

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

TESE

HEMODINÂMICA UTERINA DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE

Camila Silva Costa Ferreira

2024



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

HEMODINÂMICA UTERINA DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE

CAMILA SILVA COSTA FERREIRA

Sob Orientação do Professor
Dr. Júlio César Ferraz Jacob

e Coorientação das Professoras
Dra. Vera Lúcia Teixeira de Jesus
Dra. Aline Emerim Pinna

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas com área de concentração em Patologia Animal.

Seropédica-RJ
Fevereiro de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F383h FERREIRA, Camila Silva Costa, 1990-
Hemodinâmica uterina de éguas com endometrite /
Camila Silva Costa FERREIRA. - Seropédica, 2024.
71 f.: il.

Orientador: Júlio César Ferraz JACOB.
Coorientadora: Vera Lúcia Teixeira DE JESUS.
Coorientadora: Aline Emerim PINNA.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de pós-graduação em medicina
veterinária - patologia e ciências clínicas, 2024.

1. Ultrassonografia Doppler. 2. Diagnóstico. 3.
Patologia uterina. 4. Equino. 5. Reprodução Animal. I.
JACOB, Júlio César Ferraz, 1961-, orient. II. DE
JESUS, Vera Lúcia Teixeira, 1959-, coorient. III.
PINNA, Aline Emerim, 1978-, coorient. IV Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de pós
graduação em medicina veterinária - patologia e
ciências clínicas. V. Título.

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

CAMILA SILVA COSTA FERREIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas, Área de Concentração em Patologia Animal.

TESE APROVADA EM: 28/02/2024

Prof. Dr. Júlio César Ferraz Jacob – UFRRJ
(Orientador)

Prof. Dr. Marco Roberto Bourg de Mello – UFRRJ

Prof. Dr. José Antônio Silva Ribas – UFF

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro – UFRPE

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva - USP



TERMO Nº 287/2024 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 02/05/2024 11:07)
JULIO CESAR FERRAZ JACOB
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)
Matricula: ###023##

(Assinado digitalmente em 30/04/2024 14:48)
MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)
Matricula: ###480##

(Assinado digitalmente em 09/05/2024 08:25)
LUCLANO ANDRADE SILVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.106-##

(Assinado digitalmente em 30/04/2024 15:53)
JOSE ANTONIO SILVA RIBAS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.457-##

(Assinado digitalmente em 02/05/2024 15:00)
GUSTAVO FERRER CARNEIRO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.034-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número: 287, ano: 2024, tipo: TERMO, data de emissão: 30/04/2024 e o código de verificação: 49edbc67b0

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e aos animais que são a força contínua que sustenta minha vontade e curiosidade de sempre buscar a resposta de novos porquês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por estar sempre comigo e me proporcionar uma força imensurável para estar enfrentando as batalhas do dia a dia e as desconfianças do meu potencial e conhecimento como médica veterinária.

Em seguida, agradeço aos meus pais e meus irmãos por estarem comigo em todos os momentos da minha vida, sejam eles felizes ou tristes. Obrigado por todo respaldo, amparo e ajuda.

Agradeço ao Prof. Dr. Júlio Jacob por ter me recebido como sua orientada e ter me proporcionados muitos desafios e aprendizados durante esta caminhada do doutorado. Igualmente agradeço a minha coorientadora, Profa. Dra. Vera Lucia, por ter me acolhido na UFRRJ onde eu não conhecia nada nem ninguém e pode me ajudar a encontrar os caminhos.

Agradeço, imensamente, outra coorientadora de doutorado e orientadora da vida, a Profa. Dra. Aline Pinna, que me orienta desde o quinto período da faculdade. Dentre tantas pessoas que já passaram na minha vida, ela é a pessoa que mais acredita no meu potencial, faz de tudo para que eu acredite também e está sempre me guiando pelos caminhos profissionais da veterinária. Obrigada por nunca desistir de mim. Prometo tentar nunca decepcioná-la.

Não poderia deixar de agradecer aos professores que conheci durante essa caminhada pela UFRRJ. Obrigada pelo acolhimento, apoio e conselhos. É claro que não poderia faltar os meus amigos que sempre estiveram presentes nos momentos de conquistas, diversão, festas, decisões, incertezas e tristezas da minha vida. A eles, o meu, muito obrigada!

Com o mesmo sentimento de gratidão, agradeço aos animais. Razão da minha escolha pela Medicina Veterinária, e principalmente aos cavalos, um amor inexplicável que surgiu porque o destino quis, pois nunca tive contato diário com cavalos até entrar na faculdade e conhecer a magia no olhar deles.

Por fim, agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por me receber e me proporcionar a oportunidade de conhecer tantos profissionais excepcionais dentro da medicina veterinária e da zootecnia que lecionaram aulas maravilhosas com trocas de experiência incríveis dentre os vários locais que pude conhecer dentro do doutorado. Também agradeço a FAPERJ pela bolsa de estudos para conseguir manter as minhas pesquisas. Ao Centro de Investigação de Microrganismos (CIM), ao Laboratório de Bacteriologia de Cocos Gram Positivos e ao Laboratório de Anatomopatológica da Universidade Federal Fluminense pela parceria e avaliação das amostras de cultura fúngica, bacteriana e biopsias endometriais deste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obrigada!

RESUMO

FERREIRA, Camila Silva Costa. **Hemodinâmica uterina de éguas com endometrite**. 2024, 53p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

A endometrite equina é considerada a principal patologia reprodutiva da espécie e a causa das maiores perdas econômicas na reprodução por falhas gestacionais precoce. No entanto, não há relatos que descrevam e avaliem a aplicação da ultrassonografia Doppler modo Powerflow e espectral no diagnóstico da endometrite quando avaliadas éguas com ou sem endometrite. Com isso, objetivo deste estudo foi caracterizar a hemodinâmica uterina das éguas com endometrite. O estudo foi realizado no setor de equinocultura da UFRRJ. Foram utilizadas 45 éguas separadas em três grupos: GC – grupo controle com éguas sem endometrite (n:16 animais); GES – grupo de éguas com endometrite subclínica (n:15 animais); GEC – grupo de éguas com endometrite clínica (n:14 animais). Inicialmente foi realizada avaliação ginecológica das éguas e acompanhamento do ciclo estral até ser observado folículo pré-ovulatório. A partir disso amostras uterinas foram coletadas para exame cultura fúngica, bacteriana e exame citológico. Com a indução e detecção da ovulação, as éguas foram acompanhadas pela ultrassonografia (US) transretal modo B e US Doppler modo Powerflow dos segmentos uterinos (corpo e cornos uterinos) e US Doppler modo espectral dos ramos dorsais esquerdo e direito da artéria uterina próximo a bifurcação com a artéria ilíaca externa. Esses exames foram realizados todos os dias até a próxima ovulação para avaliação de um ciclo estral completo. Após a próxima ovulação foi realizada a coleta de um fragmento de endométrio para realização da biópsia endometrial. Foi possível confirmar a correlação de proporcionalidade entre as variáveis índice de pulsatilidade (PI) e de resistividade (RI) e ratificar que o PI se apresenta como a variável mais confiável para avaliação pelos índices Doppler. Outro achado deste estudo foi que as variáveis PI e RI se comportam de forma proporcional ao crescimento das éguas com endometrite. PI e RI podem ser recomendados como um método de diagnóstico complementar para detecção de éguas com e sem endometrite quando examinadas no 15º dia do ciclo estral (utilizando PI e RI) e no 12º dia (utilizando apenas PI). A avaliação subjetiva, realizado pela ultrassonografia Doppler modo Powerflow, se demonstrou eficiente na detecção de éguas com endometrite clínica examinadas no dia 01, 09 e 10 do ciclo estral. Já a avaliação objetiva da vascularização dos segmentos uterinos para avaliação da quantidade e intensidade dos pixels das imagens Doppler não foi eficiente, não sendo indicado como um método de diagnóstico complementar de éguas com e sem endometrite. Desta forma, conclui-se que a US Doppler modo espectral pode ser utilizado para detecção de éguas com e sem endometrite. E que a US Doppler modo Powerflow pode ser utilizada para detecção de éguas com endometrite clínica.

Palavras-chave: Diagnóstico, Patologia uterina, Ultrassonografia Doppler.

ABSTRACT

FERREIRA, Camila Silva Costa. **Uterine hemodynamics of mares with endometritis**. 2024, 53p. Thesis (Doctorate degree in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Patologia e Ciências Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Equine endometritis is considered the main reproductive pathology of the species and the cause of the greatest economic losses in reproduction due to early gestational failure. However, there are no reports describing and evaluating the use of Powerflow and spectral Doppler ultrasound in the diagnosis of endometritis in mares with or without endometritis. The aim of this study was to characterize the uterine hemodynamics of mares with endometritis. The study was carried out in the equine breeding sector of the UFRRJ. 45 mares were separated into three groups: CG - control group with mares without endometritis (n:16 animals); GES - group of mares with subclinical endometritis (n:15 animals); GEC - group of mares with clinical endometritis (n:14 animals). Initially, a gynecological assessment was carried out on the mares and the estrous cycle was monitored until a pre-ovulatory follicle was observed. Following this, uterine samples were collected for fungal and bacterial culture and cytological examination. Once ovulation had been induced and detected, the mares were monitored by B-mode transrectal ultrasound (US) and Powerflow mode Doppler US of the uterine segments (body and uterine horns) and spectral mode Doppler US of the left and right dorsal branches of the uterine artery near the bifurcation with the external iliac artery. These tests were carried out every day until the next ovulation to assess a complete estrous cycle. After the next ovulation, a fragment of the endometrium was taken for an endometrial biopsy. It was possible to confirm the correlation of proportionality between the pulsatility index (PI) and resistivity index (RI) variables and confirm that PI is the most reliable variable for evaluation using Doppler indices. Another finding of this study was that the PI and RI variables behave proportionally to the growth of mares with endometritis. PI and RI can be recommended as a complementary diagnostic method for detecting mares with and without endometritis when examined on days 15 of the estrous cycle (using PI and RI) and on day 12 (using only PI). The subjective evaluation, carried out using Powerflow Doppler ultrasound, proved to be efficient in detecting mares with clinical endometritis when examined on days 01, 09 and 10 of the estrous cycle. On the other hand, the objective evaluation of the vascularization of the uterine segments to assess the quantity and intensity of the pixels in the Doppler images was not efficient and is not indicated as a complementary diagnostic method for mares with or without endometritis. It can therefore be concluded that spectral mode Doppler US can be used to detect mares with and without endometritis. Powerflow Doppler US can also be used to detect mares with clinical endometritis.

Keywords: Diagnosis, Uterine pathology, Doppler ultrasound.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupo das idades discriminando as quantidades de animais e média \pm desvio padrão de dias do ciclo estral das éguas baseado nos grupos tratamentos e idade dos animais do estudo.	31
Tabela 2: Constatação da proporcionalidade entre a variável índice de pulsatilidade da artéria uterina (AUPI) com o grupo de animais com endometrite apresentando crescimento conjunto de 68%. $P < 0,001$	33
Tabela 3: Constatação da proporcionalidade entre a variável índice de resistividade da artéria uterina (AURI) com o grupo de animais com endometrite apresentando crescimento conjunto de 70%. $P < 0,001$	33
Tabela 4: Resultado da Correlação entre as variáveis analisadas neste estudo baseado no Teste de Spearman.	37
Tabela 5: Avaliação do índice de pulsatilidade da artéria uterina (AUPI), índice de resistividade da artéria uterina (AURI), avaliação subjetiva da vascularização uterina e avaliação objetiva da quantidade e da intensidade de pixels comparado aos grupos tratamentos deste estudo.	37
Tabela 6: Avaliação do índice de pulsatilidade da artéria uterina (AUPI), índice de resistividade da artéria uterina (AURI), avaliação subjetiva da vascularização uterina e avaliação objetiva da quantidade e da intensidade de pixels comparado ao exame de cultura microbiológica realizado neste estudo.....	38
Tabela 7: Avaliação do índice de pulsatilidade da artéria uterina (AUPI), índice de resistividade da artéria uterina (AURI), avaliação subjetiva da vascularização uterina e avaliação objetiva da quantidade e da intensidade de pixels comparado ao exame de citologia endometrial realizado neste estudo.....	39
Tabela 8: Avaliação do índice de pulsatilidade da artéria uterina (AUPI), índice de resistividade da artéria uterina (AURI), avaliação subjetiva da vascularização uterina e avaliação objetiva da quantidade e da intensidade de pixels comparado ao exame de biópsia endometrial realizado neste estudo.....	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Diferentes tipos de avaliação e contagem de neutrófilos no exame citológico para classificação de endometrite nas éguas.	11
Quadro 2: Classificação das categorias de biopsia endometrial descritas por Kenny e Doig (1986) e seus respectivos prognósticos para taxa estimada de parto das éguas.	27

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da vascularização do sistema genital feminino equino com ênfase nas artérias que irrigam o útero. UA: artéria uterina. BUA: ramo caudal e cranial da artéria uterina. UBOA: ramo uterino da artéria ovariana. UBVA: ramo uterino da artéria vaginal. E descrição de outras artérias presentes na região. VA: artéria vaginal. IPA: artéria pudenda interna. IIA: artéria ilíaca interna. EIA: artéria ilíaca externa. DCA: artéria circunflexa profunda. AO: artéria ovariana. UOV: veia útero-ovariana. CVC: veia cava ventral. UMA: artéria umbilical. Fonte: Ginther, 2007. 3
- Figura 2:** Esquema ilustrativo dos critérios utilizados para distribuição das éguas nos grupos experimentais. 22
- Figura 3:** Esquematisação do experimento. Neste fluxograma observa-se que as avaliações se iniciam quando o folículo apresenta diâmetro $\geq 35\text{mm}$ e edema classificado de 2 a 3 com a coleta de material para os exames microbiológicos e citologia uterina para classificação dos animais e distribuição entre os grupos deste estudo. Seguidamente é realizado a indução da ovulação para que seja detectado a ovulação (DO) e se inicie as avaliações ultrassonográficas. Dentro de um ciclo completo foi realizado ultrassonografia (US) Doppler modo Power Flow e US Doppler modo espectral até a próxima ovulação. Cinco dias após a segunda ovulação (D5) foi realizado o exame de biopsia uterina, retorno ao cio das éguas deste estudo e as que foram detectadas com alterações uterinas foram tratadas para que pudessem retornar ao programa de reprodução da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Fonte: Arquivo pessoal. 24
- Figura 4:** Representação do percurso realizado para escaneamento da perfusão vascular uterina. Foi realizada uma imagem em corte longitudinal do corpo do útero (CP) e um corte transversal nas três porções do corno uterino esquerdo (CE) e do corno uterino direito (CD). Fonte: Arquivo pessoal. 27
- Figura 5:** Classificação em escores da avaliação subjetiva feita simultaneamente ao exame de ultrassonografia Doppler modo Powerflow do útero das éguas. A: representa as éguas avaliadas com área uterina vascularizada menor 25% (escore baixo). B: representa as éguas avaliadas com área uterina vascularizada entre 25 e 49% (escore leve). C: representa as éguas avaliadas com área uterina vascularizada entre 50 e 75% (escore alto). Fonte: arquivo pessoal. 28
- Figura 6:** Esquematisação do passo a passo para realização da avaliação objetiva do vídeo salvo do exame de ultrassonografia Doppler modo Powerflow do útero das éguas. A, B e C: imagens classificadas com maior vascularização uterina do vídeo assistido. D, E e F: imagens editadas em photoshop para visualização apenas da vascularização uterina. G, H e I: resultado da avaliação feita em cada imagem editada visualizada pelo histograma. J: Dados do histograma planilhados, sendo a coluna A referente a numeração da paleta de cores de 0 a 255 (do preto ao branco); a coluna B referente a quantidade de pixels em cada cor sendo destacado em azul o somatório desses pixels para a imagem analisada; a coluna C referente a intensidade de pixels em cada cor sendo destacada em amarelo o somatório dessa intensidade para a imagem analisada. A intensidade é avaliada através da multiplicação entre a numeração da paleta de cores (coluna A) e a quantidade de pixels de cada cor (coluna B). Fonte: arquivo pessoal. 29
- Figura 7:** Esquematisação da análise feita para o exame de ultrassonografia Doppler modo espectral. As linhas em vermelho representam as ondas de sístole e diástole referente a movimentação sanguínea. As numerações em laranja (1, 2 e 3) ilustram as três ondas avaliadas. As caixas em laranja no canto direito da imagem demonstram os dados avaliados dentro deste exame PI (índice de pulsatilidade) e RI (índice de resistividade). Fonte: arquivo pessoal. 30

Figura 8: Relação entre o grupo das idades das éguas e os grupos tratamentos, sendo observado uma associação entre o grupo ≤ 8 anos com o grupo de endometrite subclínica (55%); o grupo 9-13 anos com animais sem endometrite (52%); e o grupo ≥ 14 anos com a endometrite clínica (70%) ($P < 0,001$).	31
Figura 9: Classificação das amostras de biopsia endometriais encontradas nas éguas utilizadas no estudo separadas pelos grupos tratamento. Pode ser observado que o grupo controle apresenta em sua maioria éguas do grupo IIA ($n=7$), que o grupo endometrite subclínica apresenta em sua maioria éguas do grupo IIB ($n=8$) e que o grupo endometrite clínica apresenta em sua maioria éguas do grupo III ($n=6$).	32
Figura 10: Classificação das amostras de biopsia endometriais encontradas nas éguas utilizadas no estudo separadas pelos grupos das idades. Pode ser observado que as éguas ≤ 8 anos obtiveram, em sua maioria, classificação da qualidade do tecido uterino em IIA ($n=6$), enquanto as éguas 9-13 anos obtiveram, em sua maioria, classificação em IIB ($n=10$) e as éguas ≥ 14 anos obtiveram, em sua maioria, classificação em III ($n=7$).	32
Figura 11: Observação da ação de sinergismo entre as variáveis índice de pulsatilidade da artéria uterina (AUPI) e índice de resistividade da artéria uterina (AURI) que quando analisadas em ação conjunta ocorre uma anulação de RI por PI. A: avaliação estatística demonstrando comportamento significativo para variável AUPI quando avaliada separadamente. B: avaliação estatística demonstrando comportamento significativo para variável AURI quando avaliada separadamente. C: avaliação estatística da ação conjunta das variáveis demonstrando que PI supri as necessidades de RI anulando-a e a tornando uma variável não significativa (PI - $P < 0,001$; e RI - $P = 0,974$).	33
Figura 12: Comportamento do índice de pulsatilidade durante o ciclo estral da égua, sendo dividido em grupo controle (linha azul), grupo endometrite subclínica (linha laranja) e grupo endometrite clínica (linha cinza). Pode ser observado que o grupo endometrite clínica obteve médias significativamente superior às apresentadas pelos grupos endometrite subclínica e controle no dia 12; e que o grupo endometrite clínica e subclínica obtiveram médias significativamente superior às apresentadas pelo grupo controle no dia 15 ($P \leq 0,05$).	34
Figura 13: Comportamento do índice de resistividade durante todo o ciclo estral da égua, sendo dividido em grupo controle (linha azul), grupo endometrite subclínica (linha laranja) e grupo endometrite clínica (linha cinza). Pode ser observado que o grupo endometrite clínica e subclínica obtiveram médias significativamente superior às apresentadas pelo grupo controle no dia 15 ($P = 0,01271$).	34
Figura 14: Comportamento da vascularização uterina através da avaliação subjetiva dos segmentos uterinos (eixo vertical) durante o ciclo estral da égua (eixo horizontal), sendo dividido em grupo controle (linha azul), grupo endometrite subclínica (linha laranja) e grupo endometrite clínica (linha cinza). Onde não foram observadas diferenças significativas entre os dias do ciclo estral, os grupos tratamentos e a variável da avaliação subjetiva ($P > 0,05$).	35
Figura 15: Comportamento da vascularização uterina através da avaliação objetiva da quantidade de pixels dos segmentos uterinos durante o ciclo estral da égua, sendo dividido em grupo controle (linha azul), grupo endometrite subclínica (linha laranja) e grupo endometrite clínica (linha cinza). Onde não foram observadas diferenças significativas entre os dias do ciclo estral, os grupos tratamentos e a variável da avaliação objetiva da quantidade de pixels dos segmentos uterinos ($P > 0,05$).	36
Figura 16: Comportamento da vascularização uterina através da avaliação objetiva da intensidade de pixels dos segmentos uterinos durante o ciclo estral da égua, sendo dividido em grupo controle (linha azul), grupo endometrite subclínica (linha laranja) e grupo endometrite clínica (linha cinza). Onde não foram observadas diferenças significativas entre os dias do ciclo estral, os grupos tratamentos e a variável da avaliação objetiva da intensidade de pixels dos segmentos uterinos ($P > 0,05$).	36

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SIMBOLOS

CEUA-IZ/UFRRJ	Comissão de tica no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
CIM	Centro de Investigao de Microrganismos
CL	Corpo lúteo
COX	Ciclooxigenases
D0	Dia da ovulao
D1	01° dia pós-ovulao
D14	14° dia pós-ovulao
D18	18° dia pós-ovulao
D19	19° dia pós-ovulao
D2	02° dia pós-ovulao
D8	08° dia pós-ovulao
DMSO	Dimetilsulfóxido
FD	Frequência Doppler
FPO	Folículos pr-ovulatórios
FR	Frequência do som refletido
FSH	Hormônio folículo estimulante
FT	Frequência do som transmitido
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
IPC	Intensidade de pixels coloridos
LH	Hormônio Luteinizante
LOX	Lipoxigenases
P4	Progesterona
PI	ndice de pulsatilidade
PRF	Frequência de repetio de pulso
RI	ndice de resistividade
TAMV	Velocidade média das velocidades máximas
UFC	Unidade formadora de colônia
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
US	Ultrassonografia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	1
2.1 Anatomia do Sistema Genital Feminino Equino	1
2.1.1 Vascularização uterina	2
2.2 Fisiologia do Ciclo Estral Equino	3
2.3 Dinâmica Folicular em Equinos	3
2.4 Endometrite Equina	4
2.4.1 Endometrite bacteriana	7
2.4.2 Endometrite fúngica	8
2.4.3 Métodos de diagnóstico na endometrite equina	9
2.4.3.1 Coleta de material	9
2.4.3.2 Cultura microbiológica	10
2.4.4.3 Citologia endometrial	11
2.4.4.4 Biópsia endometrial	12
2.4.4.5 Exame ultrassonográfico modo B	14
2.5 Ultrassonografia na Reprodução Animal	14
2.5.1 Princípios da ultrassonografia doppler	15
2.5.2 Tipos de ultrassonografia doppler	15
2.5.2.1 Ultrassonografia doppler modo colorflow	15
2.5.2.2 Ultrassonografia doppler modo powerflow	16
2.5.2.3 Ultrassonografia doppler modo espectral	16
2.5.3 Ultrassonografia doppler na reprodução animal	17
2.5.3.1 Ultrassonografia doppler na avaliação uterina	18
2.5.4.2 Ultrassonografia doppler no diagnóstico de endometrite equina	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4 METODOLOGIA	21
4.1 Local e Período do Experimento	22
4.2 Animais e Manejo	22
4.3 Critério de Distribuição das Éguas nos Grupos Experimentais	22
4.4 Experimento	23
4.4.1 Exames complementares	24
4.4.2 Avaliação ultrassonográfica	27
4.6 Análise estatística	30
5 RESULTADOS	30
5.1 Avaliação da Ultrassonografia Doppler modo Espectral	32
5.2 Avaliação da Ultrassonografia Doppler modo Powerflow	34
5.3 Correlação entre dados do estudo	36
5.4 Efeito das variáveis analisadas	37
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
9 ANEXOS	50
A – Certificado CEUA-IZ/UFRRJ	50
B – Dados Dos Exames Complementares Do Grupo Controle	51

C – Dados Dos Exames Complementares Do Grupo Endometrite Subclínica	52
D - Dados Dos Exames Complementares Do Grupo Endometrite Clínica	53

1 INTRODUÇÃO

A equideocultura exerce um importante papel na economia mundial como fonte geradora de empregos sendo um mercado em constante crescimento (Lima; Cintra, 2016). A endometrite equina é considerada a principal patologia reprodutiva encontrada na espécie e a causa das maiores perdas econômicas com falhas gestacionais precoces (Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020). Logo, há um aumento na procura por biotécnicas da reprodução para otimizar a reprodução tornando cada vez mais preciso e necessário o diagnóstico e a terapêutica da endometrite.

Neste contexto, a técnica de ultrassonografia (US) Doppler, tem demonstrado grande importância na biotecnologia da reprodução em equinos, fornecendo informações imediatas sobre a fisiologia do fluxo sanguíneo de vasos, tecidos e órgãos do sistema reprodutivo (Ginther, 2007; Camargo Ferreira; Meira, 2011). Inclusive dos segmentos uterinos onde, por meio desse novo conhecimento, conceitos antes considerados definitivos quanto à fisiologia da reprodução equina atualmente podem ser reavaliados.

Contudo, não há relatos que descrevam e avaliem a aplicação da US Doppler modo espectral no diagnóstico da endometrite e nem na formação de um padrão de vascularização dos segmentos uterinos pela US Doppler modo Powerflow quando avaliadas éguas com endometrite ou com útero hígado. Na literatura podem ser observados trabalhos com US Doppler colorida fazendo comparações da vascularização uterina pré e pós-tratamentos de endometrites ou avaliando dias pontuais do ciclo para comparações com outras variáveis. Além disso, a US Doppler pode se tornar uma importante ferramenta complementar no diagnóstico de endometrite subclínica em éguas (El-Shahat; El-Maaty; Helmy, 2019; Sá et al., 2020; Abdelnaby et al., 2020; Lüttgenau et al.; 2021Morais, 2021).

