

**UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

DISSERTAÇÃO

**Resposta Inflamatória Uterina em Éguas Inseminadas com
Sêmen Fresco e Congelado de Jumento**

Caroline Spitz dos Santos

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA EM ÉGUAS INSEMINADAS
COM SÊMEN FRESCO E CONGELADO DE JUMENTO**

CAROLINE SPITZ DOS SANTOS

Sob orientação do Professor
Júlio César Ferraz Jacob

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2012

636.1089

S237r

T

Santos, Caroline Spitz dos, 1984-
Resposta inflamatória uterina em
éguas inseminadas com sêmen fresco e
congelado de jumento / Caroline
Spitz dos Santos - 2012.
47 f.: il.

Orientador: Júlio César Ferraz
Jacob.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária.

Bibliografia: f. 39-45.

1. Éguas - Doenças - Teses. 2.
Asinino - Inseminação artificial -
Teses. 3. Endometriose - Teses. 4.
Sêmen - Teses. I. Jacob, Júlio
César Ferraz, 1961-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. III. Título.

DEDICATÓRIA

Ao autor e consumidor da minha fé, Senhor do meu coração, porque sempre esteve comigo e me ensinou grandes coisas, pois nos momentos de fraqueza, Ele disse:

“ ... Tu és meu servo, eu te escolhi e não te rejeitei, não temas, porque Eu sou contigo; não te assombres, porque Eu sou o teu Deus;

Eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel (Isaías 40: 9-10).

E nos momentos em que pensei em desistir:

“os que com lágrimas semeiam com júbilo ceifarão. Quem sai andando e chorando enquanto semeia, voltará com júbilo, trazendo os seus feixes.” Salmo 126: 5-6.

Aos meus pais, Og e Lourdes, e ao meu irmão, Marcus Vinicius, por todo o seu amor e empenho na minha educação, que me fizeram querer buscar e alcançar meus sonhos e pela compreensão e conforto nos momentos de ausência para a realização deste estudo.

Ao meu amor Daniel, por todos os momentos bons e ruins que passamos durante esse período, e por ter me ajudado a suportar os momentos mais difíceis. Aos pais do Daniel, Janete e Daniel, pelo carinho com que me acolheram.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Júlio César Ferraz Jacob, pelos ensinamentos, experiências e lições passados ao longo desses quatro anos de convivência.

À Professora Vera Lúcia Teixeira de Jesus, por sua amizade, confiança e apoio nos momentos mais difíceis. Pela orientação em todas as fases deste projeto, sem a qual não teria conseguido chegar até aqui. Agradeço por tudo o que fez, e principalmente por ter acreditado no meu trabalho. Certamente aprendi grandes lições que me fizeram uma profissional melhor.

Ao Professor José Eugênio Três, pelos ensinamentos sobre Reprodução Animal e também de vida. Pelo apoio e preocupação nas fases difíceis e por todo carinho e também torcida nos processos seletivos que a vida nos impõe .

Aos funcionários do Setor de Reprodução Animal, Zico, Zezinho e Peixerinha, minha gratidão pela amizade que inúmeras vezes me fez chorar de tanto rir e rir enquanto chorava. Pelas brincadeiras e conselhos durante toda a nossa convivência e pelo auxílio, imprescindível, na execução da parte experimental, e principalmente pelos ensinamentos práticos na lida diária com os animais.

Ao casal de amigos, Rita e Jhonnatha, por todo apoio, amizade e companheirismo em todas as fases. Por todas às vezes em que, mesmo à noite, me acompanhavam nas coletas de material, por compartilhar experiências, conselhos... Muito obrigada pela força.

Ao casal de amigos Cínthia e Jorginho, pela amizade e auxílio na parte experimental. Obrigada por terem me ajudado e dedicado tempo ao meu trabalho, até mesmo nos finais de semana.

À minha grande amiga Carolina Cavalcante, pela amizade e incentivo. Obrigada pelo apoio que me sempre me ajudou a ter motivação.

Ao professor Walter Flausino, pelo auxílio nos momentos finais do projeto, pela amizade e confiança que me ajudaram a ver novas perspectivas de pesquisa.

Ao Professor Fernando Queiroz de Almeida, pelos ensinamentos em Pesquisa e Experimentação Animal, e pelo apoio e incentivo que me levaram ao mestrado.

Ao Professor Ulisses R. Dias, pelo auxílio na leitura e interpretação das amostras de citologia uterina.

Ao Professor da área de Histologia Animal, Marcos Antônio José dos Santos pela grande contribuição a este projeto, através da coloração dos esfregaços citológicos com o método de Papanicolaou. Obrigado por sua ajuda e paciência.

Ao Professor Armando Salles, responsável pela área de Histologia Animal, por ter cedido espaço e material em seu laboratório para montagem da bateria de coloração.

À Nutricell, pelo suporte material, fornecendo o meio de criopreservação de sêmen FR-6[®] para a criopreservação das amostras de sêmen utilizadas neste estudo.

À Shering-Plough, pelo fornecimento de Chorulon[®] (Gonadotrofina Coriônica humana) para sincronização de cio dos animais deste estudo.

Ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas) e aos colegas de turma pelo apoio e incentivo.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

RESUMO

SPITZ, Caroline dos Santos. **Resposta inflamatória uterina em éguas inseminadas com sêmen fresco e congelado de jumento**. 2012. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Este estudo objetivou caracterizar a resposta inflamatória uterina de éguas após a inseminação com sêmen fresco e congelado de jumento. Sete éguas foram submetidas as inseminações artificial com sêmen fresco (G1) e congelado (G2) por dois ciclos estrais. A resposta inflamatória uterina foi avaliada por ultrassonografia, swab e citologia uterina realizadas antes (T1), quatro horas (T2) e 24 horas após as inseminações (T3). As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de Qui-quadrado e ANOVA, e a correlação de Pearson. A ultrassonografia em T1 não revelou acúmulos de fluido intra-uterino, porém, em T2 e T3 houve acúmulos menores que 20,0 mm, não havendo diferença significativa entre G1 e G2 ($p > 0,05$). Houve diferença significativa entre T1 e os demais momentos de coleta ($p < 0,001$), demonstrando que após a inseminação o acúmulo de fluido uterino observado para ambos os grupos foi atribuído à resposta inflamatória ao sêmen. As amostras de swab uterino em T1, 84,6% apresentaram crescimento, com maior frequência de *E. coli* (41,6%) e *Enterobacter* sp. (61,5%) em G1 e G2 respectivamente. Em G1 (T2 e T3) houve predomínio de *Streptococcus* β -hemolítico (50,0 % e 37,5%, respectivamente). Em G2 (T2), *Enterobacter* sp. apresentou frequência de 50,0%, contudo o número de amostras negativas (66,7%) foi maior que em T1, e em T3, a frequência de *Enterobacter* sp. foi de 87,5%. A análise de regressão linear ($R^2 = 0,3251$) das amostras avaliados em T1, T2 e T3 e o traçado em declínio da linha de tendência, demonstraram que houve redução no número de amostras positivas e o predomínio de amostras negativas em T2 e T3 em relação a T1. As amostras de citologia uterina em T1 apresentaram neutrófilos $\leq 5\%$. Em T2 o percentual de neutrófilos foi superior a 50% (G1 e G2), não apresentando diferença ($p > 0,05$) entre os grupos. Em G1 T3, houve redução no percentual de neutrófilos observados em relação a T2 ($p < 0,001$) para ambos os grupos. Sendo assim após 24 horas da inseminação a citologia demonstrou a redução significativa de neutrófilos, e que após 24 horas tem início o processo de resolução da inflamação. A correlação de Pearson entre os achados de ultrassonografia e bacteriologia demonstraram não haver uma associação ($r = -0,03324$) entre os dois testes quanto a avaliação da condição uterina, uma vez que um grande número de amostras foi positiva na bacteriologia e negativa a ultrassonografia, o mesmo foi visto em relação a citologia e ultrassonografia ($r = -0,09017$), indicando que a ultrassonografia só é positiva quando a inflamação é intensa. A análise entre os testes de citologia e bacteriologia também apresentaram correlação negativa ($r = -0,06757$), demonstrando que as bactérias isoladas não constituíram um estímulo antigênico suficiente para elevar a contagem de neutrófilos na citologia. Portanto, a presença do espermatozoide no lúmen uterino provocou uma resposta inflamatória semelhante ao que é observada com sêmen eqüino.

Palavras-chave: endometrite, sêmen asinino, bacteriologia.

ABSTRACT

SPITZ, Caroline dos Santos. **Uterine inflammatory response in mares inseminated with fresh and frozen donkey semen.** 2012. Dissertation (Master in Veterinary Medicine, Animal Pathology). Instituto de Veterinária, Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The purpose of this study was to characterize the uterine inflammatory response of mares post insemination with fresh and frozen donkey semen. Seven mares underwent artificial insemination with fresh semen (G1) and frozen (G2) for two estrous cycles. The uterine inflammatory response was assessed by ultrasonography, uterine swab and cytology performed before (T1), four hours (T2) and 24 hours post insemination (T3). Statistical analyzes were taken using the chi-square and ANOVA tests, and Pearson correlation. Ultrasonography in T1 did not show accumulation of intrauterine fluid, but in T2 and T3 there were buildups of less than 20,0 mm, without significant difference between G1 and G2 ($p > 0,05$). There were significant differences between T1 and the remaining moments ($p < 0,001$), revealing that post insemination uterine fluid accumulation noted for either groups has been assigned to inflammatory response of semen. Uterine swab samples at T1, 85,7% showed growth with higher frequency of *E. coli* (46,2%) and *Enterobacter* sp. (64,3%) in G1 and G2 respectively. In G1T2 with a predominance of *Streptococcus* β -hemolytico (50.0%), whilst in T3, *E. coli* and *Streptococcus* β -hemolytic presented the same frequency of isolation (33,3%), and there was no growth in 42,9% of the samples. In G2 (T2), *Enterobacter* sp. presented frequency of 50,0%, nevertheless the number of negative samples (57,1%) was higher than T1. At T3, 35,7% of samples showed no growth, the frequency of *Enterobacter* sp. was 88,9%. The linear regression analysis ($R^2 = 0,3251$) of the samples assessed in T1, T2 and T3 and the layout of the declining trend line, have demonstrated that there was a decrease in the number of positive samples and the predominance of negative samples at T2 and T3 about to T1. The uterine cytology samples T1 were $\leq 5\%$ of neutrophils. In T2 the percentage of neutrophils was greater than 50,0% (G1 and G2), showing no significant difference ($p > 0,05$) between groups. In G1 T3, there was a reduction in the percentage of neutrophils observed for T2 ($p < 0,001$) for both groups. Thus 24 hours after insemination cytology showed a significant reduction in neutrophils, and 24 hours after beginning the process of resolution of inflammation. The Pearson correlation between findings of ultrasonography and bacteriology showed no association ($r = -0,03324$) among the two tests for the evaluation of the uterine condition, since a large amounts of samples were positive and negative bacteriology ultrasonography, it has been seen regarding cytology and ultrasonography ($r = -0,09017$), indicating that the ultrasound is only positive when inflammation is intense. The analysis between cytology and bacteriology tests also showed negative correlation ($r = -0,06757$) indicating that the isolated bacteria were not an sufficient antigenic stimulus to raise the neutrophil count in cytology. Therefore, the presence of sperm in the uterine lumen caused an inflammatory response similar to that observed with equine semen.

Keywords: endometritis, asinine semen, bacteriology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escore de acúmulo de fluido uterino avaliado por ultrassonografia, dos dois ciclos/égua, comparando sêmen fresco (G1) e o criopreservado (G2) em T1 (antes da IA), T2 (4 horas após) e T3 (24 horas após a IA).	17
Tabela 2	Análise bacteriológica uterina em T1 (antes da IA), T2 (quatro horas após a IA) e T3 (24 horas após a IA), por animal nos dois ciclos estrais avaliados em G1 (IA com sêmen fresco).	18
Tabela 3	Espécies bacterianas isoladas de swabs uterinos antes da inseminação (T1), quatro horas após (T2), 24 horas após (T3) inseminação com sêmen fresco de jumento (G1).	19
Tabela 4	Análise bacteriológica uterina em T1, T2 e T3 por animal nos dois ciclos estrais avaliados em G2.	19
Tabela 5	Espécies bacterianas isoladas de swabs uterinos antes da inseminação (T1), quatro horas após (T2), 24 horas após (T3) inseminação com sêmen congelado de jumento (G2).	20
Tabela 6	Porcentual médio de neutrófilos encontrados nas amostras de citologia uterina coradas pelo Papanicolaou no G1 e G2.	23
Tabela 7	Correlação entre amostras positivas e negativas de cultura bacteriana (CB) e ultrassonografia uterina (US).	27
Tabela 8	Análise de correlação entre amostras positivas e negativas na citologia e ultrassonografia uterina em T1, T2 e T3.	28
Tabela 9	Análise de correlação entre amostras positivas e negativas na citologia (CIT) e cultura bacteriana (CB) uterina em T1, T2 e T3.	29
Tabela 10	Resultados de ultrassonografia e citologia uterina por animal antes da inseminação (T1), quatro horas (T2) e 24 horas após a inseminação (T3) em G1 e G2.	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Frequência absoluta de espécies bacterianas isoladas e amostras sem crescimento em T1, T2 e T3.	21
Gráfico 2	Citologia uterina realizada antes (T1) e após (T2 e T3) da inseminação artificial com sêmen fresco	23
Gráfico 3	Citologia uterina realizada antes (T1) e após (T2 e T3) a inseminação artificial com sêmen congelado fresco (G2).	24
Gráfico 4	Correlação entre os achados de cultura bacteriana (CB) e ultrassonografia (US) em G1 e G2.	28
Gráfico 5	Correlação entre a citologia e ultrassonografia em G1 e G2.	29
Gráfico 6	Correlação entre a citologia e bacteriologia em G1 e G2.	30

LISTA DE QUADRO

Quadro 1	Métodos quantitativos para interpretação de amostras de citologia endometrial equina.	10
-----------------	---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organograma da divisão da coleta de dados e total de amostras para cada grupo	14
Figura 2	Materiais utilizados para coleta de material uterino, (de baixo para cima) swab e meio de transporte Stuart, escova ginecológica e haste metálica ou pinça de citologia.	15
Figura 3	Células endometriais muco-secretórias agrupadas em estrutura semelhante a “favo de mel” coradas pelo método de Papanicolaou, aumento de 400X e zoom fotográfico de 2,5X;	22
Figura 4	Células endometriais muco-secretórias agrupadas em estrutura semelhante a “favo de mel” coradas pelo método de Papanicolaou apresentando núcleos roxos e citoplasma de cor azulada a alaranjado. Aumento de 1000X e zoom fotográfico de 3X.	22
Figura 5	Resposta inflamatória uterina em T2, com sêmen congelado, evidenciando a presença maciça de neutrófilos e muco abundante. Coloração pelo método de Papanicolaou, aumento de 400X, zoom fotográfico de 2x.	24
Figura 6	Citologia uterina em T2, com sêmen fresco, evidenciando a presença maciça de neutrófilos e muco abundante. Coloração pelo método de Papanicolaou, aumento de aumento de 1000X.	25
Figura 7	Citologia uterina realizada em T2, presença de espermatozoíde asinino (seta). Coloração Papanicolaou, aumento de 1000X.	25
Figura 8	Citologia uterina em T3, presença de células uterinas de tamanho anormal, vacuolização citoplasmática abundante, neutrófilos, hemácias e debris celulares. Coloração Papanicolaou, aumento de 400X.	26
Figura 9	Citologia uterina realizada 24 horas após a inseminação apresentando células endometriais com núcleos apresentando pontilhamento de cromatina (seta) e neutrófilos em menor quantidade. Coloração Papanicolaou, aumento de 1000X e zoom fotográfico de 2,5X.	26
Figura 10	Citologia uterina realizada 24 horas após a inseminação apresentando células endometriais com núcleos apresentando pontilhamento de cromatina (seta) e neutrófilos. Coloração Papanicolaou, aumento de 1000X e zoom fotográfico de 2,5X.	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	Mecanismos de Defesa Uterino	2
2.2	Fatores Pré-disponentes à Endometrite	3
2.3	Endometrite Bacteriana	4
2.4	Endometrite Pós-cobertura	5
2.5	Susceptibilidade à Endometrite	6
2.6	Métodos de Avaliação da Condição Uterina	7
2.6.1	Ultrassonografia	7
2.6.2	Swab uterino	7
2.6.3	Citologia uterina	8
2.6.3.1	Métodos de coloração da citologia uterina	8
2.6.3.2	Interpretação da citologia endometrial equina	9
2.7	Métodos de Diagnóstico da Endometrite Equina	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1	Local da Pesquisa	12
3.2	Animais	12
3.3	Colheita e Análise do Sêmen	12
3.4	Criopreservação de Sêmen Asinino	12
3.5	Avaliação Seminal Pós-Descongelamento	13
3.6	Inseminações Artificiais (IA)	13
3.7	Procedimentos de Colheita e Análises de Dados	13
3.7.1	Exame ultrassonográfico uterino	13
3.7.2	Isolamento bacteriano	14
3.7.3	Citologia uterina	15
3.8	Análise Estatística	16
4	RESULTADOS	17
4.1	Ultrassonografia Uterina	17
4.2	Bacteriologia Uterina	18
4.3	Citologia Uterina	21

4.4	Correlação entre os métodos de diagnóstico de endometrite	27
4.4.1	Correlação entre bacteriologia e ultrassonografia uterina	27
4.4.2	Correlação entre ultrassonografia e citologia	28
4.4.3	Correlação entre bacteriologia e citologia uterina	29
4.5	Diagnóstico de endometrite equina	30
5	DISCUSSÃO	32
5.1	Ultrassonografia uterina	32
5.2	Bacteriologia Uterina	33
5.3	Citologia Uterina	33
5.4	Correlação entre os métodos de diagnóstico de endometrite	35
5.4.1	Citologia x Ultrassonografia	35
5.4.2	Bacteriologia x Ultrassonografia	36
5.4.3	Bacteriologia x Citologia	36
6	CONCLUSÕES	38
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
	ANEXOS	46
	ANEXO I	47

1 INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva da égua está diretamente relacionada com a capacidade uterina em manter um ambiente adequado para o desenvolvimento do embrião até o parto.

O transporte espermático até o local de fertilização necessita que o endométrio apresente-se sadio, em condições ideais para que o encontro entre gametas aconteça. A composição e a qualidade do ambiente uterino são fatores cruciais que desempenham um papel importante na fertilidade da égua, uma vez que a presença de bactérias ou produtos inflamatórios no útero é incompatível com a sobrevivência do embrião.

A inflamação endometrial ocorre naturalmente após a monta natural ou inseminação artificial em éguas. É considerado um processo fisiológico necessário para a limpeza uterina do excesso de espermatozoides, bactérias e outros agentes contaminantes. Os estudos tem demonstrado a importância do espermatozoide como o principal responsável em causar esta resposta inflamatória através do efeito quimiotático que exerce sobre as células do sistema imune e através da ativação de componentes do sistema complemento.

Éguas cuja resposta inflamatória uterina está totalmente resolvida entre 36 e 48 horas são consideradas sadias. Entretanto alguns animais desenvolvem uma inflamação persistente que impede a sobrevivência do embrião, essas éguas são classificadas com susceptíveis a endometrite pós-cobertura.

A inseminação artificial com sêmen congelado tem sido associada com uma resposta inflamatória mais prolongada. Uma possível explicação para isto seria a ausência do plasma seminal, que é quase completamente removido durante o processo de criopreservação, ou ainda a uma reação de hipersensibilidade aos componentes dos crioprotetores utilizados.

O diagnóstico pode ser feito com base em observações clínicas como a presença de secreção vaginal e intervalos anormais entreaios. Contudo a endometrite sub-clínica necessita do emprego de ferramentas diagnósticas como ultrassonografia, cultura de endométrio e citologia esfoliativa.

