente R (R Core Team, 2021).

6 RESULTADOS

Previamente foi realizada a análise de interação entre tempo e espécie, onde utilizou-se o modelo de análise de interação entre duas variáveis não paramétricas análogo a ANOVA two-way na abordagem não paramétrica. E nessas análises obteve-se os seguintes resultados: SOD U/ml: $p=0,0308$; Atividade de GPX: $p=0,0227$; Concentração de TBARS: $p=0,0264$; Óxido nítrico no lavado: $p=0,0052$; PMN: $p=0,0021$. Considerando o valor de p significativo quando menor que 0,05 todas as interações foram positivas, desta forma os resultados das variáveis tempo e espécie estão apresentados abaixo.

6.1 CITOLOGIA ENDOMETRIAL

Na citologia endometrial não houve diferença na quantidade PMN encontrados nas duas espécies nos tempos 0, 6 e 24 horas após IA com sêmen congelado de asinino (Tabela 1).

É válido ressaltar também que os PMN encontrados foram neutrófilos e eosinófilos, sendo que eosinófilos estavam no útero de 04 jumentas, no momento do cio e se mantiveram em 01 delas 24 horas pós a IA. Nenhum eosinófilo foi detectado nas citologias endometriais de éguas.

Quanto a comparação dos achados celulares nos diferentes tempos dentro da mesma espécie houve diferença nos momentos D6 X D24 na espécie equina ($p=0,026$) (Tabela 1).

Tabela 01 - Quantidade de PMN recuperados por citologia uterina no cio (0), 6 e 24 horas do endométrio de éguas e jumentas, após a IA com sêmen congelado de jumento.

Momento	Média - A	DP - A	Média - E	DP - E	p – EE
Pré IA - 0	0,2	±0,7	0	±0	0,382
06 horas	17,2	±4,1	16,8	±7	0,663
24 horas	8	±11,8	0,5	±1	0,408
p D0 x D6	0,125	-	0,098	-	-
p D0 X D24	0,423	-	1	-	-
p D6 X D24	0,309	-	0,026	-	-

Legenda: PMN: polimorfonucleares; A: asininos; E: equinos; DP: desvio padrão; EE: entre as espécies; $p \leq 0,05$

Fonte: LAZAROTTO, C.C., 2022.

6.2 PERFIL OXIDATIVO

Para análise do perfil oxidativo após a inseminação foram analisadas a atividade de SOD, a concentração de GPX, o índice de peroxidação lipídica pelo TBARS e a concentração de Oxido Nítrico. Na tabela 2 encontram-se os valores obtidos para a concentração de SOD nas espécies equina e asinina. Para tal enzima houve diferença no tempo 0, ou seja, no momento da ovulação onde a enzima SOD encontrava-se em maior quantidade no lavado recuperado do endométrio das jumentas ($p = 0,0499$). Passadas 06 e 24 horas da IA os valores encontrados foram semelhantes nas duas espécies. Quanto à comparação da enzima SOD nos diferentes tempos da mesma espécie não houve diferença em nenhum momento e em nenhuma das espécies (Tabela 2).

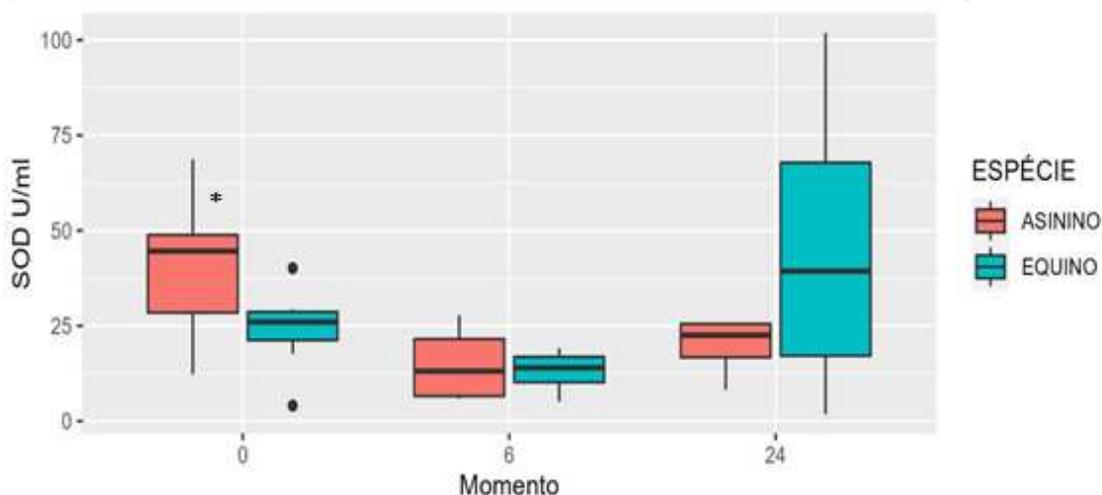
Tabela 02 - Resultados obtidos para a atividade da enzima SOD no lavado endometrial de éguas (equino) e jumentas (asinina) no momento da IA (0), 06 horas após e 24 horas após a IA com sêmen congelado asinino.

