

Concentração de nitrito endometrial e a ocorrência de patologias uterinas em vacas

Lio MOREIRA¹
Eulógio Carlos Queiróz de
CARVALHO¹
Maria Clara CALDAS-
BUSSIERE¹

1 - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ

Resumo

Relacionou-se a concentração de nitrito com a ocorrência de enfermidades uterinas. Lavado intrauterino de 1ml de PBS foi realizado em 25 peças uterinas de vacas vazias para mensuração da concentração de nitrito pela reação de Griess. Elevada concentração de nitrito exibiu relação significativa com distrofia angiomasiosa ($157,57 \pm 108,80 \text{mM}$), endometrite ($102,96 \pm 87,58 \text{mM}$) e fibrose periglandular ($99,15 \pm 89,75 \text{mM}$); e não significativa com e hiperplasia endometrial cística ($94,07 \pm 18,89 \text{mM}$) e adenomiose ($77,40 \pm 81,25 \text{mM}$). Contudo, elevada concentração de nitrito mostrou relação significativa com adenomiose acentuada profunda pelo teste *t*. Os resultados indicam que a síntese de óxido nítrico está elevada nessas enfermidades.

Palavras-chave:

Concentração de nitrito.
Enfermidades uterinas.
Óxido nítrico.
Vacas.

Correspondência para:

Lio Moreira, Setor de Morfologia e Anatomia Patológica, Laboratório de Sanidade Animal, Hospital Veterinário, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, Pq. Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ. 28013-602. Tel: 22-27261565. e-mail: moreira@uenf.br

Recebido para publicação: 30/05/2007
Aprovado para publicação: 24/04/2008

Introdução

Dentre os variados motivos que afetam a fertilidade do gado, destacam-se as afecções uterinas adquiridas, principalmente no pós-parto, como um dos principais motivos de subfertilidade e infertilidade, gerando descarte de matrizes, sem investigação conclusiva. No entanto, é evidente que as alterações microscópicas do ambiente uterino culminam com ineficiência reprodutiva e nem sempre exibem manifestações clínicas.^{1,2,3} Como importantes causas da baixa fertilidade do rebanho brasileiro destacam-se as infecções uterinas crônicas, alterações glandulares, distúrbios vasculares, fibrose e distrofias uterinas.^{4,5}

O óxido nítrico (NO) é um radical livre com atividade em todo organismo. Devido a sua meia-vida ultracurta (4s), atua de maneira parácrina e autócrina na transdução dos sinais celulares, pela interação com grupamentos prostéticos da guanilato ciclase, aumentando a guanosina monofosfato cíclico, os quais mediam seus efeitos. Então é rapidamente convertido em nitrito e nitrato.⁶

A enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*) catalisa a conversão da L-arginina em NO e L-citrulina. Existem quatro isoformas dessa enzima, a cerebral ou neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), referidas como formas constitutivas (cNOS), responsáveis pela liberação contínua e basal de NO, em concentrações picomolares e ambas requerem cálcio e calmodulina para sua ativação. A terceira isoforma é a induzível (iNOS) e libera NO em altas concentrações (nanomolares) durante horas e podem perdurar dias, em resposta a citocinas inflamatórias e lipopolissacarídeos.⁶ Uma quarta isoforma identificada na membrana interna mitocondrial (mtNOS), regula a fosforilação oxidativa.⁷

Nos processos patológicos, o NO é produzido em excesso e forma potentes oxidantes, como o peroxinitrito pela reação com superóxido.⁸ O NO desempenha importante papel nos eventos reprodutivos, tanto na fertilização⁹ como na implantação e sobrevivência embrionária em camundongos^{10,11,12} e em bovinos¹³.

O presente estudo teve como escopo

relacionar a concentração de nitrito no lúmen uterino de vacas saudáveis e acometidas por desordens uterinas.

Material e Método

Vinte e cinco peças uterinas, de vacas não prenhes em idade reprodutiva, foram colhidas e individualmente protocoladas, por ocasião do abate, em matadouros frigoríficos estaduais do município de Campos dos Goytacazes - RJ, entre março de 2003 a dezembro de 2004. As peças foram armazenadas em recipientes térmicos refrigerados e enviadas ao setor de Morfologia e Anatomia Patológica da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Através de um corte transversal realizado na altura do corpo uterino, acoplou-se uma seringa contendo 1ml de PBS (*Phosphate buffered saline*) injetando o referido volume em um dos cornos uterinos. Com auxílio de uma pipeta *Pasteur*, realizou-se o *flushing* e recuperou-se a solução, armazenando-a em criotubos de plástico de 1,5ml à -18°C, para mensuração de nitrito pela reação de Griess de acordo com método descrito por Escocard et al¹⁴.