A resposta inflamatória uterina prolongada pode gerar a produção de diversos mediadores inflamatórios dentre os quais a prostaglandina que pode gerar a luteólise precoce e causar a perda do embrião.

Atualmente, tem crescido o interesse dos criadores de cavalos pela produção de muares, fruto do acasalamento de éguas com jumento (*Equus caballus* x *Equus asinus*). Embora eqüinos e asininos sejam parentes, cada um constitui uma espécie distinta, com número de cromossomos diferentes e que quando acasalados geram híbridos quase sempre inférteis.

Os estudos sobre a eficiência reprodutiva na produção de híbridos ainda são escassos e não se sabe ao certo como o útero eqüino reage ao sêmen de outra espécie. A resposta inflamatória uterina de éguas ao sêmen de garanhões vem sendo estudada há muito tempo, contudo, nenhum trabalho até o momento relatou essa resposta ao sêmen de jumento. Sendo assim, este estudo teve por objetivos: estudar a resposta inflamatória uterina de éguas pós-inseminação com sêmen de jumento e comparar os efeitos do sêmen fresco e sêmen congelado sobre o endométrio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mecanismos de Defesa Uterino

O útero da égua é protegido de contaminantes externos através de mecanismos físicos e imunológicos. Os mecanismos físicos incluem a vulva, prega vestibulo-vaginal, vagina, cérvix e miométrio. A resposta imunológica é dependente do sistema complemento, polimorfonucleares (PMNs) e imunoglobulinas (KATILA, 1995). O endométrio equino é constituído por células ciliadas e secretoras de muco. Os cílios têm como função transportar muco, fluido, bactérias e debris através das dobras longitudinais do endométrio e cérvix (CAUSEY, 2007).

Durante a fase de estro as células epiteliais são do tipo colunar alta ou pseudoestratificadas com vacuolização da porção basal das células, alguns polimorfonucleares (PMN), principalmente neutrófilos, podem ser encontrados.

O tecido endometrial de éguas tem todos os seus componentes associados com tecido linfóide (WATSON e THOMSON, 1996). A secreção de muco pelas células endometriais permite hidratar e lubrificar o endométrio, e impede a ligação de bactérias a receptores celulares evitando a colonização do endométrio (CAUSEY, 2007). A população de leucócitos não apenas é responsável pela remodelação tecidual e ou mecanismos de defesa do útero, mas também atua na produção de citocinas e quimiocinas necessárias aos mecanismos de defesa. Quando o endométrio recebe um estímulo, um processo inflamatório tem início rapidamente, com a migração de células de defesa e acúmulo de mediadores inflamatórios (ALGHAMDI et al., 2005).

Em equídeos, o sêmen é depositado no lúmen uterino da fêmea independente do método, se por monta natural ou inseminação artificial. Tal evento decorre das características anatômicas da cérvix, que se encontra aberta durante o estro, e pela sua completa adaptação ao processo uretral do macho, que é exposto durante a ereção peniana e tumefação da glândula (TROEDSSON, 1997).

A deposição de sêmen e microrganismos dá início a uma resposta inflamatória uterina com aumento da permeabilidade capilar causando edema e extravasamento de líquido para dentro da luz uterina. A secreção de produtos inflamatórios exerce quimiotaxia sobre PMNs que migram até o local onde são responsáveis pela fagocitose e eliminação do agente estranho (TIZARD, 1996).

Estudos sugerem que o espermatozóide equino ao entrar em contato com o útero ativa a secreção de componentes do sistema complemento. A clivagem do componente C5 em C5b fornece um sinal quimiotaxico responsável pelo influxo de PMN para o lúmen uterino (KOTILAINEN et al. 1994; TROEDSSON et al., 1995). A presença do componente C3b aliado a outros mecanismos independentes do complemento permite que PMN ativados se liguem ao espermatozóide e fagocitem-no (DAHMS e TROEDSSON, 2002). Uma vez iniciado o processo inflamatório, uma série de mediadores pró-inflamatórios é liberada pelos PMN, células do endotélio vascular, células endometriais lesadas e pelos macrófagos ativados pela inflamação. As principais funções desses mediadores são atrair mais células de defesa para o local da inflamação, facilitar o acesso dessas células e melhorar a eficiência da eliminação do agente (TROEDSSON et al., 2006).

O principal mecanismo de limpeza física do útero é realizado pelo miométrio. Suas contrações permitem a expulsão dos produtos inflamatórios, sêmen e outros contaminantes após a cobertura, pelo aumento da atividade mioelétrica durante as primeiras seis horas pós-cobertura, e aumento da produção de prostaglandina (PGF_{2α}), via metabolismo do ácido

araquidônico, que atua sobre a musculatura lisa do útero causando contração (ALGHAMDI e TROEDSSON, 2002).

Tanto a monta natural quanto a IA com um volume de 80 mL de sêmen, aumentam significativamente o número total de contrações no corpo e cornos uterinos das éguas, bem como a amplitude e a duração dessas contrações. Contudo, a redução do volume inseminante para 10 mL de sêmen não teve efeito sobre as contrações uterinas, (CAMPBELL e ENGLAND, 2006).

Os mecanismos de defesa uterina são influenciados pelos hormônios esteróides. Acredita-se que as éguas são mais susceptíveis à endometrite durante o diestro (KATILA, 1996). Na fase de estro, ocorrem períodos de atividade contrátil rítmica do miométrio com grande amplitude durante aproximadamente cinco minutos, alternados com períodos equivalentes de repouso (JONES et al., 1991). O desempenho deste mecanismo requer o funcionamento da cérvix que nesta fase está completamente relaxada (LEBLANC et al., 1989).

A resposta à deposição de sêmen e seus contaminantes ocorre rapidamente, com um aumento da intensidade das contrações que expulsam o excesso de fluido do útero via cérvix. Durante o diestro a contratilidade endometrial é de baixa amplitude e a cérvix está totalmente fechada isso dificulta a expulsão de fluido. O acúmulo de fluido dificulta a fagocitose por neutrófilos, devido ao ambiente uterino hostil (TROEDSSON et al., 1993), levando ao acúmulo de óxido nítrico (NO) liberado por neutrófilos degenerados. Nessas condições, o NO atuaria reduzindo a contratilidade da musculatura lisa uterina prejudicando a resposta contrátil (ALGHAMDI e TROEDSSON, 2002).

A drenagem linfática, outro mecanismo físico para limpeza uterina, é realizada através de vasos linfáticos e linfonodos que removem o excesso de fluido da luz uterina e camada submucosa (LEBLANC et al., 1995).

O endométrio equino é considerado parte do sistema imune da mucosa, tendo capacidade local de sintetizar imunoglobulinas (WIDDERS et al., 1985 apud KATILLA, 1995). As imunoglobulinas fazem parte da resposta inflamatória iniciando e aumentando os mecanismos de defesa. Uma grande parte das imunoglobulinas (Igs) presentes no útero, aparentemente, são produzidas no endométrio, sendo mínima a transudação de Ig em circunstâncias normais (BLANCHARD et al., 2003).

2.2 Fatores Pré-disponentes à Endometrite

Vários fatores contribuem para a patogênese da endometrite em éguas, tais como idade, tipo de atividade física, conformação perineal, “*clearance*” (limpeza) uterino e competência cervical, os quais podem diferir muito entre indivíduos (LEBLANC e CAUSEY, 2009).

A condição corporal está intimamente relacionada à conformação do períneo, animais muito magros, com idade avançada ou sob atividade física intensa, podem ter grande perda de gordura corporal na região do períneo (NEWCOMBE, 2011). Esta condição faz com que o reto torne-se deslocado mais anteriormente permitindo que a vulva seja puxada acima da cavidade pélvica, isto altera a conformação perineal permitindo a contaminação fecal de vulva e vestíbulo. A pneumovagina, condição determinada pela aspiração de ar, material fecal e bactérias para dentro do vestíbulo e cavidade vaginal é comum em animais atletas (HURTGEN, 2006). A comissura ventral se torna anormalmente elevada em relação ao assoalho pélvico, que por sua vez agrava qualquer fraqueza no mecanismo do esfíncter vestibulovaginal. Isto resulta em uma deficiência do mecanismo de válvula unidirecional vulvovaginal, o qual normalmente previne a inspiração de ar e a dilatação da porção anterior da vagina (NEWCOMBE, 2011). A limpeza física do útero, ou “*clearance*” uterino, é o

principal mecanismo para prevenção da endometrite eqüina atuando na limpeza eficiente de debris do útero após a cobertura ou parto. Algumas éguas possuem dificuldade de eliminar esses debris, por possuírem defeitos anatômicos ou degenerativos que interferem com a drenagem uterina (LEBLANC e CAUSEY, 2009). Assim, a integridade vulvar, esfíncter vestibulovaginal e cérvix constituem barreiras importantes contra a contaminação e infecção uterina. Quando estas estruturas são danificadas, há um aumento no desafio microbiano no trato reprodutivo e aumento potencial de alteração no mecanismo de limpeza de fluidos e bactérias do útero acompanhando o parto ou a cobertura (HURTGEN, 2006)

Alguns defeitos anatômicos podem ser ocasionados pelo número de partições que podem gerar lesão de cérvix tornando-a incompetente. Durante um parto difícil ou distócico, a cérvix pode ser danificada ou dilacerada. Independente do grau de laceração (pequena ou de comprimento total) haverá comprometimento do tecido cervical, potencial necrose tecidual e inflamação. Além disso, podem ocorrer aderências cérvico-vaginal pós-parto e lesão do esfíncter vestibulovaginal (HURTGEN, 2006).

A localização do útero também pode se tornar uma desvantagem aos mecanismos de limpeza uterina. Em animais múltiparos mais velhos pode favorecer o aparecimento de endometrite, uma vez que o miométrio tem que contrair contra a gravidade para remover o excesso de fluido e debris inflamatórios (LEBLANC, 1999).

2.3 Endometrite Bacteriana

O lúmen uterino de éguas normais é considerado “estéril” quanto à presença de bactérias e possui a capacidade de recuperar-se da contaminação que ocorre naturalmente após o acasalamento (JACOB et al., 2002).

O útero é contaminado com uma grande quantidade de microorganismos provenientes do sêmen e da genitália externa do garanhão durante a cópula. Na maioria das vezes, as bactérias encontradas no útero são patógenos oportunistas capazes de colonizar o trato reprodutivo (BLANCHARD et al., 2003).

A grande maioria das éguas é capaz de eliminar a contaminação bacteriana pouco tempo após a cobertura e parto (KATILLA, 1996). Éguas propensas a infecção uterina crônica, geralmente são velhas, com baixa eficiência reprodutiva ou demonstram sinais clínicos de endometrite. Éguas resistentes possuem a capacidade de limpar o útero da infecção em até 96 horas após a inoculação bacteriana (TROEDSSON, 1993).

As alterações uterinas em consequência de infecções por microorganismos, resultam em falhas de concepção, resultado direto da colonização de bactérias diminuindo de forma considerável, as chances de uma gestação a termo (GASTAL et al., 1989).

O trato reprodutivo eqüino é constantemente habitado por diversos microorganismos que vivem em equilíbrio, e são considerados não patogênicos. O isolamento de bactérias da fossa clitoriana tem revelado a presença de vários agentes, sendo os mais encontrados *Escherichia. coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Citrobacter sp.* e *Streptococcus sp.* (JACOB et al., 2002).

Os patógenos mais comuns envolvidos na endometrite eqüina são: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*), *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (FRONTOSO et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2007). Éguas com histórico de problemas de fertilidade apresentam isolamento de *E. coli* com maior frequência, enquanto que *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* são raras. *Streptococcus* β -hemolítico está mais relacionado com casos clínicos de endometrite, do que com falhas na fertilidade. Porém, *E.coli* foi a espécie bacteriana mais associada aos casos de problemas de fertilidade sem sinais clínicos de endometrite. (ALBIHN et al., 2003).

S. equi subsp. *zooepidemicus* faz parte da microbiota normal da pele de equinos e é um contaminante comum no útero após a cobertura, estando presente em 66,0% das infecções uterinas. Esta bactéria tem a capacidade de se aderir às células endometriais o que, supostamente, a protegeria contra os mecanismos físicos de limpeza uterina (WATSON, 2000). *E. coli* é frequentemente encontrada em éguas com defeitos anatômicos de períneo, região vulvar predispondo a pneumovagina e a contaminação por fezes (LE BLANC, 2003). Em um estudo realizado com 239 animais, 104 (67,0%) apresentaram crescimento positivo para *E. coli* (ALBIHN et al., 2003). Frontoso et al. (2008), conduziram um estudo com 508 amostras uterinas de éguas com problemas reprodutivos como endometrite, aborto e repetição de cio, encontrando 287 (49,0%) éguas positivas, sendo isolado com maior frequência *Streptococcus* β hemolítico (31,0%, 110 isolados) seguido da *E. coli* (19,6%, 68 isolados).

2.4 Endometrite Pós-cobertura

A resposta inflamatória endometrial pós-cobertura é um evento fisiológico que acompanha a introdução de espermatozoides, bactérias e outros contaminantes no interior do lúmen uterino. Esta resposta é transitória e serve para limpeza do útero do excesso de sêmen e outros agentes (TROEDSSON et al., 1995).

Grande parte dos estudos sobre a patogenia da endometrite estavam relacionados as bactérias, atualmente, o espermatozoide é considerado o principal causador da inflamação que ocorre sempre após a cobertura (KOTILAINEN et al., 1994). A inoculação asséptica de espermatozoides no lúmen uterino causou o mesmo tipo de resposta inflamatória uterina que a encontrada com a infusão de bactérias. O espermatozoide sozinho não apresenta propriedades quimiotáticas, porém, quando na presença de componentes do sistema complemento ocorre um efeito quimiotático sobre os espermatozoides (TROEDSSON, et al., 1995).

Comparando o efeito da inseminação com sêmen congelado, fresco e apenas o diluente de sêmen sobre o endométrio, foi observado através de citologia uterina que a resposta inflamatória só diferiu quanto à concentração espermática utilizada, sendo mais intensa quanto maior for o número de espermatozoides na dose inseminante, independente do tratamento (KOTILAINEN et al., 1994). Da mesma forma, Fiala et al. (2007) observaram que a quantidade de neutrófilos na luz uterina foi maior nas éguas inseminadas com um bilhão de espermatozoides do que naquelas inseminadas com 500 milhões, duas e quatro horas após a inseminação.

A infusão de plasma seminal ou diluidor com gema de ovo, ou leite desnatado provocaram uma resposta leucocitária observada 12 horas após a infusão uterina. O percentual de leucócitos diferiu entre os tratamentos, sendo a reação mais intensa ao plasma seminal e ao diluidor à base de leite desnatado. A resposta menos intensa foi observada com o diluidor à base de gema de ovo, sugerindo que talvez a gema de ovo possa ter alguns componentes que modulariam a resposta inflamatória uterina (PALM et al., 2006).

Katila (1995) observou que independente da dose inseminante utilizada, o número de neutrófilos coletados do útero 24 horas após a inseminação foi menor do que o observado nas coletas realizadas após quatro horas, demonstrando o início da resolução da inflamação, que, geralmente, está encerrada em 48 horas.

O plasma seminal possui diversos componentes que estão envolvidos com o desenvolvimento espermático e maturação no trato reprodutivo na fêmea. Troedsson et al. (2000) observaram um efeito supressor do plasma seminal sobre a quimiotaxia de células inflamatórias, fagocitose e ativação do sistema complemento *in vitro*, o que sugere que o plasma seminal pode modular a resposta inflamatória ao espermatozoide.

A remoção do plasma seminal durante o processo de criopreservação espermática pode ser o responsável pela resposta inflamatória prolongada observada em éguas

inseminadas com sêmen congelado (TROEDSSON et al., 1995). A duração da resposta inflamatória foi menor quando a IA foi realizada na presença de plasma seminal. Houve redução significativa no número de PMN recuperados 24 horas pós-inseminação quando se utilizou plasma seminal em relação a IA sem ele (TROEDSSON et al., 2000), o que sugere que a remoção do plasma seminal na preparação do sêmen criopreservado aumenta a duração da resposta inflamatória uterina após a inseminação com sêmen congelado.

Resultados *in vitro* tem demonstrado que o meio uterino durante o processo inflamatório possui influência negativa sobre os parâmetros espermáticos, reduzindo a motilidade progressiva e a velocidade média (ALGHAMDI et al., 2001). Além disso, a formação de agregados de espermatozóides e PMNs pode impedir o deslocamento destes até o oviduto, diminuindo assim o número de células espermáticas férteis disponíveis para a fecundação. A adição de plasma seminal não aumenta a motilidade espermática, mas diminui a formação desses agregados (TROEDSSON et al., 2001).

2.5 Susceptibilidade à Endometrite

O conceito de susceptibilidade a endometrite é conhecido à décadas e ainda não está claro quais mecanismos de defesa uterina são falhos nas éguas classificadas como susceptíveis (KATILLA, 1996). A susceptibilidade à endometrite persistente pós-cobertura afeta entre 10 e 15% das éguas em reprodução (ZENT et al., 1998).

Diversos estudos investigaram os possíveis fatores que tornam alguns animais mais susceptíveis a endometrite. Até o presente, éguas sadias ou resistentes à endometrite persistente pós-cobertura conseguem debelar o processo inflamatório completamente em 36-48 horas após a cobertura. Porém, se ocorrer uma falha dos mecanismos de defesa, há o favorecimento da aderência de bactérias à mucosa uterina, levando à perda da integridade da mucosa e à instalação de uma infecção bacteriana (KATILLA, 1995).

Sob desafio bacteriano, éguas susceptíveis a endometrite tem 5.5 vezes mais chances de desenvolverem fluido intra-uterino livre comparado a éguas resistentes. Um grande número de éguas susceptíveis com acúmulo de líquido intrauterino, sugere falha na limpeza uterina permitindo a persistência e multiplicação de bactérias (MALOUFI et al., 2002).

Um dos pontos centrais que envolvem a susceptibilidade à endometrite está relacionada à atividade miometrial. Existem diferenças entre éguas normais e susceptíveis quanto à amplitude de resposta mioelétrica do útero. Em ambos os animais a resposta contrátil do miométrio tem início nas primeiras seis horas após a cobertura, porém, em éguas normais essa resposta persiste por até 19 horas, e em éguas susceptíveis, nesse tempo a resposta contrátil já se encontra em níveis basais (TROEDSSON, 1993). Em estudos *in vitro*, foi observado que a direção das contrações das fibras musculares é diferente entre as duas categorias de éguas. Enquanto, em éguas sadias a contração ocorre a partir da ponta do corno uterino em direção à cérvix, nas éguas susceptíveis a contração não apresenta padrão rítmico e o útero tende a se contrair em direção à ponta do corno uterino, o que dificulta a eliminação de conteúdo pelo órgão (REITZENSTEIN et al., 2002). Rigby et al. (2001) avaliaram a resposta miometrial de éguas normais e susceptíveis a endometrite a diferentes agonistas prostaglandina (PGF_{2α}), ocitocina e cloreto de potássio (KCL), demonstrando que éguas susceptíveis possuem um defeito intrínseco da função miometrial. Este efeito não foi associado a nenhuma resposta mediada por um receptor específico e nem a uma regulação alterada da concentração de cálcio intracelular. Outra característica das éguas susceptíveis é a menor liberação de PGF_{2α}, após a inseminação artificial ou à administração de ocitocina exógena, o que ajuda a explicar a menor capacidade contrátil do útero destes animais (NIKOLAKOPOULOS et al., 2000). O resultado final é um acúmulo de fluido na luz uterina,

por vários dias após a cobertura, acompanhado de um quadro inflamatório persistente e, na maioria dos casos, de uma infecção bacteriana (LEBLANC, 2003).

A falha reprodutiva provém de um efeito direto do ambiente uterino incompatível com a sobrevivência do embrião, ou da liberação constante de $\text{PGF}_{2\alpha}$, devido à inflamação, levando à diminuição da progesterona circulante pela lise do corpo lúteo (LEBLANC, 2003).

