

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

SABRINA BELLAVER COUSSEAU

**REAÇÃO INFLAMATÓRIA UTERINA EM ÉGUAS APÓS INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL COM SÊMEN CONGELADO CONTENDO ESPERMATOZOIDES
VIVOS OU MORTOS**

Porto Alegre

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**REAÇÃO INFLAMATÓRIA UTERINA EM ÉGUAS APÓS INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL COM SÊMEN CONGELADO CONTENDO ESPERMATOZOIDES
VIVOS OU MORTOS**

Autora: Sabrina Bellaver Cousseau

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Medicina Veterinária, da Faculdade de Veterinária da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do título de Médica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

Porto Alegre

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por sempre me apresentar, após momentos de dificuldade, com momentos onde há esperança e onde minhas forças foram renovadas.

À minha mãe Sandra por ser minhas raízes e minhas asas. Se hoje eu “sou”, foi porque ela foi e é minha maior incentivadora, defensora e amiga.

Ao meu pai Carlos, por sempre me manter otimista e com os pés no chão, sempre me dizendo que “tudo na vida é passageiro”.

Ao meu namorado por todo apoio e paciência no decorrer deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos por aceitar ser meu orientador e por toda a paciência.

À Faculdade de Veterinária da Universidade da República do Uruguai por disponibilizar seus laboratórios para a análise de parte das amostras deste trabalho, assim como às pessoas que me auxiliaram durante minha estadia no Uruguai, dentre elas: Nicolás P. Cazales e toda a sua família.

À Prof. Dr. Sandra Mara da Encarnação Fiala Rechsteiner por ter aceitado me orientar na análise de amostras deste projeto e por toda a paciência.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas por me auxiliarem no processamento de amostras e por tornarem meus dias em Pelotas mais leves e divertidos.

Ao Setor de Patologia Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS por me permitir fazer uso de seus equipamentos e instalações.

Aos amigos antigos e aos novos amigos que fiz no decorrer deste trabalho, por sempre me incentivarem e não me deixarem sentir sozinha.

Ao REPROLAB, com seus estagiários, pós-graduandos e professores, por ter sido minha escola durante 4 anos e por ter me fornecido a base que me permitiu realizar este trabalho.

À UFRGS, por me proporcionar ensino gratuito e de qualidade.

E por fim, ao cavalo. Através dele pude conhecer lugares e pessoas incríveis, que muito me ensinaram e fizeram crescer. Nele encontrei razão e força. Com ele aprendi a ter um pouco mais de paciência, a ser um pouco mais resiliente e a dar mais valor aos pequenos momentos. Graças à ele, hoje conheço mais sobre mim. À minha maior paixão.

RESUMO

Após a cobertura ou inseminação na égua, há o desenvolvimento de uma reação inflamatória uterina aguda. O objetivo do presente estudo foi avaliar a reação inflamatória uterina 4 horas após a inseminação no corpo uterino, com espermatozoides vivos ou mortos, buscando identificar possíveis diferenças na resposta imune. Para tal, foram utilizadas 20 éguas em cio (n=20), com folículo dominante \pm 35mm, edema uterino, sem acúmulo de líquido intrauterino e livres de PMNs ao exame citológico. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: *LIVE* – inseminação com espermatozoides vivos e *DEAD* - inseminação com espermatozoides mortos através de congelamento rápido em nitrogênio líquido seguido de descongelamento a 37°C, sendo utilizado um *pool* de sêmen congelado pertencente a dois garanhões. Quatro horas após a inseminação as éguas foram abatidas, seus úteros coletados e lavados com PBS, sendo o líquido recuperado, separado para contagem de leucócitos. Após a lavagem, foram retiradas 3 amostras de endométrio: corno contralateral, corno ipsilateral e corpo uterino, para exame histopatológico. As éguas inseminadas com espermatozoides mortos apresentaram um número menor de leucócitos recuperados no lavado uterino, resultado que se repetiu na contagem de neutrófilos por campo na análise histopatológica dos estratos compacto e esponjoso, onde éguas inseminadas com espermatozoides mortos apresentaram um infiltrado neutrofilico menos intenso. Não foi observada influência do local, dentro do mesmo grupo, sobre a reação inflamatória e não houve interação entre os grupos. Contudo, quando se comparou o número de neutrófilos por local, entre os grupos, foram observadas tendências de o infiltrado neutrofilico ser menor no estrato compacto do corno contralateral de éguas inseminadas com espermatozoides mortos e maior no estrato esponjoso do corno ipsilateral de éguas inseminadas com espermatozoides vivos. Além disso, o número de neutrófilos por campo do estrato esponjoso do corno contralateral foi menor no grupo de éguas inseminadas com espermatozoides mortos. Portanto, concluiu-se que a inseminação com espermatozoides mortos ocasionou uma reação inflamatória menos intensa 4 horas após a introdução do sêmen no lúmen uterino, quando comparada à inseminação com espermatozoides vivos. Estes resultados podem estar relacionados com as diferentes interações de espermatozoides vivos e mortos com o plasma seminal, o sistema imune e o ambiente uterino.