Do terço médio do corno uterino no qual efetuou-se a lavagem, uma amostra tecidual com 0,5cm de espessura foi colhida, fixada em formalina neutra tamponada a 10%, e após o período mínimo de 48 horas, a amostra foi submetida a processamento tecidual por inclusão em parafina e corada pela hematoxilina e eosina e Van-Gieson.

As desordens uterinas foram observadas por microscopia óptica de luz. A endometrite e fibrose periglandular foram avaliadas segundo Martins et al.⁴ e a adenomiose foi classificada de acordo com Moreira et al.¹⁵.

A distrofia angiomasosa foi avaliada como distúrbio do crescimento vascular, neste caso, pela abundância, posicionamento anormal, irregularidade, calibre aumentado e congestão dos vasos sanguíneos na camada endometrial, descrito por Carvalho, 2005 (informação verbal).

Os dados foram analisados pela ANOVA e teste *t* com um α de 0,05, pelo procedimento *FREQ/CHISQ* do SAS.

Resultados e Discussão

A concentração média de nitrito no lúmen uterino foi 60,04 mM, com valores variando de 0 a 281,14 mM, desvio padrão de 77,68mM e coeficiente de variação de 62,84.

Úteros acometidos por distrofia angiomasosa exibiram a concentração média mais elevada (157,57mM \pm 108,80mM, $p<0,05$), seguida por aqueles com endometrite (102,93mM \pm 87,58mM, $p<0,05$) e fibrose periglandular (99,15mM \pm 89,75mM, $p<0,05$). Enquanto que, os úteros com adenomiose e HEC (Tabela 1) exibiram concentração média similar (77,40mM \pm 81,25mM; 94,07mM \pm 19,89mM, respectivamente, $p>0,05$) as dos úteros sadios (15,29mM \pm 20,85mM, $p>0,05$). No entanto, os úteros acometidos por adenomiose acentuada profunda mostraram concentração média de nitrito elevada (98,99mM \pm 26,62mM, $p>0,05$).

O coeficiente de variação e o desvio padrão foram elevados devido à amostragem ser pequena, não uniforme e com ocorrência de pelo menos duas desordens concomitantes no corno uterino analisado, influenciando entre si. Além disso, para uma quantificação verossímil de NO seria necessária a conversão do nitrato para

Tabela 1 - Concentração média intrauterina de nitrito e a ocorrência de enfermidades uterinas de vacas abatidas em matadouros estaduais de Campos dos Goytacazes - RJ, 2003-2004

Enfermidades Uterinas	Fêmeas sem desordens uterinas	Adenomiose	Hiperplasia endometrial cística	Fibrose periglandular	Endometrite	Distrofia angiomasosa
Amostras (n)	07	18	03	11	12	05
Médias (μ M)	15,29 ^a \pm 20,85	77,40 ^a \pm 81,25	94,07 ^a \pm 19,89	99,15 ^b \pm 89,74	102,93 ^c \pm 87,58	157,57 ^d \pm 108,80

*Médias na linha seguidas por letras diferentes, são diferentes entre si em nível de 5% de probabilidade.

nitrito, de forma a justificar o valor nulo encontrado em algumas amostras.

O perfil aumentado de nitrito encontrado nos casos de distrofia angiomasosa pode ser explicado pelo fato de que os vasos sanguíneos expressam a NOS. Como é sabido, a eNOS é a principal isoforma expressada constitutivamente em vasos sanguíneos, e em casos de hipoxia ou anoxia, o NO é liberado atuando como vasodilatador.^{6,16} A distrofia angiomasosa, justifica por si a elevada concentração de óxido nítrico nos úteros com a referida desordem.

A iNOS pode ser expressada por leucócitos uterinos (macrófagos e linfócitos) em resposta a citocinas inflamatórias⁶, assim o perfil elevado de nitrito/NO encontrado nas endometrites aqui investigadas, corroboram os achados de Fang, Nowicki e Yallampalli¹⁷, que evidenciaram elevada concentração de nitrito e nitrato em úteros de ratas infectadas experimentalmente com *Escherichia coli*, uma enterobactéria comumente associada a endometrites recorrentes.

A fibrose periglandular é uma proliferação fibrocelular concêntrica às unidades glandulares, representando uma seqüela a sucessivos episódios de endometrite.⁴ Embora não explique a elevação dos níveis de NO, considerando que seus constituintes são fibrócitos, células hipobióticas, todos os casos de fibrose periglandular estavam associados com endometrite, distrofia angiomasosa ou adenomiose, e provavelmente influenciaram na concentração de nitrito em úteros com fibrose periglandular.