2.6 Métodos de Avaliação da Condição Uterina

2.6.1 Ultrassonografia

Antes da utilização da ultrassonografia, era difícil determinar a presença e a quantidade de líquido presente no útero de éguas. Desde a sua criação, o uso de ultrassonografia na reprodução teve um impacto profundo na capacidade de detectar a presença de líquido intra uterino, bem como a sua gravidade. Retenção de líquido no útero por si só não constitui uma contribuição para o diagnóstico de endometrite. No entanto, a avaliação do volume fluido ecogenicidade do líquido presente no útero, fornece informações importantes sobre a presença e gravidade da endometrite (LIU e TROEDSSON, 2008).

Durante o estro, fase estrogênica, ocorre aumento da secreção endometrial e edema, assim pequenos acúmulos de fluido $\leq 3,0\text{mm}$ de diâmetro e edema endometrial proeminente são achados ultrassonográficos normais (BLANCHARD et al., 2003).

O grau de ecogenicidade do fluido acumulado no lúmen uterino está correlacionado com a quantidade de debris e/ou células inflamatórias. Fluido claro é não ecogênico, ou seja preto, já um exsudato inflamatório é ecogenico, varia de tons cinza até o branco.

O acúmulo de líquido no útero e avaliação dos graus de ecogenicidade do fluido constituem avaliações que podem ser correlacionadas ao grau de resposta inflamatória (MCKINNON et al., 1988).

O acúmulo de fluido uterino em éguas tem sido descrito após a inseminação artificial ou monta natural (BARBACINE et al., 2003). A incidência de acúmulo de fluido e sua correlação com as taxas de concepção são variáveis entre os estudos. Em um estudo, 15% das éguas Puro Sangue Inglês, apresentaram acúmulo de fluido no dia seguinte após a cobertura, sendo a incidência e a severidade do acúmulo de fluido relacionadas positivamente com a idade. Segundo os autores, a correlação do acúmulo de fluido uterino e a taxa de concepção desses animais, demonstrou que um pequeno acúmulo de fluido um dia após a cobertura não afetou as taxas de concepção, e que quantidades médias a moderadas de fluido tiveram um pequeno efeito sobre essas taxas (ZENT et al., 1998).

Barbacini et al. (2003), usando inseminação com sêmen congelado observaram que a incidência de fluido pós-inseminação foi maior em éguas com idade entre 10-16 e maiores que 16 anos (28,2% e 67,8%, respectivamente). Os animais que não demonstraram fluido após a inseminação obtiveram maiores taxas de concepção, contudo o acúmulo de fluido, 12 a 18 horas após a inseminação não foi associada com a redução na fertilidade. A persistência de fluido intra-uterino por mais de 96 horas sugere falha do “clearance” uterino que pode levar ao favorecimento da persistência e multiplicação de bactérias (MALOUFI et al., 2002).

2.6.2. Swab uterino

Cultura bacteriana de swabs da superfície do endométrio tem sido usado no diagnóstico de infecção uterina desde o início do século passado (DIMOCK et al., 1923 apud NIELSEN, 2005). As espécies bacterianas encontradas em culturas de endométrio variam consideravelmente entre os estudos. A técnica deve ser conduzida com muito cuidado para não haver contaminação com microrganismos presentes na vagina e vulva podendo gerar

erros de diagnóstico. Nielsen (2005) elaborou um estudo para comparar a acurácia do exame microbiológico através de swab e de biópsia. O autor descreve em seus resultados que a sensibilidade do método de cultura feito do fragmento de biópsia foi superior ao método do swab (0.82 *versus* 0.77) e com apenas uma coleta é possível obter amostras que servem tanto para cultura como para avaliação citológica. O risco de contaminação bacteriana da amostra foi similar entre os dois métodos, permitindo que ambos sejam utilizados como ferramenta diagnóstica.

2.6.3 Citologia uterina

A citologia uterina foi descrita como um método diagnóstico de endometrite em 1960 e desde então tornou-se uma prática rotineira na reprodução equina (KNUDSSSEN, 1964 apud NIELSEN et al., 2010). O exame citológico do útero tem por objetivo verificar alterações de caráter inflamatório em éguas. Permite avaliar tanto uma endometrite persistente quanto a endometrite pós-cobertura (BROOK, 1985). É um método fácil e rápido e permite avaliar a condição uterina baseado na presença ou não de células inflamatórias, principalmente neutrófilos. Os resultados de um exame citológico confiável são dependentes de uma técnica de coleta que renda células bem preservadas representativas da superfície uterina sem causar dano ao endométrio (COUTO e HUGHES, 1984).

As técnicas utilizadas para obtenção de material citológico de éguas são variáveis entre os estudos, os principais são os métodos: swab, escova ginecológica e lavado uterino (NIELSEN et al., 2010; COCHIA et al., 2012).

A coleta através de lavado uterino com baixa dose consegue coletar células de uma área de superfície maior e obtém-se uma amostra mais representativa de toda condição uterina em comparação a coleta através de swabs ou biópsias. Como as lesões uterinas e ou infecções devem ser mais generalizadas o lavado uterino é um procedimento adequado de coleta, mas que também pode causar irritação de mucosa (COCCHIA et al., 2012).

A utilização de swab é o método que causa maior distorção celular, prejudicando a identificação de células sob exame, estando relacionado a diversos fatores: aderência das células nas fibras do swab, pressão aplicada na coleta das amostras ou pressão aplicada para confecção do esfregaço nas lâminas de vidro (BOURKE et al., 1997). O método da escova permite a captação de um maior número de células tornando a técnica mais eficiente que a coleta com swab (REILAS, 2001). Em um estudo recente, as três principais técnicas utilizadas para coleta citológica uterina foram comparadas: escova, swab e lavado uterino e foi observado que a técnica empregando a escova ou o lavado tiveram qualidade superior nos parâmetros celularidade total, qualidade das células recuperadas, entre outros, em relação ao swab. O emprego de escova ginecológica se mostrou uma técnica mais prática e mais rápida do que o lavado. Contudo o lavado uterino permite obtenção de amostras celulares mais preservadas de uma área uterina maior sob exame (COCHIA et al., 2012).

2.6.3.1 Métodos de coloração da citologia uterina

O método de coloração hematológica estabelecida por Romanowsky tem sido frequentemente utilizado para citologia uterina de éguas. Outra coloração também muito utilizada é o método de Giemsa e suas modificações (OLIVEIRA et al., 2010; AHMADI et al., 2006). Nesse método de coloração as células endometriais tem seu citoplasma corado de roxo pálido e o núcleo apresenta coloração roxa escura, enquanto os PMNs apresentam citoplasma de coloração pálida, quase não corado e os núcleos também apresentam coloração roxa escura (WALTER et al., 2011). Esses métodos são utilizados principalmente, por serem rápidos e práticos e permitem a preparação e leitura das amostras no campo, sem a

necessidade de um laboratório sofisticado para coloração e montagem das lâminas (RIDDLE et al., 2007; AGUILAR et al., 2006).

O método de coloração de Papanicolaou é o método de eleição para amostras de citologia vaginal e endometrial (CARVALHO, 2009). Também tem sido utilizada em mamíferos como diagnóstico de patologias reprodutivas e diferenciação das fases do ciclo estral em cabras (RAPOSO e SILVA, 1999), cadelas (JESUS et al., 2005), ratas (DAMOUS et al., 2009) e várias outras espécies. Mais recentemente, um estudo demonstrou a aplicabilidade da técnica para amostras citológicas endometriais em éguas (WALTER et al., 2011). Os autores compararam os métodos de Papanicolaou e Eosina-tiazina (Hemacolor®) para avaliação de endometrite. Ambos os métodos foram considerados satisfatórios na detecção de PMN, e ressaltaram ainda, que um benefício do uso da coloração de Papanicolaou em relação a eosina-tiazina, foi a habilidade deste método corar em três dimensões grupos de células, permitindo assim a melhor diferenciação entre elas. A coloração das células endometriais apresentaram citoplasma azulado a esverdeado e o núcleo vermelho; os PMN apresentaram citoplasma verde pálido e núcleo vermelho amarronzado (WALTER et al., 2011).

2.6.3.2 Interpretação da citologia endometrial eqüina

Apesar da citologia ser um exame prático, os métodos para sua interpretação são muito variáveis, incluem o uso do número de neutrófilos/campo por lâmina, razão de neutrófilos por células epiteliais ou porcentagem de neutrófilos. Outras interpretações classificam a presença ou ausência de inflamação como positivo ou negativo, outros quantificam o grau de inflamação em leve, moderado ou severo. Na tabela 1, estão resumidos os diferentes métodos quantitativos para diagnóstico positivo na leitura de citologia uterina (CARD, 2005).

A contagem diferencial de células é utilizada para quantificar os tipos celulares. O percentual de neutrófilos é usualmente utilizado para determinar o grau de inflamação presente (CARD, 2005). O grau de inflamação pode ser classificado com base no percentual de neutrófilos da amostra em: $\leq 5\%$, sem inflamação, de 5–15%, inflamação leve, de 15–30%, inflamação moderada, e $>30\%$ inflamação severa (BROOK, 1993).

Outros tipos celulares que podem ser encontrados na citologia esfoliativa incluem: linfócitos, eosinófilos, monócitos/macrófagos e eritrócitos. Os eosinófilos são identificados na inflamação aguda associada ao pneumo-útero e inconsistentemente frequentes em casos de endometrites fúngicas. Linfócitos e monócitos nos tecidos indicam um processo inflamatório crônico (KENNEY e DOING, 1986).

Quadro 1: Métodos quantitativos para interpretação de amostras de citologia endometrial equina.

PARÂMETRO	AUTOR	ANO
> 1 neutrófilo em cinco campos (X240)	KNUDSEN	1964
Razão de neutrófilos por células epiteliais	DIGBY E RICKETTS	1978
Razão de neutrófilos por células epiteliais > 10:1	ASBURY	1982
> 1 neutrófilo ativado por campo	ASBURY	1984
Neutrófilos por células epiteliais em 8 campos	COUTO E HUGHES	1984
Razão de neutrófilos por células epiteliais	LA COEUR E SPRINKLE	1986
> 5 neutrófilos em 10 campos	BROOK	1985
< 15 células endometriais por 1 neutrófilo	LEY	1986
≥ 3-10% das células são neutrófilos	CRICKMAN E PUGH	1986
≥ 2 % das células são neutrófilos	BALL ET AL	1988
≥ 1 neutrófilo por campo (400)	PURSWELL	1989
≥ 0,5% neutrófilos	RICKETTS E MACKINTOSH	1989

Adaptado de Clard (2005).

2.7 Métodos de Diagnóstico da Endometrite Equina

A avaliação do trato reprodutivo da égua normalmente faz uso da ultrassonografia, citologia uterina e cultivo microbiano para identificar éguas com endometrite. Mas correlação entre citologia e cultivo microbiano é variável entre os estudos e sua interpretação deve ser analisada criteriosamente (CARD, 2005).

Resultados de cultura podem ser falso-positivos devido a contaminação da amostra no ambiente e/ou genitália externa, assim como, resultados falsos negativos provém de amostragens inadequadas (CARD, 2005).

Para avaliar o grau de correlação entre citologia e cultivo microbiano do útero, Oliveira et al. (2010) avaliaram 25 éguas, das quais 16 foram positivas ao exame microbiológico. Dentre as amostras positivas, apenas quatro foram confirmadas pela citologia. Os autores atribuíram a fraca concordância entre os testes aos resultados falso-positivos de cultivo que provavelmente seria devido à contaminação do swab no momento da coleta. Estudos recentes tem demonstrado que o isolamento de microrganismos nem sempre está associado a inflamação.

Riddle et al. (2007) observou que nem todas as culturas positivas foram associadas com citologias positivas. O tipo de microrganismo isolado foi relacionado aos resultados positivos ou negativos da citologia. Os isolados contendo *Streptococcus* β-hemolítico, *Klebsiella* sp. ou *Staphylococcus* sp. foram associados a evidências citológicas de inflamação, contudo *E. coli* e *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. isolados resultaram em mais diagnósticos negativos no exame citológico.

Nielsen et al. (2010) observaram que um número significativo de amostras de cultura positivas para *E. coli* não foram associadas com a presença de PMN's. A detecção de células

inflamatórias sem a presença de bactérias provavelmente mostra que as bactérias já foram eliminadas, mas a inflamação permanece (BROOK, 1985).

A combinação dos exames de citologia e cultivo bacteriológico, aumentou o número de éguas positivas a endometrite ($P < 0,01$) quando comparado as técnicas de citologia ou ultrassonografia sozinhas, causando aumento na sensibilidade do diagnóstico de endometrite (OVERBECK et al., 2011).

A avaliação ultrassonográfica do acúmulo de fluido no útero aliado à citologia são métodos de diagnóstico da endometrite pós-cobertura. Fluido intra-uterino foi altamente associado com amostras citológicas contendo > 5 neutrófilos/campo ($P < 0,05$). Éguas com inflamação moderada a severa tem 1,4 vezes mais chance de ter acúmulo de fluido intra-uterino do que aquelas sem ou com inflamação leve (BURLESON et al., 2010). Em contraste, Fioratti et al. (2009), demonstraram em seu estudo que a intensidade da resposta inflamatória não pode ser quantificada baseada no acúmulo de fluido no lúmen uterino, uma vez que este não exibiu uma correlação linear da concentração de neutrófilos no fluido coletado com o tamanho da coluna de fluido uterino avaliada por ultrassonografia.

A presença de fluido intra-uterino foi observada mais frequentemente em 45-55% dos exames ultrassonográficos, quando foi isolado *Streptococcus* β -hemolítico, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* ou fungos, entretanto não foi observado quando se isolou *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp.* (BURLESON et al., 2010).

Endometrite clínica e sub-clínica, muitas vezes, podem não ser diagnosticadas por causa dos sinais clínicos sutis, ou mesmo da ausência destes, e da escolha do método de diagnóstico (LEBLANC e CAUSEY, 2009).

A avaliação ultrassonográfica do trato reprodutivo, a cultura e a citologia uterina são ferramentas utilizadas para identificar éguas com endometrite. Reconhecer os resultados de diagnóstico produzidos por diferentes patógenos uterinos ajudará os clínicos a identificar a causa da endometrite (BURLESON et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local da Pesquisa

O experimento foi realizado no setor de Reprodução Animal (DRRA/IZ), Laboratório de Histologia Animal, Instituto de Veterinária e no Laboratório de Patologias da Reprodução, do Projeto Sanidade Animal, Convênio Embrapa/UFRRJ, pertencente à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica/Rio de Janeiro.

3.2 Animais

Foram estudadas sete éguas da raça Bretão Postier pertencentes ao Setor de Matrizes da UFRRJ com idade três a doze anos. As amostras de sêmen utilizadas para as inseminações eram provenientes de um jumento da raça Pega com cinco anos de idade pertencente ao Setor de Garanhões da UFRRJ.

3.3 Colheita e Análise do Sêmen

Antes de cada coleta foi realizada a antissepsia do pênis do animal com água morna e sabão neutro para a remoção de sujidades, enxágue com água morna e secagem com papel toalha. O sêmen foi coletado com a utilização de vagina artificial modelo Botucatu e copo coletor contendo filtro para separar a fração gel das frações seminais.

O sêmen foi diluído na proporção 1:1 (uma parte de sêmen para uma parte de diluidor) em meio diluidor Botu sêmen[®] e transportado até o laboratório de análise de sêmen do DRRA/IZ, onde foi realizada a análise dos parâmetros de motilidade total e progressiva e vigor espermático, através de microscopia óptica com aumento de 100 e 400X, e concentração espermática em câmara hemocitométrica.

A avaliação das patologias espermáticas foi realizada em microscopia de contraste de fase, onde uma gota de sêmen diluída em formol foi analisada entre lâmina e lamínula e avaliação da morfologia de 200 células para o estabelecimento do percentual de células normais e com patologias (CBRA, 1998).

3.4 Criopreservação de Sêmen Asinino

Imediatamente após as análises, cada ejaculado diluído foi centrifugado a 600g por 10 minutos. Os pellets de espermatozoides foram ressuspensos em diluidor comercial FR-6 (NUTRICELL[®]) em quantidade suficiente para obter uma concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL. Após a adequação da concentração espermática o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL previamente identificadas e lacradas com álcool polivinílico. O sêmen foi submetido ao processo de criopreservação rápida onde as palhetas foram resfriadas a 5°C em geladeira comum por 20 minutos, e acondicionadas em caixa isotérmicas contendo nitrogênio líquido, colocadas a 6,0 cm acima do nível do nitrogênio por 20 minutos e então imersas no nitrogênio líquido e colocadas em raques identificadas as quais foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido.

3.5 Avaliação Seminal Pós-Descongelamento

As amostras acondicionadas em nitrogênio foram descongeladas a 46°C por 20 segundos. Os parâmetros de motilidade e vigor foram avaliados através de microscopia ótica. As inseminações com sêmen congelado só foram realizadas com partidas onde motilidade foi igual ou superior a 30,0% e vigor dois.

3.6 Inseminações Artificiais (IA)

A atividade ovariana das éguas foi monitorada por meio de palpação retal e ultrassonografia realizados diariamente durante o estro para determinar o dia da ovulação. Com a detecção de um folículo $\geq 35,0$ mm, as fêmeas receberam 1000 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Chorulon®) endovenosa, sendo as inseminações realizadas 24 horas após a aplicação do hCG. As IAs com sêmen fresco foram realizadas com pipetas de plástico estéreis inseridas através da cérvix e o sêmen depositado no corpo do útero, já as IAs com sêmen congelado foram realizadas no corno uterino, ipsilateral ao folículo ovulatório com uma pipeta de plástico flexível.

3.7 Procedimentos de Colheita e Análises de Dados

Os grupos foram divididos da seguinte forma:

- **Grupo 1 (G1):** éguas inseminadas com sêmen fresco de jumento na concentração de 800×10^6 / mL volume inseminante de 4 mL.
- **Grupo 2 (G2):** éguas inseminadas com sêmen congelado na concentração de 800×10^6 / mL e volume inseminante de 4 mL.

Um total de sete éguas foi utilizado para a realização do experimento. Cada animal foi submetido a inseminação artificial com sêmen fresco ou congelado, cada um sendo inseminado por dois ciclos estrais consecutivos. Para a avaliação da resposta inflamatória foram realizados os seguintes exames: ultrassonografia uterina, coleta de material uterino para cultura bacteriana e citologia uterina, que foram realizadas em três momentos distintos: antes da inseminação (T1), quatro horas após a inseminação (T2) e vinte e quatro horas após a inseminação (T3).

Cada grupo foi composto por 14 inseminações ($n= 7 \times 2$) (Figura 1).

3.7.1 Exame ultrassonográfico uterino

O exame de ultrassonografia foi realizado com aparelho de ultrasson Sonovet 600 e transdutor linear de 5 Mhz. Todo útero foi visualizado para possíveis áreas de acúmulo de líquido. Foram realizadas mensurações da área de acúmulo de líquido para classificação do escore segundo:

0 - sem presença de fluido;

1 - pequeno acúmulo de fluido uterino menor que 1 cm de altura na área da bifurcação;

2 - acúmulo médio de fluido uterino variando 1,1 a 2 cm de altura;

3 - acúmulo de fluido uterino com áreas maiores que 2 cm de altura.