Palavras-chave: Endometrite. Espermatozoide. Plasma Seminal. Neutrófilo.

ABSTRACT

After the natural breeding or insemination in the mare, an acute inflammatory reaction develops. The aim of this study was to evaluate the uterine inflammatory reaction 4 hours after insemination, in the body of the uterus, with live and dead spermatozoa, looking to identify possible differences in the immune response. Twenty mares were used in estrus with dominant follicles \pm 35mm, uterine edema, without uterine fluid and without PMNs in the cytological examination. The animals were randomly distributed in to two groups: LIVE – insemination with live spermatozoa and DEAD – insemination with dead spermatozoa, killed by snap freezing in liquid nitrogen followed by thawing at 37°C. A pool of frozen semen from two stallions was used. Four hours after the insemination the mares were slaughtered and the uteruses were collected and flushed with PBS, the fluid recovered was then examined for leukocytes search and count. After the flush, 3 endometrial samples (contralateral horn, ipsilateral horn and body) were collected for histopathological examination. Mares that were inseminated with dead spermatozoa showed a significantly smaller number of leucocytes in the uterine flush, a result that repeated itself in the neutrophil count per field in the stratum compactum and stratum spongiosum in the histopathological examination, where mares inseminated with dead spermatozoa presented a less intense neutrophilic infiltrate. It wasn't observed an influence of the site sampled, on the inflammatory reaction in the same group and there was no interaction between the two groups. However, when the number of neutrophils per field and per site was compared between the two groups, tendencies for the neutrophilic infiltrate being less intense in the stratum compactum of the contralateral horn of mares inseminated with dead spermatozoa, and more intense in the stratum spongiosum of the ipsilateral horn of mares inseminated with live spermatozoa, were observed. In addition, the number of neutrophils per field of the stratum spongiosum in the contralateral uterine horn was significantly smaller in the group of mares inseminated with dead spermatozoa. It was concluded that the insemination with dead spermatozoa entailed a less intense inflammatory reaction 4 hours after the introduction of semen in the uterine lumen, when compared to the insemination with live spermatozoa. This results may be related to the different interactions of live and dead spermatozoa with seminal plasma, the immune system and the uterine environment.