Momento	Média - A	DP - A	Média - E	DP - E	p – EE
Pré IA – 0	41,0	±18,4	24,3	±10,4	0,0499
06 horas	15,0	±10,5	13,1	±6,1	0,6857
24 horas	19,7	±8,2	45,6	±43,8	0,6631
p D0 X D6	0,375	-	0,125	-	-
p D0 X D24	0,125	-	0,625	-	-
p D6 X D24	0,468		0,343		

Legenda: SOD: Superóxido dismutase; A: asininos; E: equinos; DP: desvio padrão; EE: entre as espécies; $p \leq 0,05$.

Fonte: LAZAROTTO, C.C., 2022

Gráfico 01 - Atividade da enzima SOD na espécie equina e asinina no momento da IA – 0 ($p=0,0499$), 6 horas ($p=0,6857$) e 24 horas ($p=0,6631$) pós IA com sêmen congelado asinino.



Legenda: diferenças estatísticas que apareceram entre os grupos estão marcadas com asterisco ($p \leq 0,05$). Os outliers estão marcados com pontos.

Fonte: LAZAROTTO, C.C., 2022

Na análise da concentração de GPx (Tabela 3), obtivemos diferença entre as duas espécies no momento 0, onde na espécie equina os valores encontrados foram maiores do que na espécie asinina ($p = 0,0031$), nos outros momentos 6 e 24 horas não houve diferença entre as espécies (Gráfico 2). Não foram encontradas diferenças na concentração da enzima entre os diferentes tempos.

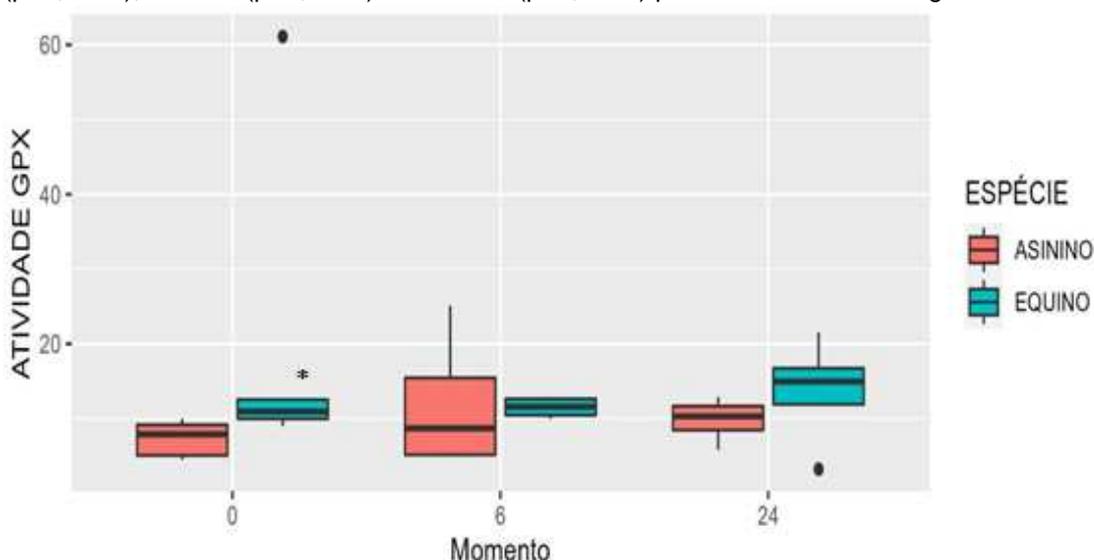
Tabela 03 - Resultados obtidos para a concentração da enzima GPx após análise do lavado endometrial de éguas (equino) e jumentas (asinina) no momento da IA – 0, 06 horas após e 24 horas após a IA com sêmen congelado asinino.