Sendo assim, acredita-se que exista uma diferença na vascularização dos segmentos uterinos entre éguas com endometrite clínica, subclínica e as que não apresentam endometrite. Posto isto, se faz necessário uma avaliação minuciosa e detalhada da vascularização uterina durante um ciclo estral das éguas para analisar e entender as variações que ocorrem e os possíveis pontos de interseção. Podendo, desta forma, colaborar em novos métodos de diagnóstico complementar a campo para um prognóstico final mais fidedigno ao caso.

À vista disso, este estudo teve como objetivo caracterizar a hemodinâmica uterina das éguas com endometrite pela Ultrassonografia Doppler.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia do Sistema Genital Feminino Equino

O sistema reprodutivo feminino equino é composto por dois ovários, dois ovidutos, útero, cérvix, vagina, vestíbulo e vulva. Localiza-se, em grande parte, na região abdominal e uma pequena parte na região pélvica das éguas. As estruturas localizadas na região abdominal são sustentadas pelo ligamento largo do útero que pode ser subdividido em mesométrio, mesossalpinge e mesovário (König e Liebich, 2016).

Os ovários são responsáveis pelo desenvolvimento dos oócitos e produção hormonal. Os ovidutos são responsáveis pelo transporte dos espermatozoides e do oócito para um local comum (ampola) para fertilização. O útero tem a função de receber o embrião em torno de 5,5 dias após a ovulação e fornece um ambiente adequado para o desenvolvimento da gestação. A cérvix tem a função de porta de entrada e/ou saída dependendo da fase do ciclo reprodutivo da

égua. A vagina juntamente com o vestíbulo forma o canal do parto e local para cópula e excreção urinária (Brinsko *et al.*, 2011).

O útero é um órgão muscular tubular que se liga aos ovidutos e a cérvix. Nas éguas apresenta-se em formato de “Y” contendo dois cornos uterinos e um corpo sendo suspenso pelo ligamento largo do útero. A porção do ligamento largo que fica em contato com o útero é chamada de mesométrio e se fixa na porção dorsal dos cornos uterinos. A porção do ligamento largo que fica em contato com o ovário é chamada de mesovário e a em contato com as tubas uterinas é chamada de mesossalpinge. Por conta desta configuração se torna difícil a avaliação por palpação do corpo do útero e evita a retração deste órgão para a região pélvica (Hafez; Hafez, 2000).

O útero é constituído por três camadas histológicas: a serosa (perimétrio), a muscular (miométrio) e a mucosa (endométrio). No perimétrio, a camada serosa, vascular e muscular longitudinal são contínuas com o do ligamento largo. O miométrio é composto de uma camada circular interna e uma camada longitudinal externa contínua com os ovidutos. Esta camada é responsável pela variação de tônus uterino na égua durante o estro, diestro ou início de gestação. E o endométrio é a camada mais interna do útero que apresenta uma faixa glandular e outra secretora e dobras endometriais dispostas longitudinalmente ao longo do útero (Morel, 2020).

2.1.1 Vascularização uterina

A vascularização uterina é fornecida pela artéria uterina e por ramos das artérias ovariana e vaginal. Essa vascularização é observada ao longo do ligamento largo juntamente com suas veias correspondentes, inervações e vasos linfáticos. O ligamento redondo do útero delimita a divisão entre o mesovário e o mesométrio que têm origem na região lombar. A inserção desse ligamento nos órgãos é um ponto de referência importante durante o exame ultrassonográfico para localização da chegada dos vasos aos seus respectivos órgãos (Brinsko *et al.*, 2011).

A artéria ovariana tem sua origem na artéria aorta, corre dorsalmente ao longo da parede abdominal, entra no mesovário e passa ao longo sua face cranial se localizando próximo caudalmente a veia útero-ovariana. A artéria vaginal tem sua origem na artéria pudenda interna que é ramo da artéria ilíaca interna. O ramo uterino da artéria vaginal passa ao longo da face lateral do colo do útero e do corpo uterino (König e Liebich, 2016).

A artéria uterina tem sua origem na artéria ilíaca externa que é um ramo da artéria aorta. A artéria uterina passa próxima e acima da artéria circunflexa profunda apresentando diâmetro de 2-6mm e 6-7mm, respectivamente. As artérias uterinas formam ramos caudais e craniais. Os ramos caudais suprem a maior parte da porção caudal do corno uterino e formam uma anastomose com o ramo uterino da artéria vaginal. Os ramos craniais suprem a porção cranial do corno uterino e formam anastomose com o ramo caudal da artéria uterina e com o ramo uterino da artéria ovariana. Deste modo, as três fontes arteriais se interligam de forma tortuosa e variável entre os indivíduos (Figura 1) (Ginther, 2007).

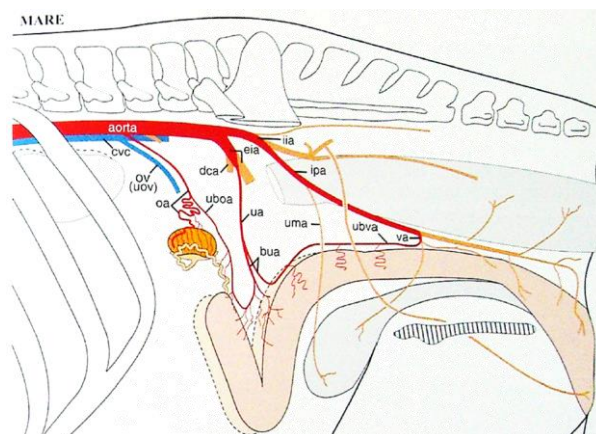


Figura 1: Representação esquemática da vascularização do sistema genital feminino equino com ênfase nas artérias que irrigam o útero. UA: artéria uterina. BUA: ramo caudal e cranial da artéria uterina. UBOA: ramo uterino da artéria ovariana. UBVA: ramo uterino da artéria vaginal. E descrição de outras artérias presentes na região. VA: artéria vaginal. IPA: artéria pudenda interna. IIA: artéria ilíaca interna. EIA: artéria ilíaca externa. DCA: artéria circunflexa profunda. AO: artéria ovariana. UOV: veia útero-ovarariana. CVC: veia cava ventral. UMA: artéria umbilical. Fonte: Ginther, 2007.

2.2 Fisiologia do Ciclo Estral Equino

As éguas são classificadas como poliéstricas estacionais de dias longos, pois a atividade reprodutiva é influenciada pela quantidade de luz em um dia. Portanto, a característica fotossensível é responsável pela ativação do sistema neuroendócrino gonadal. Tal sistema permanece inibido nos meses de baixa luminosidade (outono e inverno) em função do aumento na concentração plasmática de melatonina que exerce “feedback” negativo no hipotálamo com o bloqueio na liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Contrariamente, durante os meses de alta luminosidade (primavera e verão) a síntese de melatonina pela glândula pineal está baixa e desta forma o “feedback” negativo é desfeito ocorrendo a liberação de GnRH, desencadeando as alterações fisiológicas nos ovários, tais como crescimento folicular, ovulação e formação do corpo lúteo (CL) (Vallejo Aristizábal *et al.*, 2017).

Porém, em algumas regiões equatoriais de menor latitude e menor variação de luminosidade ao longo do ano, a estacionalidade reprodutiva não ocorre de maneira tão marcante, a ponto das éguas se comportarem como poliéstricas anuais. Contudo, outros fatores adicionais também podem influenciar a ciclicidade sexual das éguas, como por exemplo, nutrição, idade e temperatura ambiente (Farias *et al.*, 2016).

O ciclo estral da égua apresenta duração entre 21 e 23 dias (variando de 18 a 26 dias), podendo ser dividido em fases de predominância estrogênica ou estro (de 5 a 7 dias) e progesterônica ou diestro (de 14 a 16 dias). A fase folicular, também conhecida como estro é acompanhada pelo crescimento folicular, seleção, maturação e, então, a ovulação que resulta um rápido decréscimo das concentrações plasmáticas de estrógeno. A fase luteal ou diestro, considerada como o período restante do ciclo estral, é variável, de acordo com a duração do estro. Ela se inicia com a ovulação, pela formação do CL e, conseqüente, secreção de progesterona e finaliza com a luteólise do CL iniciando um novo ciclo (Zimri *et al.*, 2018).

2.3 Dinâmica Folicular em Equinos

As éguas apresentam uma única onda ovulatória na maioria dos intervalos interovulatórios. Após a fase de crescimento folicular estimulada pelo hormônio folículo estimulante (FSH) se tem o início da divergência folicular do futuro folículo dominante ocorrendo a fase de seleção folicular que é seguida pelo crescimento contínuo do folículo

dominante e atresia dos folículos subordinados. Divergência folicular em éguas começa quando o futuro folículo dominante alcança em média um diâmetro de 22,5 mm (Ginther, 2019). Para ocorrência da maturação folicular, os receptores do hormônio luteinizante (LH) devem ser expressos na superfície celular folicular estimulados por FSH e prolactina (Gérard e Robin, 2019).

Simultaneamente, se sucede uma crescente na produção de estrógeno secretada pelos folículos que induzem o comportamento de cio. Sob a influência do estrógeno, ocorre um aumento da vascularização uterina causando o edema endometrial com tumefação das pregas endometriais que permite uma melhor depuração uterina, comportamento de cio e auxílio no transporte espermático (Vallejo Aristizábal *et al.*, 2017). Quando o folículo atinge o estágio pré-ovulatório com diâmetro ≥ 35 mm, há aumento da concentração plasmática do LH que desencadeia uma série de eventos dentro do folículo pré-ovulatório que levam à ovulação (Ginther, 2017).

Na espécie equina, o CL é uma glândula endócrina temporária dentro do ovário que se forma na parte interna não se projetando para a parte externa (Aurich, 2011). O CL equino é responsável pela síntese de progesterona (P4) que atingem o pico no 8º dia após a ovulação, seguido de um declínio gradual até o 15º dia, se a égua não estiver gestante ou espontaneamente perder o embrião. Nesta situação ocorre secreção de prostaglandina F2 α que tem origem endometrial levando a égua a retornar ao estro. Porém, se houver fertilização, o CL permanece ativo e a progesterona se mantém a níveis altos contribuindo para manutenção a gestação (Sieme *et al.*, 2015). Com altos níveis de P4, se tem uma perda do edema uterino e da receptividade ao macho. Além disso pode-se observar um aumento do tônus uterino e estímulo a secreção histotrófica para nutrição embrionária (Vallejo Aristizábal *et al.*, 2017).

2.4 Endometrite Equina

A endometrite é frequentemente citada com uma das principais causas de infertilidade na égua. Contudo, recentemente, pesquisadores tem definido a endometrite como uma reposta imunológica natural à introdução de sêmen no trato reprodutivo da égua. Em éguas férteis, esta inflamação fisiológica se resolve com a remoção do fluido uterino, sêmen e bactérias dentro de 48h após a inseminação. Se essa inflamação persiste por mais de 48hs, surge então a condição patológica de endometrite persistente pós-cobertura. Se não tem resolução dessa endometrite pós-cobertura, essa condição patológica pode progredir para uma endometrite infecciosa aguda e progredir para uma endometrite crônica com degeneração endometrial (Morris; McCue; Aurich, 2020).

A endometrite é a patologia reprodutiva mais comum em equinos causando infertilidade ou subfertilidade e são alterações inflamatórias agudas ou degenerativas do endométrio (Liu; Troedsson, 2008; Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020). A capacidade de manter um ambiente uterino compatível com a vida embrionária e fetal é essencial para a eficiência reprodutiva em qualquer espécie. No entanto, o ambiente uterino é facilmente perturbado por um processo inflamatório agudo ou crônico após invasão bacteriana aeróbica e anaeróbica e/ou por fungos, que pode ocorrer durante a monta natural, inseminação artificial, exames de pré-estação de monta, infecção antes e após o parto, e principalmente durante um período limpeza pós-parto do útero (Satué; Gardon, 2016). Alguns autores também acreditam que a endometrite possa ser causada por uma disbiose do microbioma comensal uterino (Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020; Morrell; Rocha, 2022).

Os fatores predisponentes para a progressão da endometrite são conformação perineal alterada, tônus vulvar diminuído, anormalidade cervical, diminuição da contratilidade uterina, administração crônica de antibióticos, útero penduloso, disfunção da pars intermedia da hipófise, má condição corporal, idade e quantidade de partos (Ferris, 2016). A maioria das perdas devido à endometrite está relacionada à idade e quantidade de partos. Observa-se um

aumento nos últimos 10 anos na porcentagem de éguas que receberam tratamento uterino do grupo de 3 a 8 anos de 9% para 26% e do grupo de >18 anos de 24% para 51% (Morris; McCue; Aurich, 2020).

Éguas pluríparas e idosas (>15 anos de idade) tem três vezes mais chance de apresentar lesões vasculares como elastose, fibroelastose, fibrose perivascular e calcificação dos vasos quando comparado a éguas nulíparas (LeBlanc; Causey, 2009). Estudos mostram que potros oriundos dessas éguas tendem a apresentar um crescimento retardado devido ao fraco desenvolvimento placentário na unidade feto-placentária (Allen *et al.*, 2007). As angiopatias diminuem o fluxo sanguíneo e a perfusão do útero, que por sua vez pode afetar o edema endometrial, a depuração uterina, a função glandular, desenvolvimento do concepto e, portanto, fertilidade geral. A degeneração vascular não se limita ao endométrio, mas também pode ser encontrada nos vasos do miométrio e nas grandes artérias e veias entre as camadas miometriais circulares e longitudinais. A degeneração está associada ao número de potros e a classificação do grau de lesão endometrial, mas não idade (Katila; Ferreira-Dias, 2022).

Além disso, endometrites causadas por microrganismos formadores de biofilme como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e algumas leveduras e fungos, podem desencadear endometrites crônicas nessas éguas por uma série de fatores agregados (Leblanc, 2010). Também pode ser observado que éguas com idade acima de 16 anos tendem a secretar uma maior quantidade de metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandina E2 e F2 α) modificando ainda mais o equilíbrio imunoendócrino do seu organismo (Siemieniuch *et al.*, 2017).

Em éguas férteis, ocorre uma inflamação fisiológica natural e transitória quando se detecta a presença de espermatozoides no útero para a remoção eficaz das bactérias, detritos e excesso de espermatozoide através da fagocitose. Os neutrófilos juntamente com a prostaglandina E2 e F2 α , ocitocina, citocinas pró e anti-inflamatórias, ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) chegam ao lúmen uterino em 30 min após a inseminação. As COX e LOX levam ao aumento da permeabilidade vascular e um influxo de proteínas séricas e neutrófilos para formação de uma camada extracelular de neutrófilos no lúmen endometrial atingindo o pico de ação com 4-8h após a inseminação. As contrações uterinas colaboram na retirada da maior parte do líquido, bactérias opsonizadas e espermatozoides mortos em até 12h e depois disso o restante do líquido é drenado pelo sistema linfático de 12-36h. Essas éguas são classificadas como resistentes a endometrite (LeBlanc; Causey, 2009; Woodward; Troedsson, 2015; Canisso; Stewart; Da Silva, 2016; Troedsson; Woodward, 2016; Christoffersen; Troedsson, 2017; Morris; McCue; Aurich, 2020; Katila; Ferreira-Dias, 2022).

Já as éguas susceptíveis à endometrite são as que apresentam falha no processo de limpeza depois de 48h pós-cobertura produzindo uma endometrite persistente. Ocorre um retardamento do aumento da resposta as citocinas pró-inflamatórias, luteólise precoce, atraso e assincronia das contrações uterinas, aumento na produção endometrial de óxido nítrico e acúmulo de líquido. A endometrite persistente pós-cobertura ocorre em cerca de 10-15% das éguas inseminadas. Dessa forma, as éguas são classificadas como suscetíveis e resistentes a endometrite com base na sua capacidade de eliminar ou não bactérias, detritos e espermatozoides mortos do trato reprodutivo (LeBlanc; Causey, 2009; Woodward; Troedsson, 2015; Satué; Gardon, 2016; Troedsson; Woodward, 2016; Celeghini *et al.*, 2017; Christoffersen; Troedsson, 2017; Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020; Morris; McCue; Aurich, 2020; Katila; Ferreira-Dias, 2022).

A persistência do acúmulo de líquido uterino por 3-5 dias pós-inseminação, principalmente por falha na contratilidade mioelétrica pode desencadear uma endometrite clínica. Os sinais observados na endometrite clínica são líquido ecogênico no útero e líquido no útero durante o diestro, edema uterino exacerbado, secreção do orifício cervical com hiperemia, vaginite, corrimento vaginal, intervalos interestros curtos, citologia uterina positiva

ou não, cultura microbiológica uterina positiva, diminuição da perfusão tecidual que resulta numa quantidade inadequada de neurotransmissores, hormônios e células inflamatórias ao tecido endometrial, falha de cooptação vulvar com alongamento da mesma por conta do aumento da idade e/ou parições resultando em pneumovagina (LeBlanc; Causey, 2009; Woodward; Troedsson, 2015; Ferris *et al.*, 2017; Morris; McCue; Aurich, 2020). As infecções por *Streptococcus spp.*, coliformes fecais, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* são mais encontradas nas endometrites clínicas (Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020).

Na endometrite subclínica muitos destes sinais não são observados podendo levar a um erro de diagnóstico. A endometrite subclínica é característica de éguas pluríparas e adultas. Fatores como anomalias anatômicas e degeneração uterina contribuem para a presença da infecção. Características como disfunção mucociliar, cicatrizes, cistos e atrofia das pregas endometriais e diminuição da perfusão tecidual estão associadas a subfertilidade dessas éguas (LeBlanc; Causey, 2009). Uma pesquisa sugere que as concentrações séricas de IL-6, IL-10, proteína sérica amiloide A e os níveis plasmáticos de prostaglandina E2 e F2 α poderiam ser usados para prever a endometrite subclínica em éguas (Hedia *et al.*, 2021).

Com relação às endometrites crônicas, observar-se o comprometimento da depuração uterina e contratilidade miometrial desempenhando um papel importante na patologia (Liu; Troedsson, 2008). Outros fatores encontrados estão relacionados à idade, alteração da conformação perineal e competência cervical (Morrell; Rocha, 2022). Os microrganismos mais frequentemente encontrados são a *Escherichia coli* e o *Streptococcus equi subespécie zooepidemicus* por apresentar infecções latentes e profundas no endométrio das éguas (Katila, 2016; Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020). Geralmente está relacionada a uma condição subjacente como uma pneumovagina e a formação de biofilme por essas bactérias (Beehan *et al.*, 2015). O diagnóstico definitivo é por biópsia onde observa-se fibrose periglandular e endometrial, além de infiltrados com linfócitos e plasmócitos (Satué; Gardon, 2016; Schöninger; Schoon, 2020).

A égua possui três mecanismos principais de defesa para prevenir infecções uterinas: as barreiras físicas do trato reprodutivo, o sistema imunológico inato e a depuração uterina mecânica (Ferris *et al.*, 2017). As barreiras físicas incluem a vulva, o esfíncter vestibulo-vaginal e a cérvix. A alteração funcional de uma dessas barreiras contribui para a irritação uterina propiciando a entrada de ar e bactérias. O ideal é que a vulva apresente os lábios colabados na vertical com 2/3 do comprimento vulvar posicionados abaixo da borda pélvica e 1/3 do comprimento vulvar acima da borda pélvica (Canisso; Stewart; Da Silva, 2016; Satué; Gardon, 2016). O procedimento cirúrgico de Caslick é a técnica mais utilizada para a diminuição da recidivas em éguas com conformação vulvar alterada (Liu; Troedsson, 2008).

Dentre as éguas gestantes, esta doença infecciosa pode aparecer como fracasso na concepção, perdas embrionárias precoces, abortamento durante a gestação, placentite, nascimento de recém-nascido séptico e metrite pós-parto. A endometrite pós-parto interfere na fertilidade, criando um ambiente inadequado para o desenvolvimento embrionário e placentação, podendo também serem observadas alterações na produção de leite e comportamento materno, sendo capaz de afetar a sobrevivência de seus filhotes (Pascottini *et al.*, 2023).

Apesar disso, a endometrite tem uma incidência menor em éguas paridas do que em éguas que permaneceram vazias da estação de monta anterior (Krekeller *et al.*, 2023). Assim sendo, este é um dos principais obstáculos para a produção de um número maior de potros vivos e saudáveis de éguas gestantes durante a estação. Porém, a combinação do exame microbiológico, citologia e biópsia uterina podem contribuir para o melhor desempenho diagnóstico em éguas subférteis. A chave para o sucesso do gerenciamento dessas éguas é identificá-las antes ou logo após o parto e manejar apropriadamente. (Satué; Gardon, 2016).

2.4.1 Endometrite bacteriana

Na indústria dos equinos, a endometrite infecciosa de origem bacteriana representa cerca de 25% a 60% de perdas econômicas, levando à infertilidade dos animais. Diferentes bactérias aeróbicas e anaeróbicas podem entrar no útero durante a monta natural, inseminação artificial, exames reprodutivos, partos e no pós-parto que se torna um ponto crítico, pois há um relaxamento uterino e cervical aumentando por causa do processo de parto (Satué; Gardon, 2016).

Assim, deve-se atentar as bactérias presentes na microbiota vaginal que são comensais nesse local, mas podem se tornar patológicas na região uterina. Foi constatado que não há mudanças na população bacteriana entre o estro e o diestro, sendo as mais encontradas em *Porphyromonas spp.*, *Campylobacter spp.*, *Arcanobacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Kiritimatiaellae spp.* e *Akkermansia spp.* não cultivadas (Barba *et al.*, 2020).

A endometrite bacteriana é um dos principais problemas em éguas cíclicas com baixa resistência a infecções. As bactérias patogênicas mais comumente isoladas do útero das éguas são: a *Streptococcus β-hemolítico (Streptococcus equi ssp. zooepidemicus)*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. As bactérias não patogênicas frequentemente isoladas foram as do gênero *Bacillus* (Ferris, 2016; Rua *et al.*, 2016).

Em um estudo descrito na literatura foram encontradas uma maior frequência de outros tipos de bactérias como: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter sp.*, *Edwardsiella*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia spp.* e *Alcaligenes spp.* (Cabrera; Pastorello; Alvarenga, 2016). As infecções podem ser causadas principalmente por microrganismos oportunistas e/ou comensais, como *Streptococcus equi subespécie zooepidemicus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Ou por bactérias como *Taylorella equigenitalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* que são transmitidas por via venérea (Satué; Gardon, 2016).

As bactérias variam na capacidade de aderir aos epitélios, na viscosidade de suas secreções, na resistência à fagocitose e na capacidade de induzir infecção (Morrell; Rocha, 2022). Algumas dessas bactérias produzem biofilme ou permanecem em estado de latência podendo ser as responsáveis pela subfertilidade em muitas éguas. A formação do biofilme envolve múltiplas etapas que inclui a fixação pelas fímbrias, proliferação e deslocamento durante a infecção. Após a adesão das bactérias na superfície uterina, ocorre a formação de uma matriz extracelular de polissacarídeos. Com o crescimento da população bacteriana, o ambiente dentro do biofilme se torna heterogêneo, com altas concentrações de oxigênio e um pH neutro (Ferris *et al.*, 2017; Liu; Zhang; Ji, 2020).

A vantagem de um biofilme vivo para as bactérias é a capacidade de replicação genética em taxas aceleradas e desempenha a função de barreira para a difusão de antimicrobianos limitando a penetração e gerando resistência a terapia e ao sistema imunológico do hospedeiro (Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020). As bactérias que produzem biofilme e estão ligadas a endometrite equina são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus equi subespécie zooepidemicus* e *Staphylococcus aureus* (Morris; McCue; Aurich, 2020; Morrell; Rocha, 2022).

Nervo *et al.* (2019) salientaram a presença de *Chlamydia abortus* na endometrite crônica de éguas subférteis. A *Chlamydia abortus* é uma bactéria gram negativa intracelular obrigatória sendo muito conhecida por ser o agente do abortamento enzoótico ovino. O grupo de pesquisadores reforça a busca pelo histórico do contato de ovelhas com éguas nas endometrites confirmadas por essa bactéria.

Outro grupo de pesquisadores demonstrou que nas mulheres, a endometrite bacteriana crônica está relacionada a presença de nove patógenos diferentes: *Chlamydia trachomatis*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Klebsiella pneumoniae*,

Mycoplasma hominis, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus aureus* (Moreno *et al.*, 2018).

Apesar da infecção bacteriana em sua maioria se comportar de forma semelhante algumas apresentam características próprias. A *Escherichia coli* tende a aderir à superfície epitelial impedindo a sua remoção física e apresenta correlação com citologia endometrial negativa (Nielsen *et al.*, 2010). Apresenta alta prevalência na fossa clitoriana como potencial reservatório para infecção uterina ascendente (Beehan *et al.*, 2015) e está associada ao líquido uterino turvo e a presença de muco (Katila, 2016).

A *Pseudomonas aeruginosa* produz biofilme podendo resultar em infecções crônicas após tratamentos prolongados. A *Klebsiella pneumoniae* e outros patógenos gram negativos aumentam a viscosidade do muco uterino diminuindo a capacidade dos cílios de se mover (LeBlanc; Causey, 2009). Também pode ser observada a presença de líquido intrauterino pelo exame ultrassonográfico (Leblanc, 2010).