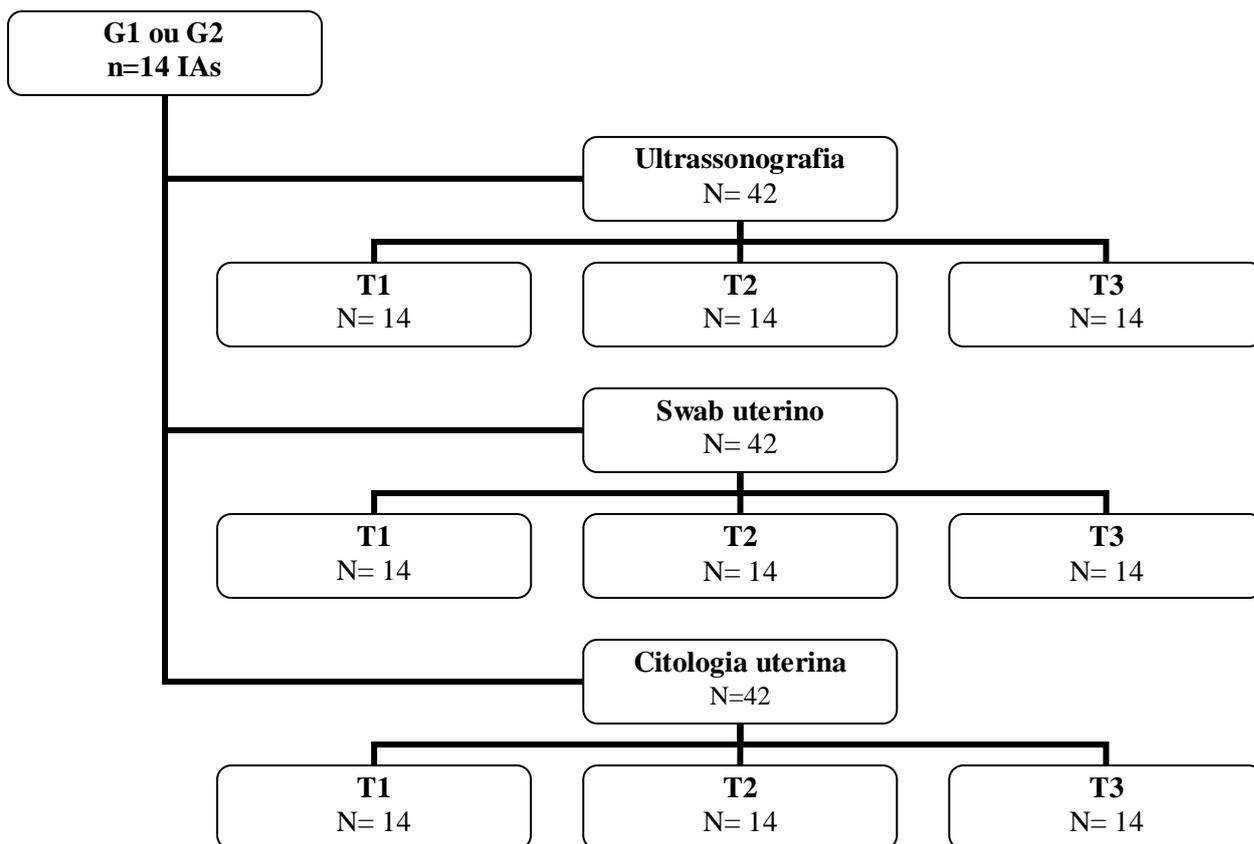


Figura 1: Organograma da divisão da coleta de dados e total de amostras para cada grupo.

3.7.2 Isolamento bacteriano

Antes da coleta, cada animal foi submetido à limpeza de todo conteúdo fecal presente no reto, para facilitar o acesso ao útero pelo canal vaginal e eliminar o risco do animal defecar sobre o instrumental durante a coleta de material. Em seguida era feita a anti-sepsia da região de vulva e ânus com água e antisséptico iodopovidona, após, a região foi seca com papel toalha. A coleta de amostras uterinas para cultivo bacteriano foram realizadas com swab estéril contendo meio de transporte Stuart (Coplan–Laborclin[®]) acoplado a uma haste de metal previamente esterilizada, para mantê-lo protegido de contaminantes e facilitar o acesso ao útero (Figura 2).

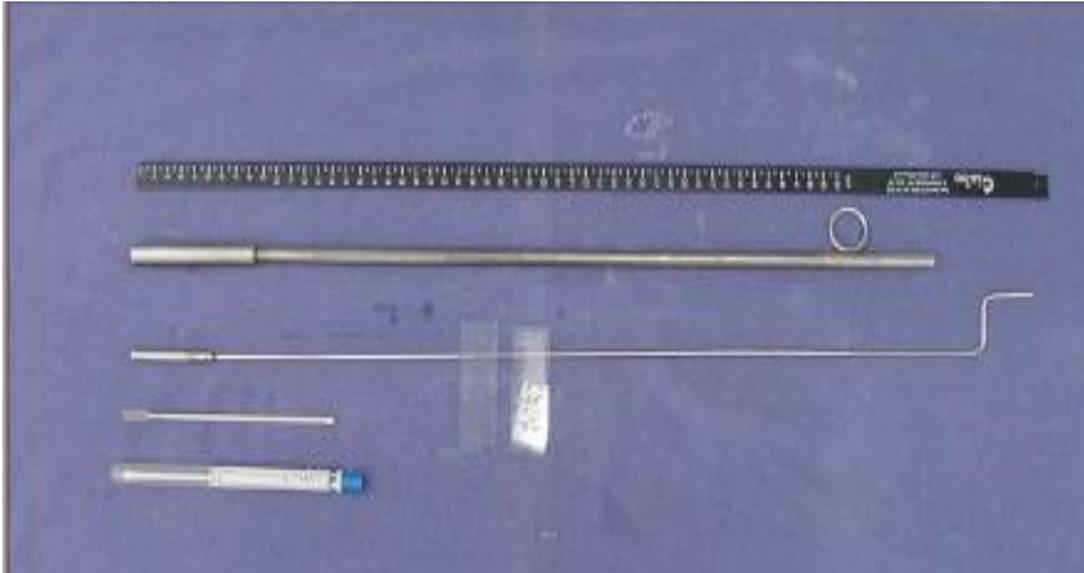


Figura 2: Materiais utilizados para coleta de material uterino, (de baixo para cima) swab e meio de transporte Stuart, escova ginecológica e haste metálica ou pinça de citologia.

Para amostragem do útero, a haste era introduzida através do canal vaginal protegido pela mão, e passada através da cérvix, o swab era exposto ao lúmen uterino e rotacionado algumas vezes, logo após era retraído para dentro da haste e removido do útero e novamente protegido pela mão na saída do canal vaginal. Após a coleta o material foi acondicionado em meio de transporte Stuart e sob refrigeração encaminhado ao Laboratório de Patologias da Reprodução (PSA-UFRRJ), onde os swabs foram semeados em três meios de cultivo distintos: Agar MacConkey, Agar EMB (Eosina Azul Metileno) e Agar sangue (Laborclin[®]). As placas foram incubadas à 37C° em condições de aerobiose. A leitura das placas foi realizada após um período de 24-48 horas de incubação sendo observado a morfologia das colônias isoladas e as mesmas classificadas de acordo com Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (KRIEG e HOLT, 1984).

Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram coradas pelo método de Gram. Então, foi estabelecida a metodologia de identificação pertinente ao microorganismo suspeito. Para as amostras suspeitas de Enterobactérias, as seguintes provas de identificação foram realizadas: comportamento em agar tríplice açúcar-ferro (TSI) (Laborclin[®]), motilidade em tubo, produção de indol, produção de ácidos a partir da glicose, fermentação de açúcares, redução do nitrato, produção de gelatinase, produção de urease e outras provas diferenciais, de acordo com o microorganismo envolvido. A identificação dos isolados de *Streptococcus* spp. foi efetuada através da inoculação em leite adicionado de azul de metileno, e das provas de hidrólise de esculina e do hipurato segundo Koneman et al. (2008).

3.7.3 Citologia uterina

O material celular foi coletado com o uso de escova ginecológica estéril (Citobrush, Inlab[®]), acopladas a um haste metálica previamente esterilizado. Foram feitos esfregaços em lâminas histológicas, fixados em etanol absoluto e levadas ao Laboratório de Histologia Animal (Instituto de Veterinária) para serem coradas pelo método de Papanicolaou (Street, 1952) (ANEXO 1).

A leitura das lâminas foi realizada em microscopia óptica com aumento de 400 e 1000X, onde se procedeu à contagem de duzentas células, diferenciando-as em epiteliais

uterinas e polimorfonucleares (PMN) neutrófilos, basófilos e eosinófilos e outras células que por ventura estivessem presentes. Os resultados foram transformados em percentual e o grau de inflamação classificado segundo Brook (1993): inflamação leve (5 -15%), inflamação moderada (15 - 30%) e inflamação severa (> 30%) de neutrófilos.

3.8 Análise Estatística

A análise estatística entre os tratamentos foi realizada através do teste de Qui-quadrado e ANOVA com nível de significância de 5% (IC 95%). Para correlação dos dados de citologia, isolamento bacteriológico e achados de ultrassonografia foi empregado o teste de correlação de Pearson.

4 RESULTADOS

4.1 Ultrassonografia Uterina

Todas as éguas foram submetidas à avaliação ultrassonográfica antes da inseminação (T1) e não foi constatada a presença de fluido no lúmen uterino. Após a inseminação (T2) com sêmen fresco e congelado, a ultrassonografia revelou a presença de fluido com escores variados entre os animais.

Embora não tenha sido constatada a presença de fluido em T1, os resultados de um ciclo do Animal 4 em G1 e um ciclo do Animal 6 e 7 em G2 foram excluídos por terem apresentado resultados de citologia positiva para endometrite.

Em T2, o acúmulo de fluido uterino manteve escore inferior a dois em todos os animais independente do grupo, com exceção de uma égua do G1 que apresentou escore três. Em T3, foi possível observar a redução no número de éguas que apresentavam acúmulo de fluido intra-uterino, com 50,0% dos animais (G1 e G2) sem fluido detectável pela ultrassonografia. O restante dos animais do G1 apresentaram escore um, porém, 35,7 e 14,3% dos animais do G2 apresentaram escore um e dois, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Escore de acúmulo de fluido uterino avaliado por ultrassonografia, dos dois ciclos/égua, comparando sêmen fresco (G1) e o criopreservado (G2) em T1 (antes da inseminação), T2 (4 horas após) e T3 (24 horas após a inseminação).

G1	Ciclo1			Ciclo2		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Animal 1	0	1	0	0	1	1
Animal 2	0	2	0	0	1	1
Animal 3	0	1	1	0	2	0
Animal 4*	0	2	0	-	-	-
Animal 5	0	2	0	0	2	0
Animal 6	0	1	1	0	1	1
Animal 7	0	1	1	0	0	0

G2	Ciclo 1			Ciclo 2		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Animal 1	0	1	0	0	1	0
Animal 2	0	1	0	0	1	0
Animal 3	0	2	2	0	1	1
Animal 4	0	1	1	0	2	1
Animal 5	0	2	2	0	1	1
Animal 6*	-	-	-	0	2	0
Animal 7*	0	2	1	-	-	-

Legenda: Zero: ausência de fluido, 1: fluido <1cm, 2: fluido de 1,1 a 2,1 cm, 3: fluido > 2,2 cm. * Resultados excluídos do estudo.

Quando avaliado pela ANOVA quanto ausência ou presença de fluido no lúmen uterino, os resultados em conjunto G1 x G2 nos dois ciclos, constatou-se diferença ($p < 0,001$) de T1 quando comparado aos demais horários nos dois grupos e ciclos. A análise estatística de T2 e T3 entre G1 e G2, não demonstrou diferença.

4.2 Bacteriologia Uterina

A análise bacteriológica uterina realizada por tratamento demonstrou que em T1 do G1, 11 (84,6%) amostras foram positivas ao cultivo e duas (15,4%) negativas. Foi observado crescimento em cultura pura em 10 amostras (91,6%) e uma cultura mista (8,4%) de *Streptococcus* β -hemolítico / *Klebsiella* sp. (Tabela 2).

Tabela 2. Análise bacteriológica uterina em T1 (antes da IA), T2 (quatro horas após a IA) e T3 (24 horas após a IA), por animal nos dois ciclos estrais avaliados em G1 (IA com sêmen fresco).

1 CICLO	T1	T2	T3
ANIMAL 1	<i>Streptococcus</i> β hemol.	<i>Enterobacter</i> sp./ <i>Klebsiella</i> sp.	<i>E. coli</i>
ANIMAL 2	<i>Streptococcus</i> β hemol.	<i>Streptococcus</i> β hemol.	s/crescimento
ANIMAL 3	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus</i> β hemol.	<i>Klebsiella</i> sp.
ANIMAL 4	<i>E. coli</i>	s/crescimento	<i>E. coli</i>
ANIMAL 5	<i>E. coli</i>	s/crescimento	<i>Streptococcus</i> β hemol
ANIMAL 6	<i>Klebsiella</i> sp./ <i>Strept.</i> β hemol.	<i>Streptococcus</i> β hemol.	<i>Klebsiella</i> sp./ <i>Strept.</i> β hemol.
ANIMAL 7	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.	s/crescimento
2 CICLO	T1	T2	T3
ANIMAL 1	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	s/crescimento
ANIMAL 2	s/ crescimento	<i>Streptococcus</i> β hemol.	s/crescimento
ANIMAL 3	s/crescimento	s/crescimento	s/crescimento
ANIMAL 4*	---	---	---
ANIMAL 5	<i>Serratia</i> sp	s/crescimento	<i>Serratia</i> sp.
ANIMAL 6	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>Streptococcus</i> β hemolítico
ANIMAL 7	<i>E. coli</i>	<i>Streptococcus</i> β hemol.	s/crescimento

Legenda: * resultados excluídos por apresentarem endometrite antes da inseminação

O número de isolamentos de cada espécie bacteriana encontradas em T1 de G1, demonstrou uma frequência maior para *E. coli* (41,6%), seguida por *Streptococcus* β -hemolítico (25,0%). Em T2, houve crescimento bacteriano em nove amostras (69,2%) sendo *Streptococcus* β -hemolítico isolado com maior frequência (50,0%). Em T3, o isolamento ocorreu em sete (53,8%), das 13 amostras, e as bactérias mais frequentemente isoladas foram *Streptococcus* β -hemolítico (37,5%), *E. coli* e *Klebsiella* sp, com 25% de frequência relativa para ambas. Houve crescimento misto de *Streptococcus* β -hemolítico / *Klebsiella* sp. em uma amostra. As demais espécies e frequências de isolamento do G1 encontram-se na tabela 3.

Tabela 3: Espécies bacterianas isoladas de swabs uterinos antes da inseminação (T1), quatro horas após (T2), 24 horas após (T3) inseminação com sêmen fresco de jumento (G1).

Bactérias isoladas	Sêmen fresco (G1)					
	T1		T2		T3	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
<i>E. coli</i>	5	41,6	2	20	2	25
<i>Enterobacter</i> sp.	1	8,4	1	10	-	-
<i>Klebsiela</i> sp.	2	16,7	2	20	2	25
<i>Serratia</i> sp.	1	8,4	-	-	1	12,5
<i>Streptococcus</i> β hemolítico	3	25	5	50	3	37,5
Total	12	100	10	100	8	100
Total de amostras positivas	11	84,6	9	69,2	7	53,8
Total de amostras negativas	2	15,4	4	30,8	6	46,2

N corresponde ao número de vezes que a espécie foi isolada

No grupo de éguas inseminadas com sêmen congelado (G2), T1 apresentou crescimento positivo em 11 amostras (91,7%). Das amostras positivas, apenas duas apresentaram cultivo misto de *Enterobacter* sp./*Streptococcus* β-hemolítico (Tabela 4).

Tabela 4. Análise bacteriológica uterina em T1, T2 e T3 por animal nos dois ciclos estrais avaliados em G2.

1 CICLO	T1	T2	T3
ANIMAL 1	<i>Streptococcus</i> β hemolítico	s/crescimento	s/crescimento
ANIMAL 2	<i>Enterobacter</i> sp. / <i>Strep.</i> β hemol.	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.
ANIMAL 3	<i>Enterobacter</i> sp.	s/crescimento	<i>Enterobacter</i> sp.
ANIMAL 4	<i>Enterobacter</i> sp.	s/crescimento	s/crescimento
ANIMAL 5	<i>Enterobacter</i> sp. / <i>Strep.</i> β hemol .	s/crescimento	<i>Enterobacter</i> sp.
ANIMAL 6*	---	---	---
ANIMAL 7	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Enterobacter</i> sp.
2 CICLO	T1	T2	T3
ANIMAL 1	<i>Streptococcus</i> β hemol	s/crescimento	s/crescimento
ANIMAL 2	<i>Enterobacter</i> sp.	s/crescimento	<i>Enterobacter</i> sp.
ANIMAL 3	<i>Enterobacter</i> sp.	s/crescimento	<i>Enterobacter</i> sp.
ANIMAL 4	s/crescimento	s/crescimento	s/crescimento
ANIMAL 5	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
ANIMAL 6	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Streptococcus</i> β hemolitico	<i>Enterobacter</i> sp.
ANIMAL 7*	---	---	---

Legenda: * resultados excluídos por apresentarem endometrite antes da inseminação

Os demais isolamentos em T1 apresentaram crescimento de uma única espécie, sendo mais freqüente o isolamento de *Enterobacter* sp. (61,5%).

Em T2, apenas quatro amostras apresentaram crescimento positivo (33,4%) nas oito demais amostras (66,6%) não houve crescimento de bactérias. *Enterobacter* sp., novamente, foi a cultura predominante, estando presente em 50,0% das amostras positivas. Todos os

isolamentos em T2 de G2 foram constituídos por culturas puras. Os resultados em T3, demonstraram crescimento em oito amostras (66,6%). Somente duas espécies foram isoladas, sendo *Enterobacter* sp. presente em sete (87,5%) e *E. coli* isolada em apenas uma amostra (12,5%). As bactérias encontradas em G2 estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Espécies bacterianas isoladas de swabs uterinos antes da inseminação (T1), quatro horas após (T2), 24 horas após (T3) inseminação com sêmen congelado de jumento (G2).

Bactérias isoladas	Sêmen criopreservado (G2)					
	T1		T2		T3	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
<i>E. coli</i>	1	7,7	1	25	1	12,5
<i>Enterobacter</i> sp.	8	61,5	2	50	7	87,5
<i>Streptococcus</i> β - hemolítico	4	30,8	1	25	-	-
Total	13	100	4	100	8	100
Total de amostras positivas	11	91,7	4	33,4	8	66,6
Total de amostras negativas	1	8,3	8	66,6	4	33,4

N corresponde ao número de vezes que a espécie foi isolada

ANOVA não demonstrou diferença ($p > 0,05$) entre os isolamentos do G1 x G2, quando comparado com os diferentes horários da inseminação e ciclos.

Na análise de regressão linear para avaliação das espécies de bactérias isoladas e número de amostras em que não houve crescimento. A avaliação foi conduzida levando em consideração apenas os diferentes momentos de coleta independente dos tratamentos (G1 e G2). Sendo assim, no total 75 amostras foram avaliadas, das quais 50 foram positivas e em 25 não houve crescimento. Em T1, houve um maior frequência de isolamento de *Enterobacter* sp. (9), seguido por *E. coli* (6) e apenas três amostras não apresentaram crescimento, contudo em T2 houve predomínio de amostras em que não houve crescimento.

O isolamento de *Streptococcus* β -hemolítico foi ligeiramente maior, em relação as demais espécies isoladas (Gráfico 1).