Key words: Endometritis. Spermatozoa. Seminal Plasma. Neutrophil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Número de leucócitos observados após lavagem uterina, no grupo de éguas inseminadas com espermatozoides vivos (*LIVE*) e no grupo de éguas inseminadas com espermatozoides mortos (*DEAD*)..... 28
- Figura 2** – Número de neutrófilos por campo do estrato compacto de amostras do endométrio do corno contralateral, ipsilateral e do corpo uterino, de éguas pertencentes ao grupo de éguas inseminadas com espermatozoides vivos (*LIVE*) e ao grupo de éguas inseminadas com espermatozoides mortos (*DEAD*)..... 29
- Figura 3** – Número de neutrófilos por campo do estrato esponjoso de amostras do endométrio do corno contralateral, ipsilateral e do corpo uterino, de éguas pertencentes ao grupo de éguas inseminadas com espermatozoides vivos (*LIVE*) e ao grupo de éguas inseminadas com espermatozoides mortos (*DEAD*)..... 30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1	Resposta inflamatória uterina pós-cobertura ou inseminação.....	9
2.2	Fatores provenientes da égua que influenciam a reação inflamatória uterina pós-cobertura.....	9
2.2.1	Mecanismos Físicos.....	9
2.2.1.1	Barreiras físicas.....	9
2.2.1.2	Limpeza mecânica.....	10
2.2.2	Mecanismos imunológicos.....	11
2.2.2.1	Resposta imune humoral.....	11
2.2.2.2	Resposta imune celular.....	11
2.2.2.2.	Neutrófilo.....	12
2.2.3	Características da égua suscetível.....	13
2.3	Fatores provenientes do sêmen que influenciam na reação inflamatória uterina pós-cobertura.....	14
2.3.1	Espermatozoide.....	15
2.3.1.1	Transporte espermático e as diferentes populações de espermatozoides.....	16
2.3.2	Plasma seminal.....	18
2.3.2.1	Crisp-3.....	19
2.3.2.2	Lactoferrina.....	20
2.4	Técnicas para diagnóstico e avaliação de endometrites na égua.....	20
2.4.1	Ultrassonografia.....	21
2.4.2	Exame bacteriológico.....	21
2.4.3	Citologia endometrial.....	21
2.4.4	Biópsia endometrial.....	23
2.4.4.1	Caracterização de inflamações endometriais agudas.....	24
2.4.4.2	Caracterização de inflamações endometriais crônicas.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	Animais.....	25

3.2	Sêmen.....	25
3.2.1	Sêmen contendo espermatozoides mortos.....	26
3.2.2	Sêmen contendo espermatozoides vivos.....	26
3.3	Contagem em câmara de Neubauer.....	26
3.4	Análise histológica.....	26
3.5	Métodos de análise estatística.....	26
4	RESULTADOS.....	28
4.1	Edema uterino e diâmetro folicular.....	28
4.2	Contagem em câmara de Neubauer.....	28
4.3	Análise histológica.....	29
5	DISCUSSÃO.....	32
6	CONCLUSÃO.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Na espécie equina, independente do manejo reprodutivo utilizado, o sêmen é sempre depositado no lúmen uterino. Com isso, milhões de espermatozoides, acompanhados de fluido seminal e possíveis bactérias contaminantes, passam a interagir com o ambiente uterino, levando a uma resposta inflamatória do endométrio denominada de endometrite pós-cobertura (TROEDSSON, 1997).

A endometrite pós-cobertura é uma resposta fisiológica, transitória e, na maioria dos casos, breve (KATILA, 1995), que tem por objetivo remover do ambiente uterino, espermatozoides mortos e/ou em excesso e outros contaminantes (TROEDSSON, 1999). Este processo torna o útero um local estéril e não-inflamado, em tempo da chegada do embrião no dia 5-6 pós-fertilização, fornecendo assim um ambiente propício para o estabelecimento da prenhez na égua (BETTERIDGE *et al.*, 1982).

Em éguas saudáveis, a inflamação uterina que ocorre após a cobertura é resolvida dentro de 36 horas à 48 horas (LEBLANC *et al.*, 1989; KATILA, 1995; TROEDSSON, 1999). No entanto, existe um grupo de éguas que nem sempre é capaz de limpar o ambiente uterino dentro deste prazo. Estas éguas são consideradas éguas suscetíveis ao estabelecimento de um processo inflamatório persistente, denominado de endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) (LEBLANC, 2003).