A família de estreptococos estimula a produção de um exsudato inflamatório que interfere na fagocitose dos neutrófilos, apresentando uma correlação com citologias endometriais positivas com alto número de neutrófilos. Também diminuem a viscosidade do muco uterino aumentando o líquido intrauterino que pode ser observado por exame ultrassonográfico (LeBlanc; Causey, 2009; Leblanc, 2010).

O *Streptococcus equi subsp. zooepidemia* é um dos patógenos mais comumente isolados do útero de éguas, entretanto outras espécies de estreptococos, incluindo *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* e *S. equi subsp. equi (S. equi)* também foram isolados do endométrio equino (Morris; McCue; Aurich, 2020). Apresentam capacidade de causar infecção crônica latente por residir profundamente no tecido endometrial gerando baixas taxas de prenhez nas éguas afetadas. Está altamente associado ao aumento da idade, número elevado de parições e má conformação vulvar nas éguas. (Christoffersen *et al.*, 2015a).

2.4.2 Endometrite fúngica

A endometrite fúngica apresenta uma baixa incidência (1-5%) dentre as patologias uterinas, estando mais comumente relacionada ao uso generalizado de antibióticos podendo gerar disbiose e a manipulação intensiva das éguas dentro das biotécnicas da reprodução (Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020; Morris; McCue; Aurich, 2020; Morrell; Rocha, 2022).

O fungo ou levedura ao entrar no útero induzem uma resposta inflamatória aguda e o lúmen preenchido por neutrófilos e linfócitos ricos em proteínas que podem gerar uma secreção vulvar purulenta. São microrganismos que permanecem mais restritos ao lúmen não tendo características de infecções nas camadas mais profundas. A maioria das éguas pode apresentar uma recuperação espontânea com rápida eliminação do fungo. As infecções micóticas variam de síndromes graves a assintomáticas com sintomas não patognomônicos, pois por muitos anos o diagnóstico desta patologia ocorria como exame de exclusão para endometrite bacteriana (Blue, 1987).

A endometrite fúngica nas éguas apresenta, em sua maioria, um potencial patogênico para fungos leveduriformes e menos frequentemente para os filamentosos. Os fungos leveduriformes mais comumente isolados são *Candida spp.*, principalmente a *Candida albicans*. Já os fungos filamentosos são dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Trichosporon*. Dentre as espécies de fungos e leveduras isolados observa-se *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon penicillatum* e *Trichosporon capitatum*. (Blue, 1987; Ribas; Carvalho; Stussi, 2014; Satué; Gardon, 2016; Factor; Cruz; Orlandi, 2019).

Como as bactérias que ocasionam as endometrites são essencialmente contaminantes e oportunistas, infecções mistas entre fungos e bactérias podem ocorrer. A *Pseudomonas aeruginosa* é uma das bactérias mais encontradas em associação com fungos e leveduras.

(Ribas; Carvalho; Stussi, 2014; Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020; Morris; McCue; Aurich, 2020).

Algumas espécies de leveduras e fungos apresentam capacidade de produzir biofilme, uma matriz extracelular que gera resistência à terapia e a defesa imunológica do organismo podendo resultar em infecções crônicas após tratamentos prolongados (Leblanc, 2010).

2.4.3 Métodos de diagnóstico na endometrite equina

O diagnóstico de endometrite é baseado no histórico da égua, exame físico, reprodutivo e diagnóstico laboratorial. Dentre esses exames estão inclusos: ultrassonografia transretal, exame vaginal e cervical, citologia endometrial, cultura microbiológica do endométrio, biopsia endometrial e em alguns casos a histeroscopia (LeBlanc; Causey, 2009). Pelo fato da endometrite ser uma infecção local e raramente apresenta um agravo sistêmico, o leucograma e os marcadores inflamatórios (fibrinogênio, proteína amiloide sérica A, haptoglobina) não se alteram (Katila, 2016).

Antigamente os métodos para detecção da endometrite se baseavam na observação da inflamação da cérvix e do útero com auxílio de um espéculo para realização dos exames de citologia endometrial e cultura uterina. Com o início do uso da ultrassonografia foi possível detectar estágios iniciais de infecções uterinas com padrões anormais de edema e linhas hiperecóticas característico de ar ou exsudato; depuração uterina comprometida; e a quantidade e aspecto do líquido presente no útero (Liu; Troedsson, 2008; Pascottini *et al.*, 2023).

A presença de 2 a 3cm de líquido intrauterino durante o estro ou entre 6 e 36h pós-cobertura são indicadores de uma égua suscetível a endometrite (Leblanc, 2010; Christoffersen; Troedsson, 2017; Morris; McCue; Aurich, 2020; Katila; Ferreira-Dias, 2022). A US Doppler trouxe ao mercado uma ferramenta inovadora, tornando mais fácil de assegurar o diagnóstico de endometrites subclínicas pela avaliação do fluxo sanguíneo local e uma análise mais precisa da fisiologia de ovários e útero (Ginther, 2007; Camargo Ferreira; Meira, 2011).

2.4.3.1 Coleta de material

A literatura demonstra algumas formas de coleta de material uterino incluindo escova citológica, swab, lavado de baixo volume e biopsia endometrial. Comumente utiliza-se a escova citológica e o swab uterino como técnicas de triagem inicial para os exames de citologia endometrial e cultura microbiológica. Com os resultados apresentando-se negativos e a égua demonstrando sinais clínicos sugestivos de endometrite é indicado o uso da técnica de biopsia endometrial e lavado de baixo volume para confirmar ou descartar a presença da endometrite (Buczowska *et al.*, 2014; Ferris, 2016; Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020).

A escova citológica se demonstrou mais sensível para detecção de inflamação uterina quando comparada ao swab (Ferris, 2016; Rua *et al.*, 2016). E a utilização do swab se tornou uma técnica comum na rotina a campo, por ser uma técnica barata, fácil e segura. Porém apresenta como desvantagem coletar material de uma pequena parte do endométrio, em torno de 1-2cm podendo gerar um resultado falso negativo (Canisso; Stewart; Da Silva, 2016).

Em 2020, Khone e colaboradores fizeram uma pesquisa de campo para entender quais métodos de diagnóstico e tratamentos os médicos veterinários da região nordeste da Europa realizavam. Foi constatado que a técnica de amostragem mais popular na rotina era o exame de cultura bacteriana, mas a citologia endometrial, lavado de baixo volume e biopsia endometrial não eram utilizados na rotina para o diagnóstico da endometrite em éguas.

Alguns estudos demonstram que o lavado de baixo volume é a técnica com melhor aproveitamento para a avaliação de cultura microbiológica quando comparado ao swab endometrial e de pior aproveitamento quando comparada a escova citológica para avaliação da citologia endometrial. Essa técnica resulta na diminuição de resultados falso negativos na pesquisa por microrganismos (Leblanc, 2010; Ferris, 2016).

Christoffersen e colaboradores (2015b) descreveram uma técnica de lavagem de baixo volume diferente. Neste caso era utilizada uma sonda de lavagem estéril, camisa sanitária, um espéculo de aço estéril e uma bolsa de soro Ringer Lactato. O uso de um tubo de lavagem descartável e um sistema fechado de tubulação de fluido foi vantajoso para o trabalho a campo que pode ser conduzido por uma pessoa. A sensibilidade do crescimento bacteriano da técnica de lavado com dupla proteção foi considerada superior em comparação a técnica de lavado de baixo volume descrito por LeBlanc (2010), com a biópsia uterina e com o swab uterino do mesmo experimento (0,75; 0,5; 0,3 respectivamente).

Em 2022, Ravaioli *et al.* apontaram que o lavado uterino com alto volume de líquido aumenta significativamente a sensibilidade do exame bacteriológico que aliado com o enriquecimento do processamento laboratorial ampliou a taxa de isolamento de microrganismos. Uma outra técnica testada foi o lavado do fragmento de biópsia endometrial para realização do exame de cultura microbiológica e citologia endometrial e posteriormente a avaliação histopatológica. Porém essa técnica demonstrou baixa sensibilidade quando comparada a técnica do swab ou escova citológica (Teixeira Soares *et al.*, 2022).

2.4.3.2 Cultura microbiológica

O material para realização da cultura microbiológica deve ser sempre coletado antes de qualquer procedimento uterino a fim de evitar possíveis contaminações. E no caso de se coletar amostras para cultura fúngica e bacteriana preconiza-se a primeira coleta para cultura fúngica por apresentar uma maior dificuldade de crescimento em meio com muitas colônias bacterianas. A coleta de material para esse exame pode ser feita por swab uterino, lavado de baixo volume ou cultura da biópsia, sendo esta última técnica a mais sensível e específica para a detecção dos microrganismos (Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020).

Na coleta de material para este exame utiliza-se swab para envio de amostra para pesquisa de culturas fúngicas e bacterianas. Nesta técnica a cânula que protege o swab é posicionada na cérvis e transpassado até o lúmen uterino. Nesse momento o swab é exposto pôr 30s na região realizando movimento giratório horário e anti-horário para a coleta do material uterino. Posteriormente o swab é retraído e protegido para ser retirado da égua e colocado em meio de transporte para ser analisado no laboratório (Ferris, 2016).

As bactérias anaeróbias não têm grande importância na casuística da endometrite equina, por tanto as análises laboratoriais são realizadas em condições aeróbicas. O método normalmente empregado é a incubação em placas de ágar sangue a 37°C (Katila, 2016).

As placas são avaliadas em 24h e em 48h, se necessário. O diagnóstico é baseado em tamanho da colônia, morfologia, pigmentação e hemólise. Ágares especiais e testes de coloração de Gram podem ser usados para identificação adicional das bactérias. Para análise das colônias bacterianas, sugere-se que uma unidade formadora de colônia (UFC) não é indicativa de infecção, mas sim de contaminação, e que uma monocultura (ou *Escherichia coli* juntamente com *Streptococcus β-hemolítico*) com quatro UFC de organismos patogênicos são indicativos de infecção (Katila, 2016).

Para cultura bacteriana preconiza-se que as placas semeadas permaneçam por 48-72h na estufa por conta de bactérias de crescimento lento, e para cultura fúngicas é necessário que as placas semeadas permaneçam por 3-4 semanas por conta da longa fase de crescimento micótico e uma identificação mais precisa (Morris; McCue; Aurich, 2020).

A cultura a partir de lavado uterino parece ser útil na detecção de éguas com endometrite subclínica causada por *Escherichia coli*. A técnica de coleta de material com lavagem de baixo volume demonstrou uma maior sensibilidade que a técnica de coleta de material com swab uterino, pois algumas bactérias formam-se em placas (LeBlanc; Causey, 2009, Katila, 2016). Um estudo demonstrou que éguas que apresentavam cultura positiva para bactérias gram

positivas tendiam a aumentar CD14 e TNF- α em comparação positivas para bacterinas gram negativas (Lecton *et al.*, 2023).

2.4.4.3 Citologia endometrial

A citologia endometrial é um exame que pode ser usado para avaliação do tipo e da proporção de células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, outros leucócitos) em relação as células epiteliais do útero. Ocasionalmente, também pode detectar colônias bacterianas, hifas, leveduras e cristais de urina. As células de defesa migram para o lúmen uterino em resposta à inflamação, então a endometrite é diagnosticada pelo exame de escarificação do endométrio uterino. A coleta do material pode ser feita pela escova citológica ou por lavado de baixo volume que apresenta sensibilidade superior ao uso do swab uterino para análise desta técnica (Rua *et al.*, 2016; Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020; Nielsen; Fog; Bojesen, 2021).

Neste exame utiliza-se escova citológica para coleta de amostra com melhor quantidade de celularidade e diminuição de artefatos na leitura do exame. Nesta técnica a cânula que protege a escova citológica é posicionada na cérvix e transpassado até o lúmen uterino. Nesse momento a escova citológica é exposta em torno de 30s. na região realizando movimento giratório horário e anti-horário para a coleta do material uterino. Posteriormente a escova citológica é retraída e protegida para ser retirada da égua, transcorrida em lâmina de vidro com movimentos giratórios para fixação da amostra e em seguida fixada por corantes para análise das amostras microscopicamente (Ferris, 2016; Factor; Cruz; Orlandi, 2019).

A avaliação microscópica das lâminas é baseada na proporção de células endometriais e neutrófilos, ou a quantidade de neutrófilos por campo ou ainda a quantidade total de neutrófilo de uma lâmina total. As variações de análise se distinguem entre diferentes autores citados no quadro a seguir (Quadro 1) (Factor; Cruz; Orlandi, 2019).

Quadro 1: Diferentes tipos de avaliação e contagem de neutrófilos no exame citológico para classificação de endometrite nas éguas.

Autor	Classificação
Nielsen (2005)	> 0,5% de neutrófilos
Aguiar et al. (2006)	> 2% de neutrófilos
Riddle et al. (2007)	> 2 neutrófilos em 10 campos (400x)
LeBlanc et al. (2007)	\geq 1 neutrófilo por campo em 10 campos (1000x)
Burleson et al. (2010)	> 2 neutrófilos por campo (400x)
Overbeck et al. (2011)	> 2% de neutrófilos (1000x)
Cocchia et al. (2012)	> 2 neutrófilos por campo e >0,5% de neutrófilo (1000x)
Overbeck et al. (2013)	> 2% de neutrófilos em 300 células contadas

Adaptado de Factor; Cruz; Orlandi, 2019.

Na citologia endometrial das éguas observam-se células epiteliais que podem variar de cuboides (anestro) a colunares (estro). As células epiteliais escamosas são raras no útero das éguas. Quando presentes estão associadas a éguas pós-parto ou éguas que apresentam refluxo urinário para o útero. São células características quando há processo de contaminação cervical. A presença de células epiteliais uterinas rompidas ou degeneradas estão associadas a um inadequado manuseio das amostras antes da coloração ou a uma infecção crônica (Ferris, 2016).

A citologia está diretamente relacionada à taxa de gestação onde éguas com 0-2 neutrófilos por campo apresentaram taxa de gestação de 60%, enquanto éguas com 3-5 neutrófilos tiveram taxa de gestação de 36% e éguas com mais de 5 neutrófilos por campo tiveram taxa de gestação de 23% (Nielsen *et al.*, 2010; Canisso; Stewart; Da Silva, 2016).

Em um estudo foi demonstrado que a citologia está intimamente ligada a ecogenicidade do líquido encontrado durante o exame ultrassonográfico. Foi demonstrado neste estudo que a ecogenicidade variava proporcionalmente a quantidade de leucócitos visualizados na citologia endometrial e que a incidência de endometrite estava relacionada a idade dos animais (Rahawy; Al-Haaik; Hayawy, 2022). E outro estudo constatou que éguas com exame de citologia endometrial positiva tinham associação com o aumento da concentração de IL-1 β e diminuição de IFN- γ e CCL5 e a presença de líquido uterino aumentava IL-17 (Lecton *et al.*, 2023).

Observou-se que o exame citológico apresenta uma baixa sensibilidade na detecção de endometrites causadas por bactérias gram negativas. Ou seja, éguas com endometrite bacteriana por *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* tendem a apresentar exame citológico negativo, enquanto endometrites por *Streptococcus β -hemolítico*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* tendem a apresentar exame citológico positivo. A mesma característica foi comparada ao líquido intrauterino, onde o exame citológico negativo estava relacionado a microrganismo sem a presença de líquido (endometrite subclínica) enquanto o exame citológico positivo estava relacionado a microrganismo com a presença de líquido (endometrite clínica e aguda) (Leblanc, 2010; Christoffersen *et al.*, 2015b; Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020).

As infecções fúngicas podem ser detectáveis por citologia cervical ou uterina. Mesmo sem secreção vulvar evidente, há a presença de neutrófilos e hifas fúngicas nos esfregaços cervicais. E nos esfregaços uterinos 80% das estruturas fúngicas podem ser observadas (Blue, 1987; Ribas; Carvalho; Stussi, 2014).

Outras possíveis causas para uma citologia positiva, além da endometrite, seriam a pneumovagina, refluxo de urina para o útero, presença de sêmen e produção excessiva de muco endometrial (Leblanc, 2010).

2.4.4.4 Biópsia endometrial

A biópsia uterina é o único exame em que se pode avaliar a integridade estrutural do endométrio em relação aos infiltrados inflamatórios, mudanças fibróticas e dilatação de glândulas endometriais e vasos linfáticos. É realizada principalmente para melhor detalhar avaliações de anormalidade que possam afetar o endométrio como lesões. Serve também para determinar o potencial de fertilidade da égua em relação às características do endométrio, porque, em contraste com as técnicas de cultura microbiológica e a citologia uterina, que primeiramente avaliam fatores inflamatórios superficiais, a biópsia permite a avaliação de infiltrados profundos e fibroses ao redor das glândulas, dilatação de glândulas, densidade glandular, assim como mudanças estacionais (Rua *et al.*, 2016). É a técnica mais indicada quando há suspeita de endometrite crônica (Moreno *et al.*, 2018; Pascotinni *et al.*, 2023), e contraindicada em éguas gestantes, devido ao risco de ruptura de membranas fetais assim como o risco de ocorrer liberação de prostaglandina e sangue no interior do útero (Rua *et al.*, 2016).

Nesta técnica a pinça de Yeoman, tipo “boca de jacaré” é posicionada na cérvix e transpassado até o lúmen uterino com seu mecanismo de corte fechado. Posteriormente, por palpação transretal, o mecanismo de corte da pinça é aberto e posicionado na região de interseção entre o corpo e corno uterino na parte dorsal. Para coleta do material é realizado um movimento giratório e de tração simultâneo e firme e então o material é retirado do útero. A amostra coletada pode ser submetida à cultura microbiológica por swab, a citologia endometrial com a escova citológica e em seguida colocada em fixador de Bouin por 12-24h e transpassado para formol para fixação da amostra e avaliação histológica (Ferris, 2016). O tamanho mínimo

da amostra coletada deve ser de 10x3x3mm (Schöninger; Schoon, 2020) sendo o tamanho ideal de 20x4x3mm (Rua *et al.*, 2016).

As biopsias coletadas durante o período de anestro mostram atrofia endometrial sazonal. Já as amostras coletadas durante o período de ciclicidade exibem glândulas endometriais regulares e ativas e morfologia endometrial funcional. Durante a fase de diestro percebe-se uma maior densidade glandular causado pelo aumento da tortuosidade das glândulas e redução do edema estromal. Diferentemente, na fase de estro se tem o alinhamento glandular e aumento do edema estromal (Schöninger; Schoon, 2020).

Na biopsia uterina, as lesões são classificadas como inflamatórias (aguda, subaguda ou crônica) e não inflamatórias, hipo ou hiperplasia endometrial e doenças crônicas degenerativas. A endometrite aguda é classificada pela presença de neutrófilos enquanto a crônica apresenta predominantemente linfócitos e alguns eosinófilos (LeBlanc; Causey, 2009). O grau de fibrose periglandular (leve, moderada ou grave) é determinado de acordo com o número de camadas periglandulares de células estromais e o número de ninhos fibróticos de glândulas dentro de um campo de visão microscópico linear com 5,0mm. A infiltração/inflamação eosinofílica pode ser provocada pela infecção por certas bactérias, vírus, fungos e parasitas, bem como por reações alérgicas (Schöninger; Schoon, 2020).

Uma escala de avaliação da qualidade endometrial das éguas com base nas glândulas e vasos linfáticos, alterações fibróticas e infiltrados de células inflamatórias foi desenvolvida para classificação uterina das éguas. Éguas grau I eram éguas consideradas saudáveis com as glândulas uterinas distribuídas de forma uniforme e com pouca ou nenhuma célula inflamatória. As éguas de grau IIA-IIB são éguas classificadas como potencialmente suscetíveis a endometrite pós-cobertura. E as éguas grau III foram às identificadas com glândulas uterinas dilatadas rodeadas por células fibróticas inativas, característico com processos degenerativos (Kenny; Doig, 1986; Woodward; Troedsson, 2013; Christoffersen; Troedsson, 2017; Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020).

Quando avaliadas amostras de biopsia de éguas vazias e prenhas entre os dias 7, 10 e 13 pós-ovulação observou-se que no dia 7 ocorreu grande perda das células ciliadas no grupo de éguas prenhas em comparação com o grupo vazias e células superficiais do endométrio mais salientes e em pequena quantidade de material histotrófico entre as dobras; no dia 10 a secreção glandular histotrófica e a secreção do epitélio luminal apresentaram-se mais intensa nas éguas prenhas; e no dia 13, grande quantidade de histotrófico foi observada dentro de grandes aberturas glandulares cercado por células ciliadas (Camozzato *et al.*, 2019).

Um outro estudo realizou avaliações histológicas do útero de éguas inseminadas e vazias no dia 5 pós-ovulação, sendo as éguas inseminadas subdivididas em um grupo onde as amostras foram coletadas entre 5.0 e 5.5 dias e outro grupo de amostras coletadas entre 5.5 e 6.0 dias. O grupo inseminado apresentou aumento no diâmetro glandular, diminuição na população de células ciliadas e um aumento na população de linfócitos, em comparação com o grupo vazio. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais em número de células poligonais microciliadas, percentagem de células planas ou salientes células no epitélio, quantidade de secreção sobre o epitélio, densidade glandular, diâmetro luminal das glândulas, altura do epitélio glandular, quantidade de secreção intraglandular, diâmetro dos vasos sanguíneos e número de eosinófilos e neutrófilos. Também não foi detectada diferença entre os subgrupos de éguas inseminadas (Caballeros *et al.*, 2019).

As avaliações histológicas para detecção da endometrite apresentam relação direta com a idade das éguas, sendo que a incidência da endometrite em éguas de 5 anos é de 32%, em éguas de 6 a 10 anos é de 66%, em éguas com idade entre 11 e 15 anos é de 84%, em éguas com idade entre 16 e 20 anos é de 90% e em éguas com mais de 20 anos de idade é de 92,5% (Schöninger; Schoon, 2020). Outras associações podem ser realizadas baseadas no resultados como: a elastose está associada ao aumento do número de partos; a linfangiectasia é secundária

a degeneração vascular em inflamações crônicas ou em éguas com deficiência na drenagem cervical; a perda de epitélio, exsudato excessivo e hiperplasia epitelial são indicadores de inflamação uterina crônica; alterações degenerativas (periglandular fibrose, ectasia glandular e linfangiectasia) são processos considerados normais no envelhecimento (>10 anos de idade) (LeBlanc; Causey, 2009; Schöniger; Schoon, 2020).

2.4.4.5 Exame ultrassonográfico modo B

O exame ultrassonográfico transretal do trato reprodutivo é essencial na avaliação não invasiva do útero e dos ovários, sendo considerado um método importante de diagnóstico da endometrite (Sertich, 2007). É fundamental uma monitorização ultrassonográfica contínua, de modo a detectar a presença e quantificar o volume de fluido intrauterino, visto que a observação de fluido no útero é considerada um dos principais sinais de endometrite (Liu, 2011).

O momento mais relevante para a observação ou não do fluido intrauterino é durante o diestro, pois a cérvix encontra-se fechada e desta forma, em uma égua saudável, esse fluido deveria estar ausente (Adams *et al.*, 1987). Esse líquido não apresenta distribuição uniforme dentro do útero, tendendo a se acumular no corpo e nas junções entre corpo e cornos uterinos, visto que o útero é um órgão suspenso pelos ligamentos largos do útero (Jones, 1995).

O fluido intrauterino deve ser avaliado quanto à distensão, à ecotextura e à persistência do fluido (Card, 2005). O acúmulo de líquido ≥ 2 cm observada durante o estro, ou entre as 6 e as 36 horas após a inseminação artificial são considerados indícios de suscetibilidade à endometrite pós-cobertura (LeBlanc; Causey, 2009; Brinsko *et al.*, 2011). Outros autores ainda relataram que o acúmulo de fluido uterino durante o período ovulatório está consistentemente associado à baixas taxas de gestação (Barbacini *et al.*, 2003)

Aumento da ecogenicidade do fluido uterino está relacionado com a presença de polimorfonucleares e detritos que são indicativos de inflamação (Card, 2005). Linhas hiperecóticas espessas e curtas podem representar ar ou exsudado (LeBlanc; Causey, 2009). Já um conteúdo anecótico normalmente é compatível com a existência de um transudado (Causey, 2007).

Outro sinal importante de endometrite visualizado pelo exame ultrassonográfico é a presença de edema uterino exacerbado (LeBlanc; Causey, 2009). O edema endometrial pode ser classificado em uma escala modificada do sistema descrito por Samper (2009), em que há uma graduação do edema em quatro níveis: grau 0 corresponde à ausência de edema; grau I há dificuldade na identificação das pregas endometriais; grau II há visualização das pregas; grau III as pregas endometriais são facilmente identificáveis e possuem as bordas hiperecóticas e centros hipoecóticos (como gomos de laranja); e grau IV corresponde ao edema exacerbado, com pregas endometriais excepcionalmente espessas, bordas hiperecóticas e marcada com uma baixa ecogenicidade central, verificando-se perda da arquitetura normal dos gomos de laranja (Parrilla-Hernandez *et al.* 2014).

O edema exacerbado pode ser causado por fatores não-inflamatórias como a incompetência cervical, reação vascular anormal ao estrogênio, patologia linfática ou atividade mioelétrica alterada, sendo considerado um marcador de patologias uterinas durante o estro. Seu aparecimento pode ocorrer conjuntamente com a presença de fluido uterino, indicativo de problemas da drenagem uterina (LeBlanc; Causey, 2009; Parrilla-Hernandez *et al.* 2014).