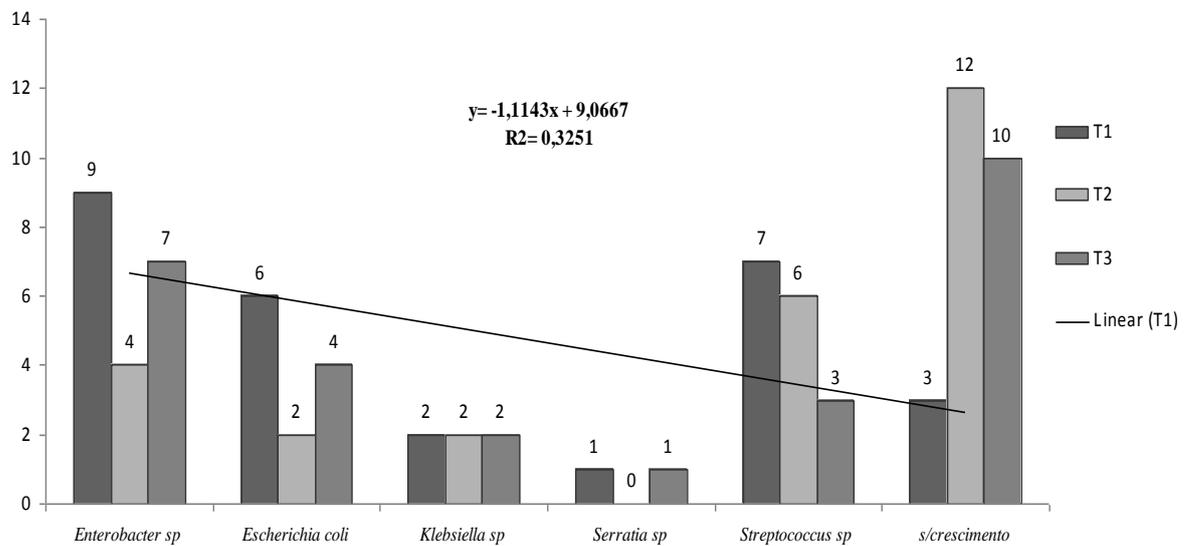


Gráfico 1. Frequência absoluta de espécies bacterianas isoladas e amostras sem crescimento em T1, T2 e T3.

A análise de T3 revelou um acréscimo na frequência absoluta de isolamento de *Enterobacter sp.* (7) em relação a T2, porém o número de amostras negativas prevaleceu sobre as positivas.

A análise de regressão linear das amostras de swab uterino avaliados em T1, T2 e T3 ($R^2 = 0,3251$) e o traçado em declínio da linha de tendência, demonstraram que houve redução no número de amostras positivas e o predomínio de amostras negativas em T2 e T3 em relação a T1.

4.3 Citologia Uterina

Os tipos celulares encontrados nas amostras foram predominantemente de células endometriais muco-secretórias, que pelo método de coloração de Papanicolaou, apresentaram núcleos de coloração roxa e citoplasma em tons variando de verde-azulado a sutilmente alaranjado (Figuras 3 e 4).

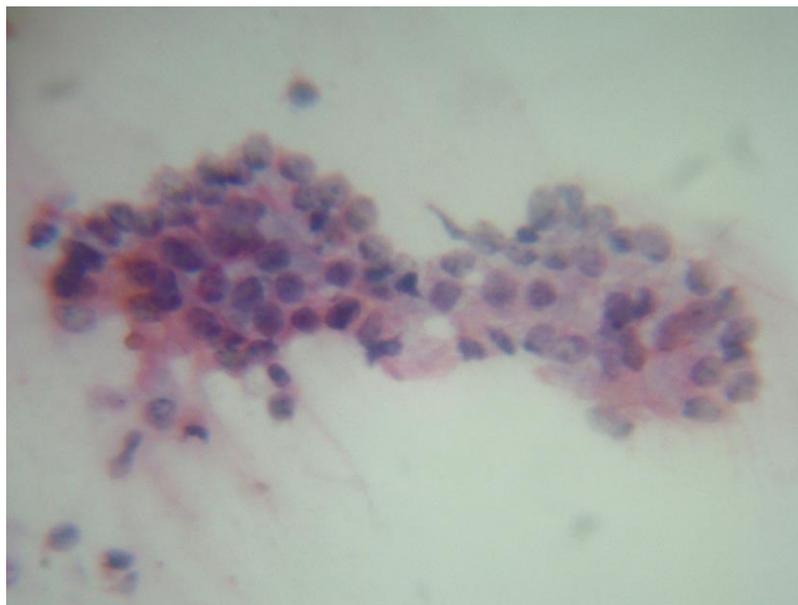


Figura 3: Células endometriais muco-secretórias agrupadas em estrutura semelhante a “favo de mel” coradas pelo método de Papanicolaou, aumento de 400X e zoom fotográfico de 2,5X.

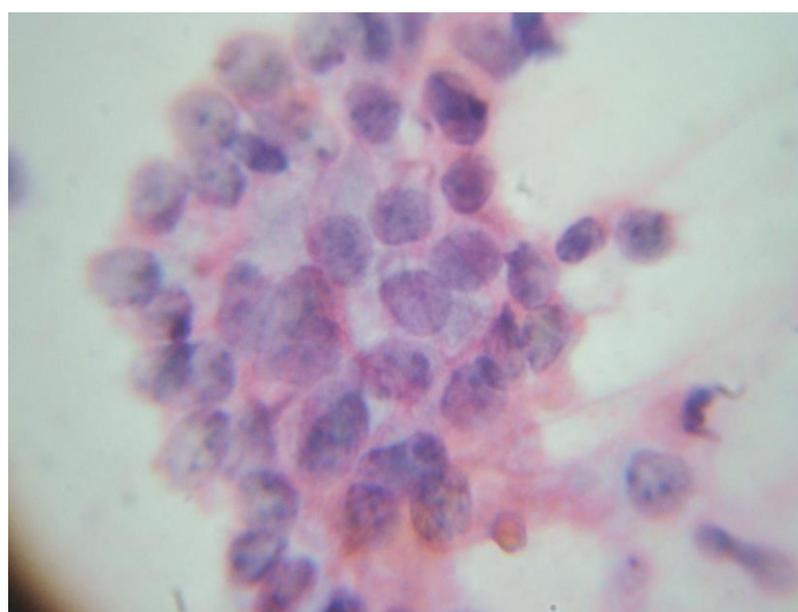


Figura 4: Células endometriais muco-secretórias agrupadas em estrutura semelhante a “favo de mel” coradas pelo método de Papanicolaou apresentando núcleos roxos e citoplasma de cor azulada a alaranjado. Aumento de 1000X e zoom fotográfico de 3X.

Os resultados de um ciclo estral do Animal 4 em G1 e Animal 6 e 7 em G2 foram excluídos por terem apresentado percentual de PMNs superior a 5% antes das inseminações.

As amostras de citologia apresentaram porcentual de neutrófilos dentro da normalidade em T1 para éguas em estro ($\leq 5\%$), com média de 1,1 e 1,3% em G1 e G2, respectivamente (Tabela 6). Pela ANOVA, não houve diferença entre T1/G1 e T1/G2 ($p > 0,05$).

Tabela 6: Porcentual médio de neutrófilos encontrados nas amostras de citologia uterina coradas pelo Papanicolaou no G1 e G2.

	G1 (Média/2 ciclos)			G2 (Média/2 ciclos)		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Animal 1	0,0	75,0	28,5	0,0	46,0	12,0
Animal 2	5,0	66,0	10,5	0,0	62,5	16,5
Animal 3	0,0	74,0	24,5	1,0	20,5	10,0
Animal 4*	0,0	90,0	20,0	2,0	47,5	60,0
Animal 5	0,0	87,0	35,5	2,0	57,5	8,0
Animal 6*	1,5	81,5	2,0	3,0	89,5	25,0
Animal 7*	1,0	88,0	76,5	1,0	94,0	9,0
Media	1,1±1,8^{Aa}	80,2±8,9^{Bb}	28,5±24,0^{Cc}	1,3±1,1^{Da}	66,1±23,1^{Eb}	21,5±19,4^{Fc}

Anova: Letras maiúsculas diferentes $p < 0,001$, letras minúsculas iguais $p > 0,05$ (IC 95%).

**Exclusão dos resultados de 1 ciclo por apresentarem endometrite antes das inseminações.*

Após a inseminação (T2), as éguas apresentaram corrimento vulvo-vaginal purulento, independente do tipo de sêmen utilizado. A citologia uterina revelou um porcentual elevado de neutrófilos com média de 80,2% e 66,1%, em G1 e G2 respectivamente, apresentando diferença ($p=0,001$) entre T1 e T2, em ambos os grupos, porém, não houve diferença entre os grupos (Gráfico 2 e 3).

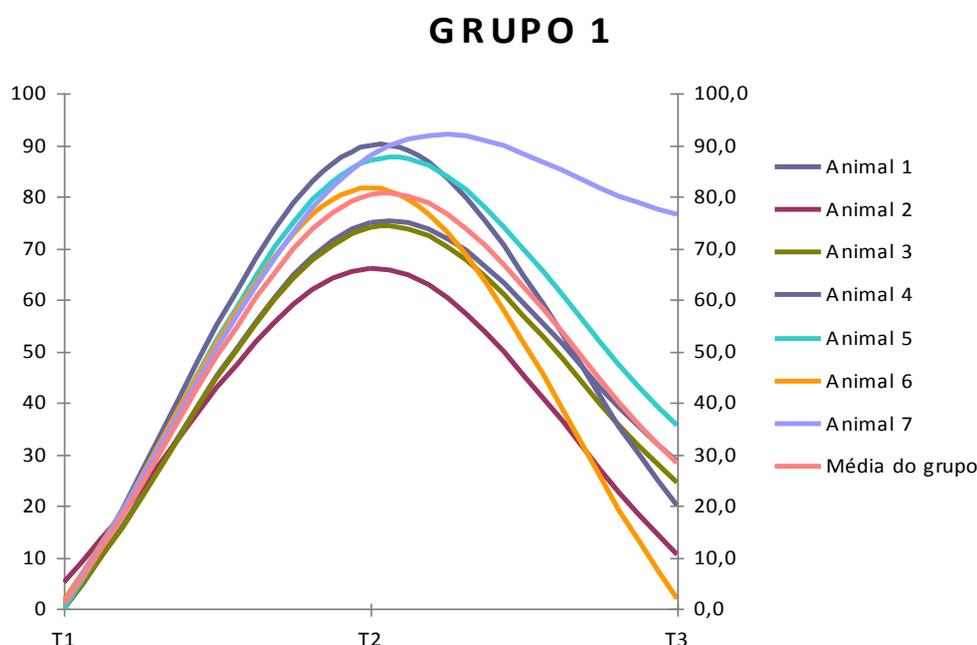


Gráfico 2. Citologia uterina realizada antes (T1) e após (T2 e T3) da inseminação artificial com sêmen fresco (G1).

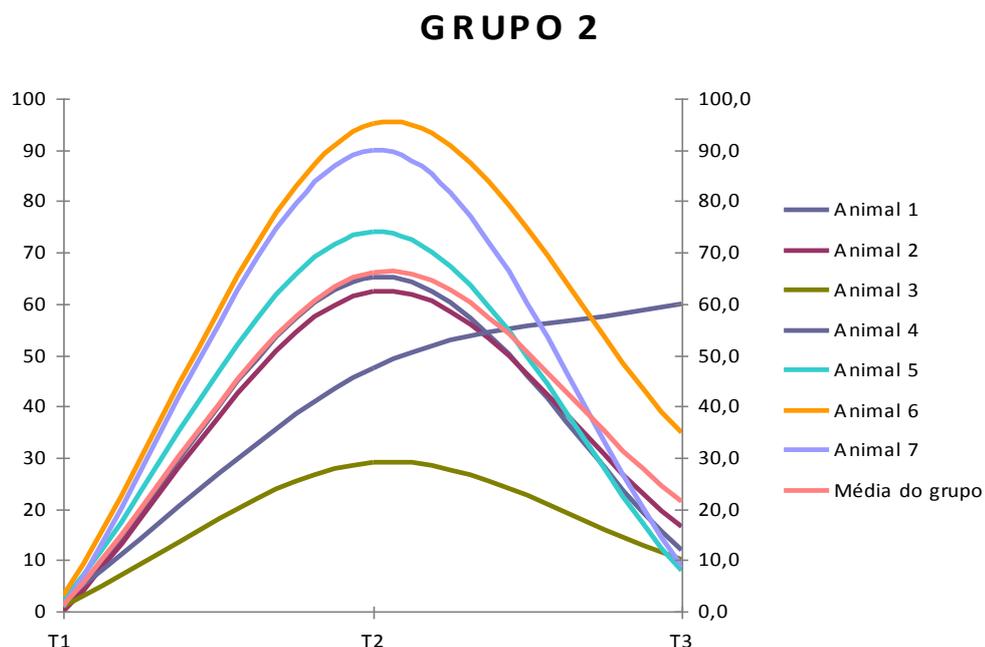


Gráfico 3. Citologia uterina realizada antes (T1) e após (T2 e T3) a inseminação artificial com sêmen congelado (G2).

As células de defesa encontradas com maior frequência foram neutrófilos, que na coloração de Papanicolaou apresentaram citoplasma levemente avermelhado e núcleos roxos. A frequência de eosinófilos foi pequena, sendo evidenciado no animal 1 e 3 em G1 com percentual médio de 1% para ambos e no animal 7 em G2, com frequência relativa de 6%. Houve um aumento qualitativo de muco em T2, apresentando coloração alaranjada (Figuras 5 e 6). Em alguns casos foi possível visualizar a presença de espermatozoides (Figura 7).

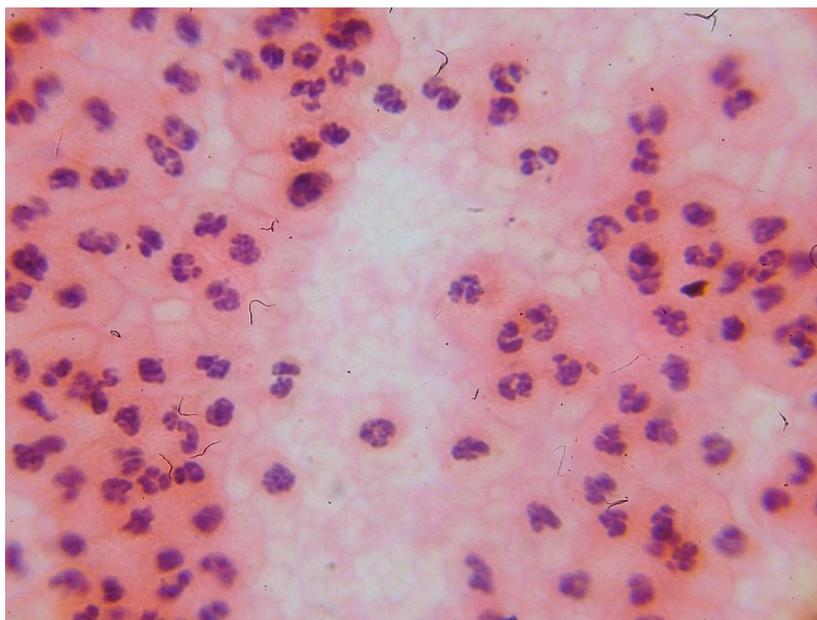


Figura 5: Resposta inflamatória uterina em T2, com sêmen congelado, evidenciando a presença maciça de neutrófilos e muco abundante. Coloração pelo método de Papanicolaou, aumento de 400X, zoom fotográfico de 2x.

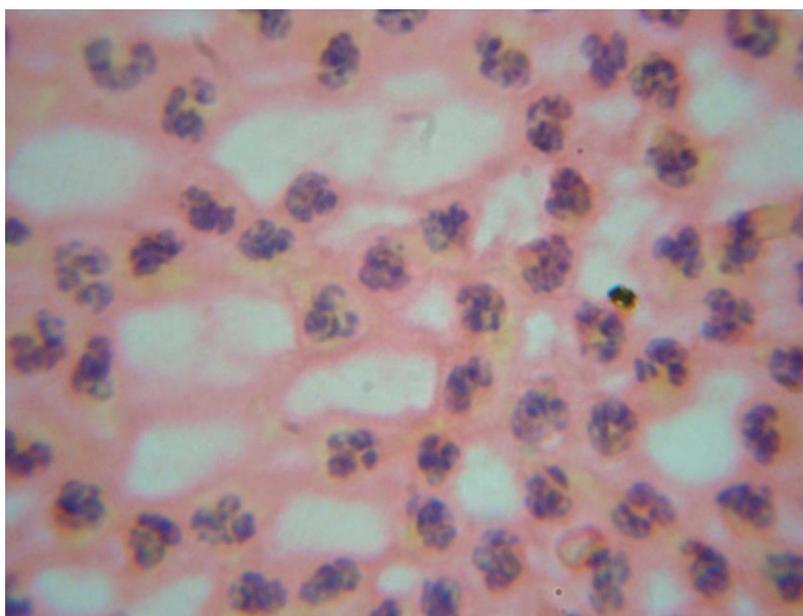


Figura 6: Citologia uterina em T2, com sêmen fresco, evidenciando a presença maciça de neutrófilos e muco abundante. Coloração pelo método de Papanicolaou, aumento de aumento de 1000X.

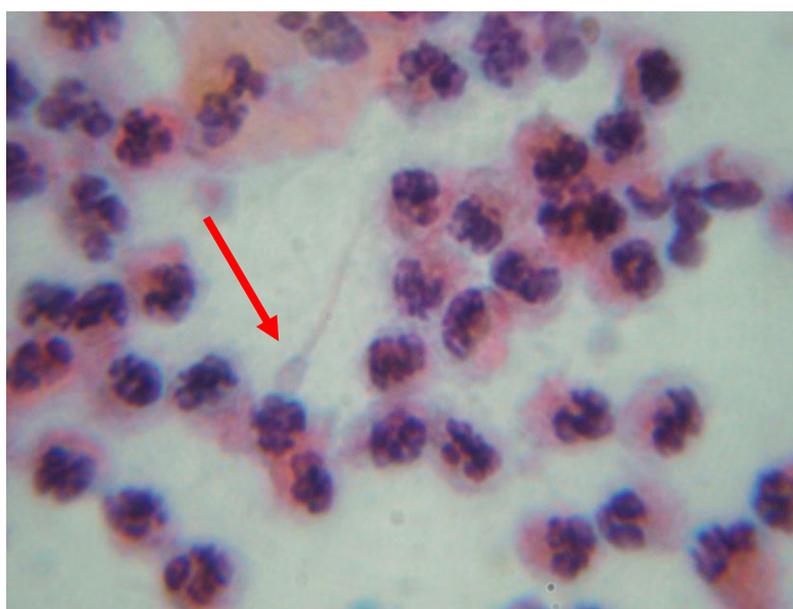


Figura 7: Citologia uterina realizada em T2, presença de espermatozóide asinino (seta). Coloração Papanicolaou, aumento de 1000X.

A resposta inflamatória uterina em T3 mostrou diferença ($p=0,001$) na contagem de neutrófilos em relação a T2 em ambos os grupos. A citologia realizada em T3 apresentou média percentual de neutrófilos de 28,2% em G1, e 21,5% em G2, não havendo diferença entre os dois grupos ($p>0,05$), a exceção foi vista no animal 7 que diferiu em relação as demais fêmeas no G1 e do animal 4 no G2. Não houve diferença ($p>0,05$) quando se comparou T1 e T3 de ambos os grupos.

Apesar da redução percentual de neutrófilos em T3, foi possível visualizar aumento no tamanho das células endometriais, com citoplasma vacuolizado, núcleos apresentando

pontilhamento de cromatina, e aumento qualitativo na presença de debris inflamatórios, com células degeneradas, núcleos nus e a presença de bactérias (Figura 8, 9 e 10).