A incapacidade de resolver o processo inflamatório pós-cobertura antes do quinto dia pós-fertilização pode levar à liberação de prostaglandinas, responsáveis pela lise do corpo lúteo, resultando na diminuição da concentração circulante de progesterona (NEELY *et al.*, 1979). Além disso, também torna o ambiente uterino incompatível com a sobrevivência do embrião (LEBLANC, 2003), causando perdas embrionárias e, por consequência, perdas econômicas aos criadores.

Acredita-se que éguas suscetíveis à endometrite persistente pós-cobertura compõem cerca de 10-15% da população de éguas de cria e que a EPPC seja a terceira doença mais comum dentre as condições médicas nos cavalos adultos e uma das principais causas de subfertilidade e infertilidade em éguas (ZENT *et al.*, 1998; TRAUB-DARGATZ *et al.*, 1991). Por estes motivos a inflamação uterina desencadeada pelo processo de cobertura ou inseminação é um campo de estudos importante na área da reprodução de equinos, onde se busca elucidar a fisiopatologia deste evento, assim como desenvolver meios de evitar a infertilidade e suas consequentes perdas econômicas.

Apesar do foco de grande parte dos estudos sobre a patogenia da endometrite ter sido as bactérias, o espermatozoide é considerado o principal causador da inflamação que ocorre sempre após a cobertura (KOTILAINEN *et al.*, 1994). Indo além, Troedsson *et al.* (2001) sugerem que a inflamação persistente induzida pelo espermatozoide pode ser uma causa de infertilidade em éguas suscetíveis, mais importante do que a endometrite infecciosa.

Estudos *in vitro* observam que a interação do sistema imune com espermatozoides vivos e mortos é diferente (TROEDSSON *et al.*, 2010; DOTY *et al.*, 2011; TROEDSSON *et al.*, 2014). No entanto, ainda são escassos estudos *in vivo* avaliando a reação inflamatória uterina para estas duas populações espermáticas (FEDORKA *et al.*, 2017). O objetivo do presente estudo foi avaliar a reação inflamatória uterina 4 horas após a inseminação no corpo uterino, com espermatozoides vivos ou mortos, buscando identificar possíveis diferenças na resposta celular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resposta inflamatória uterina pós-cobertura ou inseminação

A inflamação uterina que ocorre sempre após a cobertura ou inseminação é caracterizada como uma resposta inflamatória aguda, onde uma série de mediadores pró-inflamatórios é liberada pelos neutrófilos que realizarão a fagocitose, pelas células do endotélio vascular, por células endometriais lesadas e pelos macrófagos ativados pela inflamação. Estes mediadores têm como principais funções: atrair mais células de defesa para o local da inflamação, facilitar o acesso dessas células e melhorar a eficiência da eliminação do agente agressor. Além dos mediadores pró-inflamatórios, também são liberadas prostaglandinas que atuam induzindo alterações na permeabilidade vascular, citocinas que mantêm a inflamação ativa e colagenases, elastases e gelatinases que favorecem o aporte de células e atuam no processo de reparação (MACKAY, 2000).

Quando o processo inflamatório deixa de ser necessário, o mesmo estímulo que induziu a liberação dos mediadores pró-inflamatórios agora promove o aparecimento de mecanismos e de moléculas que atuam encerrando o processo inflamatório, inibindo a produção de citocinas, bloqueando receptores celulares ou induzindo a morte celular (MACKAY, 2000).

2.2 Fatores provenientes da égua que influenciam a reação inflamatória uterina pós-cobertura

Para promover uma rápida eliminação dos agentes causadores da inflamação, o útero dispõe de mecanismos de defesa, físicos e imunológicos. Os mecanismos físicos são constituídos pelas barreiras físicas e pela limpeza mecânica, enquanto que a resposta imune humoral e celular referem-se aos mecanismos imunológicos (HUGHES;LOY, 1969; PETERSON *et al.*, 1969).