2.5 Ultrassonografia na Reprodução Animal

Entre 1980 e 1982 foi usado transdutor linear transretal de baixa frequência (3.0 MHz) pela primeira vez em éguas. Em 1983 que o transdutor linear transretal de frequência menos profunda (5.0 MHz) foi introduzido, trazendo um campo com maior possibilidade de informação e detalhe principalmente de estruturas próximas a parede do reto. Desta forma, as

pesquisas de imagens ultrassonográficas da ecotextura do trato reprodutivo nas éguas eram superiores as das mulheres, pois nestas ainda eram feitas US via abdominal (Ginther, 2014).

A US modo B é primordialmente empregada para a identificação anatômica de estruturas que podem ser avaliadas posteriormente pelos modos coloridos (Carvalho; Chammas; Cerri, 2008). O uso da US Doppler dentro da reprodução de grandes animais foi relatado pela primeira vez por pesquisadores alemães em 1998 em éguas e em 2000 em vacas. Eram avaliada velocidade de fluxo sanguíneo das artérias ovarianas e uterinas durante o ciclo estral e das artérias uterina e umbilical durante o período gestacional (Ginther, 2014).

2.5.1 Princípios da ultrassonografia doppler

A US Doppler é um método que fornece informações em tempo real da arquitetura vascular e dos aspectos hemodinâmicos dos vasos sanguíneos. Pode determinar a presença, a direção e o tipo de fluxo sanguíneo. Em 1842, Christian Johann Doppler descreve a situação na qual uma fonte de ondas (sonoras ou eletromagnéticas), que está em movimento em relação a um receptor, altera a frequência de onda durante este processo, aumentando a frequência durante a aproximação da fonte e diminuindo durante o seu distanciamento (Carvalho; Chammas; Cerri, 2008).

O efeito Doppler é o princípio físico no qual se verifica a alteração da frequência das ondas sonoras refletidas quando o objeto refletor se move em relação a uma fonte de onda sonora. As hemácias em movimento dentro dos vasos, ao encontrarem uma onda sonora, comportam-se como corpos refletores. Assim, a diferença entre a frequência do som transmitido (f_t) e a daquele refletido (f_r) é chamada deslocamento de frequência Doppler (f_d). Se o sentido do fluxo sanguíneo for em direção do transdutor, então a f_d será positiva, isto é, o eco retornado terá uma frequência mais alta. Se a direção do fluxo sanguíneo for ao sentido contrário do transdutor, então a f_d será negativa, isto é, o eco retornado terá uma frequência mais baixa. A detecção da arquitetura vascular para determinação do padrão de fluxo sanguíneo permite guiar biópsias de tecidos de forma mais segura, evitando grandes vasos ou áreas de intensa vascularização. A técnica ainda auxilia na caracterização de massas tumorais e fornece informações sobre a hemodinâmica de diversos órgãos vitais (Ginther, 2007).

2.5.2 Tipos de ultrassonografia doppler

Sendo assim, podemos definir que a US Doppler se baseia na movimentação das hemácias em relação ao transdutor, de maneira que as alterações de velocidade e de sentido do fluxo sanguíneo são representadas por imagens com específicas cores e tonalidades. A técnica de US Doppler apresenta três modos de ação distintos: modo-B, modo colorido e modo espectral (Ginther, 2007).

Os diferentes tipos de exame Doppler permitem um estudo da hemodinâmica de órgão como testículos, útero e ovários contribuindo no conhecimento de aspectos fisiológicos e patológicos e potencializando o exame ultrassonográfico na identificação precoce de certas patologias permitindo o monitoramento e tratamento mais efetivos (Ortega-Ferrusola, 2022).

2.5.2.1 Ultrassonografia doppler modo colorflow

Na US Doppler modo Color Flow a direção do fluxo sanguíneo em relação ao transdutor é representada, tradicionalmente, pelas cores: vermelho para fluxos positivos; e azul para fluxos negativos. Porém, atualmente os aparelhos mais modernos de Doppler já oferecem outras combinações de cores na representação dos fluxos positivos e negativos. Os fluxos de maior velocidade são expressos por tonalidades mais claras da cor referente ao sentido. A extensão da vascularização pode ser estimada pela porcentagem de pixel (sinais coloridos) de um tecido, que pode ser avaliada subjetivamente ou objetivamente (Bollwein; Heppelmann; Lüttgenau, 2016; Ortega-Ferrusola, 2022).

Romano et al. (2015) descreveram a técnica para avaliações subjetivas e objetivas das imagens a serem analisadas no sistema reproduzidor equino. Para a avaliação subjetiva é considerada a porcentagem (0% - 100%) da estrutura estudada com sinais Doppler colorido durante a imagem em tempo real em exame contínuo com vídeos de um minuto. Esses dados são gravados para posterior avaliação. Na avaliação objetiva é realizada a digitalização das imagens para um computador. Três imagens estáticas da estrutura representando os momentos de maior fluxo sanguíneo são salvas do aparelho de ultrassom para o computador e modificadas por programas computadorizados de edição de imagem. O número de sinais Doppler colorido são indicados pelo total do número e intensidade de pixels por imagem colorida, que são calculados pelo software ImageJ 1.31v (National Institutes of Health, Bethesda, MD). A intensidade do Doppler indica a maior velocidade do sangue considerando o grau de brilho dos pixels coloridos. A intensidade total de pixels é baseada no nível de brilho gerado por computador para cada pixel, somado para todos os pixels. Este protocolo serve tanto para avaliações via US Doppler modo Color Flow e modo Power Flow.

A US Doppler modo Color Flow e modo Power Flow pode ser eficaz para identificar éguas individuais que apresentem falha ou regressão de CL, antes de qualquer diminuição na concentração de P4, diminuição da área do CL ou alterações de ecogenicidade da imagem pelo modo B (Brogan *et al.*, 2016).

2.5.2.2 Ultrassonografia doppler modo powerflow

A US Doppler modo Power Flow aumenta a sensibilidade de exibição do fluxo sanguíneo dentro do tecido de três a cinco vezes, em comparação com o modo Color Flow. A maior sensibilidade permite a avaliação de vasos com pequeno diâmetro ou fluxo lento que não aparece em um fluxo de cor convencional por causa dos intervalos de velocidade incompatíveis e ângulos Doppler. O modo Power Flow é independente de ângulos Doppler e não é influenciado pelo “aliasing” (Ginther; Utt, 2004). A desvantagem é o acúmulo de imagem mais lento e, portanto, menor número de quadros gravados para formação do vídeo (Ginther, 2007).

Nesse modo, o fluxo sanguíneo é detectado e caracterizado na imagem permitindo inferir qualitativamente sobre o grau de vascularização em um tecido ou vaso. No modo Power Flow o fluxo é caracterizado de modo homogêneo, tradicionalmente, pela cor laranja, não permitindo determinar o direcionamento do fluxo. A velocidade do fluxo é indicada pela intensidade das cores, sendo que quanto mais clara for a cor, mais rápido é o fluxo e quanto mais escura for a cor, mais lento é o fluxo (Fogaça *et al.*, 2016).

2.5.2.3 Ultrassonografia doppler modo espectral

A US Doppler modo espectral é o único tipo de avaliação Doppler que permite quantificação do fluxo sanguíneo de um determinado vaso em tempo real. Os dados fornecidos por esse exame são: velocidade de pico sistólico, velocidade diastólica final, velocidade média no tempo e parâmetros de resistividade vascular periférica como o índice de pulsatilidade (PI) e o índice de resistividade (RI) (Ortega-Ferrusola, 2022).

O fluxo sanguíneo da artéria desejada é encontrado posicionando o cursor (“gate”) no lúmen da artéria para avaliação do volume da amostra. A frequência de repetição de pulso (PRF) é a frequência com a qual os pulsos são emitidos por segundo e é ajustada de acordo com o fluxo amostral. Esta técnica permite precisar a localização do volume de tecido do qual o sinal Doppler de fluxo sanguíneo foi coletado. O PRF determinará a frequência Doppler máxima detectável pelo equipamento sem ambiguidades (Carvalho; Chammas; Cerri, 2008).

As avaliações do volume das amostras são espelhadas em gráficos que representam a velocidade do fluxo sanguíneo da artéria em questão por vários tempos dentro do ciclo cardíaco ou de um pulso arterial individual (Ginther, 2014). Convencionou-se que o fluxo em direção ao transdutor fica disposto acima da linha de base e o fluxo que vai em direção contrária ao

transdutor fica disposto abaixo da linha de base. A linha de base representa fluxo sanguíneo zero (Carvalho; Chammas; Cerri, 2008).

Os parâmetros de resistividade vascular periférica são taxas calculadas a partir dos vários pontos da mudança de velocidade no ciclo cardíaco. Eles são especialmente úteis para as artérias tortuosas do trato reprodutivo porque elas são independentes do ângulo do transdutor ao ângulo de fluxo sanguíneo (Ginther, 2014). Os índices hemodinâmicos como a relação sístole-diástole, RI e PI permitem a comparação do fluxo durante a sístole e na diástole. RI e PI apresentam correlação negativa com a perfusão vascular do tecido irrigado pela artéria em questão, ou seja, quanto menores RI e PI maior será a perfusão vascular no tecido suprido por aquele vaso. Quando existe fase negativa no traçado do gráfico espectral, o PI é mais fidedigno (Bollwein; Heppelmann; Lüttgenau, 2016).

As alterações desses índices auxiliam na identificação de estenose, trombose e alterações na resistividade vascular associada à rejeição de transplantes e a disfunções de parênquima, ou na caracterização de malignidade de doenças (Carvalho; Chammas; Cerri, 2008). De forma geral, é observado um aumento dos índices em doenças isquêmicas ou em processos degenerativos e uma diminuição em condições inflamatórias devido a hiperemia (Ortega-Ferrusola, 2022).

2.5.3 Ultrassonografia doppler na reprodução animal

Em 2017, Ishak *et al.* demonstraram que nas éguas os folículos pré-ovulatórios (FPO) maiores e bem vascularizados produzem CL maiores com maior fluxo sanguíneo e com maior concentração sistêmica de P4. Essa seleção é um fator importante que pode levar a um ambiente uterino melhor para o estabelecimento da prenhez. Além disso, a repetição do diâmetro do FPO nos indivíduos durante a primavera e o outono pode fornecer indícios para estimar o melhor tempo de reprodução durante o período de transição. O menor fluxo sanguíneo de CL observado durante o último ciclo estral da estação reprodutiva é outro importante achado do estudo, que pode esclarecer a insuficiência lútea do período de transição.

Anos depois outra pesquisa, também relacionando vascularização folicular, luteal e concentração de P4, demonstrou que a idade é um fator que vai influenciar essa hemodinâmica e conseqüentemente a taxa de gestação (Requena *et al.*, 2021).

Com relação à taxa de gestação, pesquisas demonstram que uma maior taxa de gestação está associada a um maior fluxo sanguíneo em FPO. Pois foi observada uma maior percentagem de sinais Doppler do fluxo sanguíneo na parede folicular e uma redução nos índices Doppler de PI e RI nos vasos ovarianos em éguas que emprenhavam em comparação as éguas que não emprenhavam (Silva *et al.*, 2006).

A US Doppler modo Color Flow pode ser eficaz para identificar éguas individuais que apresentem falha ou regressão de CL, antes de qualquer diminuição na circulação [P4], diminuição da área do CL, alterações de ecogenicidade da imagem no modo B ou do que tónus uterino/cervical se tornam aparente (Brogan *et al.*, 2016).

Similarmente, pelas avaliações diárias do CL em éguas, entre o dia da ovulação até o oitavo dia pós-ovulação, foi notado que a área do CL é fracamente correlacionada com a perfusão vascular lútea e concentrações de P4. Uma correlação positiva foi observada entre perfusão vascular lútea e concentrações de P4 no plasma. Da mesma forma, o número de pixels coloridos e a intensidade total dos pixels foram correlacionados positivamente com a perfusão vascular e com concentrações de P4 em éguas (Romano *et al.*, 2015).

Em outra avaliação diária do CL, por meio da US Doppler modo Power Flow, observou-se um aumento transitório da área luteal total durante os primeiros dias após a ovulação. Foi demonstrado que éguas velhas apresentaram maior ($p < 0,05$) área lútea do que éguas jovens entre o 2° e 8° dia (D2 e D8) e entre 18° e 19° dia após ovulação (D18-D19). Porém as éguas velhas têm um aumento tardio ($p < 0,05$) da vascularização lútea durante os primeiros dias de

gestação. No entanto, os CL de éguas jovens e velhas tinham vascularização semelhante e constantemente alta ($p > 0,2$) a partir de D14. Também foi observado um aumento progressivo ($p < 0,05$) das concentrações plasmáticas de P4 observadas até D8 seguido por uma diminuição gradual, levando a níveis intermediários de P4 ($5,1 \pm 0,4$ ng / ml). Conclui-se assim que o CL recém-formado de éguas velhas sofreu uma remodelação estrutural compensatória para garantir o suprimento sanguíneo local e a saída contínua de P4 durante gestação precoce para manutenção da mesma não sofrendo com o efeito idade (Camargo Ferreira *et al.*, 2019).

Dentre as avaliações do CL, também foi demonstrada uma correlação positiva da concentração de P4 com a área do CL e com a área vascularizada do CL entre o 6° e o 18° dia após ovulação. Estes dados foram obtidos durante as estações de transição (primavera e outono) constatando que as variáveis apresentavam índices menores nos últimos ciclos (outono) do que nos primeiros ciclos (primavera) (Panzani *et al.*, 2017).

Em um estudo feito com receptoras de embrião dentro de um programa comercial de transferência de embrião utilizando a US Doppler Color Flow, foi possível constatar que o sucesso na taxa de gestação não é influenciado pela área luteal, mas sim pela perfusão sanguínea e concentração de progesterona. Outro achado significativo desta pesquisa foi que a alta taxa de perfusão vascular do corpo lúteo está mais associada a uma maior chance de manutenção da gestação quando comparada à concentração de progesterona (Morelli *et al.*, 2023).

2.5.3.1 Ultrassonografia doppler na avaliação uterina

A avaliação hemodinâmica do útero pode ser feita por dados espectrais coletados das artérias uterinas e suas ramificações (Bollwein *et al.*, 1998), ou por avaliações subjetivas ou objetivas do fluxo sanguíneo do endométrio que fornecem dados referentes a alterações locais e específicas da área avaliada (Silva *et al.*, 2005; Camargo Ferreira; Meira, 2011).

As primeiras investigações relacionando US Doppler com a fisiologia uterina equina foram realizadas por Stolla e Bollwein (1997), Mayer et al (1998) e Bollwein et al. (1998), que obtiveram um padrão cíclico no fluxo sanguíneo uterino. Bollwein et al. (1998) realizaram a mensuração do RI da artéria uterina em diferentes dias do ciclo estral equino verificando que não houve diferença entre os valores das artérias esquerda e direita. Não evidenciando correlação dos valores encontrados do fluxo com presença ou ausência de folículos ou corpos luteais ipsilaterais ao corno avaliado, indicando que a circulação é distribuída igualmente para os dois cornos do útero.

Os autores verificaram também que o RI médio para todos os dias avaliados foi maior quando observado em éguas pluríparas do que quando observado em nulíparas. Neste estudo também foi encontrado valores de RI significativamente mais altos nos dias 0 e 10 do ciclo estral em comparação aos dias 5, 15 e 20 (considerando D0 o dia da ovulação). Os autores correlacionaram o menor valor de RI observado no dia 5 à possibilidade de aumento do suprimento sanguíneo para o útero nessa fase lútea inicial devido ao momento da entrada do embrião no útero.

Ferreira et al. (2015) observaram altos valores de PI em um grupo de éguas consideradas com alta degeneração uterina, indicando que éguas com degeneração endometrial severa e difusa apresentam alta resistência arterial no miométrio e conseqüentemente, baixo fluxo sanguíneo após a IA. O aumento da resistência arterial intrauterina em éguas também pode comprometer a vasodilatação local requerida para a migração de neutrófilos para o lúmen uterino. Não houve efeito da idade no fluxo sanguíneo uterino após o depósito de sêmen no útero das éguas. Ferreira, Gastal, Ginther (2008) também observaram que a perfusão vascular e a resistência arterial não foram afetadas pela idade em éguas nulíparas. Ou seja, a degeneração vascular uterina tem sido associada com mudanças degenerativas endometriais e número de prenhez da mesma égua, sem associação com a idade (Esteller-Vico; Liu; Couto, 2012).

Ferreira et al. (2020) avaliaram o fluxo da artéria uterina em receptoras no dia da inovulação do embrião. Foi observado que nos animais onde o RI dos ramos dorsais das artérias uterinas próximas a 1.0 são proporcionais a éguas com maior vascularização do corpo lúteo e uma elevada concentração plasmática de P4. Podendo utilizar estes índices para selecionar éguas com maior aptidão para o desenvolvimento do embrião quando se compara duas éguas semelhantes clinicamente por exames ultrassonográficos convencionais.

Por meio da US Doppler modo Color Flow, estudos revelaram que ocorrem alterações na perfusão vascular do endométrio localmente, em associação com alterações de localização da vesícula embrionária durante a fase de migração embrionária. Maior vascularização foi observada no corno com o embrião em comparação com o corno contralateral. Verificou-se que o embrião leva em torno de 30 min para ir de um corno ao outro, ratificando desta forma, que há um aumento na vascularização endometrial dentro de uma média de sete minutos após a vesícula embrionária chegar ao corno e se estabiliza pelos próximos 20 minutos. Análises feitas por meio da US Doppler modo espectral demonstraram que as artérias na região mesometrial obtiveram um aumento gradual na velocidade média das velocidades máximas (TAMV) nos dois cornos durante a fase de migração embrionária e maior velocidade no corno de fixação em comparação ao contralateral (Silva *et al.*, 2005).

Pesquisas demonstraram a capacidade de prever diagnósticos de gestação precocemente. Nieto-Olmedo *et al.* (2020) detectaram diferenças na perfusão vascular uterina entre éguas gestantes e não gestantes precocemente entre 7º e 8º dia após ovulação, demonstrando que a US Doppler modo Power Flow é um método eficaz para o diagnóstico precoce da gestação. Esses achados foram comprovados, pois a área de perfusão vascular do útero (mm²) e intensidade aumenta nas éguas gestantes em comparação com as éguas sem recuperação embrionária. Portanto, pode-se utilizar este modo de US Doppler como uma ferramenta para avaliação prévia da doadora em um programa de transferência de embriões antes da recuperação embrionária e diminuindo os custos da TE dentro da estação de monta.

Também se pode usar a US Doppler para indicar se o embrião irá se fixar e se orientar corretamente ou não. Neste caso, ocorre o aumento da vascularização na parede do endométrio na região ventral de onde o embrião irá se posicionar 12h após a fixação da vesícula embrionária e um ponto de vascularização próximo a parede do endométrio no polo ventral da bolsa foi considerado um indicador da futura posição do embrião propriamente dito (Silva; Ginther, 2006).

A desorientação embrionária tem uma incidência de 13% nas éguas. Pela US Doppler também é possível acompanhar essa fixação e orientação inadequada precocemente. Porém, os estudos demonstraram que esse tipo de anomalia está associado a um útero flácido e com invasão dorsal defeituosa do endométrio. Entretanto, o aumento assimétrico do saco alantoide pode corrigir espontaneamente a desorientação, de modo que a orientação para formação do cordão umbilical se encontra em posição fisiológica perto das 12h de um relógio (Ginther; Silva, 2006).

Com US Doppler modo Color Flow é possível determinar o sexo fetal equino no período entre 90 e 180 dias de gestação por meio da observação das gônadas fetais. A precisão do exame pode ser aumentada quando se detecta as estruturas da genitália externa, como prepúcio, teta, vulva e clitóris. A US Doppler permite a observação da vascularização no plexo pampiniforme nos machos e da vascularização das camadas cortical e medular do ovário nas fêmeas. Considerando que o feto frequentemente se move durante esse período, o exame requer que o operador seja habilidoso para realizar o diagnóstico o mais breve possível diminuindo assim possíveis artefatos por conta da movimentação do feto (Resende *et al.*, 2014).

Para avaliação da vascularização arterial pode-se utilizar como método de eleição a US Doppler modo espectral apesar de ainda ser um exame em fase de estudo e pouco utilizado na rotina da reprodução. Porém foi observado que éguas gestantes de jumento apresentaram uma

maior vascularização uterina no corno uterino contralateral ao da fixação embrionária e que éguas idosas apresentaram menor fluxo sanguíneo na artéria uterina, pois tiveram PI e RI mais altos, ou seja, menos vascularizados (Lemos *et al.*, 2017).

Outros dados encontrados na literatura demonstram que os índices espectrais (RI e PI) das artérias uterinas podem ser utilizados ao longo da gestação, tanto de éguas prenhas de garanhão como de jumento, como parâmetro de normalidade para verificação da hemodinâmica materno fetal (Oliveira, 2021). E que esses mesmos índices tendem a diminuir em éguas com gestação avançada aumentando a perfusão vascular das artérias uterinas no terço final da gestação. Podendo, desta forma, serem utilizados como exames preventivos para perdas gestacionais e pré-falha da função vascular na placenta (Campos *et al.*, 2022).

2.5.4.2 Ultrassonografia doppler no diagnóstico de endometrite equina

Dentre as patologias reprodutivas, é possível a utilização da US Doppler para a identificação de formações tumorais ovarianas, folículos anovulatórios, cistos uterinos e endometrite em éguas inférteis que apresentaram um aumento da vascularização local quando comparada a normalidade (El-Shahat; El-Maaty; Helmy, 2019).

Quando relacionado ao diagnóstico de endometrite, Sá *et al.* (2020) a partir da inoculação intrauterina de *Escherichia coli*, verificaram diferenças significativas do fluxo sanguíneo avaliado antes da inoculação da bactéria (M0) e 24h pós inoculação (M1), onde a perfusão sanguínea em M1 apresentou quase o dobro do M0 nos três seguimentos uterinos avaliados. Em seguida, as éguas foram tratadas com uma solução fitoterápica Fitoclean® (Organnact Saúde Animal, Brasil). A US Doppler Color Flow foi realizada antes do tratamento (A), 24h (B) e 48h (C) após o tratamento. Os autores relataram que a perfusão uterina foi maior no momento A do que no momento B e C, porém a diminuição da carga bacteriana uterina não foi verificada.

Os autores supõem que a diminuição da vascularização dos grupos pós-tratamento pode ser atribuída à vasoconstrição ocasionada pela reação de componentes com propriedades anti-inflamatórias presente no produto, que pode ter ocasionado a diminuição da perfusão local mesmo com a presença de microrganismos. Por fim essas éguas foram submetidas à antibioticoterapia por infusão de gentamicina. A US Doppler Color Flow foi realizada sete dias após o tratamento, sendo comparados os exames realizados pré-inoculação de *E. coli*, pós-tratamento com Fitoclean® e uma semana após a antibioticoterapia (M0, M1 e M2, respectivamente). Os autores observaram redução da vascularização do grupo tratado com Fitoclean® após a antibioticoterapia, porém, a perfusão sanguínea nesse grupo ainda foi maior que M0, mesmo com eliminação das bactérias presentes. Constatando que é possível identificar a endometrite aguda por meio do US Doppler Color Flow, porém a perfusão vascular identificada não apresentou correlação com os exames laboratoriais uterinos realizados (Sá *et al.*, 2020).

Abdelnaby *et al.* (2020) realizaram a ultrassonografia Doppler espectral das artérias uterinas dorsais e US Doppler Color Flow do útero de éguas com e sem endometrite, correlacionando os dados com o impacto da patologia no estado oxidativo e hormonal. O fluxo sanguíneo uterino analisado pela US Doppler Color Flow mostrou um aumento significativo no grupo de endometrite, enquanto o modo espectral mostrou um aumento significativo nos índices Doppler de PSV e TAMV e na taxa de área do fluxo sanguíneo acompanhada de uma diminuição significativa nos índices Doppler de PI e RI. Além disso, a elevada perfusão sanguínea uterina estava correlacionada com o acúmulo de fluido dentro do útero, ocorrendo uma diferença marcante entre os cornos uterinos em relação ao tamanho da área de coloração da US Doppler Color Flow, que pode ser devido à elevação acentuada do acúmulo de fluidos no corno direito do grupo endometrite.

Já Morais (2021) avaliou, por meio da US Doppler Power Flow, a intensidade de pixels coloridos (IPC) dos segmentos uterinos durante o estro antes e após tratamento uterino com Dimetilsulfóxido (DMSO). A partir das avaliações notou-se que éguas com citologia negativa (apesar de exame de cultura positivo) apresentavam menor fluxo sanguíneo que éguas com citologia positiva. A IPC demonstrou-se reduzida nas éguas que se tornaram gestantes. Já nas éguas que permaneceram vazias, a IPC permaneceu elevada. Desta forma, a US Doppler Power Flow ser utilizada como método diagnóstico auxiliar em alguns casos de endometrite equina. Nas éguas prenhas o fluxo sanguíneo no endométrio e RI diminuíram. Já nas éguas vazias o fluxo sanguíneo no endométrio e RI se mantiveram alto ou aumentaram.