Momento	Média - A	DP - A	Média - E	DP - E	p – EE
Pré IA – 0	7,4	±2,3	17,1	±10,4	0,0031
06 horas	11,9	±9,4	11,5	±6,1	0,6631
24 horas	9,8	±3,0	13,7	±43,8	0,3429
p D0 X D6	0,125	-	0,789	-	-
p D0 X D24	0,999	-	0,875	-	-
p D6 X D24	0,885	-	0,343	-	-

Legenda: GPX: Glutathiona Peroxidase A: asininos; E: equinos; DP: desvio padrão; EE: entre as espécies; $p \leq 0,05$.

Fonte: LAZAROTTO, C.C., 2022

Gráfico 02 - Concentração da enzima GPx na espécie equina e asinina no momento da IA – 0 ($p=0,0031$), 6 horas ($p=0,6631$) e 24 horas ($p=0,3429$) pós IA com sêmen congelado asinino.



Legenda: diferenças estatísticas que apareceram entre os grupos estão marcadas com asterisco. Outliers marcados com pontos.

Fonte: LAZAROTTO, C.C., 2022

A concentração de TBARS (Tabela 4), não foi diferente entre os grupos e momentos avaliados.

Tabela 04 - Resultados obtidos para a concentração de TBARS após análise do lavado endometrial de éguas (equino) e jumentas (asinina) no momento da IA – 0, 06 horas após e 24 horas após a IA com sêmen congelado asinino.

Momento	Média - A	DP - A	Média - E	DP - E	p – EE
Pré IA – 0	109,1	±8,0	125,0	±25,5	0,3282
06 horas	113,6	±12,1	104,2	±3,9	0,2111
24 horas	109,4	±10,4	167,1	±122,0	0,8857
p D0 X D6	0,375	-	0,255	-	-
p D0 X D24	0,999	-	0,875	-	-
p D6 X D24	0,486	-	0,486	-	-

Legenda: TBARS: substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico; A: asininos; E: equinos; DP: desvio padrão; EE: entre as espécies; $p \leq 0,05$.

Fonte: LAZAROTTO, C.C., 2022

6.3 ÓXIDO NÍTRICO

Além das enzimas referentes ao estresse oxidativo também foi quantificado o óxido nítrico presente nos lavados endometriais (Tabela 5), os

resultados para esse marcador não apresentaram diferença em nenhum dos grupos e momentos analisados.

Tabela 05 - Resultados obtidos para a presença de óxido nítrico após análise do lavado endometrial de éguas (equino) e jumentas (asinina) no momento da IA – 0, 06 horas após e 24 horas após a IA com sêmen congelado asinino.

Momento	Média - A	DP - A	Média - E	DP - E	p – EE
Pré IA – 0	2,55	±0,47	2,59	±0,0049	0,9999
06 horas	2,59	±0,0008	2,59	±0,0057	0,9999
24 horas	2,59	±0,0025	2,59	±0,00057	0,4651
p D0 X D6	0,125	-	0,581	-	-
p D0 X D24	0,125	-	0,097	-	-
p D6 X D24	1	-	0,309	-	-

Legenda: A: asininos; E: equinos; DP: desvio padrão; EE: entre as espécies; p ≤0,05.

Fonte: LAZAROTTO, C.C., 2022

7 DISCUSSÃO

O sêmen congelado de asininos vem sendo usado para IA de jumentas e éguas, porém com resultados satisfatórios somente na espécie equina, pois quando utilizado na espécie asinina, os índices de prenhez obtidos são limitados (CANISSO, 2008). Uma explicação para o fato, seria uma possível inflamação exacerbada pós IA no endométrio das jumentas, frente ao sêmen congelado (OLIVEIRA, *et al*, 2016). Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar e comparar a inflamação uterina pós IA com sêmen congelado de jumentos em jumentas e éguas obtendo amostras diretamente do ambiente uterino.