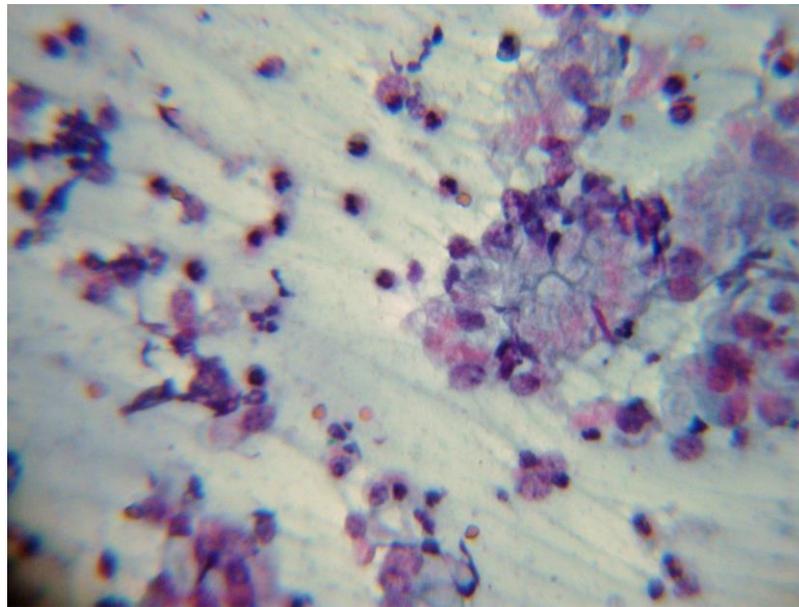


Figura 8: Citologia uterina em T3, presença de células uterinas de tamanho anormal, vacuolização citoplasmática abundante, neutrófilos, hemácias e debris celulares. Coloração Papanicolaou, aumento de 400X.

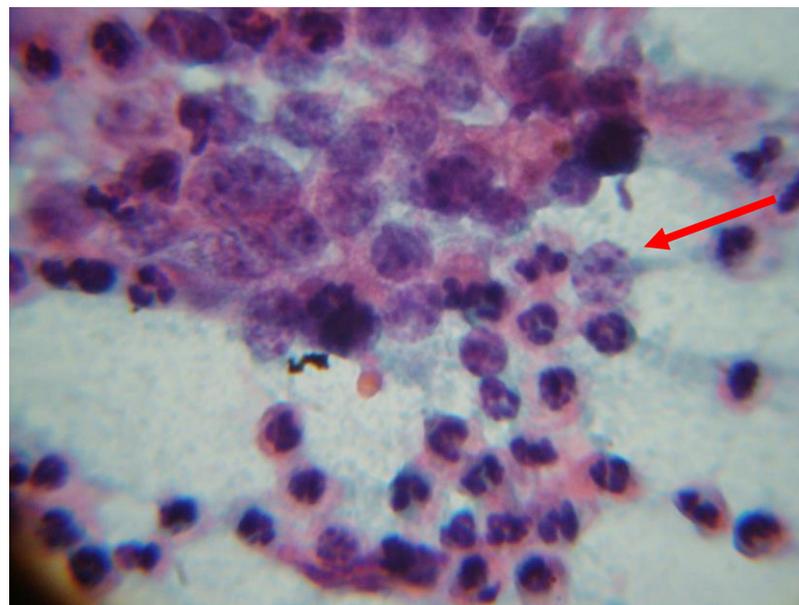


Figura 9: Citologia uterina realizada 24 horas após a inseminação apresentando células endometriais com núcleos apresentando pontilhamento de cromatina (seta) e neutrófilos em menor quantidade. Coloração Papanicolaou, aumento de 1000X e zoom fotográfico de 2,5X.

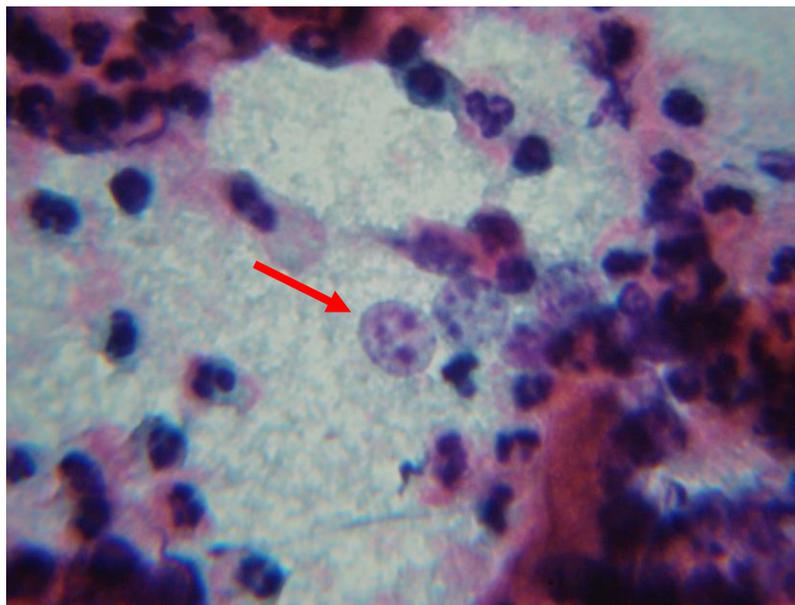


Figura 10: Citologia uterina realizada 24 horas após a inseminação apresentando células endometriais com núcleos apresentando pontilhamento de cromatina (seta) e neutrófilos. Coloração Papanicolaou, aumento de 1000X e zoom fotográfico de 2,5X.

4.4 Correlação entre os métodos de diagnóstico de endometrite.

4.4.1 Correlação entre bacteriologia e ultrassonografia uterina

A análise ultrassonográfica e bacteriológica em T1 demonstraram que não houve concordância entre as técnicas de diagnóstico de endometrite. Em T1 houve crescimento bacteriano em 11 e 12 amostras de G1 e G2, respectivamente, contudo não houve evidências ultrassonográficas de fluido uterino. Em T2, oito (G1) e quatro (G2) amostras apresentaram crescimento e ultrassonografia positivos, em quatro (G1) e oito (G2) amostras houve acúmulo de fluido detectável pelo ultrassom, porém, sem crescimento bacteriano. Em T3, três (G1) e cinco (G2) amostras apresentaram concordância entre a bacteriologia e ultrassonografia positivas. Os demais resultados foram semelhantes em ambos os grupos com exceção em três amostras que apresentaram crescimento negativo e fluido positivo (Tabela 7).

Tabela 7. Correlação entre amostras positivas e negativas de cultura bacteriana (CB) e ultrassonografia uterina (US).

	CB (+)/US (+)	CB (+)/US(-)	CB (-)/US(-)	CB (-)/US(+)
T1G1	0	11	2	0
T2G1	8	1	0	4
T3G1	3	4	3	3
TOTAL	11	16	5	7
	CB (+)/US(+)	CB (+)/US(-)	CB (-)/US(-)	CB (-)/US(+)
T1G2	0	11	1	0
T2G2	4	0	0	8
T3G2	5	3	2	2
TOTAL	9	14	3	10

Os dados referentes a correlação entre a bacteriologia e o ultrassonografia nos diferentes horários de observação, o coeficiente de correlação foi de -0,03324 em G1 e G2 não havendo diferença entre os grupos (Gráfico 4).

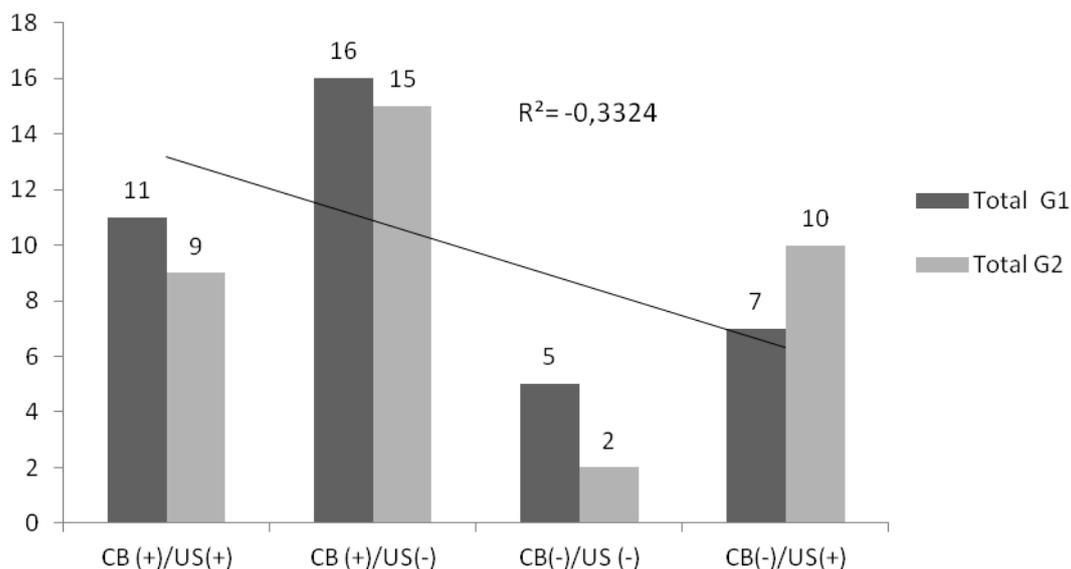


Gráfico 4: Correlação entre os achados de cultura bacteriana (CB) e ultrassonografia (US) em G1 e G2.

4.4.2 Correlação entre ultrassonografia e citologia

A análise citológica e sua relação com o acúmulo de fluido, revelou que em T1, houve concordância entre os métodos quanto ao diagnóstico negativo na citologia e na ultrassonografia tanto em G1, quanto em G2. Quatro horas após a inseminação (T2), 13 amostras apresentaram citologia e ultrassonografia positivas em G1. Em G2, todas as amostras de citologia e ultrassonografia também foram positivas. A análise dos dados em T3 revelou que não houve concordância entre amostras positivas na citologia e ultrassonografia, sendo que apenas quatro amostras apresentaram resultados positivos em G1 e cinco em G2 (Tabela 8).

Tabela 8: Análise de correlação entre amostras positivas e negativas na citologia e ultrassonografia uterina em T1, T2 e T3.

	Cit (+)/US(+)	Cit (+)/US(-)	Cit (-)/US(-)	Cit (-)/US(+)
T1G1	0	0	13	0
T2G1	13	0	0	0
T3G1	4	7	0	2
TOTAL	17	7	13	2
	Cit (+)/US(+)	Cit (+)/US(-)	Cit (-)/US(-)	Cit (-)/US(+)
T1G2	0	0	12	0
T2G2	12	0	0	0
T3G2	5	5	0	2
TOTAL	17	5	12	2

A correlação entre a citologia e a ultrassonografia nos diferentes momentos de observação nos dois grupos (G1 e G2), apresentou um coeficiente de correlação negativo ($r = -0,09017$), demonstrando a baixa correlação existente entre os métodos (Gráfico 5).

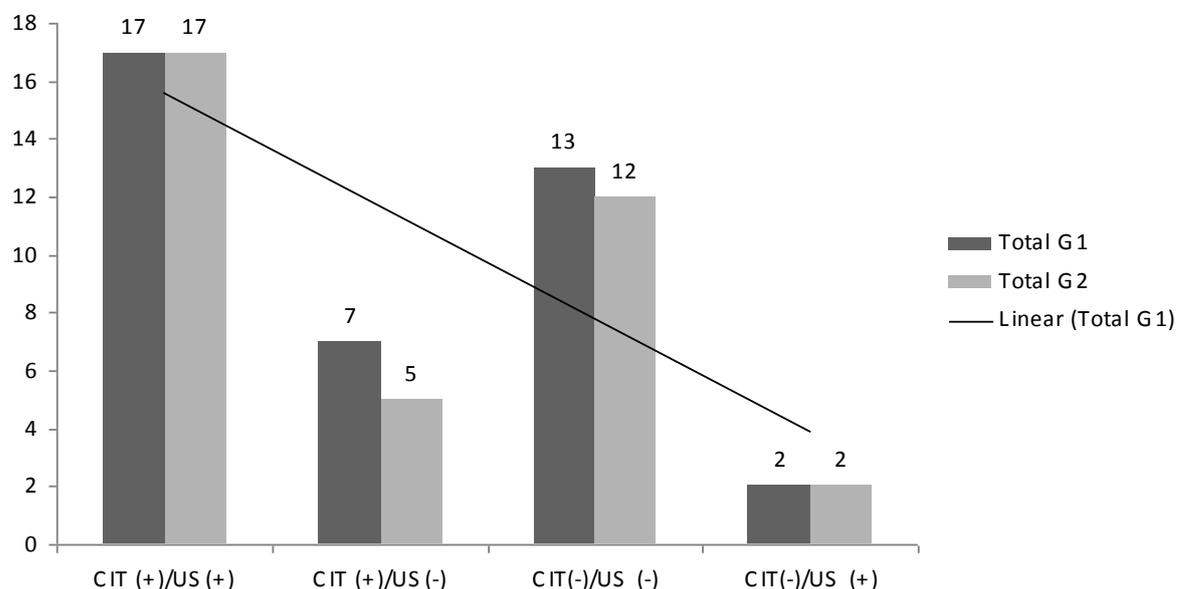


Gráfico 5: Correlação entre a citologia e ultrassonografia em G1 e G2.

Os dados de correlação entre citologia e ultrassonografia entre G1 e G2 foram submetidos à ANOVA e demonstraram que não houve diferença ($p= 0,8651$) entre os grupos.

4.4.3 Correlação entre bacteriologia e citologia uterina

A análise citológica e bacteriológica uterina em T1 demonstrou que houve crescimento em 11 amostras, contudo sem indícios citológicos de inflamação tanto em G1 quanto em G2. Somente duas (G1) e uma (G2) amostras apresentaram crescimento e citologia negativos. Em T2, nove (G1) e quatro (G2) amostras tiveram crescimento e citologia positivas. Em quatro (G1) e oito (G2) o crescimento foi negativo, porém, a citologia positiva. Em T3, seis amostras apresentaram crescimento e citologia positiva em ambos os grupos, entretanto, cinco (G1) e quatro (G2) amostras apresentaram citologia positiva sem crescimento bacteriano (Tabela 9).

Tabela 9: Análise de correlação entre amostras positivas e negativas na citologia (CIT) e cultura bacteriana (CB) uterina em T1, T2 e T3.

	CB (+) / CIT (+)	CB (+) / CIT (-)	CB (-) / CIT (-)	CB (-) / CIT (+)
T1G1	0	11	2	0
T2G1	9	0	0	4
T3G1	6	1	1	5
TOTAL	15	12	3	9
	CB (+) / CIT (+)	CB (+) / CIT (-)	CB (-) / CIT (-)	CB (-) / CIT (+)
T1G2	0	11	1	0
T2G2	4	0	0	8
T3G2	6	2	0	4
TOTAL	10	13	1	12

A correlação entre as duas técnicas apresentou coeficiente de correlação de $-0,06757$, assim não houve concordância entre os testes (Gráfico 4). A análise entre os grupos não revelou diferença entre G1 e G2 (Gráfico 6).

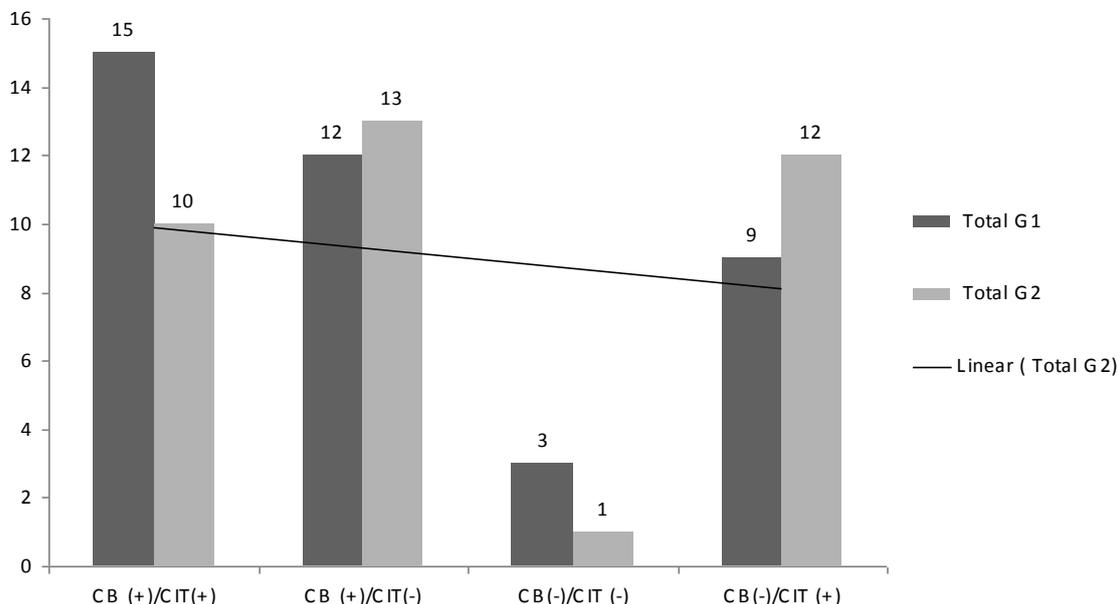


Gráfico 6: Correlação entre a citologia e bacteriologia em G1 e G2.

4.5 Diagnóstico de endometrite equina.

Os resultados de ultrassonografia e citologia uterina foram utilizados como critério para a graduação de endometrite, segundo Brook (1993). Todas os animais foram consideradas normais, ou seja, sem endometrite antes das inseminações. Contudo, os resultados de um ciclo estral do animal 4 em G1, e dos animais 6 e 7 no G2 foram excluídos do estudo por terem apresentado porcentual de PMNs superior a 5%, sem desta forma consideradas positivas para endometrite.

Após a inseminação (T2), todos os animais apresentaram endometrite de grau moderado a severo, apresentando porcentual médio de PMNs acima de 20% e acúmulo de fluidom menor que 3 cm (escores 1-2).

Os resultados em T3, demonstraram a redução do porcentual de células inflamatórias encontradas na citologia. O animal 6 apresentou citologia normal nos dois ciclos avaliados em G1. Os demais animais, ainda apresentaram endometrite de grau variando de leve até severa. Em G2, dois animais apresentaram exames normais após 24 horas da inseminação, os demais apresentaram endometrite variando de leve até severa (Tabela 10).

Tabela10: Resultados de ultrassonografia e citologia uterina por animal antes da inseminação (T1), quatro horas (T2) e 24 horas após a inseminação (T3) em G1 e G2.

GRUPO 1	T1			T2			T3		
	US	CITOL (% PMN)	Diagnóstico	US	CIT (% PMN)	Diagnóstico	US	CIT (% PMN)	Diagnóstico
Animal 1	0	0	Normal	1	100	Endometrite severa	0	37	Endometrite severa
Animal 1	0	0	Normal	1	50	Endometrite severa	1	20	Endometrite moderada
Animal 2	0	5	Normal	2	96	Endometrite severa	0	12	Endometrite leve
Animal 2	0	5	Normal	1	36	Endometrite severa	1	9	Endometrite leve
Animal 3	0	0	Normal	1	55	Endometrite severa	1	31	Endometrite severa
Animal 3	0	0	Normal	2	93	Endometrite severa	0	18	Endometrite moderada
Animal 4*	0	0	Normal	2	90	Endometrite severa	0	20	Endometrite moderada
Animal 5	0	0	Normal	2	94	Endometrite severa	0	11	Endometrite leve
Animal 5	0	0	Normal	2	80	Endometrite severa	0	20	Endometrite moderada
Animal 6	0	3	Normal	1	67	Endometrite severa	1	4	Normal
Animal 6	0	0	Normal	1	96	Endometrite severa	1	0	Normal
Animal 7	0	0	Normal	1	80	Endometrite severa	1	73	Endometrite severa
Animal 7	0	2	Normal	0	96	Endometrite severa	0	80	Endometrite severa

GRUPO 2	T1			T2			T3		
	US	CIT (% PMN)	Diagnóstico	US	CIT (% PMN)	Diagnóstico	US	CIT (% PMN)	Diagnóstico
Animal 1	0	0	Normal	1	56	Endometrite severa	0	16	Endometrite moderada
Animal 1	0	0	Normal	1	74	Endometrite severa	0	8	Endometrite leve
Animal 2	0	0	Normal	1	25	Endometrite moderada	0	7	Endometrite leve
Animal 2	0	0	Normal	1	100	Endometrite severa	0	26	Endometrite moderada
Animal 3	0	0	Normal	2	34	Endometrite severa	2	0	Normal
Animal 3	0	2	Normal	1	24	Endometrite moderada	1	20	Endometrite moderada
Animal 4	0	0	Normal	1	49	Endometrite severa	1	75	Endometrite severa
Animal 4	0	4	Normal	2	46	Endometrite severa	1	45	Endometrite severa
Animal 5	0	4	Normal	2	100	Endometrite severa	2	5	Normal
Animal 5	0	0	Normal	1	48	Endometrite severa	1	11	Endometrite leve
Animal 6*	0	3	Normal	2	95	Endometrite severa	0	35	Endometrite severa
Animal 7*	0	1	Normal	2	90	Endometrite severa	1	9	Endometrite leve

Legenda: * animais que tiveram os resultados excluídos por apresentarem endometrite antes da inseminação.