Em um estudo feito com éguas susceptíveis a endometrite pós-cobertura observou-se que as éguas susceptíveis apresentavam maior vascularização uterina até 1 dia antes da inseminação quando comparada as éguas resistentes. E que PI apresentou-se elevado dois dias após a inseminação (Lüttgenau *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral caracterizar a hemodinâmica uterina das éguas com endometrite.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a vascularização dos segmentos uterinos (corpo uterino e cornos uterinos esquerdo e direito) mediante a utilização da técnica de US Doppler modo Power Flow, relacionando-a com a idade, os dias do ciclo estral, a éguas diagnosticadas com endometrite;
- Avaliar o fluxo sanguíneo dos ramos dorsais das artérias uterinas esquerda e direita mediante a utilização da técnica de US Doppler modo espectral, evidenciando alterações nos valores dos índices Doppler (RI e PI) e relacionando-a com a idade, os dias do ciclo estral, a éguas diagnosticadas com endometrite;
- Identificar principais microrganismos envolvidos nos processos de endometrite clínica e subclínica.
- Verificar principais alterações teciduais que ocorrem em éguas com endometrite clínica e subclínica.

4 METODOLOGIA

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA-IZ/UFRRJ) protocolado sob o nº 0121-07-2021 (Anexo A).

4.1 Local e Período do Experimento

O estudo foi realizado no setor de Equideocultura (22°46'48.4"S 43°41'03.0"W) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado no município de Seropédica/RJ, durante a estação de monta 2021/2022 e 2022/2023.

4.2 Animais e Manejo

Inicialmente foram avaliadas 80 éguas nas quais foram selecionadas 45 éguas da raça Mangalarga Marchador, pluríparas, cíclicas, com escore corporal de 4-6 de acordo com Henneke *et al.* (1983) e com idade variando entre 5 e 20 anos. As éguas selecionadas foram separadas em três grupos experimentais, de acordo com o critério de distribuição para os grupos experimentais citado abaixo: GC – grupo controle, composto de éguas sem endometrite (16 animais); GES – grupo de éguas com endometrite subclínica (15 animais); GEC – grupo de éguas com endometrite clínica (14 animais).

Após a separação dos grupos experimentais, essas mesmas éguas foram classificadas em três grupos de acordo com a idade para correlação entre a idade e as alterações uterinas durante os ciclos reprodutivos. Desta forma, grupo I foi composto por animais com idade ≤ 8 anos (n=13); o grupo II por animais entre 9-13 anos (n=19); e o grupo III por animais com idade ≥ 14 anos (n=13), segundo divisão feita por Allen *et al.* (2007).

Os animais utilizados eram criados a pasto, recebendo volumoso a uma taxa de consumo de 2% do peso vivo e 2kg/dia de ração balanceada, com acesso livre a água e sal mineral. Além disso, todo o protocolo de manejo sanitário (vacinação, vermifugação e carrapaticida) foram mantidos atualizados.

4.3 Critério de Distribuição das Éguas nos Grupos Experimentais

Para classificar as éguas entre os grupos do experimento foram utilizados os seguintes critérios: exame de citologia uterina, exame de cultura microbiológica uterina e a presença ou não de fluido intrauterino (FIU) e/ou permanência de edema exacerbado avaliado pela US modo B. Quando detectado fluido uterino com distensão ≥ 2 cm foi considerado sugestivo de endometrite (LeBlanc; Causey, 2009; Brinsko *et al.*, 2011). Para os animais serem classificados com endometrite subclínica ou clínica era necessário que o exame de cultura bacteriana e/ou fúngica desse positivo (Figura 2).

Éguas	Histórico reprodutivo	Citologia endometrial	Cultura microbiológica	FIU e/ou edema exacerbado
Sem endometrite	-	-	-	-
Endometrite subclínica	+ ou -	+ ou -	+	-
Endometrite clínica	+ ou -	+ ou -	+	+

Figura 2: Esquema ilustrativo dos critérios utilizados para distribuição das éguas nos grupos experimentais.

O detalhamento dos dados utilizados como critério de inclusão foi apresentado nos Anexos B (grupo controle), C (grupo endometrite subclínica) e D (grupo endometrite clínica). Sendo assim, para que fosse considerado do grupo controle (Anexo B) era esperado que as éguas apresentassem citologia endometrial, cultura bacteriana e fúngica negativas e que não apresentassem de fluido e/ou edema exacerbado pela US modo B.

Para que fosse considerado do grupo endometrite subclínica (Anexo C) era esperado que as éguas apresentassem citologia endometrial positiva ou negativa, cultura bacteriana e/ou

fúngica positiva e que não tenha sido detectada a presença de fluido e/ou edema exacerbado pela US modo B.

Para que fosse considerado do grupo endometrite clínica (Anexo D) era esperado que as éguas apresentassem citologia endometrial positiva ou negativa, cultura bacteriana e/ou fúngica positiva e que tenha sido detectada a presença de fluido e/ou edema exacerbado pela US modo B.

4.4 Experimento

A primeira etapa do experimento consistiu em uma avaliação das éguas (histórico reprodutivo e exame ultrassonográfico). Em seguida foi feito um acompanhamento do ciclo estral até ser observado um folículo pré-ovulatório (diâmetro ≥ 35 mm e edema ≥ 3) (Brinsko *et al.*, 2011). A partir dessas informações foi realizada a coleta de amostras uterinas para cultura fúngica e bacteriana assim como para o exame citológico endometrial, logo após era realizada a indução da ovulação. A indução da ovulação foi realizada pelos análogos do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) como a deslorelina na dose de 750 μ g /ml, por via intramuscular (Sincrorrelin®, Cravinhos, SP, Brasil) ou histrelina na dose de 250 μ g /ml, por via intramuscular (Strelin®, Botucatu, SP, Brasil) ou hCG na dose de 1000 UI, por via endovenosa (Chorulon® 5000UI, Rahway, NJ, USA).

Após a detecção da ovulação (D0) as éguas foram submetidas ao acompanhamento pela US transretal modo B, US Doppler modo Power Flow dos segmentos uterinos (corno uterino esquerdo, corpo do útero e corno uterino direito) e US Doppler modo espectral do fluxo sanguíneo das artérias uterinas esquerda e direita que originasse na artéria ilíaca externa que é um ramo da artéria aorta. Esses exames ultrassonográficos foram realizados todos os dias até a ovulação do ciclo estral seguinte.

Cinco dias após a segunda ovulação foi realizado o exame de biópsia endometrial e utilizado um fármaco a base de dinoprost trometamina da família das prostaglandinas na dose de 5 mg/ml (volume de 1ml), por via intramuscular (Lutalyse®, SP, Brasil) para que ocorresse a luteólise e a égua retorna-se ao cio. As éguas diagnosticadas com endometrite foram tratadas baseado nos protocolos de lavagem uterina, uso de antissépticos, uso de antibióticos como gentamicina, penicilina e enrofloxacina, uso de antifúngicos como fluconazol e óleo ozonizado. Após os tratamentos, as éguas retornaram ao programa de reprodução animal da UFRRJ e serem emprenhadas (Figura 3).

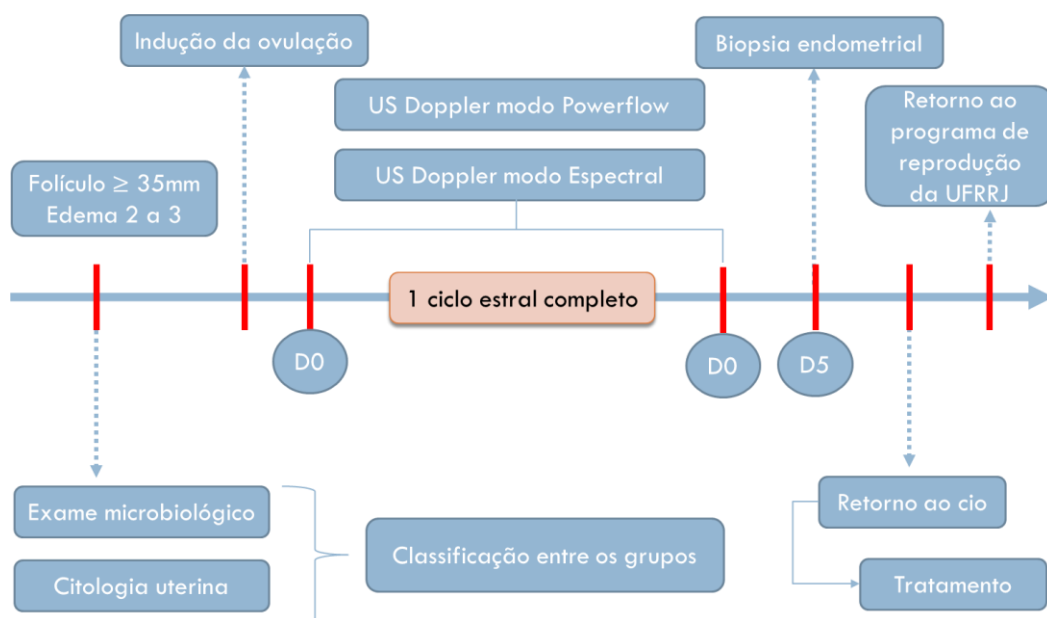


Figura 3: Esquemática do experimento. Neste fluxograma observa-se que as avaliações se iniciam quando o folículo apresenta diâmetro ≥ 35 mm e edema classificado de 2 a 3 com a coleta de material para os exames microbiológicos e citologia uterina para classificação dos animais e distribuição entre os grupos deste estudo. Seguidamente é realizado a indução da ovulação para que seja detectado a ovulação (D0) e se inicie as avaliações ultrassonográficas. Dentro de um ciclo completo foi realizado ultrassonografia (US) Doppler modo Power Flow e US Doppler modo espectral até a próxima ovulação. Cinco dias após a segunda ovulação (D5) foi realizado o exame de biopsia uterina, retorno ao cio das éguas deste estudo e as que foram detectadas com alterações uterinas foram tratadas para que pudessem retornar ao programa de reprodução da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Fonte: Arquivo pessoal.

4.4.1 Exames complementares

Após a seleção dos animais, foram realizados exames prévios nas éguas para caracterização uterina e classificação quanto ao grupo experimental a que pertenciam. Para a coleta dos exames as éguas foram contidas em um brete de contenção para que fosse realizado o processo de higienização da região vulvar e perianal. A higienização foi realizada lavando a região vulvar seguida da região perianal com iodopolividona degermante, enxaguando, borrifando álcool 70% e secando com papel toalha a região vulvar seguida da região perianal.

- **Cultura fúngica**

O primeiro material coletado foi destinado para cultura fúngica. A coleta foi realizada com auxílio de uma pinça ginecológica de aço inoxidável com dupla proteção para equinos, previamente flambada em bandeja com álcool 70% por cerca de 5 minutos e resfriada com solução fisiológica estéril.

Após transpassar a vulva, o óstio cervical era localizado para transposição da cérvix, sendo o swab exposto ao lúmen do corpo uterino. Após a exposição, eram realizados dez movimentos giratórios para coleta do material uterino. Em seguida a haste era recolhida para dentro da cânula protegendo o swab e a pinça retirada do útero. O swab era retirado da pinça ginecológica e acondicionado em tubo contendo meio de cultura Stuart identificado com nome do animal e data da coleta. Em seguida era transportado sob refrigeração para o Centro de Investigação de Microrganismos (CIM) do Instituto Biomédico da UFF para avaliação micológica.

No laboratório, os swabs com as amostras eram diretamente semeados em dois tubos: um contendo Ágar Sabouraud dextrose 2% (BD, New Jersey, EUA) e o outro Mycosel® (BD, New Jersey, EUA). Esses tubos eram incubados em temperatura ambiente (25° C) por até quatro

semanas, com verificação semanal quanto desenvolvimento das unidades formadoras de colônias.

Caso houvesse crescimento, cada colônia era semeada em placa com Sabouraud dextrose a fim de se obter culturas puras. Em cada placa foram colocados 10 mL de meio e cada isolado era repicado e incubado a temperatura de 25 ° C. Após o período de crescimento (cerca de cinco a sete dias) eram separadas as placas de Petri que continham apenas um único tipo de colônia de fungo filamentosos e as características macromorfológicas eram anotadas: cor, textura, bordas e relevo. As placas nas quais foram observadas mais de um tipo de fungo eram novamente repicadas até se obter culturas puras livres de contaminação. Estes procedimentos foram realizados em fluxo laminar e próximo a uma lamparina.

A fim de avaliar a micromorfologia dos fungos filamentosos isolados e identificá-los quanto ao gênero, foi realizada a técnica do microcultivo. Nessa técnica, uma placa de petri esterilizada contendo gaze e tubo em “U” como suporte para a lâmina de vidro foi preparada. Com auxílio de uma espátula estéril um bloco de ágar batata foi depositado sobre a porção central da lâmina.

Cada isolado fúngico foi então cultivado nas bordas do bloco de ágar dextrose em quatro lugares com auxílio de alça de inoculação, esterilizada em bico de Bunsen. Uma lamínula foi colocada de imediato sobre a superfície do bloco de ágar inoculado. Com auxílio de pipeta, uma pequena quantidade de água destilada estéril, suficiente para saturar a gaze, foi depositada no fundo da placa.

A placa foi tampada e incubada a temperatura ambiente durante um período de 5 a 7 dias. Quando o crescimento fúngico mostrou-se visualmente suficiente, a lamínula foi retirada com auxílio de uma pinça, sendo posteriormente colocada sobre uma gota do corante azul-de-lactofenol na superfície de outra lâmina e levada ao microscópio para análise. Através da utilização do corante lactofenol azul de algodão era possível analisar as estruturas das hifas, verificando a presença ou não de septos, as estruturas microscópicas dos conidióforos, assim como as estruturas microscópicas das fiáides, verificando a disposição das mesmas, a qual permite a diferenciação de fungos filamentosos em diversos gêneros.

Quando era observado o crescimento de colônias glabras, era feita uma microscopia direta para a distinção de colônias bacterianas de leveduras. No caso de crescimento de leveduras, quando possível foram realizadas provas do tubo germinativo na presença de soro humano a 37 ° C, microcultivo em ágar milho e repique em Chromagar candida (DIFCO). Caso as colônias glabras fossem bactérias, a amostra era encaminhada para o Laboratório de Bacteriologia de Cocos Gram Positivos (UFF).

- Cultura bacteriana

O segundo exame realizado foi o de cultura bacteriana. A cada novo exame a ser realizado a pinça ginecológica era flambada e resfriada. Para coleta deste material foi realizado o mesmo procedimento de coleta citado anteriormente. O swab era retirado da pinça ginecológica e acondicionado em tubo contendo meio de cultura Stuart identificado com nome do animal e data da coleta. Em seguida era transportado sob refrigeração ao Laboratório de Bacteriologia de Cocos Gram Positivos (UFF) para avaliação bacteriológica.

No laboratório da UFF, as amostras passavam pelas análises da coloração de Gram, morfologia e prova da catalase, e eram congeladas para posteriormente serem encaminhadas para a identificação das espécies bacterianas por MALDI-TOF. No dia anterior a realização do MALDI-TOF, as amostras eram descongeladas, semeadas em meio ATS (Ágar Tryptic Soy) e incubadas em estufa à 37°C.

A identificação das espécies bacterianas foi realizada por MALDI-TOF MS (do inglês, Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry), no

Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Nesta etapa, cada colônia isolada foi depositada nos poços da sample target, uma placa metálica fornecida pelo fabricante (Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA) do equipamento, com auxílio de palitos de madeira estéreis. Em seguida, foi adicionado 1µL de ácido fórmico 70% (v/v) a cada poço da placa e, após a secagem em temperatura ambiente, foi adicionado 1µL da solução matriz composta por ácido α -ciano-4hidroxicinâmico (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) a cada poço. Através dos espectros obtidos pelo detector do aparelho MALDI-TOF Microflex LT, foi gerado um score pelo software Biotyper 3.1, referente a cada amostra analisada. As espécies bacterianas foram identificadas a partir da pontuação gerada.

Nesta etapa, somente foram consideradas confiáveis identificações quanto ao gênero e espécie bacteriana aquelas que apresentaram score ≥ 2.3 . As amostras que apresentaram score entre 1.9 e 2.299 indicaram identificação somente quanto ao gênero.

- Citologia endometrial

O terceiro exame foi o de citologia endometrial. Neste caso, foi utilizada uma escova citológica para coleta do material uterino. A cada novo exame a ser realizado a pinça ginecológica era flambada e resfriada. Para coleta deste material foi realizado o mesmo procedimento já descrito nos exames anteriores. Após a retirada da escova citológica da pinça ginecológica, o material celular era distribuído em três lâminas microscópicas, previamente identificadas com nome do animal e data da coleta, por imprint.

Em seguida, as lâminas foram coradas com kit Panótico Rápido® (método Diff Quick) que constitui de três etapas: 1ª etapa (1 minuto) - realizada por um solvente de fixação (álcool), responsável por desidratar as células presentes no esfregaço, removendo a água e fixando as estruturas celulares na lâmina; 2ª etapa (10 segundos) - realizada com o corante eosina, um corante ácido que se liga aos componentes ácidos presentes no citoplasma das células, proporcionando uma coloração rosada a alaranjada às estruturas plasmáticas; e 3ª etapa (5 segundos) - realizada com o corante azul de metileno, um corante básico que se liga a componentes básicos do núcleo celular. Por fim, as lâminas eram lavadas em uma fina linha de água corrente para remoção do excesso de corante e acomodadas inclinadas para secagem.

A leitura das lâminas foi realizada seguindo a metodologia descrita por Riddle, LeBlanc, Stromberg (2007) classificando o exame como negativo quando as lâminas apresentavam <2 neutrófilo a cada 10 campos por lâmina; endometrite moderada quando as lâminas apresentavam 2-5 neutrófilo a cada 10 campos por lâmina; e endometrite grave quando as lâminas apresentavam ≥ 5 neutrófilo a cada 10 campos por lâmina. E ao final da leitura era realizada uma média da quantidade de polimorfonucleares encontrados nas três lâminas de cada água para categorização destas.

- Biopsia endometrial

Por fim, foi realizada uma biopsia endometrial no 5º dia após a finalização dos exames ultrassonográficos, para que não ocorresse uma possível interferência na hemodinâmica vascular. Foi realizada uma sedação prévia nos animais com cloridrato de detomidina na dose de 0,002ml/kg, por via intravenosa. Este exame é importante para avaliação das camadas uterinas e sua vascularização presente associada a possíveis alterações dos mesmos quando confrontado com o exame de US Doppler.

As amostras para biopsia foram colhidas com auxílio da pinça de Yeoman, tipo “boca de jacaré”, previamente flambada em bandeja com álcool 70% por cerca de 5 minutos e resfriada com solução fisiológica estéril. O fragmento de tecido endometrial, medindo em torno de 2cm, foi retirado na bifurcação entre o corpo e os cornos uterinos esquerdo ou direito. As amostras coletadas foram acondicionadas imediatamente em fixador Bouin por 24h e depois

transferidas para formol 10%. Essas amostras foram conservadas em geladeira em todo o processo. A avaliação do tecido endometrial foi realizada baseada na descrição de Kenney e Doig (1986) (Quadro 2).

Quadro 2: Classificação das categorias de biopsia endometrial descritas por Kenney e Doig (1986) e seus respectivos prognósticos para taxa estimada de parto das éguas.

Categoria	Achados microscópicos	Taxa estimada de parto
I	Sem alterações significativas, Tecido endometrial considerado normal	80-90%
IIA	Suave inflamação dispersa, lacunas linfáticas leve, atrofia endometrial parcial na estação reprodutiva	50-80%
IIB	Moderada inflamação dispersa, lacunas linfáticas moderadas	10-50%
III	Severas alterações irreversíveis com fibrose e inflamação, lacunas linfáticas marcadas com atrofia endometrial profunda na estação reprodutiva.	<10%

Adaptado de Rua *et al.* 2016 e Schöninger; Schoon, 2020.

4.4.2 Avaliação ultrassonográfica

As éguas foram examinadas pela US modo B e US Doppler utilizando equipamento Mindray Medical International Limited, modelo Z5 VET com transdutor Linear Retal 6LE5Vs (5.0/6.5/8.0MHz) e realizadas pelo mesmo operador durante todo o estudo. As éguas foram examinadas pela ultrassonografia transretal modo B para um escaneamento da região reprodutiva geral e, posteriormente, ocorreu avaliação com US Doppler modo Power Flow observando a perfusão sanguínea dos seguimentos uterinos. Foram aplicadas as seguintes configurações: ganho 100, frequência 5 MHz, profundidade 7.4, potência 100%.

A perfusão vascular uterina foi realizada através do escaneamento de toda extensão uterina. Foram realizados vídeos em corte longitudinal do corpo uterino (1 escaneamento) e transversal dos cornos uterinos esquerdo e direito (1 escaneamentos por lado) (Figura 4).

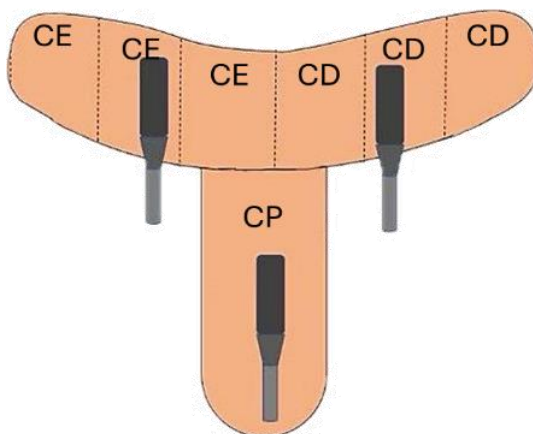


Figura 4: Representação do percurso realizado para escaneamento da perfusão vascular uterina. Foi realizada uma imagem em corte longitudinal do corpo do útero (CP) e um corte transversal nas três porções do corno uterino esquerdo (CE) e do corno uterino direito (CD). Fonte: Arquivo pessoal.

De forma subjetiva, estimou-se em tempo real a porcentagem (0 a 100%) de tecido endometrial com sinais coloridos visualizados durante o estro e diestro. Assim, as éguas avaliadas com área uterina vascularizada menor 25% receberam escore baixo; de 25 a 49%, escore leve; de 50 a 75%, escore alto; e acima de 75%, escore muito alto (Figura 5).



Figura 5: Classificação em escores da avaliação subjetiva feita simultaneamente ao exame de ultrassonografia Doppler modo Powerflow do útero das éguas. A: representa as éguas avaliadas com área uterina vascularizada menor 25% (escore baixo). B: representa as éguas avaliadas com área uterina vascularizada entre 25 e 49% (escore leve). C: representa as éguas avaliadas com área uterina vascularizada entre 50 e 75% (escore alto). Fonte: arquivo pessoal.

Já de forma objetiva, a vascularização dos seguimentos uterinos foi avaliada pela determinação da quantidade e intensidade de pontos coloridos Doppler (grau de brilho) em imagem congelada. Para essa avaliação, os exames ultrassonográficos Doppler foram salvos e avaliados em um programa reprodutor multimídia em um computador. A imagem mais representativa de cada segmento uterino, caracterizada pela maior área uterina contendo a maior quantidade de sinais coloridos, foram selecionadas. Estas imagens foram extraídas e salvas em formato TIFT utilizando o programa Photopea – Online Photo Editor®. O número total de pontos coloridos por imagem-TIFT foi calculado pelo programa ImageJ 1.52a® (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Por fim, foi feita uma avaliação da quantidade e da intensidade dos pixels a partir do histograma de cada imagem modificada e com a utilização do programa Excel® foi feita uma média dos valores (Figura 6).

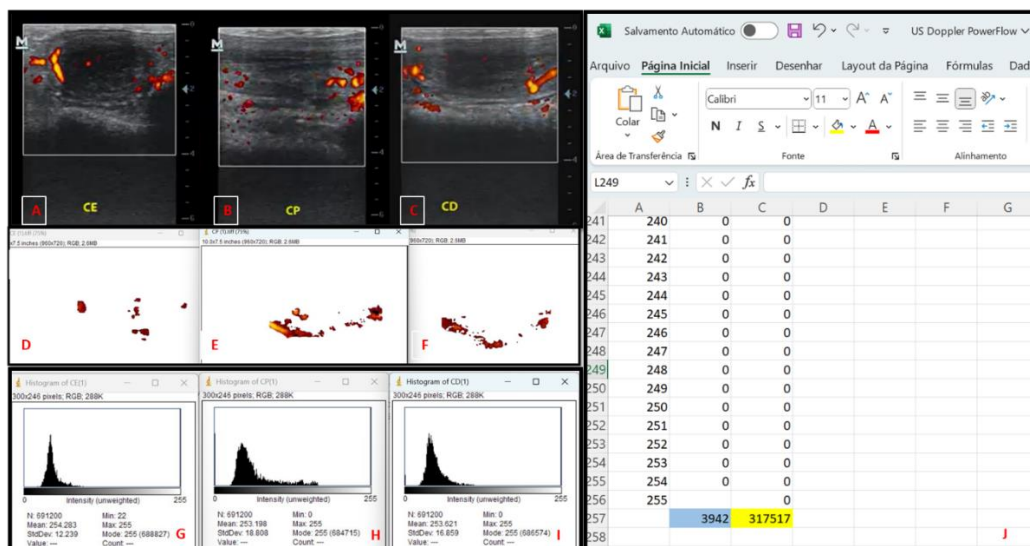


Figura 6: Esquemática do passo a passo para realização da avaliação objetiva do vídeo salvo do exame de ultrassonografia Doppler modo Powerflow do útero das éguas. A, B e C: imagens classificadas com maior vascularização uterina do vídeo assistido. D, E e F: imagens editadas em photoshop para visualização apenas da vascularização uterina. G, H e I: resultado da avaliação feita em cada imagem editada visualizada pelo histograma. J: Dados do histograma planilhados, sendo a coluna A referente a numeração da paleta de cores de 0 a 255 (do preto ao branco); a coluna B referente a quantidade de pixels em cada cor sendo destacado em azul o somatório desses pixels para a imagem analisada; a coluna C referente a intensidade de pixels em cada cor sendo destacada em amarelo o somatório dessa intensidade para a imagem analisada. A intensidade é avaliada através da multiplicação entre a numeração da paleta de cores (coluna A) e a quantidade de pixels de cada cor (coluna B). Fonte: arquivo pessoal.