Na presente pesquisa não houve diferença em relação a quantidade total de PMN encontrados no endométrio das duas espécies. Foram encontrados, em sua maioria neutrófilos, e alguns eosinófilos nas jumentas, conforme descrito por Miró e colaboradores, como um achado normal para as fêmeas asininas no momento do cio (MIRÓ, 2018). Nas éguas a presença de eosinófilos está relacionada a casos de pneumoutero, endometrite bacteriana e endometrite fúngica, ou seja, esse tipo de célula não faz parte de achados uterinos normais para éguas (RIBAS, *et al*, 2014).

Segundo Quartuccio e colaboradores, a idade das jumentas e o número de partos das mesmas também influenciam na quantidade de células endometriais e PMN encontrados pela citologia (QUARTUCCIO, *et al.*, 2020). Na presente pesquisa foram utilizadas algumas fêmeas nulíparas e outras que tinham tido 1 ou 2 partos, mas nenhuma delas com mais de 9 anos de idade o que pode justificar o fato de não terem sido observadas grandes diferenças no perfil celular encontrado no útero das fêmeas.

Quando comparadas a quantidade de células encontradas no lúmen uterino nos diferentes momentos na mesma espécie, houve diferença no momento 06 horas em relação ao momento 24 horas no endométrio das éguas ($p=0,026$), evidenciando uma contagem de polimorfonucleares maior no momento 06 horas, logo após a IA, quando sabe-se que a atividade inflamatória está mais intensa em resposta ao insulto causado pela IA. Mas que voltou a diminuir passadas 24 horas o que demonstra uma não susceptibilidade do grupo de éguas utilizadas a EPPC.

Observou-se diferença na atividade da enzima SOD, onde no momento da ovulação a enzima SOD encontrava-se em maior atividade no lavado recuperado do endométrio das jumentas ($p = 0,0499$). Passadas 06 e 24 horas da IA os valores encontrados foram semelhantes nas duas espécies. A SOD é uma enzima que contribui para a minimização dos efeitos oxidativos das EROs (LIMA-VERDE, 2011), sua presença em maior quantidade no endométrio das jumentas no momento do estro demonstra um perfil oxidativo diferente nesta espécie em relação as éguas. Porém, essa diferença aconteceu somente antes da IA pode-se dizer que não foi o sêmen congelado o responsável por essa maior atividade.

Outra enzima analisada foi a GPx, cuja concentração foi diferente também no momento 0. A mesma estava presente em maior concentração no endométrio das éguas ($p=0,003$) do que no endométrio das jumentas. Essa enzima participa da doação do O_2^- ao H_2O_2 , sendo este último convertido pela catalase a oxigênio e água (MISRA; FRIDOVICH, 1972). Essa também é uma enzima que contribui para a remoção das EROs nos tecidos (LIMA-VERDE, 2011), sua presença evidencia a modulação do perfil oxidativo no momento do estro, que pode ser diferente entre as duas espécies. Maior atividade de SOD nas jumentas e maior concentração de GPx nas éguas no momento em que existe, a possibilidade de IA ou monta natural e que estas desencadeariam uma inflamação fisiológica. Sendo estas moléculas antioxidantes naturais produzidos pelo organismo estes poderiam contribuir para controlar essa inflamação (LIMA-VERDE, 2011),

A concentração de TBARS não apresentou diferença entre as espécies em nenhum dos momentos analisados. A concentração de TBARS é uma maneira bastante difundida de verificar indiretamente o estresse oxidativo, sendo que um trabalho realizado com vacas holandesas comparando a concentração de TBARS, recuperado do lavado uterino de vacas saudáveis versus endometrite clínica e endometrite subclínica encontrou maior quantidade da molécula nos dois últimos grupos (CARVALHO, 2002).