5 DISCUSSÃO

5.1 Ultrassonografia uterina

A realização da ultrassonografia antes da inseminação (T1) teve como objetivo caracterizar a presença de qualquer quantidade de fluido intra-uterino nas éguas durante o período do experimento, desta forma foi observado à ausência de fluido compatível com uma resposta inflamatória antes das inseminações. Baseado em exames ultrassonográficos, Brinsko et al. (2011) afirmaram que a presença de dois ou mais centímetros de fluido durante o estro é um bom indicativo que a égua possui endometrite. Sendo assim, os animais do presente estudo foram considerados sem endometrite antes da inseminação.

Após a inseminação (T2) foram observados pequenos acúmulos, menores que 20 mm, para ambos os grupos, sendo sua presença atribuída a uma resposta inflamatória normal após a deposição de sêmen, este fato pode ser comprovado pela análise estatística entre os horários de coleta, onde T1 de ambos os grupos, apresentaram diferença significativa de T2 e T3, o que demonstra a ausência de processo inflamatório no início do experimento. Porém, o diagnóstico baseado somente no exame ultrassonográfico pode não ser suficiente para avaliar se há presença de inflamação endometrial, como foi demonstrado por Samper (2009) em que nem todas as éguas com endometrite sub-clínica acumularam fluido durante o estro e/ou após a cobertura.

A análise estatística de T2 e T3 entre G1 e G2, não demonstrou diferença significativa, demonstrando que as fêmeas apresentaram um processo inflamatório compatível com a deposição de sêmen no lúmen uterino independente de ser fresco ou congelado. Estes achados não estão de acordo com Kotilainen et al. (1994), que descreveram uma resposta inflamatória mais intensa com maior acúmulo de fluido intra-uterino em éguas inseminadas com sêmen congelado em relação ao sêmen fresco. Uma das possíveis explicações para o acúmulo de fluido uterino após a IA com sêmen congelado seria pela marcada reação inflamatória devido à ausência de plasma seminal atuando como modulador da resposta inflamatória induzida pelos espermatozoides (DAHMS e TROEDSSON, 2002). No entanto, Portus et al. (2005) constataram que a IA com plasma seminal causou uma resposta inflamatória superior apresentando quantidades maiores de fluido intra-uterino, devido ao número menor de contrações uterinas/minuto observado no grupo aonde a IA foi realizada com plasma seminal.

No presente estudo, as inseminações foram sempre realizadas com valores fixos de volume e concentração espermática (800×10^6 em 4ml) para evitar a influência desses parâmetros sobre a quantidade de fluido presente no útero após a IA. Contudo, Guvenc et al. (2005) observaram que a dose inseminante de sêmen congelado não teve influência na quantidade de fluido acumulado no corpo uterino 24 horas após a IA. A inseminação com 20 ou 200×10^6 espermatozoides, produziram quantidades de fluido similares.

A avaliação após 24 horas (T3), não revelou acúmulos de fluido significativos, observou-se que metade dos animais em G1 e G2, não apresentavam fluido detectável pela ultrassonografia, sendo esses resultados compatíveis com a redução do número de leucócitos observado na citologia uterina. De forma semelhante, Watson et al. (2001) e Hunter et al. (2006) não detectaram a presença de fluido significativo em éguas inseminadas com sêmen congelado após 12 e 24 horas, respectivamente.

Sendo assim, neste estudo, o acúmulo de fluido uterino observado em T2 e T3 estiveram relacionados ao processo inflamatório induzido pelo espermatozoide asinino independente do tipo de apresentação do sêmen.

5.2 Bacteriologia Uterina

A análise microbiológica uterina no presente estudo revelou que 85,7% das amostras apresentaram isolamento bacteriano em T1 (G1 e G2). Essa taxa de isolamento possivelmente, está relacionada a contaminação do útero com bactérias presentes nas secreções vaginais, e/ou fezes que teriam acesso ao útero durante o estro por causa da dilatação da cérvix. Portanto, o isolamento de bactérias durante o estro não deve ser considerado algo incomum e a caracterização de infecção somente deveria ser efetuada se houver uma resposta inflamatória concomitante compatível, do contrário, apenas são consideradas parte da microbiota vaginal que tem acesso constante ao útero durante o estro. Segundo Katila (1996), durante o estro (fase estrogênica) ocorre um processo de limpeza física uterina que permite que o útero se prepare para receber o embrião. Sendo assim, durante esta fase, a cérvix da égua dilata e a atividade miometrial no sentido dos cornos para a cérvix é maior permitindo a expulsão de contaminantes.

Frequências de isolamento semelhantes foram descritas por Langoni et al. (1999) e Silva et al. (1999), em que 80,7% e 79,6 % das amostras foram positivas, respectivamente. Em ambos os estudos os autores atribuíram os achados bacteriológicos ao histórico reprodutivo de falha na concepção ou a presença de sinais clínicos de endometrite, porém os animais deste estudo foram considerados normais e aqueles que apresentaram sinais de endometrite antes das inseminações tiveram seus resultados excluídos.

Após as inseminações (T2) foi observado que o número de amostras onde não houve crescimento bacteriano foi ligeiramente maior do em T1, provavelmente a presença do sêmen e secreções seminais geraram alterações físico-químicas no ambiente uterino atraindo PMNs para o lúmen, o que poderia contribuir na opsonização das bactérias encontradas em T1. Sendo assim, as espécies bacterianas identificadas nos diferentes momentos de avaliação do presente estudo podem ter sofrido variação de acordo com sua localização e oportunidade de crescimento no endométrio, como foi observado para *Streptococcus* β -hemolítico em T2 de G1.

Quando as amostras foram analisadas somente pelos momentos de coleta, sem levar em conta, os tratamentos (G1 e G2), a análise de regressão linear, aliado a linha de tendência em declínio, demonstraram que as bactérias presentes em T1 e que não suscitaram uma resposta inflamatória, podem ter sofrido ação dos PMNs presentes na reação inflamatória direcionada ao sêmen e/ou as mudanças químicas nas secreções uterinas durante o processo inflamatório poderiam ter contribuído para a inibição do crescimento bacteriano no ambiente hostil em T2 e T3. Hunter et al. (2006) sugeriram que a presença simultânea de bactérias e espermatozóides no útero, poderia proporcionar uma ação sinérgica ou aditiva com uma resposta inflamatória uterina mais intensa. Possivelmente, devido a estímulos antigênicos diferentes.

5.3 Citologia Uterina

As amostras de citologia antes das inseminações (T1) não revelaram porcentuais médios significativos de PMNs ($\geq 5\%$) que fossem compatíveis com diagnóstico positivo de endometrite segundo a classificação de Brook (1993), apresentando frequências $\leq 3\%$. Os animais que apresentaram citologia positiva tiveram seus resultados excluídos do estudo (Tabela 10). Card et al. (2004) atribuíram o percentual de 5% de neutrófilos a população de leucócitos residentes no útero, que durante a fase estrogênica, se marginalizam próximo ao endométrio.

Assim como constatado para o sêmen equino, o sêmen de jumento foi igualmente capaz de estimular uma resposta inflamatória rápida e intensa, visualizada clinicamente por

corrimento vulvar do tipo purulento em todas as éguas em T2 de ambos os grupos. As amostras de citologia quatro horas após as inseminações demonstraram que houve um grande afluxo de PMNs para o lúmen uterino, sendo encontrado um percentual médio de neutrófilos de 80,2% em G1 e 66,1% em G2. Entretanto, não houve diferença entre os grupos quanto a frequência de células encontradas. Esses achados estão de acordo com Katila (1995), que observou a migração leucocitária inicial para o lúmen uterino logo após a deposição do sêmen e o pico de resposta inflamatória ocorrendo entre seis e 12 horas após. O mesmo foi observado por Kakeya et al. (1998), em que a resposta inflamatória ao sêmen equino fresco *in natura* ou diluído, elevou a contagem de leucócitos uma hora após a inseminação com qualquer um dos tratamentos.

No presente estudo, após a inseminação (T2), a frequência média de células inflamatórias foi superior a 50,0%, demonstrando claramente que a presença do espermatozóide no endométrio induziu uma resposta significativamente maior em ambos os grupos. A intensa resposta leucocitária observada é provavelmente, devido a ativação da cascata do complemento estimulada pelo espermatozóide asinino, assim como demonstrado por Troedsson et al. (1995) para o espermatozóide equino. Corroborando os resultados, Kotilainen et al. (1994), constataram que a concentração de PMNs foi significativamente maior após a inseminação do que a infusão de diluidores de sêmen ou PBS, demonstrando o importante papel que o espermatozóide exerce na quimiotaxia de PMNs para o lúmen uterino. Fiala et al. (2007), também relataram resultados semelhantes, onde o número de células inflamatórias recuperadas do útero, quatro horas após a inseminação foi significativamente maior do que a infusão de plasma seminal ou leite desnatado sozinho. A intensidade de resposta inflamatória foi diretamente proporcional à concentração espermática utilizada, provavelmente, intensificando a quimiotaxia e estimulando a migração dos PMNs.

No presente estudo, embora tenha ocorrido uma intensa resposta inflamatória quatro horas após a inseminação com sêmen fresco e congelado de jumento, às 24 horas, a quantidade de neutrófilos foi numericamente menor, sendo o percentual encontrado em G1 de 28,2% e em G2 21,5%, não havendo diferença entre os grupos. Entretanto, a recuperação uterina do processo inflamatório se mostrou individual, sendo ainda elevada no animal 7 (76,5%) em G1 e no animal 4 (60%) no G2, mas como a avaliação só foi realizada até 24 horas, é possível que estes animais tenham se recuperado dentro do prazo estipulado para classificar éguas como sadias que é de até 96 horas segundo Katila (1995). Outros estudos também descreveram uma redução significativa do número de leucócitos presentes no lúmen uterino após 24 horas da inseminação, demonstrando a resolução parcial do processo (FIALA et al., 2007; KAKEYA et al., 1998; CARD et al., 2004).

Após a redução do processo inflamatório, foi possível observar a presença de muco e debris, indicando que 24 horas após um processo intenso, é possível visualizar indícios de resolução da resposta inflamatória. Contudo, foram observadas algumas alterações celulares, como, células apresentando pontilhamento de cromatina, núcleos nus, presença de picnose e cariorrexe, além de um aumento qualitativo na presença de muco observado durante o processo inflamatório. Achados semelhantes foram observados por Causey et al. (2008) após a inflamação em resposta a deposição de sêmen. Outras observações feitas pelos autores foram uma maior quantidade de muco extracelular, aumento na intensidade de coloração, e aumento no tamanho das células endometriais em inflamações moderadas a severas.

A resposta inflamatória observada para o sêmen fresco e congelado de jumento foi semelhante em T2 e T3, demonstrando que o sêmen congelado de jumento não produziu uma resposta inflamatória uterina mais intensa e prolongada como descrito por Kotilainen et al. (1994), o único estudo que efetivamente comparou a ação do sêmen fresco *versus* congelado sobre o endométrio. Estes resultados poderiam ser decorrentes de diferenças entre o local de deposição do sêmen congelado, extremidade do corno, e a coleta de material bacteriológico e

citológico, que foi realizada no corpo do útero, uma vez que a haste de metal não possibilitaria o acesso ao corno uterino. Contudo, Guvenc et al. (2005), constataram que não houve diferença significativa no número de PMNs recuperados do útero de éguas inseminadas com sêmen congelado no corno ou corpo do útero, demonstrando que a resposta inflamatória ao espermatozóide foi generalizada.

Desta forma, os achados no presente estudo demonstraram não haver diferenças na estimulação da resposta inflamatória pelo sêmen fresco ou congelado, revelando que ambos foram capazes de promover uma estimulação antigênica, e estão de acordo com outros estudos realizados com sêmen eqüino congelado (CARD et al., 2004; TROEDSSON et al., 1995).

No presente estudo, o método de coleta de citologia uterina utilizando a escova ginecológica demonstrou ser eficaz, rendendo amostras citológicas consideradas satisfatórias, e esfregaços com boa celularidade para realização do diagnóstico. Outros autores também relataram bons resultados na qualidade das amostras e de sensibilidade no diagnóstico de endometrite para a citologia uterina realizada com escova ginecológica em comparação com outras técnicas (DEFONTIS et al., 2011; OVERBECK et al., 2011; COCCHIA et al., 2012).

A utilização do método de coloração de Papanicolaou estavam restritos a citologia vaginal em cadelas, cabras e outras espécies (JESUS et al., 2005; RAPOSO et al., 1999), principalmente, para diferenciação das fases do ciclo estral. O emprego desta coloração na citologia endometrial eqüina foi feita por Walter et al. (2011), que utilizaram o método de coloração de Papanicolaou-Shorr. Os autores relataram que as amostras celulares foram suficientemente coradas pelo método e facilmente identificadas como endometriais e PMNs. A desvantagem para o uso desta coloração foi a demanda de tempo para realização da coloração de Papanicolaou-Shorr (cerca de 60 minutos). Da mesma forma, a coloração de Papanicolaou utilizada no presente estudo, permitiu uma adequada visualização de todos os tipos celulares, permitindo uma boa leitura e interpretação citológica, principalmente, em lâminas que apresentavam grumos celulares, fornecendo uma visualização mais definida das camadas de células presentes no esfregaço e, uma melhor caracterização celular, importantes na diferenciação de neutrófilos, pois como o método é multicromático baseado em três soluções corantes com afinidades distintas, possibilita corar de forma diferente os tipos celulares encontrados na citologia uterina.

A inflamação uterina observada em éguas inseminadas com sêmen fresco e congelado de jumento foi semelhante aos relatos para o sêmen eqüino, nos mesmos momentos de coleta, e a redução desta resposta também esteve de acordo com a literatura. Sendo assim, o espermatozóide asinino foi capaz de promover uma resposta uterina semelhante ao que é descrito para o espermatozóide eqüino e que não teve relação com o tipo de sêmen utilizado, se fresco ou criopreservado.

5.4 Correlação entre os métodos de diagnóstico de endometrite

5.4.1 Citologia x Ultrassonografia

A ausência de fluido detectável na ultrassonografia, realizada antes das inseminações foi compatível com os achados citológicos negativos em T1, demonstrando que não havia um processo inflamatório antes das inseminações em ambos os grupos. A inseminação com sêmen de jumento causou um processo inflamatório intenso (T2), que foi diagnosticado tanto pela ultrassonografia quanto pela citologia. Apenas uma amostra em G1 não demonstrou concordância entre os métodos. Contudo, em T3 a discrepância entre os resultados indicam

que a ultrassonografia não constatou a presença de fluido pela resolução parcial do processo inflamatório enquanto a citologia apresentou a redução do número de células inflamatórias.

Quando submetidas a análise de correlação de Pearson, o valor de “r” foi negativo, demonstrando a ausência de correlação entre os métodos diagnósticos. Resultados semelhantes foram descritos por Fioratti et al. (2009) que não encontraram relação entre os dois métodos de diagnóstico, uma vez que o acúmulo de fluido uterino não exibiu uma correlação linear com a concentração de neutrófilos no fluido uterino. Camozzato et al. (2009), também não encontraram relação entre o exame ultrassonográfico e a citologia, demonstrando que a ultrassonografia sozinha não é capaz de diagnosticar éguas com processo inflamatório, visto que 35,7% das éguas onde não foi constatada a presença de fluido intra-uterino apresentaram citologia positiva para endometrite. Desta forma, o diagnóstico de endometrite pós-cobertura através da ultrassonografia no presente estudo não foi adequada para a avaliação do ambiente do lúmen uterino quanto a presença ou não de inflamação, pois só permitiu o diagnóstico quando o grau de inflamação endometrial se apresentou severo. Burluson et al. (2010), correlacionaram positivamente o acúmulo de fluido uterino com amostras citológicas de inflamação apenas quando estas foram classificadas como moderada a severa, apresentando 1.4 vezes mais chances de ter fluido intra-uterino.

5.4.2 Bacteriologia x Ultrassonografia

A análise entre o isolamento bacteriano e acúmulo de fluido também não revelaram uma concordância entre os métodos de diagnóstico ($r=-0,03324$). A relação entre o número de amostras positivas na bacteriologia e negativas na ultrassonografia em T1, demonstra que embora tenha ocorrido o isolamento, as bactérias que estavam presentes no lúmen uterino neste momento não estimularam a produção de inflamação e secreção de fluido que pudesse ser diagnosticado pela ultrassonografia. Em T2, quase metade das amostras apresentaram cultura e ultrassonografia positivas em ambos os grupos, porém, o restante apresentou pequenos acúmulos de fluido e resultados de isolamento negativos. Estes achados demonstram que o acúmulo de fluido observado em T2 esteve mais relacionado com a deposição de sêmen e ao processo inflamatório subsequente do que as bactérias isoladas neste momento. Em T3, metade das amostras apresentaram-se positivas em ambos os métodos de diagnóstico, contudo, também houve crescimento bacteriano sem a presença de fluido no lúmen uterino, demonstrando uma fraca concordância entre os métodos que pode ser atribuída ao processo inflamatório destinado ao sêmen após vinte e quatro horas da inseminação independente do tipo de sêmen utilizado. Estes achados estão de acordo com Burluson et al. (2010) que demonstraram que o acúmulo de fluido detectado na ultrassonografia esteve associado a inflamação uterina moderada a severa, e não ao isolamento de um microrganismo específico. Sendo assim, a ultrassonografia sozinha não deveria ser utilizada como ferramenta para diagnóstico de endometrite equina, uma vez que ela só é capaz de detectar a presença significativa de fluido uterino.

5.4.3 Bacteriologia x Citologia

A relação entre a bacteriologia e a citologia uterina em T1, demonstrou que grande parte das amostras apresentaram crescimento bacteriano positivo, sem sinais citológicos de inflamação. No presente estudo, foram tomados todos os cuidados necessários para se evitar a contaminação do swab com bactérias presentes no ambiente e aparelho reprodutivo externo da égua, a fim de garantir que as bactérias isoladas fossem provenientes do lúmen uterino. Sendo assim, o crescimento observado em T1, foi considerado contaminação uterina por bactérias no momento da amostragem e que não promoveram um estímulo antigênico suficiente para

elevação significativa da contagem de PMNs. Este fato é possível, tendo em vista que durante o estro que os mecanismos de defesa uterinos são mais intensos, pois é nesta fase que o útero está mais propenso a adquirir contaminantes provenientes do sêmen e vagina.

Após a inseminação (T2) foi possível observar que nenhuma amostra apresentou crescimento bacteriano positivo e citologia negativa, contudo houve aumento no número de amostras sem crescimento bacteriano e citologia positiva demonstrando que apesar da presença de bactérias constatado em T1, em T2 a resposta inflamatória somente foi estimulada após a deposição do sêmen.

Em T3 novamente houve crescimento de bactérias e citologia positiva em aproximadamente metade das amostras, as demais amostras apresentaram citologia positiva, porém, sem crescimento bacteriano, demonstrando que a inflamação foi destinada ao espermatozóide. Os dois métodos também não demonstraram correlação ($r=-0,06757$), pois quando a bacteriologia foi positiva, a citologia foi negativa, reforçando a idéia que a resposta inflamatória foi direcionada ao sêmen e não a presença de bactérias. Corroborando este fato, Wingfield e Ricketts (1982), afirmaram que nem sempre o isolamento de bactérias demonstram a presença de endometrite infecciosa.