Posteriormente, as éguas foram examinadas utilizando US Doppler modo espectral mensurando os Índices de Pulsatilidade (PI) e Resistividade (RI) do fluxo sanguíneo do ramo dorsal da artéria uterina (AU) direita e esquerda que originasse na artéria ilíaca externa que é um ramo da artéria aorta. Os dados foram coletados e divididos em AUEPI (índice de pulsatilidade da artéria uterina esquerda), AUERI (índice de resistividade da artéria uterina esquerda), AUDPI (índice de pulsatilidade da artéria uterina direita) e AUDRI (índice de resistividade da artéria uterina direita). Contudo para o melhor aproveitamento dos dados, visto que não houve diferença estatística entre os lados, a equipe decidiu por juntar os dados de AUEPI e AUDPI somando os dados e obtendo uma média dos valores da amostra. E mesmo foi feito para AUERI e AUDRI. Sendo assim, no fim amostras foram analisadas como AUPI (índice de pulsatilidade da artéria uterina) e AURI (índice de resistividade da artéria uterina).

Para avaliação do PI e RI, observou-se o fluxo sanguíneo do ramo dorsal da artéria uterina direita e esquerda durante três ciclos cardíacos ininterruptos. Com a imagem ultrassonográfica congelada avaliou-se as ondas cardíacas através do traço sistólico anotando os valores de PI e RI produzidos pelo aparelho de ultrassom em planilhas (Figura 7). Foram aplicadas as seguintes configurações: ganho 28, PRF 3.6, frequência 5 MHz, profundidade 7.4, potência 100%.

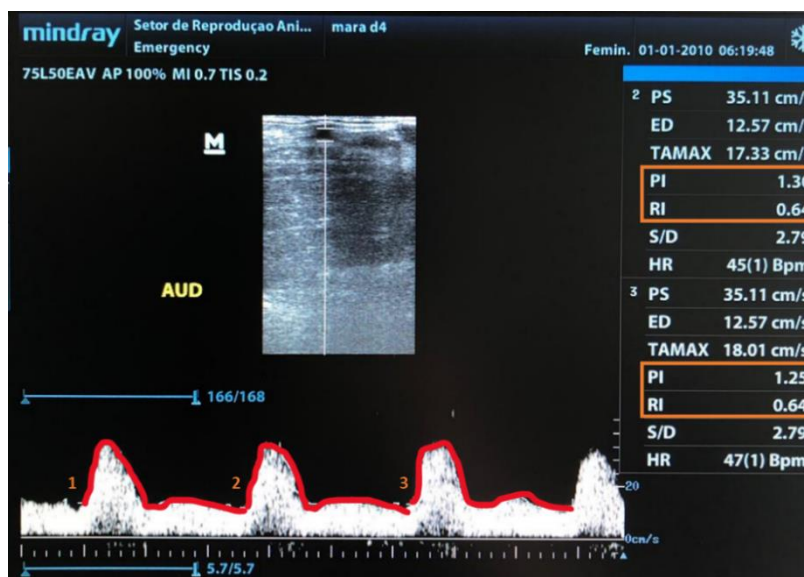


Figura 7: Esquemática da análise feita para o exame de ultrassonografia Doppler modo espectral. As linhas em vermelho representam as ondas de sístole e diástole referente a movimentação sanguínea. As numerações em laranja (1, 2 e 3) ilustram as três ondas avaliadas. As caixas em laranja no canto direito da imagem demonstram os dados avaliados dentro deste exame PI (índice de pulsatilidade) e RI (índice de resistividade). Fonte: arquivo pessoal.

4.6 Análise estatística

Com as frequências dos atributos das variáveis qualitativas estudadas (microrganismo, citologia endometrial e biopsia) foram aplicadas o teste G para independência com o objetivo de verificar uma possível associação significativa entre os fatores (Callegari-Jacques, 2003).

Para a comparação das médias das variáveis AUPI, AURI, avaliação objetiva (pixels e intensidade) obtidos das éguas nas diferentes situações experimentais foi realizada a análise de variância, seguido do teste de Tukey para a comparação de médias (Sampaio, 2002).

Para a comparação dos escores da avaliação subjetiva obtidos das éguas nas diferentes situações experimentais foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn (Ayres et al., 2007).

Para o estudo da correlação entre as variáveis AUPI, AURI, avaliação subjetiva, avaliação objetiva (pixels e intensidade) foi utilizado o teste de correlação de Spearman (Ayres et al., 2007).

Os dados foram apresentados como: média \pm desvio padrão da média.

O nível de significância considerado foi de 5%.

5 RESULTADOS

Baseado nos dados do estudo, foi observado que a média de dias do ciclo estral se manteve em $21,06 \pm 2,69$ para o grupo controle; $22,20 \pm 1,26$ para o grupo endometrite subclínica; $22,5 \pm 2,28$ para grupo endometrite clínica. Em relação a idade das éguas ocorreu uma distribuição ao acaso em que pode ser observado uma média de $10,19 \pm 3,66$ anos para o grupo controle; $10 \pm 3,72$ anos para o grupo endometrite subclínica; $14,64 \pm 5,06$ anos para o grupo endometrite clínica.

Com a análise desses dados pode-se observar que a média dos dias do ciclo estral é influenciável com significância baseado nos grupos tratamento (grupo controle, endometrite subclínica e endometrite clínica) quando comparada a idade das éguas. As médias da duração

do ciclo estral dos grupos endometrite subclínica e clínica foram significativamente maiores do que a do grupo controle ($P=0,040776$). Não sendo observado diferença significativa entre as médias da duração do ciclo estral para os grupos das idades ($P= 0,445359$) (Tabela 1).

Tabela 1: Grupo das idades discriminando as quantidades de animais e média \pm desvio padrão de dias do ciclo estral das éguas baseado nos grupos tratamentos e idade dos animais do estudo.

Idade	n		GC	GES	GEC
GI: ≤ 8 anos	13	n	4	7	2
		MCE	20,50 \pm 1,73 ^{aA}	22,30 \pm 0,95 ^{aB}	22,50 \pm 0,71 ^{aB}
GII: 9-13 anos	19	n	10	6	3
		MCE	20,80 \pm 1,23 ^{aA}	21,83 \pm 1,17 ^{aB}	22,33 \pm 1,53 ^{aB}
GIII: ≥ 14 anos	13	n	2	2	9
		MCE	21,00 \pm 7,07 ^{aA}	23,00 \pm 2,83 ^{aB}	22,44 \pm 2,60 ^{aB}

Letras minúsculas diferentes entre linhas significa diferença estatística em relação aos grupos idade ($P\leq 0,05$).

Letras maiúsculas diferentes entre colunas significa diferença estatística entre os grupos tratamentos ($P\leq 0,05$).

GC: grupo controle; GES: grupo endometrite subclínica; GEC: grupo endometrite clínica; MCE: média do ciclo estral em dias.

Pode ser observado também que os grupos das idades que apresentaram a maior percentagem de animais com endometrite foi o grupo I e III (66% e 86%, respectivamente) ($P<0,001$). Onde foi constatado uma associação entre o grupo I (≤ 8 anos) com o grupo de endometrite subclínica (55%); o grupo II (9-13 anos) com animais sem endometrite (52%); e o grupo III (≥ 14 anos) com a endometrite clínica (70%) ($P<0,001$) (Figura 8).

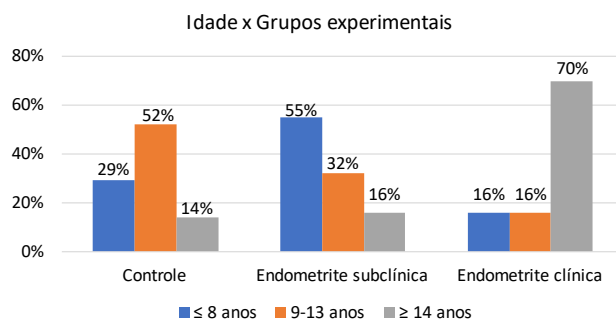


Figura 8: Relação entre o grupo das idades das éguas e os grupos tratamentos, sendo observado uma associação entre o grupo ≤ 8 anos com o grupo de endometrite subclínica (55%); o grupo 9-13 anos com animais sem endometrite (52%); e o grupo ≥ 14 anos com a endometrite clínica (70%) ($P<0,001$).

Quando avaliado o resultado das amostras de biopsia endometrial pode ser constatado que as éguas avaliadas neste estudo apresentaram classificação I ($n=2$), seguida de IIA ($n=13$), IIB ($n=18$) e III ($n=12$). Quando analisadas as amostras pelos grupos tratamentos é possível notar que o grupo controle apresenta em sua maioria éguas do grupo IIA ($n=7$), que o grupo endometrite subclínica apresenta em sua maioria éguas do grupo IIB ($n=8$) e que o grupo endometrite clínica apresenta em sua maioria éguas do grupo III ($n=6$) (Figura 9).

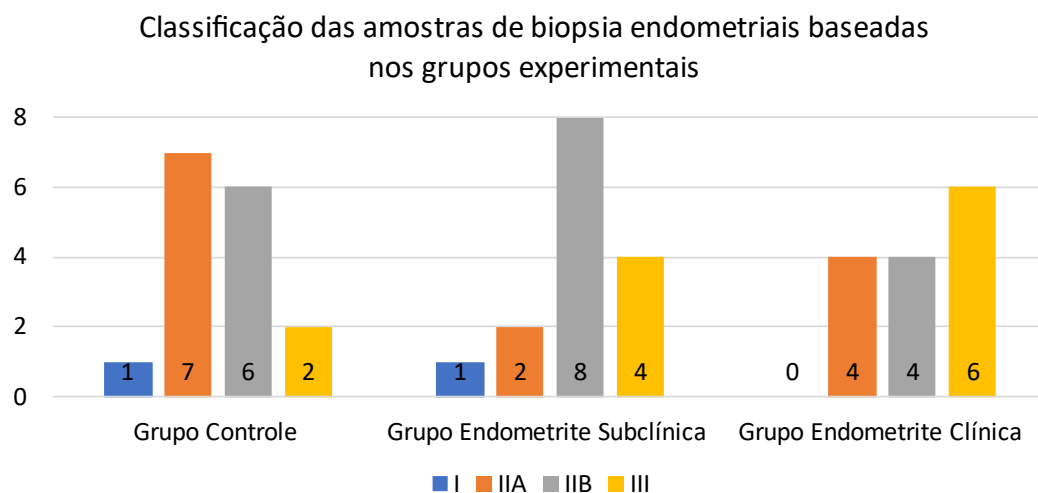


Figura 9: Classificação das amostras de biopsia endometriais encontradas nas éguas utilizadas no estudo separadas pelos grupos tratamento. Pode ser observado que o grupo controle apresenta em sua maioria éguas do grupo IIA (n=7), que o grupo endometrite subclínica apresenta em sua maioria éguas do grupo IIB (n=8) e que o grupo endometrite clínica apresenta em sua maioria éguas do grupo III (n=6).

No momento em que foi cruzado os dados das biopsias endometriais com os grupos das idades é possível observar que as éguas ≤ 8 anos obtiveram, em sua maioria, classificação da qualidade do tecido uterino em IIA (n=6), enquanto as éguas 9-13 anos obtiveram, em sua maioria, classificação em IIB (n=10) e as éguas ≥ 14 anos obtiveram, em sua maioria, classificação em III (n=7) (Figura 10).

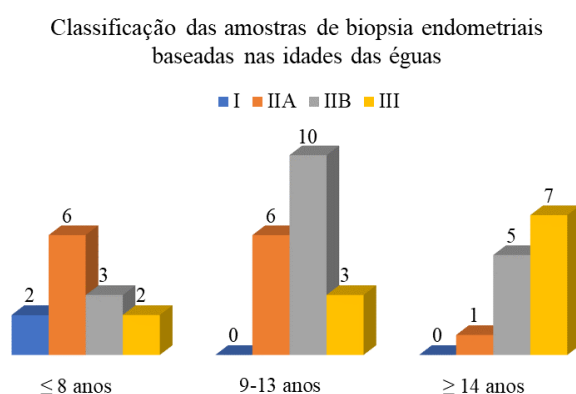


Figura 10: Classificação das amostras de biopsia endometriais encontradas nas éguas utilizadas no estudo separadas pelos grupos das idades. Pode ser observado que as éguas ≤ 8 anos obtiveram, em sua maioria, classificação da qualidade do tecido uterino em IIA (n=6), enquanto as éguas 9-13 anos obtiveram, em sua maioria, classificação em IIB (n=10) e as éguas ≥ 14 anos obtiveram, em sua maioria, classificação em III (n=7).

5.1 Avaliação da Ultrassonografia Doppler modo Espectral

Após a realização da estatística dos dados dos índices de pulsatilidade (PI) e de resistividade (RI) foi possível distinguir qual seria a variável de confiança para interpretação dos dados, visto que PI e RI são variáveis proporcionais. Para isso foi realizado separadamente o cruzamento destas variáveis com os grupos das idades e foi possível perceber que PI e RI se comportavam de forma significativa ($P < 0,001$). Porém quando analisado a ação conjunta de PI e RI foi observado que a ação de sinergismo entre as variáveis fazia com que PI suprisse as

necessidades de RI anulando-a e a tornando uma variável não significativa (PI: $P < 0,001$; RI: $P = 0,974$) (Figura 11).

	Significância		Significância		Significância
≤ 8 anos	$P < 0,001$	≤ 8 anos	$P < 0,001$	≤ 8 anos	$P < 0,001$
9-13 anos	$P < 0,001$	9-13 anos	$P < 0,001$	9-13 anos	$P < 0,001$
≥ 14 anos	$P < 0,001$	≥ 14 anos	$P < 0,001$	≥ 14 anos	$P < 0,001$
AUPI	$P < 0,001$	AURI	$P = 0,001$	AUPI	$P < 0,001$
				AURI	$P = 0,974$

Figura 11: Observação da ação de sinergismo entre as variáveis índice de pulsatilidade da artéria uterina (AUPI) e índice de resistividade da artéria uterina (AURI) que quando analisadas em ação conjunta ocorre uma anulação de RI por PI. A: avaliação estatística demonstrando comportamento significativo para variável AUPI quando avaliada separadamente. B: avaliação estatística demonstrando comportamento significativo para variável AURI quando avaliada separadamente. C: avaliação estatística da ação conjunta das variáveis demonstrando que PI supri as necessidades de RI anulando-a e a tornando uma variável não significativa (PI - $P < 0,001$; e RI - $P = 0,974$).

O outro ponto avaliado foi qual seria o comportamento de PI e RI em relação as características dos grupos com endometrite. Para isso, foi avaliado o comportamento das variáveis (AUPI e AURI) diante dos grupos com e sem endometrite. O resultado exibido demonstra uma proporcionalidade entre as variáveis e grupo endometrite. Ou seja, os dados atestam que ao passo que esses índices Doppler aumentavam, crescia também o número de animais com endometrite (68% e 70%, respectivamente) (Tabela 2 e Tabela 3).

Tabela 2: Constatação da proporcionalidade entre a variável índice de pulsatilidade da artéria uterina (AUPI) com o grupo de animais com endometrite apresentando crescimento conjunto de 68%. $P < 0,001$.

AUPI	Sem endometrite	Com endometrite
0 - 1,63	40%	60%
1,64 - 1000	32%	68%

Tabela 3: Constatação da proporcionalidade entre a variável índice de resistividade da artéria uterina (AURI) com o grupo de animais com endometrite apresentando crescimento conjunto de 70%. $P < 0,001$.

AURI	Sem endometrite	Com endometrite
0 - 0,73	38%	62%
0,74 - 1	20%	70%

Com a tabulação dos dados de AUPI e AURI pode ser desenvolvido uma linha de comportamento das variáveis ao longo dos dias do ciclo estral das éguas para avaliação das variáveis em relação aos grupos tratamentos. Desta forma pode ser observado que no AUPI o grupo endometrite clínica obteve médias significativamente superior às apresentadas pelos grupos endometrite subclínica e controle no 12º dia do ciclo estral ($P = 0,04025$); e que o grupo endometrite clínica e subclínica obtiveram médias significativamente superior às apresentadas pelo grupo controle no 15º dia do ciclo estral ($P = 0,01188$) (Figura 12).

Comportamento do Índice de Pulsatilidade durante o ciclo estral das éguas

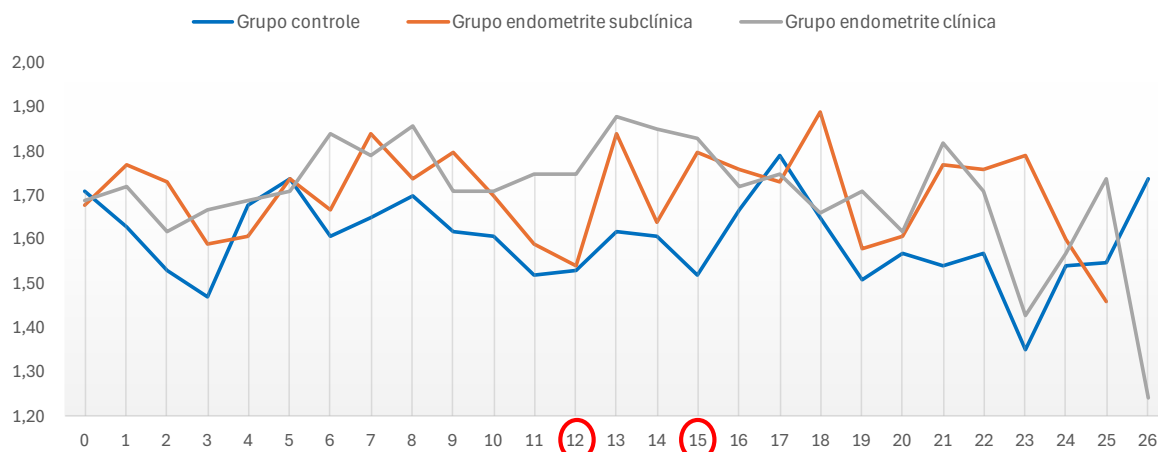


Figura 12: Comportamento do índice de pulsatilidade durante o ciclo estral da égua, sendo dividido em grupo controle (linha azul), grupo endometrite subclínica (linha laranja) e grupo endometrite clínica (linha cinza). Pode ser observado que o grupo endometrite clínica obteve médias significativamente superior às apresentadas pelos grupos endometrite subclínica e controle no dia 12; e que o grupo endometrite clínica e subclínica obtiveram médias significativamente superior às apresentadas pelo grupo controle no dia 15 ($P \leq 0,05$).

Já em relação a AURI foi possível notar que o grupo endometrite clínica e subclínica obtiveram médias significativamente superior às apresentadas pelo grupo controle no 15º dia do ciclo estral ($P = 0,01271$) (Figura 13).

Comportamento do Índice de Resistividade durante o ciclo estral das éguas

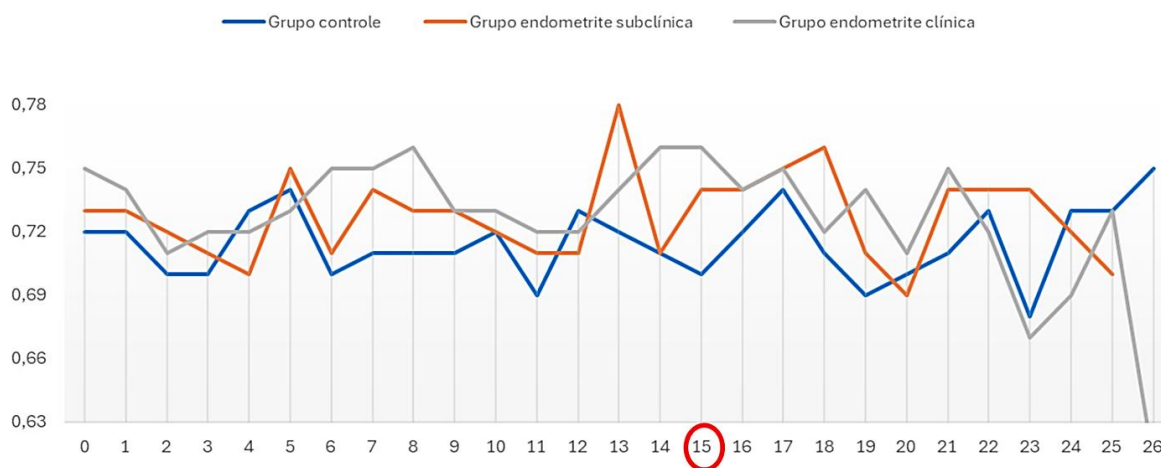


Figura 13: Comportamento do índice de resistividade durante todo o ciclo estral da égua, sendo dividido em grupo controle (linha azul), grupo endometrite subclínica (linha laranja) e grupo endometrite clínica (linha cinza). Pode ser observado que o grupo endometrite clínica e subclínica obtiveram médias significativamente superior às apresentadas pelo grupo controle no dia 15 ($P = 0,01271$).

5.2 Avaliação da Ultrassonografia Doppler modo Powerflow

Na avaliação dos dados obtidos pela US Doppler modo Powerflow pode ser desenvolvido uma linha de comportamento das variáveis ao longo dos dias do ciclo estral das éguas para avaliação das variáveis em relação aos grupos tratamentos. Desta forma, pode ser avaliado o comportamento da vascularização dos segmentos uterinos pela avaliação subjetiva.

Isto posto, pode ser observado um aumento significativo dos escores de vascularização uterina para o grupo endometrite clínica quando comparado ao grupo endometrite subclínica no 01º dia do ciclo estral ($P= 0,032921$); no 09º dia do ciclo estral quando comparada ao grupo endometrite subclínica e controle ($P<0,05$); e no 10º dia do ciclo estral quando comparado o grupo endometrite clínica em relação ao grupo controle ($P=0,033497$) (Figura 14).

Comportamento da vascularização uterina através da avaliação subjetiva durante o ciclo estral das éguas

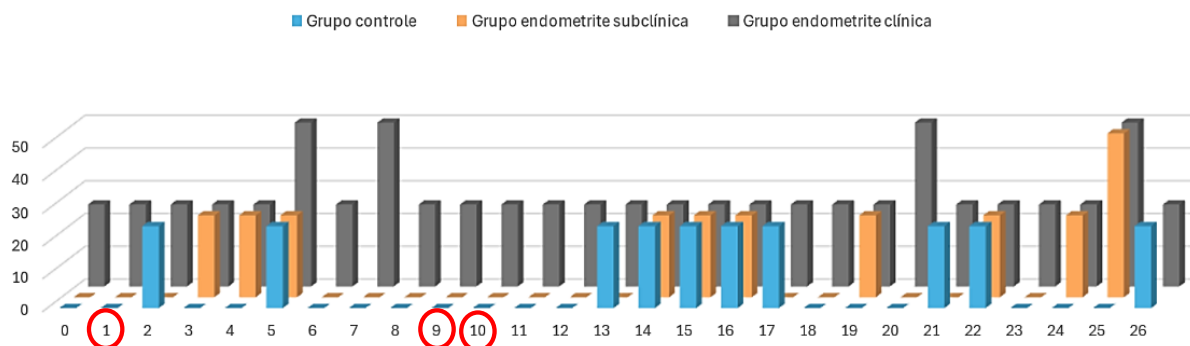


Figura 14: Comportamento da vascularização uterina através da avaliação subjetiva dos segmentos uterinos (eixo vertical) durante o ciclo estral da égua (eixo horizontal), sendo dividido em grupo controle (linha azul), grupo endometrite subclínica (linha laranja) e grupo endometrite clínica (linha cinza). Onde pode ser observado um aumento significativo dos escores de vascularização uterina para o grupo endometrite clínica quando comparado ao grupo endometrite subclínica no dia 01($P= 0,032921$); no dia 09 quando comparada ao grupo endometrite subclínica e controle ($P<0,05$); e no dia 10 quando comparado o grupo endometrite clínica em relação ao grupo controle ($P=0,033497$).

Igualmente, pode ser avaliado o comportamento da vascularização dos segmentos uterinos de forma objetiva pela avaliação da quantidade e intensidade de pixels durante o ciclo estral da égua de acordo com os grupos tratamentos deste estudo (Figura 15 e Figura 16, respectivamente). Contudo não foram observadas diferenças significativas entre os dias do ciclo estral, os grupos tratamentos e as variáveis da avaliação objetiva da quantidade de pixels e avaliação objetiva da intensidade de pixels ($P>0,05$).