Alguns estudos que se atém a verificar e quantificar a presença de óxido nítrico em éguas pós cobertura, evidenciaram que este apresenta-se em maior concentração naquelas éguas que são susceptíveis a endometrite persistente pós cobertura (MALOUFI, *et al.*, 2002). O grupo de éguas escolhidas para o

presente trabalho foi de animais saudáveis, foi levado em consideração na escolha dos animais a exclusão daquelas que apresentavam qualquer sinal de uma possível endometrite pelas características clínicas e pelo histórico reprodutivo, o que pode explicar o baixo índice de óxido nítrico encontrado nos momentos analisados. Nas jumentas os níveis de óxido nítrico também se mantiveram baixos, sendo que em nenhum momento se verificou diferença na concentração de óxido nítrico encontrado nas duas espécies.

Verificou-se que *in vitro*, a presença de óxido nítrico altera a sobrevivência dos oócitos bovinos (VIANA, *et al.*, 2007). Em outro estudo que verificou o desenvolvimento de embriões de camundongos *in vitro* evidenciou-se que não só a presença em concentrações não adequadas de óxido nítrico, mas também a sua total ausência levam a apoptose e causam a morte embrionária precoce (CHEN; JIANG; TZENG, 2001). Na realização deste trabalho foi observada uma quantidade mínima de óxido nítrico em alguns momentos de ambas as espécies, 06 horas pós IA nas jumentas e 24 horas pós IA nas éguas, porém em nenhum momento este esteve completamente ausente. Se levarmos em consideração os resultados dos trabalhos citados, podemos afirmar que, estas concentrações obtidas podem não interferir na sobrevivência dos oócitos e embriões destas fêmeas saudáveis, mas que existe a possibilidade de concentrações maiores interferirem na fertilidade, ou na sobrevivência embrionária em animais susceptíveis a endometrite.

Um experimento realizado com éguas receptoras de embrião no período final do estro não mostrou diferença entre os níveis de óxido nítrico em éguas classificadas como livres ou acometidas por endometrite com base no exame citológico. Onde, apesar da diferença na citologia todas as éguas apresentarem a mesma quantidade de óxido nítrico nessa fase do ciclo estral (LINHARES, 2013).

Quando se utilizou a inoculação bacteriana para induzir a endometrite experimental em éguas e submetendo, ou não, essas a tratamento com glicocorticoide demonstrou-se que a quantidade de óxido nítrico presente no endométrio do grupo controle, que não recebeu a infecção experimental e, dos grupos que receberam a infecção e, que foram tratadas ou não, não apresentou diferença, o que demonstra que os momentos em que as amostras uterinas são coletadas pode ser o ponto crucial para o entendimento da participação do óxido

nítrico sobre a resposta inflamatória uterina (WOLF, *et al.*, 2016), no presente trabalho foram selecionados os momentos pré IA, 06 e 24 horas pós IA, por serem os momentos críticos para o entendimento da inflamação no momento do estro e após a IA.

Assim, com os animais e parâmetros analisados, a inflamação endometrial causada pelo sêmen congelado, não foi diferente entre asininos e equinos, refutando a hipótese deste trabalho. Deixando em aberto a real influência da resposta inflamatória uterina sobre as diferentes taxas de gestação obtidas nas duas espécies.

Entretanto, um grupo de pesquisadores que atingiu um índice de 50% de gestação em jumentas com sêmen congelado asinino por congelamento direto, maneira que convencionalmente não é utilizada para congelar sêmen de equinos, mas sim de bovinos, carneiros e suínos, atribui esse alto índice de gestação a mudança do protocolo de congelamento, bem como a não utilização de indutores de ovulação (SARAGUSTY, *et al.*, 2017). Acredita-se segundo este trabalho que o uso de indutores de ovulação em jumentas sejam eles análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ou Gonadotrofina Coriônica humana (hCG), pode interferir na maturação oocitária, promovendo a ovulação de oócitos imaturos e não passíveis de fertilização (SARAGUSTY, *et al.*, 2017). Mais uma vez o alto índice de prenhez obtido aponta para que a inflamação causada pelo sêmen não seja o único empecilho, já que houve repetidas IAs, e mesmo assim os resultados de prenhez foram satisfatórios (50%) (SARAGUSTY, *et al.*, 2017).

O método de congelamento utilizado bem como a ação dos indutores de ovulação na falha de maturação oocitária são questões que precisam ser completamente elucidadas, mas são fatores que somados a uma modulação inflamatória diferente pré IA, como foi visto no presente trabalho poderiam ajudar a explicar a causa de um resultado limitado de prenhez com uso de sêmen congelado na espécie asinina.