Neste estudo a combinação das técnicas de bacteriologia e citologia permitiu avaliar a resposta do útero equino frente à deposição de sêmen asinino e a presença de bactérias. Contudo nenhum estudo até o presente havia feito a relação entre os achados bacteriológicos e citológicos antes e após a inseminação. Sendo assim, os achados demonstram que não é possível fazer a interpretação da resposta inflamatória ao sêmen baseado em apenas um método diagnóstico. Segundo Wingfield e Ricketts (1982) a bacteriologia uterina não pode ser interpretada sem os dados citológicos correspondentes. Overbeck et al. (2011) demonstraram que a combinação do exame citológico através da escova ginecológica e o crescimento bacteriano foram de maior sensibilidade e de significância em éguas com processo inflamatório, mas a combinação de ambos os testes aumentaram o sucesso em detectar a subfertilidade em éguas.

6 CONCLUSÕES

- O sêmen fresco e congelado asinino provocaram resposta inflamatória uterina semelhante ao que é descrito para o sêmen eqüino, quatro horas após a inseminação.
- O diagnóstico de endometrite pós-cobertura somente através da ultrassonografia não se mostrou adequada para a avaliação do ambiente uterino quanto a presença ou não de inflamação, pois só permitiu o diagnóstico quando o grau de inflamação endometrial se apresentou severo.
- O isolamento de bactérias não foi sempre associado com a presença de resposta inflamatória, desta forma as espécies encontradas foram apenas consideradas parte da microbiota vaginal oportunista que tem acesso constante ao útero durante o estro e que não apresentaram estímulo antigênico suficiente para desencadear uma resposta inflamatória concomitante à sua presença.
- A citologia endometrial pela coloração de Papanicolaou permitiu avaliar não somente o grau de resposta inflamatória uterina, mas também as mudanças estruturais que ocorrem durante a resolução do processo inflamatório.
- A ultrassonografia e citologia uterina, quando utilizados em conjunto possibilitam uma avaliação da resposta inflamatória uterina mais precisa do que se utilizados sozinhos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMADI, M.R.; NAZIFI, S.; GHASARI, H.R.; DAMEHY, M.; Evaluation of the cytology of uterus, vagina, and clitoris as predictor of condition in the mare. *Comp. Clinic Pathology*, v. 14, p. 186-190, 2006.
- AGUILAR, J.; HANKS, M.; SHAW, D.J.; ELSE, R.; WATSON, E.; Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares. *Theriogenology*, v.66, p. 423-430, 2006.
- ALBIHN, A; BÅVERUD, V.; MAGNUSSON, U.; Uterine Microbiology and Antimicrobial Susceptibility in Isolated Bacteria from Mares with Fertility Problems. *Acta Veterinaria Scandinava*, n. 3-4, v. 44, p. 121-129, 2003.
- ALGHAMDI, A.; TROEDSSON, M.H.T.; LASCHKEWITSCH, T.; XUE, J-L; Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. *Theriogenology*, v. 55, p.019–1028, 2001.
- ALGHAMDI, AS.; FOSTER, D.M.; CARLSON,C.S.; TROEDSSON, M.H.T.; Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. *American Journal Reproduction immunology*, v. 53, p. 230-237, 2005.
- ALGHAMDI AS, TROEDSSON MHT. Concentration of nitric oxide in uterine secretion from mares susceptible and resistant to chronic post-breeding endometritis. *Theriogenology*, v.58, p.445-448, 2002.
- BARBACINI, S.; NECCHI, D.; ZAVAGLIA, G.; SQUIRES, E. L; Retrospective study on the incidence of post-insemination uterine fluid in mares inseminated with frozen/thawed semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 23, n. 11, p. 493-496, 2003.
- BLANCHARD, T.L; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.; BRINSKO, S.; RIGBY, S.; Endometritis. *Manual of Equine Reproduction*, p. 59-63, 2ed., Mosby, 2003.
- BOURKE, M.; MILLS, J. N.; BARNES, A.L.; Collection of endometrial cells in the mare. *Australian Veterinary Journal* v. 75, n 10, 1997.
- BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D.; Endometritis. In: *Manual of Equine Reproduction*, 3° Ed, p. 73-84, 2011.
- BROOK, D. Cytological and bacteriological examination of the mare's endometrium. *Equine Veterinary Science*, v. 5, p. 16-22, 1985.
- BROOK D. Uterine cytology. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger; p. 246–53, 1993.

BURLESON, M.D.; LEBLANC, M.M.; RIDDLE, W.T.; HENDRICKS, K.E.M.; Endometrial microbial isolates are associated with different ultrasonographic and endometrial cytology findings in Thoroughbred mares. *Animal Reproduction Science*, p. S103, 2010.

CAMOZZATO, G.C.; MALSCHITZKY, E.; LOF, H.K.; DAVOLI, G.; WOLF, C.A.; MATTOS, R.C.; Inflamação uterina: ultra-som ou exame citológico?. In: *Anais do XVIII Congresso de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, MG, 2009.

CAMPBELL, M.L.H., ENGLAND, G.C.W.; The effect of coitus and artificial insemination of different volumes of fresh semen on uterine contractions in the mare. *Animal Reproduction Science*, v. 94, p. 248–251, 2006.

CARD, C.; Endometrial cytology in mares bred with frozen semen. In: *50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Denver, CO, USA, 2004. Disponível em: www.ivis.org. Acesso em: 10/02/2011.

CARD, C.; Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*, v. 64, p. 580-588, 2005.

CARVALHO, G.; *Citologia do Trato Genital Feminino*, 396 p, 5^a Ed., Editora Revinter, 2009.

CAUSEY, R.C.; Mucus an the mare: How little we know. *Theriogenology*, v. 68, p. 386-394, 2007.

CAUSEY, R.C.; MILETELLO, T.; O'DONNELL, L.; LYLE, S.K.; PACCAMONTI, D.L.; ANDERSON, K.J.; EILTS, B.E.; MORSE, S.; LEBLANC, M.M.; Pathologic effects of clinical uterine inflammation on the equine endometrial mucosa. In: *54th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners – AAEP*, San Diego, CA, USA, 2008. Disponível em: www.ivis.org. Acesso em: 26/12/2012.

COCHIA, N.; PACIELLO, O.; AULETTA, L.; UCELLO, V.; SILVESTRO, L.; MALLARDO, K.; PARAGGIO, G.; PASOLINE, M.P.; Comparasion of the citobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, v. 77, p 89-98, 2012.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 2. ed. 1998.

COUTO, M.S.; HUGHES, J.P.; Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. *Equine Veterinary Journal*, v. 10, p. 167-170, 1984.

CRICKMAN, S.; PUGH, D.; Equine endometrial cytology: a review of techniques and interpretations. *Veterinary Medicine*, v. 81, p. 650– 656, 1986.

DAHMS, B.J.; TROEDSSON, M.H.T.; The effect of seminal plasma components on opsonisation an PMS-phagocytosis of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 58, p. 457-460, 2002.

DAMOUS, L.L.; SILVA, S.M.; LOPES, R.A.; SAKANO, C.R.; SIMOES, M.D.E.J.; MONTERO, E.F.; Study on the vaginal smear of rats submitted to autologous ovarian transplant: impact of remote ischemic preconditioning. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 24, n.5, p. 387-392, 2009.

DEFONTIS, M.; VAILLANCOURT, D.; GRAND, F.X.; Comparison of three methods of sampling for endometrial cytology in the mare. *Tierärztliche Praxis Grobtiere*, v. 39, p.171-175,2011.

DIMOCK, W.V.; EDWARDS, P.R.; Bacteria of the genital tract of mares and the sêmen of stallions and their relation to breeding efficiency. *Journal American Veterinary Medicine Association*, v. 64, p. 288-298, 1923.

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

FIORATTI, E. G.; VILLAVERDE, A.I.S.; GRECO, B.G.M.; MELO, C.M.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M.A.; Correlation between fluid accumulation, neutrophils concentration and uterine cytology in post-breeding endometritis mares. In: *Proceedings of the 11th International Congress of World Equine Veterinary Association*, 2009 - Guarujá, SP, Brazil. Disponível em: www.ivos.org, acesso em: 01/03/11.

FRONTOSO, R.; DE CARLO, E.; PASOLINI, M.P.; VAN DER MEULEN, K.; PAGNINI, U.; IOVANE, G.; DE MARTINO, L.; Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. *Research Veterinary Science*, v. 84, p. 1-6, 2008

GASTAL, E.L.; HENRY, M.; NASCIMENTO, E.F.; Influencia das alterações uterinas e tubáricas na taxa de fertilização de éguas. *Revista Brasileira. Reprodução. Animal*, v.13, p.171 (Suplemento). 1989.

GUVENC, K.; REILAS, T.; KATILA, T.; Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology*, v.63, p. 2504-2512, 2005.

HUNTER, B.; RAZ, T.; GREY, A.; CHIRINO-TREJO, M.; CARD, C.; Uterine inflammatory response to simultaneous treatment with frozen semen and bacteria in resistant mares. *Proceedings of The Annual Convention of The AAEP*, San Antonio, Texas, v. 52, p. 389-392, 2006.

HURTGEN, J.P.; Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. *Theriogenology*, n. 66, p. 560-566, 2006.

JACOB, J.C.F; JESUS, V.L.T; BARBOSA, H.P.; ZIMMERMAN, M.F.; SILVA, A.G; MELO, C.M.; Susceptibilidade antimicrobiana de swab uterino e da fossa clitoriana de éguas com susceptibilidade. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida*, n. 2, v. 22, 2002.

JESUS, V. L. T. ; CHAVES, A. R. ; LILENBAUM, W. ; SANTOS, M. . J. ; DIAS, U. R. ; TRABALI FILHO, S.C.; Exame citológico esfoliativo na prevenção de lesões ginecológicas de cadêlas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 28, n. 5, p. 282-286, 2005.

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

KAKEYA, A.Y.; LOPES, M.D.; PAPA, F.O.; MEIRA, C.; Resposta inflamatória uterina aguda frente a inseminação artificial com sêmen “in natura” e com diferentes diluentes, através da citologia cérvico-uterina em éguas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 22, n. 4, p. 216-219, 1998.

KATILA, T.; Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biology Reproduction Mono.*, v. 1, p. 515–517, 1995.

KATILA T.; Uterine defence mechanisms in the mare. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 197-204, 1996.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A.; Equine endometrial biopsy. *Current Therapy in Theriogenology*, p. 723-729, 2° Ed., Editora W.B. Saunders Company, 1986.

KNUDSEN, O.; A combined cytologic and bacteriologic endometrial examination in the mare. In: *Proceedings of American Association of equine practitioners*, v.28, p.431-433. 1964.

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

KONEMAM, E.W.; *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas colorido*. 6° ed., Editora Guanabara Koogan, , 2008.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.C.; *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 9Ed., Baltimore, Williams & Wilkins, 1984..

LANGONI, H.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LUCHEIS, S.B.I.; LUVIZOTTO, M.C.R.I.; SAKAMOTO, C.; LISTONI, F.J.P.; Participação de bactérias aeróbicas, microaerófilas e anaeróbicas na endometrite equine. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n.1, p. 44-51, 1999.

LEBLANC MM, ASBURY AC, LYLE SK. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. *American Journal Veterinary Research*, v. 50, p, 864–7, 1989.

LEBLANC, M.M., JOHNSON, R.D., CALDERWOOD MAYS, M.B. & VALDERRAMA, C.; Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Biology Reproduction Mono*, v. 1, p. 501-506, 1995.

LEBLANC, M.M.; The equine endometrium and the pathophysiology of endometritis. *Proceedings Society of Theriogenology*, p. 78-81, 1999.

LEBLANC MM. Persistent mating induced endometritis. *Current therapy in equine medicine*, p.234-237, Philadelphia: WB Saunders, 2003.

LEBLANC, M.M.; MAGSIG, J.; STROMBERG, A.J.; Use a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, v.68, p.403-412, 2007.

LEBLANC, M.M.; CAUSEY, R.C.; Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, n3, p. 10-22, 2009.

LIU, I.K.M.; TROEDSSON, M.H.T.; The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Theriogenology*, v.70, p. 415–420, 2008.

MALOUFI, F.; PIERSON, R.; OTTO, S.; BALL, C.; CARD, C.; Mares susceptible or resistant to endometritis have similar endometrial echographic and inflammatory cell reactions at 96 hours after infusion with frozen semen and extender. In: *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, v. 48, p. 51-57, 2002. Disponível em: www.ivis.org. Acesso em 12/03/11.

MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L.; SHIDELLER, L.K.; Diagnostic ultrasonography of the mares's reproductive tract. *Equine Veterinary Science*, v. 8, p. 329-333, 1988.

NEWCOMBE, J.R.; Why are mares with pneumovagina susceptible to bacterial endometritis? A personal Opinion. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 31, n. 4, p. 174-179, 2011.

NIELSEN, J. M.; Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*, v. 64, p. 510-518, 2005.

NIELSEN, J. M.; TROEDSSON, M.H.; PEDERSEN, M.R.; BOJESSEN, A.M.; LEHN-JENSEN, H.; ZENT, W. W.; Diagnosis of Endometritis in the Mare Based on Bacteriological and Cytological Examinations of the endometrium: comparison of results obtained by swabs and biopsies. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 30, n .1, p.27-30, 2010.

NIKOLAKOPOULOS E, KINDAHL H, WATSON ED. Oxytocin and PGF-2 alpha release in mares resistant and susceptible to persistent mating induced endometritis. *Journal of Reproduction and Fertility* (Supplementum), n.56, p.363-372, 2000.

OLIVEIRA, J.B.; PEIXOTO, R.M.; SILVA D. R.; PINHEIRO JR, J.W.; OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A; Etiologia e perfil de sensibilidade de bactérias aeróbias isoladas de éguas suspeitas de endometrite procedentes do Estado de Pernambuco. *Revista de Medicina Veterinária*, v.1, n. 1, p. 19-25, 2007.

OLIVEIRA, J.B.; PEIXOTO, R.M.; SILVA D. R.; PINHEIRO JR, J.W.; OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A; Análise comparativa entre o exame citológico e microbiológico no diagnóstico de endometrite equina. *Veterinaria e Zootecnia*, v. 17, p. 43-46, 2010.

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

PALM, F.; WALTER, I.; BUDIK, S.; AURICH, C.; Influence of different semen extenders and seminal plasma on the inflammatory response of the endometrium in oestrous mares. *Animal Reproduction Science*, n. 94, p. 286–289, 2006.

PORTUS, B.J.; REILAS, T.; KATILLA, T.; Effect of seminal plasma on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. *Equine Veterinary Journal*, v.37, n. 6, p. 515-519, 2005.

RAPOSO, R. S.; SILVA, L.D. M.; Comparação Qualitativa de Diferentes Técnicas de coloração para a Citologia Vaginal de Cabras da Raça Saanen. *Ciência Animal*, v.9, n. 2, p. 81-85, 1999.

REITZENSTEIN, M., CALLAHAN, M.A., HANSEN, P., LEBLANC, M.M.; Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after administration of detomidine and oxytocin. *Theriogenology*, v.58, p.887- 898, 2002

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

RICKETTS, S.W.; YOUNG, A.; MEDICI, E.B.; Uterine and clitoral cultures. In: Mckinnon A.O. e VOSS, J.L., *Equine Reproduction*, p. 234-245, 1993.

RIDDLE, W.T.; LEBLANC, M.M.; STROMBERG, A.J.; Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*, v. 68, p. 395-402, 2007.

RIGBY, S.L.; BARHOUMI, R.; BURGHARDT, R.C.; COLLERAN, P.; THOMPSON, J.A.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P.; TAYLOR, T.; WILKERSON, M.K.; Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. *Biology of Reproduction*, V. 65, p. 740-747, 2001.

SILVA, N.; BRAGA, C.E.; COSTA, G.M.; LOBATO, F.C.F; Isolamento e teste de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias em infecções uterinas de éguas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n.3, p. 213-216, 1999.

STREET CM; *Papanicolaou Techniques in Exfoliative Cytology. Laboratory Technique in Biology and Medicine*, 3° ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1952, p 253.

TIZARD, I.R.; *Veterinary Immunology*, 5° ed., Philadelphia, Saunders, 1996.

TROEDSSON, M.H.T., LIU, I.K.M.; ING, M.; PASCOE, J.R., Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 99, p. 307–313, 1994.

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

TROEDSSON MHT. Diseases of uterus. In: *Current Therapy in Equine Medicine*. Saunders, p. 517-523, 1997.

TROEDSSON, M.H.T., LEE, C.S., FRANKLIN, R., CRABO, B.G.; Post-breeding uterine inflammation: the role of seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 56 (*Supplementum.*), p. 341–349, 2000.

TROEDSSON, M.H.T.; LOSET, K.; ALGHAMDI, A.M.; DAHMS, B.; CRABO, B.G.; Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to sēmen. *Animal Reproduction Science*, v. 68, p. 273–278, 2001.

TROEDSSON MHT, DESVOUGES AL, HANSEN PJ, BUHI WC.; Equine seminal plasma proteins protect live spermatozoa from PMN-binding and phagocytosis, while providing a mechanism for selective sperm elimination of apoptotic and dead spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.94, p.60-61, 2006.

WALTER, J.; KLEIN, C.; WEHREND, A.; Comparison of eosin-thiazin and Papanicolaou-Shorr staining for endometrial cytologies of broodmares. *Tierärztliche Praxis Großtiere*, v. 6, p. 358-362, 2011.

WATSON, E.D.; Post-breeding endometritis in the mare. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 221–232, 2000.

WATSON, E.D.; THOMSOM, S.R.M.; Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*, v. 28, p. 106–110, 1996.

WATSON, E.D.; BARBACINE, S.; BERROCAL, B.; SHEERIN, O.; MARCH, V.; ZAVAGLIA, G.; NEEST, D.; Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares. *Theriogenology*, p.123-131. 2001.

WIDDERS, P.R.; STOKES, C.R.; DAVID, J.S.E.; Effect of cycle stages on immunoglobulin concentrations in reproduction tract secretions of the mare. *Journal of Reproduction Immunology*, v. 7, p. 233-242, 1985.

WINGFIELD DIGBY, N.J.; RICCKETTS, S.W.; Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice, *Journal of Reproduction and Fertility Supplementum*, v.35, p. 455-459, 1982.

ZENT, W.W., TROEDSSON, M.H.T., XUE, J.L.; Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: a field study. *Proceedings Society of Theriogenology*, Baltimore, 78–79, 1998.

ANEXOS

ANEXO I

COLORAÇÃO DE PAPANICOLAOU

Componentes	- Hematoxilina de Harris
	- Orange G
	- EA 36
	- Etanol absoluto
	- Ácido acético 10%
	- Xilol
	

Etapas:	1) Hidratação	Colocação das lâminas em uma cuba com água corrente por 10 a 15 minutos;
	2) 1º Corante: Hematoxilina de Harris por 3 a 5 minutos	Imersão das lâminas em Hematoxilina de Harris pelo tempo de 3 a 5 minutos
	3) Lavagem	Lavagem das lâminas em água corrente por 5 a 10 minutos;
	4) Diferenciação	Submeter as lâminas a duas imersões em ácido acético a 10%;
	5) Lavagem	Lavagem das lâminas em água corrente por 10 a 15 minutos
	6) Desidratação	Submeter as lâminas a 3 a 5 imersões em álcool absoluto
	7) 2º Corante: Orange G	Corar em Orange G por 3 a 5 minutos;
	8) Lavagem	Lavar em duas trocas de álcool absoluto
	9) 3º Corante : EA 36	Corar em EA 36 por 5 a 10 minutos
	10) Lavagem	Lavar em duas trocas de álcool absoluto
	11) Secagem	Secar as lâminas ao ar
	12) Xilol 1	Banhar em xilol por 5 minutos
	13) Xilol 2	Banhar em xilol pelo tempo necessário para a montagem da lâmina
	14) Xilol 3	Banhar em xilol pelo tempo necessário para a montagem da lâmina