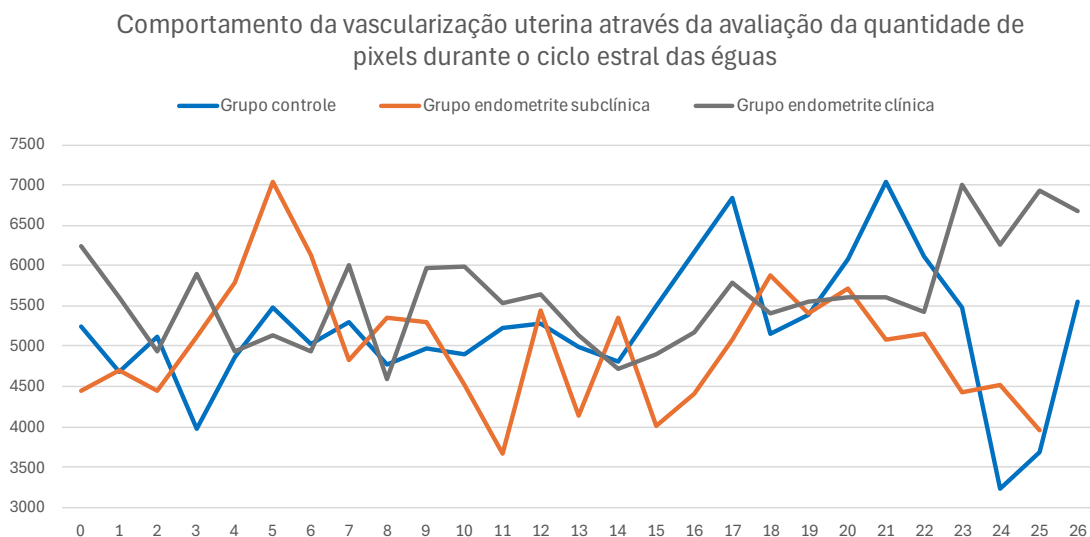


Figura 15: Comportamento da vascularização uterina através da avaliação objetiva da quantidade de pixels dos segmentos uterinos durante o ciclo estral da égua, sendo dividido em grupo controle (linha azul), grupo endometrite subclínica (linha laranja) e grupo endometrite clínica (linha cinza). Onde não foram observadas diferenças significativas entre os dias do ciclo estral, os grupos tratamentos e a variável da avaliação objetiva da quantidade de pixels dos segmentos uterinos ($P > 0,05$).

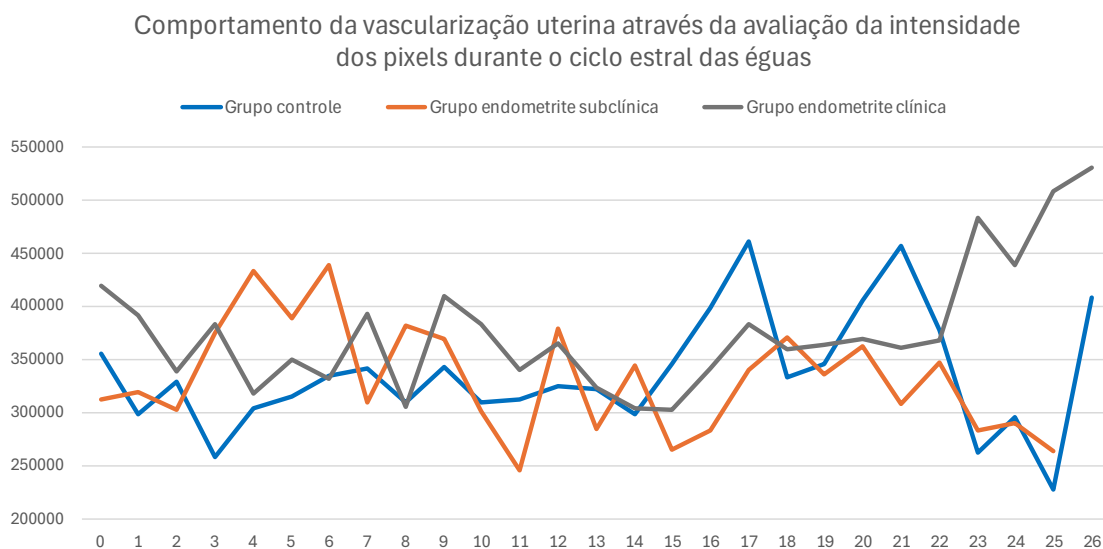


Figura 16: Comportamento da vascularização uterina através da avaliação objetiva da intensidade de pixels dos segmentos uterinos durante o ciclo estral da égua, sendo dividido em grupo controle (linha azul), grupo endometrite subclínica (linha laranja) e grupo endometrite clínica (linha cinza). Onde não foram observadas diferenças significativas entre os dias do ciclo estral, os grupos tratamentos e a variável da avaliação objetiva da intensidade de pixels dos segmentos uterinos ($P > 0,05$).

5.3 Correlação entre dados do estudo

Baseado nas variáveis analisadas neste estudo foi verificado a correlação entre elas. Desta forma, foi observado que AUPI e AURI apresentaram correlação significativa, positiva e forte com $\rho = 0,88$ ($P < 0,0001$); e que AUPI e AURI e a avaliação subjetiva, realizado pela US Doppler modo Powerflow, não apresentaram correlação significativa com $\rho = 0,07$ e $\rho = 0,02$, respectivamente ($P > 0,05$).

A avaliação subjetiva e a avaliação objetiva da quantidade de pixels apresentaram correlação significativa, positiva e moderada com $\rho=0,51$ ($P<0,0001$), da mesma forma a avaliação subjetiva e a avaliação objetiva da intensidade de pixels apresentaram correlação significativa, positiva e moderada com $\rho=0,50$ ($P<0,0001$). Além disso a avaliação objetiva da quantidade de pixels e a avaliação objetiva da intensidade de pixels apresentaram correlação significativa, positiva e forte com $\rho=0,94$ ($P<0,0001$) (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado da Correlação entre as variáveis analisadas neste estudo baseado no Teste de Spearman.

Correlação	Spearman	Classificação	p
AUPI X AURI	0,88	Forte	<0,0001
AUPI X Av. subjetiva	0,07	Fraca	>0,05
AURI X Av. subjetiva	0,02	Fraca	>0,05
Av. subjetiva X Av. objetiva da quantidade de pixels	0,51	Moderada	<0,0001
Av. subjetiva X Av. objetiva da intensidade de pixels	0,50	Moderada	<0,0001
Av. objetiva da quantidade de pixels X Av. objetiva da intensidade de pixels	0,94	Forte	<0,0001

AUPI: Índice de Pulsatilidade da artéria uterina; AURI: Índice de Resistividade da artéria uterina; Av.: Avaliação

5.4 Efeito das variáveis analisadas

Neste tópico se tem descrito o efeito das variáveis perante os grupos tratamento e os exames de cultura microbiologia, citologia e biopsia endometrial. A primeira análise realizada foi a avaliação relacionada aos grupos tratamentos. Pode ser observado que tanto em AUPI quanto em AURI, os grupos endometrite subclínica e endometrite clínica apresentaram médias significativamente superior as observadas no grupo controle ($P\leq 0,05$).

Já dentro da avaliação subjetiva foi observado que o grupo endometrite clínica apresentou escore de vascularização significativamente superior às encontradas nos grupos controle e endometrite subclínica ($P\leq 0,05$). Tanto a avaliação objetiva da quantidade de pixels como na avaliação objetiva da intensidade de pixels não foi observada diferença significativa entre os grupos tratamentos ($P>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5: Avaliação do índice de pulsatilidade da artéria uterina (AUPI), índice de resistividade da artéria uterina (AURI), avaliação subjetiva da vascularização uterina e avaliação objetiva da quantidade e da intensidade de pixels comparado aos grupos tratamentos deste estudo.

Grupos	n	AUPI	AURI	Av. subjetiva	Quantidade de pixels	Intensidade de pixels
GC	16	1,61±0,10 ^a	0,71±0,02 ^a	Baixa perfusão ^a	5212±2452 ^a	33187±170984 ^a
GES	15	1,72±0,10 ^b	0,73±0,03 ^b	Baixa perfusão ^a	5069±2534 ^a	436207±15772230 ^a
GEC	14	1,71±0,10 ^b	0,73±0,02 ^b	Leve perfusão ^b	5475±2856 ^a	362201±208170 ^a

Letras diferentes entre linhas significa diferença estatística ($P\leq 0,05$)

GC: grupo controle; GES: grupo endometrite subclínica; GEC: grupo endometrite clínica; AUPI: Índice de Pulsatilidade da artéria uterina; AURI: Índice de Resistividade da artéria uterina; Av.: Avaliação.

Quando analisado os exames de cultura microbiologia, citologia e biopsia endometrial não foi observada nenhuma associação significativa entre o cruzamento das variáveis

qualitativas estudadas (cultura microbiológica x citologia endometrial; cultura microbiológica x biopsia endometrial; citologia endometrial x biopsia endometrial) ($P>0,05$).

Contudo, quando analisado esses mesmos exames em cruzamento com as variáveis da ultrassonografia Doppler podemos observar alguns dados relevantes. Podemos perceber que a variável AUPI apresentou diferença significativa entre os grupos com infecções mistas quando comparados aos grupos com infecções por gram positivas, gram negativas e sem infecções. Já AURI demonstrou diferença significativa entre o grupo com infecção mista quando comparada ao grupo com infecção por gram positiva e sem infecção ($P<0,0001$).

Já na avaliação subjetiva da vascularização uterina observou-se que o grupo com infecção com gram positiva apresentou a maior média quando comparada ao grupo com infecção fúngica, mista e sem infecção e não foi diferente do grupo com infecção gram negativa ($P<0,0001$). E seguidamente, na avaliação objetiva para quantidade de pixels observou-se diferença significativa entre as infecções por bactérias gram positivas e negativas e as infecções fúngicas e mistas ($P<0,0001$). Já na avaliação objetiva para intensidade de pixel pode ser observada uma diferença entre infecções por gram negativas e mistas e a infecção fúngica ($P<0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6: Avaliação do índice de pulsatilidade da artéria uterina (AUPI), índice de resistividade da artéria uterina (AURI), avaliação subjetiva da vascularização uterina e avaliação objetiva da quantidade e da intensidade de pixels comparado ao exame de cultura microbiológica realizado neste estudo.

Cultura microbiológica	n	AUPI	AURI	Av. subjetiva	Quantidade de pixels	Intensidade de pixels
0	16	1,61±0,32 ^a	0,71±0,06 ^a	Baixa perfusão ^a	5221±2456 ^{ac}	333600±171370 ^{ab}
F	4	1,71±0,39 ^{ab}	0,72±0,06 ^{ab}	Baixa perfusão ^{ac}	4187±1441 ^{bd}	276727±109125 ^b
G+	6	1,73±0,33 ^a	0,74±0,06 ^a	Leve perfusão ^b	5480±2101 ^{ac}	357362±155629 ^{ab}
G-	9	1,66±0,32 ^a	0,73±0,07 ^{ab}	Leve perfusão ^{bc}	5837±3207 ^c	379045±235528 ^a
M	10	1,80±0,36 ^b	0,74±0,08 ^b	Baixa perfusão ^a	5015±2763 ^{ad}	373168±452380 ^a

Letras diferentes entre linhas significa diferença estatística ($P\leq0,05$)

0: animais sem infecção; F: animais com infecção fúngica; G+: animais com infecção por bactérias gram positivas; G-: animais com infecção por bactérias gram negativas; M: animais com infecção mista; AUPI: Índice de Pulsatilidade da artéria uterina; AURI: Índice de Resistividade da artéria uterina; Av.: Avaliação.

Em relação a citologia endometrial, quando comparada a variável AUPI percebe-se uma diferença significativa entre todos os grupos, sendo o grupo com classificação grave o de maior média. Já em AURI nota-se uma diferença significativa entre o grupo grave e o grupo negativo e moderado ($P<0,0001$). Seguidamente, quando observamos a avaliação subjetiva da vascularização do útero podemos constatar uma diferença significativa entre éguas com exame de citologia negativo e positivo (moderado e grave) independente do grau de inflamação ($P<0,0001$). E quando analisamos a avaliação objetiva por quantidade de pixels e intensidade de pixels nota-se uma diferença significativa associada a inflamação moderada quando comparada aos outros grupos (negativa e grave) ($P<0,0001$) (Tabela 7).

Tabela 7: Avaliação do índice de pulsatilidade da artéria uterina (AUPI), índice de resistividade da artéria uterina (AURI), avaliação subjetiva da vascularização uterina e avaliação objetiva da quantidade e da intensidade de pixels comparado ao exame de citologia endometrial realizado neste estudo.

Citologia endometrial	n	AUPI	AURI	Av. subjetiva	Quantidade de pixels	Intensidade de pixels
Negativa	33	1,69±0,34 ^a	0,72±0,07 ^a	Baixa perfusão ^a	5048±2257 ^a	331502±187156 ^a
Moderada	10	1,61±0,36 ^b	0,71±0,07 ^a	Leve perfusão ^b	6013±3565 ^b	429380±452930 ^b
Grave	2	1,95±0,32 ^c	0,78±0,04 ^b	Leve perfusão ^b	4673±1633 ^a	297283±122428 ^a

Letras diferentes entre linhas significa diferença estatística (P≤0,05)

AUPI: Índice de Pulsatilidade da artéria uterina; AURI: Índice de Resistividade da artéria uterina; Av.: Avaliação.

Por fim quando analisado os dados da biopsia endometrial nota-se que, da mesma maneira, AUPI e AURI demonstraram uma diferença significativa entre a classificação IIB e a classificação IIA e III, onde IIB demonstrou maior média quando comparada com as demais (P<0,0001). Assim como na avaliação pela Ultrassonografia Doppler modo Powerflow, tanto pela avaliação subjetiva (P<0,001) quanto pela avaliação objetiva (P<0,0001), observa-se uma diferença significativa da classificação IIA em relação as classificações I e IIB (Tabela 8).

Tabela 8: Avaliação do índice de pulsatilidade da artéria uterina (AUPI), índice de resistividade da artéria uterina (AURI), avaliação subjetiva da vascularização uterina e avaliação objetiva da quantidade e da intensidade de pixels comparado ao exame de biópsia endometrial realizado neste estudo.

Biópsia endometrial	n	AUPI	AURI	Av. subjetiva	Quantidade de pixels	Intensidade de pixels
I	2	1,71±0,31 ^{ab}	0,71±0,05 ^a	Baixa perfusão ^a	4326±1237 ^a	288050±103864 ^a
IIA	13	1,60±0,30 ^a	0,71±0,06 ^a	Leve perfusão ^b	6013±3420 ^b	415687±413469 ^b
IIB	18	1,77±0,35 ^b	0,74±0,06 ^b	Baixa perfusão ^a	4885±2078 ^a	330696±198668 ^a
III	12	1,63±0,37 ^a	0,72±0,08 ^a	Baixa perfusão ^{ab}	4885±2079 ^a	325753±159811 ^a

Letras diferentes entre linhas significa diferença estatística (P≤0,05)

AUPI: Índice de Pulsatilidade da artéria uterina; AURI: Índice de Resistividade da artéria uterina; Av.: Avaliação.

6 DISCUSSÃO

Com a avaliação dos resultados deste estudo é possível constatar que os índices Doppler, PI e RI, são ferramentas eficientes para detecção de éguas com e sem endometrite. Podendo ser utilizados, ainda que indiretamente, como parâmetros para complementação na identificação de éguas com endometrite subclínica. Pois se a endometrite clínica pode ser detectada pela US modo B (LeBlanc; Causey, 2009; Brinsko et al., 2011), por diagnóstico diferencial com o emprego de diferentes técnicas ultrassonográficas pode ser alcançado o prognóstico de endometrite subclínica.

Neste estudo pode-se observar que a duração do ciclo estral não foi influenciada pela idade das éguas e sim pela presença ou não da patologia uterina e sua classificação. Ou seja, a

duração do ciclo estral é influenciada de acordo a classificação da égua com endometrite clínica, endometrite subclínica ou sem endometrite.

Além disso, foi observado que o grupo das éguas ≥ 14 anos apresentou, em sua maioria, éguas pertencentes ao grupo de endometrite clínica, corroborando com dados relatados por outros autores (Morris; McCue; Aurich, 2020). Acredita-se que esses dados possam estar relacionados a manipulação durante os programas de reprodução equina e as modificações anatômicas previstas e diagnosticadas com a idade, como descrito na literatura (LeBlanc; Causey, 2009; Ferris, 2016; Morrell; Rocha, 2022). Um dado curioso observado, foi que a maioria das éguas diagnosticadas com endometrite subclínica se encontrava no grupo de éguas ≤ 8 anos, dados que asar de incomum já foram relatados por Riddle, LeBlanc, Stromberg (2007).

Foi possível notar que as éguas classificadas no grupo ≤ 8 anos se encontravam associadas ao grupo de éguas endometrite subclínica com classificação da qualidade uterina de IIA, segundo o exame de biopsia endometrial. Enquanto que o grupo de 9-13 anos associado ao grupo de éguas sem endometrite com classificadas uterina de IIB. E o grupo ≥ 14 anos relacionado ao grupo de éguas com endometrite clínica com classificação uterina de III. Apesar de ser esperado que as éguas do grupo de 9-13anos fossem relacionadas ao grupo de éguas com endometrite subclínica e que as éguas do grupo ≤ 8 anos fossem relacionadas ao grupo de éguas sem endometrite, acredita-se que esta informação esteja relacionada a técnica de coleta dos exames de cultura microbiológica escolhida associada a uma possível infecção por microrganismos produtores de biofilme que dificultam a identificação dos mesmos.

Um estudo identificado na literatura descreve, baseada na avaliação do tecido uterino, uma relação direta da idade com a detecção de endometrite em éguas, onde se observa uma relação de 32% para éguas de 5 anos, de 66% para éguas de 6 a 10 anos, de 84% para éguas de 11 a 15 anos, de 90% para éguas de 16 a 20 anos e de 92,5% para éguas com mais de 20 anos de idade (Schöninger; Schoon, 2020). Neste estudo foi observado uma relação de 20% para éguas com ≤ 8 anos e de 9-13 anos e de 25% para éguas com ≥ 14 anos.

Na avaliação da US Doppler modo espectral, foi possível confirmar a correlação de proporcionalidade entre as variáveis PI e RI reafirmando o que já se tem descrito na literatura. Da mesma forma que se pode ratificar que o PI se apresenta como a variável mais confiável para avaliação pelos índices Doppler (Ginther, 2007; Bollwein; Heppelmann; Lüttgenau, 2016).

Outro achado deste estudo foi que que as variáveis PI e RI se comportam de forma proporcional ao crescimento das éguas com endometrite, ou seja, conforme aumenta a capacidade de pulsatilidade e de resistência das artérias uterinas dorsais também se observa o aumento do número de éguas classificadas com endometrite. Esta informação corrobora com outro achado deste estudo relacionada ao exame de citologia endometrial que demonstra um aumento da classificação da quantidade de células de defesa proporcional ao aumento dos valores dos índices Doppler. Contudo, vale recordar que a literatura relata que os índices Doppler são inversamente proporcionais a perfusão vascular. Ou seja, em processos infecciosos deveríamos observar uma diminuição de PI e RI (Bollwein; Heppelmann; Lüttgenau, 2016; Ortega-Ferrusola, 2022).

Todavia, acredita-se que essas informações descritas na literatura se refiram a processos infecciosos agudos. Pois, de acordo com os resultados observados neste estudo, pode ser detectado um alto número de éguas associadas com um processo de cronicidade em virtude da classificação IIB, pelo exame de biopsia endometrial, correspondente a uma moderada inflamação endometrial com lacunas linfáticas de tamanho moderado e assim uma baixa perfusão vascular na região tecidual. Estas informações são compatíveis a uma outra apresentada na literatura em que há um aumento dos índices Doppler em doenças isquêmicas ou em processos degenerativos (Ortega-Ferrusola, 2022). Desta forma, acredita-se que os índices Doppler sejam capazes de identificar éguas com endometrites com caráter crônico.

Podemos destacar, neste estudo, que PI e RI apresentaram diferenças entre os grupos tratamentos, onde se pode observar que tanto o grupo de éguas com endometrite clínica como o grupo de endometrite subclínica demonstraram valores superiores ao grupo controle. E que dentro de um ciclo estral essa diferença pode ser diagnosticada no 15º dia do ciclo estral após a ovulação período em que também se observa o processo de luteólise. Estando apto de ser recomendado como um método de diagnóstico complementar. O PI também pode ser utilizado para discriminar éguas do grupo endometrite clínica em relação as éguas do grupo endometrite subclínica e controle no 12º dia do ciclo estral.

Na avaliação pela US Doppler modo Powerflow, com a avaliação subjetiva da vascularização dos segmentos uterinos pode-se destacar a diferença encontrada entre as éguas com endometrite clínica em relação a éguas com endometrite subclínica ou sem endometrite. Essa variação pode ser detectada no 01º dia para éguas com endometrite subclínica, no 09º dia para éguas com endometrite subclínica e ou sem endometrite e no 10º dia para éguas sem endometrite. Esses achados podem ser conectados ao pico de concentração de P4 que ocorre entre os dias 8-10 do ciclo estral da égua (Sieme et al., 2015) juntamente com a ação de vaso constrição que a P4 realiza na região uterina durante o diestro (Satué; Gardon, 2020).

No entanto, quando se é citado éguas com endometrite clínica percebe-se que a ação das células de defesa como neutrófilos, prostaglandinas, ocitocinas e citocinas pró e anti-inflamatórias ocorre no início do diestro na tentativa de propiciar um ambiente uterino apto a uma possível gestação, porém esta ação se torna falha. Observa-se um aumento das ações anti-inflamatórias fazendo com que o endométrio libere prostaglandinas rapidamente levando a uma luteólise precoce (Troedsson; Woodward, 2016; Christoffersen; Troedsson, 2017; Morris; McCue; Aurich, 2020). Justificando desta forma o aumento da vascularização dos segmentos uterinos das éguas com endometrite clínica, pois retornam ao cio precocemente quando comparadas as outras classes.

Pelo fato da avaliação subjetiva ter sido indicada na identificação somente de endometrites clínicas, suspeitamos que esses achados não estejam relacionados a endometrite clínica ou subclínica, e sim ao grau da endometrite: aguda ou crônica que demanda um maior ou menor aporte sanguíneo, respectivamente (Katila, 2016; Canisso; Segabinazzi; Fedorka, 2020).

Associando essas informações, observamos que no exame de citologia endometrial foi possível, pela avaliação subjetiva da ultrassonografia Doppler modo Powerflow, distinguir éguas sem e com endometrite baseado nas classificações de citologia negativa e positiva (moderada e grave), respectivamente. Supõem-se também, baseado no exame de cultura microbiológica, que a avaliação subjetiva seja indicado na identificação de endometrites agudas, visto a diferença observada pelas bactérias gram positivas que apresentam uma maior classificação de vascularização uterina condizente com um maior aporte sanguíneo para o transporte de células de defesa para combater a infecção uterina.

Desta forma, é possível correlacionar as informações de citologia endometrial e cultura microbiológica com uma endometrite aguda gerada por bactérias gram positivas, o que condiz com o que já se tem descrito na literatura, onde bactérias gram positivas apresentam correlação de citologias endometriais positivas com um alto número de neutrófilos e com produção de exsudato inflamatório (LeBlanc; Causey, 2009; Leblanc, 2010).

Em relação aos dados tabelados da análise objetiva da vascularização dos segmentos uterinos para avaliação da quantidade e intensidade dos pixels das imagens Doppler não foi possível observar nenhuma diferença significativa entre os grupos tratamentos, não sendo indicado como um método de diagnóstico complementar para identificação de éguas com e sem endometrite. Contudo esse método foi importante para a identificação de éguas que apresentavam citologia endometrial moderada, biopsia endometrial com classificação IIA e

uma prioridade a éguas com infecção por bactérias gram positivas (para quantidade de pixels) e éguas com infecção fúngica (para intensidade de pixels).

Pressupomos que essa combinação de resultados esteja associada a endometrites agudas associadas a microrganismos produtores de biofilme. Pois observa-se que as éguas apresentam infecções com baixa concentração de células de defesa e com um endométrio com suave inflamação e lacunas linfáticas leve, não caracterizando a existência de processos crônicos. Pois, como relatado pela literatura, a velocidade e quantidade de fluxo sanguíneo está relacionada a intensidade de pixels (cores mais claras) visualizadas nas imagens ultrassonográficas (Bollwein; Heppelmann; Lüttgenau, 2016), ou seja, relacionados a processos agudos.

Dentre as variáveis estudadas e analisadas foi notado que a avaliação subjetiva e a avaliação objetiva tanto da quantidade quanto da intensidade apresentaram uma correlação significativa, positiva e moderada. A vista disso, podemos considerar a avaliação subjetiva realizada por um operador treinado um método indicado como diagnóstico complementar para auxílio do prognóstico final do paciente.

Não foi possível detectar uma correlação com significância entre a avaliação subjetiva da vascularização dos segmentos uterinos e PI e RI. Acredita-se que este fato está relacionado com a distância entre os dois locais de coleta da amostra, sendo um no ramo dorsal da artéria uterina próxima a artéria aorta na bifurcação da artéria ilíaca externa e o outro na parede tecidual uterina.

7 CONCLUSÃO

Embasado nos dados descritos e discutidos neste estudo, conclui-se que os índices de pulsatilidade e resistividade pode ser recomendado como um método de diagnóstico complementar para detecção de éguas com e sem endometrite quando examinadas no 15º dia do ciclo estral.

Outro achado deste estudo foi que que as variáveis PI e RI se comportam de forma proporcional ao crescimento das éguas com endometrite, podendo ser recomendado como um método de diagnóstico complementar para identificação de éguas com endometrites com caráter crônico.