8 CONCLUSÕES

Com o presente trabalho conclui-se que para os parâmetros analisados para avaliar a inflamação endometrial de éguas e jumentas pós inseminação artificial com sêmen congelado de jumentos, não houve diferença entre as espécies, o que refuta a hipótese inicial. Em relação às enzimas usadas para avaliar o perfil oxidativo do endométrio pode-se dizer que se notou uma diferença entre espécies, antes da IA, não tendo ligação com o sêmen.

REFERÊNCIAS

ALGHAMDI, A. S.; TROEDSSON, M. H. T. Concentration of nitric oxide in uterine secretion from mares susceptible and resistant to chronic post-breeding endometritis. **Theriogenology**, v. 58, n. 2–4, p. 445–448, 2002.

ALMEIDA JÚNIOR, H. **Equinocultura**. p. 1–35, 2013.

AMANN, R.; SCIENCE, B. P.J. OF EQUINE VETERINARY; 1987. **Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa**. Elsevier, 1987.

ANDRADE, A. Z. de, *et al.* Marcadores séricos de estresse oxidativo em mulheres inférteis com endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 6, p. 279–285, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

CANISSO, I. F. **Sexual behavior, seminal parameters and fertility of the semen freeze from donkeys (*Equus asinus*) Pêga breed**. 2008. 211 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Animais Domésticos; Nutrição e Alimentação Animal; Pastagens e Forragicultura) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008

CANISSO, I. F.; *et al.* Key Aspects of Donkey and Mule Reproduction. The Veterinary clinics of North America. **Equine practice**, v. 35, n. 3, p. 607–642, dez. 2019.

CARVALHO, L. *et al.* Avaliação oxidativa do lavado uterino de bovinos de leite com endometrite. **XXIII Seminário Interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão UNICRUZ**, 2002.

CASTEJÓN, F. C. **Estudio de la congelación del semen e inseminación artificial en el asno zamorano-leonés**. 2005. 173f. Tese (Doctor em Veterinaria). Facultad de Veterinaria - Universidad Complutense de Madrid.

CHEN, H. W.; JIANG, W. S.; TZENG, C. R. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. **Fertility and Sterility**, v. 75, n. 6, p. 1163–1171, 2001.

CHRISTOFFERSEN, M.; *et al.* **Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares**. Elsevier, 2012.

CHRISTOFFERSEN, M.; TROEDSSON, M. H. T. Inflammation and fertility in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 14–20, 2017.

CONTRI, A.; *et al.* Effect of sperm concentration on characteristics of frozen-thawed semen in donkeys. **Animal reproduction science**, v. 136, n. 1–2, p. 74–80, dez. 2012.

EL PAÍS. **A demanda chinesa que ameaça o jumento brasileiro.**

<https://brasil.elpais.com/brasil/2019-12-11/sob-a-pele-do-jumento.html>. Acesso em: 13/06/2022.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **The role, impact and welfare of working (traction and transport) animals.** 2014.

FEDORKA, C. *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**, v. 52, n. 1, p. 89–96, fev. 2017.

GEORGE, B. O.; OSHARECHIREN, O. I. Oxidative stress and antioxidant status in sportsmen two hours after strenuous exercise and in sedentary control subjects. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 480–483, 2009.

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

KATILA, T. Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 31–41, ago. 2012.

KATILA, T. Uterine defence mechanisms in the mare. **Animal Reproduction Science**. Volume 42, Issues 1–4, April 1996, Pages 197-204

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

LIMA-VERDE, I. Implicações do estresse oxidativo no ovário e embrião mamífero. **Medicina Veterinária**, v. 1, n. 1, p. 81–88, 2011.

LINHARES, L. F. P. **Relação entre o percentual de neutrófilos e a concentração de óxido nítrico no endométrio de éguas receptoras de embrião no período pré ovulatório.** Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia Agropecuária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Mestrado em Ciência Animal, 2013.

MALOUFI, F. *et al.* **Mares susceptible or resistant to endometritis have similar endometrial echographic and inflammatory cell reactions at 96 hours after infusion with frozen semen.** *ivis.org*, 2002.