A adenomiose uterina tem sido um achado freqüente em vacas vazias descartadas em matadouros e apontada como uma das causas de subfertilidade ou esterilidade.¹⁵ Atribui-se a esta enfermidade interferência na sobrevivência espermática, embrionária e na implantação do embrião, em função das alterações vasculares¹⁸, estresse oxidativo¹⁶ e degradação excessiva da matriz extracelular^{19,20}, levando a modificações no micro-ambiente uterino,

culminando com subfertilidade e infertilidade em camundongas e mulheres^{19,21}. Elevada expressão de NOS tem sido observada em úteros de mulheres acometidas por adenomiose.^{16,22} Essas informações legitimam o elevado nível de nitrito assistidos na presente investigação.

Orsi¹³ demonstrou que elevada concentração NO ($e^{>10\text{mM}}$) provoca inibição do desenvolvimento de embriões bovinos, apontando efeitos tóxicos do NO sobre a fosforilação oxidativa, glicólise e captação de aminoácidos essenciais, culminando com a falha no desenvolvimento do blastocisto já foi demonstrado que elevada concentração de NO inibe a pré-implantação e desenvolvimento de embriões de camundongos^{10,11,12}, sugerindo que o NO atue como uma molécula efetora da perda embrionária precoce, pelos seus efeitos deletérios sobre a respiração mitocondrial (fosforilação oxidativa) e promoção da apoptose. Assim, a elevada concentração de nitrito associada com distrofia angiomasosa, endometrite, fibrose periglandular e adenomiose acentuada profunda observada neste estudo sugere que a subfertilidade ou infertilidade em vacas portadoras dessas desordens seja causada em parte, pela síntese aumentada de NO, pelos seus efeitos citotóxicos no trato reprodutivo e diretamente sobre o embrião.

Apesar do nitrato não ter sido mensurado neste estudo, pôde-se perceber que existe uma elevada liberação de deste radical nas desordens investigadas, e essas mostraram forte relação com a concentração de nitrito, que é um metabólito menos estável do que o nitrato. O nitrito também é altamente reativo e potente oxidante, convertido rapidamente a nitrato pelas células como mecanismo de defesa.^{6,14,17} Contudo, cabe salientar que os valores de nitrito encontrados nesta pesquisa não traduzem os valores reais de NO liberado nos distúrbios reprodutivos analisados, e sim comprovam que existe liberação exacerbada de NO.

As concentrações individuais de nitrito permitem hipotetizar que as desordens

observadas neste experimento, potencializam a geração do NO, pois ao analisarmos os dados isoladamente, os maiores valores de nitrito (281,14; 265,36; 117,82; 116,85 e 105,33 mM) estavam associados a pelo menos duas afecções ocorrendo simultaneamente no mesmo segmento uterino. Estes resultados mostraram que há uma relação positiva com o tipo e a quantidade de alterações uterinas com a concentração de nitrito luminal. O estudo de Orsi¹³, enfatiza que concentração de NO a partir de 10mM já é tóxica para embriões de bovinos.

Portanto é fato que, existe um perfil

elevado do NO em úteros bovinos acometidos por distrofia angiomasiosa, endometrite, fibrose periglandular e adenomiiose profunda, confirmado pela concentração elevada de nitrito associada.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Prof^a Célia Raquel Quirino (CCTA/UENF) pela realização da análise estatística, aos técnicos do SMAP e LRMGA, aos Matadouros Estaduais de Campos dos Goytacazes e a UENF/FAPERJ pelo financiamento desta investigação.

Endometrial nitrite concentration and the occurrence of uterine pathologies of cows

Abstract

The occurrence of uterine pathologies was evaluated considering uterine nitrite concentration. The uterus of 25 non pregnant cows was washed with 1ml of PBS to measure the nitrite concentration using the Griess reaction. There was significant relationship between high nitrite concentration with angiomasiosis dystrophy ($157,57 \pm 108,80$ mM), endometritis ($102,96 \pm 87,58$ mM) and periglandular fibrosis ($99,15 \pm 89,75$ mM). No relation was found between nitrite concentration and cystic endometrial hyperplasia ($94,07 \pm 18,89$ mM) and adenomyosis ($77,40 \pm 81,25$ mM). However, high nitrite concentration showed a significant relationship with deep accentuate adenomyosis by *t* test. The data suggest that nitric oxide synthesis is elevated in these illnesses.

Key words:

Cows.
Uterine illness.
Nitrite concentration.
Nitric oxide.