A avaliação subjetiva, realizado pela ultrassonografia Doppler modo Powerflow, se demonstrou eficiente na detecção de éguas com endometrite clínica examinadas no 01º, 09º e 10º dia do ciclo estral. Como também, baseado no exame de cultura microbiológica, a avaliação subjetiva pode ser recomendado como um método de diagnóstico complementar na identificação de endometrites agudas

Já a avaliação objetiva da vascularização dos segmentos uterinos para avaliação da quantidade e intensidade dos pixels das imagens Doppler não foi possível observar nenhuma diferença significativa, não sendo indicado como um método de diagnóstico complementar de éguas com e sem endometrite. Porém, pode ser recomendado como um método de diagnóstico complementar na identificação de endometrites agudas associadas a microrganismos produtores de biofilme.

Por conta da correlação relatada entre a avaliação subjetiva e a avaliação objetiva tanto da quantidade quanto da intensidade, podemos considerar a avaliação subjetiva realizada por um operador treinado, um método indicado como diagnóstico complementar para auxílio do prognóstico final do paciente relacionado a presença ou não de endometrite.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNABY, E. A. et al. Uterine hemodynamic patterns, oxidative stress, and chromoendoscopy in mares with endometritis. **Theriogenology**, v. 158, p. 112-120, 2020.
- ADAMS, G. et al. Effect of uterine inflammation and ultrasonically detected uterine pathology on fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 445-454, 1987.
- ALLEN, W. R. et al. Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mares and stallions in England. **Equine veterinary journal**, v. 39, n. 5, p. 438-445, 2007.
- AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3-4, p. 220-228, 2011.
- AYRES, M. et al. BioEstat. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém, Software versão 5.3. 2007.
- BARBA, M. et al. Vaginal microbiota is stable throughout the estrous cycle in arabian mares. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2020, 2020.
- BARBACINI, S. et al. Retrospective Study on the Incidence of Post insemination Uterine Fluid in Mares Inseminated with Frozen/Thawed Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 23 (11), p. 493-496, 2003.
- BEEHAN, D. P. et al. The evaluation of biofilm-forming potential of Escherichia coli collected from the equine female reproductive tract. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 11-12, p. 935-939, 2015.
- BLUE, M. G. Mycotic endometritis in mares. Review and clinical observations. **NZ vet. J**, v. 35, p. 181-183, 1987.
- BOLLWEIN, H. et al. Transrectal color Doppler sonography of the A. uterine in cyclic mares. **Theriogenology**, v.49, p.1483-1488, 1998
- BOLLWEIN, H.; HEPPELMANN, M.; LÜTTGENAU, J. Ultrasonographic Doppler use for female reproduction management. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, n. 1, p. 149-164, 2016.
- BRINSKO, S. P. et al. **Manual of Equine Reproduction**. 3ª ed., Elsevier, 2011. 332p.
- BROGAN, P. T. et al. Relationship between colour flow Doppler sonographic assessment of corpus luteum activity and progesterone concentrations in mares after embryo transfer. **Animal reproduction science**, v. 166, p. 22-27, 2016.
- BUCZKOWSKA, J. et al. Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2014.
- CABALLEROS, J. E. et al. Ultrastructural and histological characteristics of the equine endometrium at day 5 post ovulation. **Theriogenology**, v. 132, p. 106-112, 2019.
- CABRERA, T.; PASTORELLO, M.; ALVARENGA, M. A. Prevalência e perfil de sensibilidade bacteriana em éguas com Endometrite. **ENCICLOPEDIA BIOSFERA**, v. 13, n. 23, 2016.

- CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística. Princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 255 p. 2003.
- CAMARGO FERREIRA, J. et al. Luteal vascularity and embryo dynamics in mares during early gestation: Effect of age and endometrial degeneration. **Reproduction in domestic animals**, v. 54, n. 3, p. 571-579, 2019.
- CAMARGO FERREIRA, J.; MEIRA, C. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciência Rural (UFSM. Impresso)**, v. 41, p. 1063-1069, 2011.
- CAMOZZATO, G. C. et al. Ultrastructural and histological characteristics of the endometrium during early embryo development in mares. **Theriogenology**, v. 123, p. 1-10, 2019.
- CAMPOS, I. S. et al. Spectral Doppler ultrasound in the placental development of Mangalarga Marchador mares. **Theriogenology**, v. 180, p. 171-175, 2022.
- CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; FEDORKA, C. E. Persistent breeding-induced endometritis in mares—A multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 4, p. 1432, 2020.
- CANISSO, I. F.; STEWART, J.; DA SILVA, M. A. C. Endometritis: Managing persistent post-breeding endometritis. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 465-480, 2016.
- CARD, C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. **Theriogenology**, v.64, p. 580–588, 2005.
- CARVALHO, C. F.; CHAMMAS, M. C.; CERRI, G. G. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia. **Ciência Rural**, v.8, n.3, p.872-879, 2008.
- CAUSEY, R. C. Mucus and the mare: How little we know. **Theriogenology**, v.68, p. 386–394, 2007.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Relação entre a qualidade do sêmen com a endometrite pós-cobertura em equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 169-174, 2017.
- CHRISTOFFERSEN, M. et al. Diagnostic double-guarded low-volume uterine lavage in mares. **Theriogenology**, v. 83, n. 2, p. 222-227, 2015b.
- CHRISTOFFERSEN, M. et al. Risk factors associated with uterine fluid after breeding caused by *Streptococcus zooepidemicus*. **Theriogenology**, v. 84, n. 8, p. 1283-1290, 2015a.
- CHRISTOFFERSEN, M.; TROEDSSON, M. H. T. Inflammation and fertility in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 14-20, 2017.
- EL-SHAHAT, K. H.; EL-MAATY, A. A. B. O.; HELMY, M. Power and colour doppler ultrasonography for evaluation of the ovarian and uterine haemodynamics of infertile mares. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, 0004, 2019.
- ESTELLER-VICO, A.; LIU, I. K.; COUTO, S. Uterine vascular degeneration is present throughout the uterine wall of multiparous mares. Colinearity between elastosis, endometrial grade, age and parity. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 1078-1084, 2012.

- FACTOR, L.; CRUZ, D. S.; ORLANDI, C. M. Métodos de coleta de amostra para exame de citologia endometrial em éguas com endometrite. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 43, n. 3, p. 748-755, 2019.
- FARIAS, L. D. et al. Indução da ovulação em éguas: uma revisão. **R. bras. Reprod. Anim.**, p. 17-21, 2016.
- FERREIRA, C. S. C. et al. Spectral Doppler Ultrasound in selecting an equine embryo receiver. **Reproduction in Domestic Animals**. 2020.
- FERREIRA, J. C. et al. Real-time characterization of the uterine blood flow in mares before and after artificial insemination. **Animal reproduction science**, v. 160, p. 90-96, 2015.
- FERREIRA, J. C.; GASTAL, E. L.; GINTHER, O. J. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. **Reproduction**, v. 135, p. 541 – 550, 2008.
- FERRIS, R. A. Endometritis: Diagnostic tools for infectious endometritis. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 481-498, 2016.
- FERRIS, Ryan A. et al. Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical perspective. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 41, p. 74-80, 2017.
- FOGAÇA, J. L. et al. Modalidade Doppler na Ultrassonografia. **5º Jornada Científica e Tecnológica da FATEC de Botucatu**, São Paulo, Brasil. 2016.
- GÉRARD, N.; ROBIN, E. Cellular and molecular mechanisms of the preovulatory follicle differentiation and ovulation: What do we know in the mare relative to other species. **Theriogenology**, v. 130, p. 163-176, 2019.
- GINTHER, O. J. Follicle selection in mares: 90 years from observation to theory. **Journal of equine veterinary science**, v. 54, p. 24-31, 2017.
- GINTHER, O. J. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 112-125, 2014.
- GINTHER, O. J. Intraovarian spatial and vascular harmony between follicles and corpus luteum in monovulatory heifers, mares, and women. **Theriogenology**, v. 128, p. 31-39, 2019.
- GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: Color-Doppler ultrasonography**. CrossPlains: Equiservices, p.258, 2007.
- GINTHER, O. J.; SILVA, L. A. Incidence and nature of disorientation of the embryo proper and spontaneous correction in mares. **Journal of equine veterinary science**, v. 26, n. 6, p. 249-256, 2006.
- GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24 p.516-526, 2004.
- HAFEZ, E.S.E., HAFEZ, B. **Functional anatomy of reproduction. In: HAFEZ, E.S.E. Reproduction in farm animals**. 7. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.1-68, 2000.
- HEDIA, M. et al. Hemodynamic changes in cytokines, chemokines, acute phase proteins and prostaglandins in mares with subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 171, p. 38-43, 2021.
- HENNEKE, D. R. et al. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine veterinary journal**, v. 15, n. 4, p. 371-372, 1983.

- HERZOG, K. et al. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 691-697, 2010.
- ISHAK, G. M. et al. Pre-ovulatory follicle affects corpus luteum diameter, blood flow, and progesterone production in mares. **Animal reproduction science**, v. 187, p. 1-12, 2017.
- JONES, D. Fluid distribution and cervical loss following intrauterine infusion in the mare. **Equine Practice**, v.17, p. 12–19, 1995.
- KATILA, T. Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. **Reproductive biology**, v. 16, n. 3, p. 189-196, 2016.
- KATILA, T.; FERREIRA-DIAS, G. Evolution of the Concepts of Endometriosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. **Animals**, v. 12, n. 6, p. 779, 2022.
- KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. **Current therapy in theriogenology**, v. 2, n. 3, p. 723-729, 1986.
- KÖHNE, M. et al. Diagnostic and treatment practices of equine endometritis—a questionnaire. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 547, 2020.
- KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. **Anatomia dos animais domésticos**: texto e atlas colorido. Porto Alegre, Artmed: Grupo A, 2016. E-book. ISBN 9786558820239.
- KREKELER, N. et al. Association of the uterine microbiome to mare fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, p. 104724, 2023.
- LEBLANC, M. M. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, p. 21-27, 2010.
- LEBLANC, M. M.; CAUSEY, R. C. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 10-22, 2009.
- LECTION, J. et al. Use of endometrial swab and cytobrush for detection of inflammatory diagnostic markers of endometritis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, p. 104725, 2023.
- LEMOS, S. G. C. et al. Vascularização uterina de éguas prenhes de jumento e de garanhão monitoradas por ultrassonografia Doppler1. **Pesq. Vet. Bras**, v. 37, n. 8, p. 877-882, 2017.
- LIMA, Roberto Arruda de Souza; CINTRA, André Galvão. Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 56p. 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>
- LIU, I. K. M.; TROEDSSON, M. H. T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 415-420, 2008.
- LIU, I. The diagnosis causes and treatment of persistent endometritis in the mare, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p. 256–261, 2011.
- LIU, Y.; ZHANG, J.; JI, Y. Environmental factors modulate biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Science Progress**, v. 103, n. 1, p. 0036850419898659, 2020.

LÜTTGENAU, J. et al. Intrauterine infusion of killed semen adversely affects uterine blood flow and endometrial gene expression of inflammatory cytokines in mares susceptible to persistent breeding-induced endometritis. **Theriogenology**, v. 163, p. 18-30, 2021.

MORAIS, R.C.L. **Efeito da infusão intrauterina de dimetilsulfóxido sobre a vascularização e o perfil microbiológico uterino em éguas com endometrite**, 131F (Tese), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2021.

MOREL, M. C. G. D. **Equine Reproductive: Physiology, Breeding and Stud Management**. 5 ed. Cabi, 2020.

MORELLI, K. G. et al. Doppler ultrasonography: an improvement in real-time recipient selection in equine ET programs. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, p. 104665, 2023.

MORENO, I. et al. The diagnosis of chronic endometritis in infertile asymptomatic women: a comparative study of histology, microbial cultures, hysteroscopy, and molecular microbiology. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 218, n. 6, p. 602. e1-602. e16, 2018.

MORRELL, J. M.; ROCHA, A. A novel approach to minimising acute equine endometritis that may help to prevent the development of the chronic state. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 799619, 2022.

MORRIS, Lee HA; MCCUE, P. M.; AURICH, Christine. Equine endometritis: A review of challenges and new approaches. **Reproduction**, v. 160, n. 5, p. R95-R110, 2020.

NERVO, T. et al. Chronic endometritis in subfertile mares with presence of chlamydial DNA. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 73, p. 91-94, 2019.

NIELSEN, J. M. et al. 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.

NIELSEN, J. M.; FOG, P.; BOJESSEN, A. M. Impact of yeast endometritis on fertility in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 99, p. 103409, 2021.

NIETO-OLMEDO, P. et al. The Use of Power Mode Doppler Ultrasonography as a Predictive Tool of Early Pregnancy in the Mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 66, p. 218-219, 2018.

OLIVEIRA, M. 2021. **Hemodinâmica da interação materno-fetal e histopatologia placentária de éguas prenhas de jumento e de garanhão**. 114p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense Área de concentração: Clínica e Reprodução Animal). Niterói-RJ, Brasil. 2021.

OLIVERIA, M. et al. Índices de resistência e pulsatilidade das artérias umbilicais em éguas gestantes de jumento vs garanhão nos primeiros 50 dias de gestação. **Anais da XX Conferência Anual ABRAVEQ**, São Paulo – SP, 2019.

ORTEGA-FERRUSOLA, C. et al. Advances in the ultrasound diagnosis in equine reproductive medicine: New approaches. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 57, p. 34-44, 2022.

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

- PANZANI, D. et al. Corpus luteum vascularization and progesterone production in autumn and winter cycles of the mare: relationship between ultrasonographic characteristics of corpora lutea and plasma progesterone concentration in the last cycles before anestrus. **Journal of equine veterinary science**, v. 56, p. 35-39, 2017.
- PARRILLA-HERNANDEZ, S. et al. High concentrations of myeloperoxidase in the equine uterus as an indicator of endometritis. **Theriogenology**, v.81, p. 936–940, 2014.
- PASCOTTINI, O. B. et al. General and comparative aspects of endometritis in domestic species: a review. **Reproduction in domestic animals**, 58(Suppl. 2):49–71, 2023.
- PENNINCK, D.; D'ANJOU, M. **Atlas of small animal ultrasonography**. 2ª ED. John Wiley & Sons, 2015.
- PIERSON, R. A.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Basic principles and techniques for transrectal ultrasonography in cattle and horses. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 3-20, 1988.
- RAHAWY, M. A.; AL-HAAIK, A. G.; HAYAWY, E. H. Detection of endometritis using uterine cytobrush and ultrasonography in mares. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 36, n. 1, p. 39-44, 2022.
- RAVAIOLI, V. et al. Infectious Endometritis in Mares: Microbiological Findings in Field Samples. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 112, p. 103913, 2022.
- REQUENA, F. et al. Assessment of age effects on ovarian hemodynamics using doppler ultrasound and progesterone concentrations in cycling Spanish Purebred mares. **Animals**, v. 11, n. 8, p. 2339, 2021.
- RESENDE, H. L. et al. Determination of equine fetal sex by Doppler ultrasonography of the gonads. **Equine veterinary journal**, v. 46, n. 6, p. 756-758, 2014.
- RIBAS, J. A. S.; CARVALHO, E. Q.; STUSSI, J. P. Endometrite fúngica em éguas: diagnóstico e implicações clínico-patológicas. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 21, n. 3, 2014.
- RIDDLE, W. T.; LEBLANC, M. M.; STROMBERG, A. J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 395-402, 2007.
- ROMANO, R. M. et al. Characterization of luteal blood flow and secretion of progesterone in mares treated with human chorionic gonadotropin for ovulation induction or during early diestrus. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 7, p. 591-597, 2015.
- RUA, M. A. S. et al. Métodos diagnósticos de endometrite em éguas. **Pubvet**, v. 10, p. 873-945, 2016.
- SÁ, M. A. F. et al. Acute endometritis induced by *Escherichia coli* in mares evaluated through color doppler ultrasonography, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.72, n.5, p.1586-1598, 2020.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 265 p. 2002.
- SAMPER, J. C. Uterine Edema in the Mare. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**, p.133–138, 2009.

- SATUÉ, K.; GARDON, J. C. Infection and Infertility in Mares. In: **Genital Infections and Infertility**. InTech, 2016.
- SCHÖNIGER, S.; SCHOON, H. A. The healthy and diseased equine endometrium: A review of morphological features and molecular analyses. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 625, 2020.
- SERTICH, P. L. **Intrauterine diagnostic procedures**. In J. Samper, J. Pycock, & A. McKinnon (Eds.), *Current therapy in equine reproduction* (pp. 36–43). Saunders Elsevier, 2007.
- SIEME, H. et al. Improving the formation and function of the corpus luteum in the mare. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.117-120, 2015.
- SIEMIENIUCH, M. J. et al. Advanced age in mares affects endometrial secretion of arachidonic acid metabolites during equine subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 103, p. 191-196, 2017.
- SILVA, L. A. et al. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 3, p. 755-761, 2005.
- SILVA, L. A. et al. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. **Anim Reprod**, v. 3, n. 339, p. e46, 2006.
- SILVA, L. A.; GINTHER, O. J. An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 2, p. 337-343, 2006.
- TEIXEIRA-SOARES, C. M. et al. Comparison between gynecological examination methods and sample collection techniques for the diagnosis of endometritis in subfertile mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 119, p. 104147, 2022.
- TROEDSSON, M. H. T.; WOODWARD, E. M. Our current understanding of the pathophysiology of equine endometritis with an emphasis on breeding-induced endometritis. **Reproductive biology**, v. 16, n. 1, p. 8-12, 2016.
- VALLEJO ARISTIZÁBAL, V. H. et al. Transferência de embriões em éguas receptoras anovulatórias. **Revista de Medicina Veterinaria**, n. 33, p. 137-147, 2017.
- WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. T. Equine breeding-induced endometritis: A review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 9, p. 673-682, 2013.
- WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. T. Inflammatory mechanisms of endometritis. **Equine veterinary journal**, v. 47, n. 4, p. 384-389, 2015.
- ZIMRI, C. V. et al. Revisión: El Ciclo Reproductivo de la Yegua. **Abanico Veterinario**, v. 8, n. 3, 2018.

9 ANEXOS

A – Certificado CEUA-IZ/UFRRJ



INSTITUTO DE ZOOTECNIA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IZ/UFRRJ

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Diferença de hemodinâmica uterina de éguas normais x éguas com endometrite.", protocolo nº 0121-07-2021, sob a responsabilidade de Júlio Cesar Ferraz Jacob e equipe; que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IZ/UFRRJ) na XLVIII reunião de 06/08/2021.

Finalidade da Proposta: pesquisa
Vigência da Proposta: agosto de 2023
Área: Ciências Agrárias; Reprodução Animal
Origem: Setor de Equideocultura da Fazenda Universitária da UFRRJ
Espécie: Equinos
Quantidade: 30 éguas

"Resumo: A endometrite equina é considerada a terceira principal doença da espécie e a causa das maiores perdas econômicas na reprodução equina por falhas gestacionais precoces. No entanto, não há relatos que descrevam e avaliem a aplicação da ultrassonografia Doppler modo powerflow e espectral no diagnóstico da endometrite e nem da formação de um padrão de vascularização dos segmentos uterinos quando avaliadas éguas com ou sem endometrite. Com isso, o objetivo geral do projeto é formar um padrão na diferenciação da hemodinâmica vascular uterina das éguas normais e compará-las as éguas suscetíveis a endometrite. O projeto será realizado no setor de equideocultura, localizada nas dependências da UFRRJ. Serão utilizadas 30 éguas separadas em três grupos: G1 – grupo de éguas sem endometrite; G2 – grupo de éguas com endometrite subclínica; G3 – grupo de éguas com endometrite clínica. A primeira etapa consiste numa avaliação das éguas (histórico reprodutivo e ultrassonográfico). Em seguida será acompanhado ciclo estral até ser observado folículo pré-ovulatório. A partir disso será realizado um lavado de baixo volume a fim de coletar amostras para exame citológico, cultura bacteriana e fúngica. A partir da ovulação, as éguas serão acompanhadas pela ultrassonografia (US) transretal modo B e US Doppler modo powerflow dos segmentos uterinos e US Doppler modo espectral das artérias uterinas. Após completar um ciclo de avaliação da hemodinâmica uterina será realizado uma biópsia uterina para fechamos um diagnóstico mais fidedigno da sanidade uterina das éguas utilizadas. Depois da realização dos exames complementares, essas éguas serão novamente acompanhadas em um terceiro ciclo estral para tratamento uterino das éguas classificadas com endometrite com ozonioterapia. Deste modo, pretende-se desenvolver um padrão da hemodinâmica uterina para essa patologia. E desta forma colaborar em novos métodos de diagnóstico complementar para um prognóstico final mais fidedigno ao caso. Além de tratar as éguas com alterações uterinas com a ozonioterapia."

Seropédica, 28 de outubro de 2021

Prof. Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira
Coordenador da CEUA/IZ/UFRRJ

BR 465, Km 7 / Campus da UFRRJ - Seropédica - Rio de Janeiro - CEP: 23.890-000, ceua.iz.ufrrj@gmail.com

B – Dados Dos Exames Complementares Do Grupo Controle

Animal	Idade	Histórico Reprodutivo	Citologia endometrial	Cultura bacteriana	Cultura fungica	FIU e/ou edema exacerbado	Biopsia uterina	Grupo
Xarlote	10		0,20	-	-	-	IIB	GC
Uruguaiana	12		2,13	-	-	-	IIA	GC
Xayla	10		0,73	-	-	-	IIA	GC
Vania	11		0,53	-	-	-	IIA	GC
Fernandinha	17		2,83	-	-	-	III	GC
Xantipa	10		0,57	-	-	-	IIB	GC
Trovoada	13		0,97	-	-	-	IIB	GC
Rouge	15		0,13	-	-	-	IIB	GC
Xantala	10		0,47	-	-	-	IIA	GC
Única	12		0,30	-	-	-	IIB	GC
Chopada	5		0,07	-	-	-	I	GC
Copa do mundo	5		0,27	-	-	-	IIA	GC
Carioca	5		1,00	-	-	-	IIA	GC
Cachoeira	5		1,00	-	-	-	IIA	GC
Égua 17	10		0,27	-	-	-	IIB	GC
Pampa Paula	13		0,05	-	-	-	III	GC

GC: grupo controle

C – Dados Dos Exames Complementares Do Grupo Endometrite Subclínica

Animal	Idade	Histórico Reprodutivo	Citologia endometrial	Cultura bacteriana	Cultura fungica	FIU e/ou edema exacerbado	Biopsia uterina	Grupo
Americana	8		3,50	KP / PA/ EC/ SA	-	-	IIA	GES
Veneza	11		1,00	KP / PA/ EC	-	-	IIB	GES
Amélia	8		0,40	EC	Cladosporium spp.	-	IIB	GES
Boresta	6		0,17	SA/ EC	Penicillium spp.	-	IIB	GES
Tempestade	13		2,50	AS	Aspergillus spp.	-	IIB	GES
Xayene	10		0,73	EC/ SS	-	-	IIB	GES
Neblina	19		2,67	SA/ SH	-	-	IIB	GES
Xereta	10		1,47	EC	Trichophyton mentagrophytes	-	IIB	GES
Xisnanda	10		2,90	EC	-	-	IIB	GES
Aninha	8		0,60	EC/B	-	-	III	GES
Querencia	16		1,07	SA/ SS	-	-	III	GES
Açucena	8		2,10	-	Trichosporum spp.	-	III	GES
Bella	7		0,47	SA/EC/Proteus	-	-	I	GES
Cruel	5		0,50	SA	-	-	IIA	GES
Égua 24	11		0,63	KP	Candida spp.	-	III	GES

GES: grupo endometrite subclínica; KP = Klebsiella pneumoniae; PA = Pseudomonas aeruginosa; EC = Escherichia coli; SA = Staphylococcus aureus; SH = Staphylococcus hyicus; SS = Staphylococcus saprophyticus; SSc = Staphylococcus sciuri

D - Dados Dos Exames Complementares Do Grupo Endometrite Clínica

Animal	Idade	Histórico Reprodutivo	Citologia endometrial	Cultura bacteriana	Cultura fungica	FIU e/ou edema exacerbado	Biopsia uterina	Grupo
Laisa	21	aborto	1,73	KP / PA	-	ED5/ Liq. 3.80	III	GEC
Valquiria	11	aborto	4,37	KP / PA/ EC	-	ED5 / muco leitoso	IIA	GEC
Anitta	8		4,13	SA	Aspergillus spp.	Muco / liq. 3.90	IIB	GEC
Jaguariuna	23	Urovagina	14,53	SA/ SH	-	ED5/ Liq. 3.40	III	GEC
Rainha	15	Liq. Uteirno	4,53	SSc	-	liq.3.35	III	GEC
Mara	20		1,53	EC/B	-	liq. 2.32	III	GEC
Nadir	19		0,10	-	Trichophyton mentagrophytes	muco leitoso / liq.2.5	IIB	GEC
Suzi	14		1,10	SA/EC	-	liq.2.7	IIB	GEC
Vicky	11		0,60	SA	-	liq.2.7	IIA	GEC
Quira	16		0,70	-	Trichophyton mentagrophytes	muito ar	IIA	GEC
Copacabana	5		0,23	-	Candida /Rodotorula	liq. 3.90	IIA	GEC
Samantha	14		0,43	EC	-	liq. 3.44	IIB	GEC
Égua 79	16		9,40	EC	-	liq. 2.5	III	GEC
Égua 74	12		0,10	EC	-	liq. 4.70	III	GEC

GEC: grupo endometrite clínica; KP = Klebsiella pneumoniae; PA = Pseudomonas aeruginosa; EC = Escherichia coli; SA = Staphylococcus aureus; SH = Staphylococcus hyicus; SS = Staphylococcus saprophyticus; SSc = Staphylococcus sciuri