MIRÓ, J.; PAPAS, M. Post–Artificial Insemination Endometrial Inflammation and Its Control in Donkeys. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 38–43, 2018.

MIRÓ, J.; SCIENCE, M. P.-J. OF E. V. **Post–Artificial Insemination Endometrial Inflammation and Its Control in Donkeys.** Elsevier, 2018.

MIRÓ, J. *et al.* Collagen and Eosinophils in Jenny's Endometrium: Do They Differ With Endometrial Classification? **Veterinary Science**. 2020.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170–3175, 1972.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. SUPPL. 1, p. 414–421, 2010.

OLIVEIRA, J. V.; et al. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1–4, p. 82–84, 2006.

OLIVEIRA, P. V. L. F. **Influência da adição de plasma seminal ao sêmen congelado de jumento (*Equus asinus*) e da lavagem uterina, sobre a fertilidade de jumentas**. 1 CD-ROM. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/154702>. Acesso 6 de mai. 2022.

OLIVEIRA, J. V., et al. Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1267–1273, abr. 2016.

OLIVEIRA, J. V., et al. Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1267–73, 15 abr. 2016b.

PEÑA-ALFARO, C. E., et al. Fisiologia e biotecnologia da reprodução de asininos (Physiology and biotechnology on the donkey reproduction). **Ciência Animal Edição Especial Ciência Animal**, v. 22, n. 221, p. 207–218, 2012.

QUARTUCCIO, M. et al. Endometrial cytology during the different phases of the estrous cycle in Jennies: New evidences. **Animals**, v. 10, n. 6, p. 1–15, 2020.

RANGEL, A. H. DO N., et al. Aspectos Composicionais E Nutricionais Do Leite De Jumenta: Uma Revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 160, 2015.

REITZENSTEIN, M. VON, et al. Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after administration of detomidine and oxytocin. **Theriogenology**, v. 58, p. 887–898, 2002.

REVISTA HORSE. Do tropeirismo a elite equestre. **Revista Horse**. <https://www.revistahorse.com.br/imprensa/do-troperismo-a-elite-equestre/20210706-100919-w209>. Acesso em: 13 de jun.06 de 2022.

RIBAS, J. A., et al. Endometrite fúngica em éguas: diagnóstico e implicações clínico-patológicas. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 21, n. 3, p. 204-212, jul./set. 2014.

RIBEIRO, P., et al. Principais diferenças fenotípicas e genéticas entre bardotos e muares. **Sinapse Múltipla**, v. 6, n. 2, p. 301–395, 2017.

ROTA, A., et al. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1846–1854, nov. 2012.

ROZAS, A. L. A. G., **Actuaciones para la conservación del asno zamorano-leonés. Inseminación artificial con semen refrigerado y congelado.** 2005. 285f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Facultad de Veterinaria – Universidad Complutense de Madrid. Madrid, Espanha.

ROZEBOOM, K., The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. *academic.oup.com*, 1999.

SARAGUSTY, J., *et al.* Follicular size predicts success in artificial insemination with frozen-thawed sperm in donkeys. **Plos One**, v. 12, n. 5, p. e0175637, 17 maio 2017.

VELLOSA, J. C. R., *et al.* Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 305–312, 2013.

VENDRAMINI, O. M., *et al.* Science : Cervix conformation : a first anatomical approach in baudet du poitou jenny asses. **Baudet du Poitou jenny asses**. n. September 2010, p. 741–744, 2014.

VIANA, K. S., *et al.* Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 3–4, p. 217–227, 2007.

VIDAMENT, M., *et al.* Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 22–35, 2009.

VILES, K., *et al.* Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen-thawed semen. **Animal Reproduction Science**, v. 143, n. 1–4, p. 57–63, dez. 2013.

VILÉS, K., *et al.* Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen-thawed semen. **Animal Reproduction Science**, v. 143, n. 1–4, p. 57–63, dez. 2013.

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.

WOLF, C. A. *et al.* Uterine nitric oxide levels and isofluopredone treatment effect in mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 2, p. 100–104, 2016.

WOODWARD, E. *et al.* Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. **Reproduction**, v. 145, n. 3, p. 289-296, 2013.

ZERBE, H., *et al.* Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 209–223, 2003.