Referências

- BONNETT, B. N. et al. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows I. Technique, histological criteria and results. **Can. J. Vet. Res.**, v. 5, p. 155-161, 1991.
- LEWIS, G. S. Symposium: Health problems of the postpartum cow, uterine health and disorders. **J. Dairy Sci.**, v. 80, n. 5, p. 984-994, 1997.
- HATIPOGLU, F.; ORTATATLI, M.; KIRAN, M. M.; ERER, H.; ÇİFTÇİ, M. K. An Abattoir Study of Genital Pathology in Cows: II. Uterus, Cervix and Vagina. **Revue Méd. Vét.**, v. 53, n. 2, p. 93-100, 2002.
- MARTINS, C. F. et al. Biópsia endometrial em vacas *Bos indicus* em regime extensivo de criação com problemas de infertilidade. **Ens. Cien.**, v. 6, n. 2, p. 13-33, 2002.
- MONTEIRO, C. M. R. et al. Estudo das características histológicas do útero e tubas uterinas de vacas e novilhas da raça Nelore (*Bos primigenius indicus*). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 40, n. 1, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962003000100005>. Acesso em: 22 maio 2007.
- ROSSELLI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Hum. Reprod.**, v. 4, n. 2, p. 125-137, 1998.
- LOPES-FIGUEROA, M. O.; LEESE, H. J.; HOUGHTON, F. D. Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria. **Biophys. Res. Commun.**, v. 272, p. 528-533, 2004.
- BECKMAN, J. S. The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In: LANCASTER, J. **Nitric oxide: principles and actions**. California: Academic Press, 1996. p. 1-82.
- HECK, D. E. et al. NG-monomethyl-L-arginine inhibits

- Arbacia fertilization and differentiation. **Biol. Bull.**, v. 187, p. 243-249, 1994.
- 10 HADDAD, E. K.; DUCLOS, A. J.; BAINES, M. G. Early embryo loss is associated with local production of nitric oxide by decidual mononuclear cells. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 1143-1152, 1995.
- 11 GOUGE, R. C. et al. Nitric oxide as regulator of embryonic development. **Biol. Reprod.**, v. 58, p. 875-879, 1998.
- 12 MANSER, R. C.; LEESE, H. J.; HOUGHTON, F. D. Effect of inhibiting nitric oxide production on mouse preimplantation embryo development and metabolism. **Biol. Reprod.**, v. 71, n. 2, p. 528-533, 2004.
- 13 ORSI, N. M. Embriotoxicity of the nitric oxide donor sodium nitroprusside in preimplantation bovine embryos in vitro. **Anim. Reprod. Sc.**, v. 91, n. 3-4, p. 225-236, 2006.
- 14 ESCOCARD, R. C. et al. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Immunobiology**, v. 211, p. 37-46, 2006.
- 15 MOREIRA, L. et al. Histopatologia da adenomiose em vacas abatidas no Norte Fluminense. **Cien. Anim. Bras.**, v. 7, n. 1, p. 85-91, 2006.
- 16 OTA, H. et al. Endothelial nitric oxide synthase in the endometrium during the menstrual cycle in patients with endometriosis and adenomyosis. **Fertil. Steril.**, v. 69, n. 2, p. 165-172, 1998.
- 17 FANG, L.; NOWICKI, B.; YALLAMPALLI, C. Differential expression of uterine NO in pregnant and nonpregnant rats with intrauterine bacterial infection. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 280, p. 356-363, 2001.
- 18 LEVGUR, M.; ABADL, M. A.; TUCKER, A. Adenomyosis: symptoms, histology and pregnancy terminations. **Obstet. Gynecol.**, v. 95, p. 688-691, 2000.
- 19 MORI, T. et al. Suppression of the the development of experimentally induced uterine adenomyosis by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, ONO-4817, in mice. **Exp. Biol. Med.**, v. 5, p. 429-433, 2000.
- 20 MATSUDA, M.; SASABE, H.; ADACHI, Y. Increased invasion activity of endometrial stromal cells and elevated expression of matrix metalloproteinase messenger RNA in the uterine tissues of mice experimentally induced adenomyosis. **Gen. Obstet. Gynecol.**, v. 185, p. 1374-1380, 2001.
- 21 INAGAKI, N.; UNG, L.; OTANI, T. Uterine cavity metalloproteinase and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. **Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 4, p. 1-7, 2003.
- 22 KAMADA, Y. et al. GnRH agonist-suppressed expression of nitric oxide synthases and generation of peroxynitrite in adenomyosis. **Hum. Reprod.**, v. 15, n. 12, p. 2512-2519, 2000.