2.2.1 Mecanismos físicos

2.2.1.1 Barreiras físicas

As barreiras físicas são constituídas pela vulva, vestíbulo e cérvix, sendo responsáveis por proteger o ambiente uterino da entrada de contaminantes como ar, matéria fecal e urina. Fatores como idade, condição corporal, presença de lesões e aderências podem interferir na eficiência destas barreiras (PASCOE, 1979; CASLICK, 1937).

Como na espécie equina, a deposição do sêmen durante a cobertura ou inseminação é intrauterina, todas as barreiras de defesa são ultrapassadas neste momento, causando ampla reação inflamatória devido à deposição de sêmen e bactérias (TROEDSSON, 1997).

2.2.1.2 Limpeza mecânica

Um importante mecanismo para a eliminação rápida de agentes agressores e de componentes e subprodutos inflamatórios é a contratilidade miométrial, que é imprescindível para a limpeza física da luz uterina (EVANS *et al.*, 1987; LEBLANC *et al.*, 1994; TROEDSSON *et al.*, 1993).

Durante o estro, ocorrem períodos de atividade contrátil de aproximadamente 5 minutos, alternados com períodos equivalentes de repouso (JONES *et al.*, 1991). O desempenho deste mecanismo requer o funcionamento da cérvix (LEBLANC *et al.*, 1989), onde esta deve estar relaxada para que o conteúdo uterino seja eliminado através dela. A resposta à agressão, como a cobertura ou a inseminação, é rápida, ocorrendo um aumento da intensidade das contrações uterinas. Estudos utilizando cintilografia mostram que, em éguas saudáveis, metade do radiocolóide infundido no útero, em conjunto com colônias de *Streptococcus zooepidemicus*, é eliminado nos primeiros 60 minutos após a inoculação (LEBLANC *et al.*, 1994).

Por outro lado, durante o diestro, a cérvix se encontra fechada e acredita-se que os vasos linfáticos são os principais responsáveis por absorver os fluidos do lúmen uterino (LEBLANC *et al.*, 1995). Entretanto, para que a drenagem linfática exerça sua função é fundamental uma boa contratilidade miométrial (LeBLANC *et al.*, 1995), para que haja compressão dos vasos linfáticos, movendo o fluido absorvido em direção aos linfonodos (GUYTON, 1991)

A limpeza física do útero tem papel central na patogenia da endometrite persistente pós-cobertura (TROEDSSON, 1997). No entanto, o excesso de espermatozoides e bactérias não é completamente removido do ambiente uterino através da limpeza mecânica, sendo necessária a ação concomitante de mecanismos imunológicos (CHRISTOFFERSEN; TROEDSSON, 2017). Ao induzir em éguas saudáveis uma deficiência na

contratilidade miometrial com clenbuterol, Nikolakopoulos e Watson (2000) observaram que, apesar do acúmulo de fluido uterino e da presença marcada de neutrófilos ao exame citológico, 60% das éguas não apresentou crescimento bacteriano 48 horas após a cobertura. Os autores concluíram então que mesmo quando a contratilidade está prejudicada, os demais mecanismos de defesa uterina são capazes de eliminar a infecção bacteriana.

2.2.2 Mecanismos imunológicos

2.2.2.1 Resposta imune humoral

O sistema imune humoral, como mecanismo de defesa uterino na égua, atua basicamente através das imunoglobulinas e do sistema complemento (TROEDSSON *et al.*, 1993).

Por sua constituição tecidual, o endométrio é considerado parte do sistema imune das mucosas, o qual tem potencial de síntese local de imunoglobulinas (WIDDERS *et al.*, 1985). As imunoglobulinas foram detectadas pela primeira vez por Kenney e Kaleel (1975) através de lavados uterinos, sendo isoladas seis classes de imunoglobulinas: IgGa, IgGb, IgGc, IgT, IgA e IgM.

O sistema complemento é uma das principais vias efetoras da inflamação, onde a sua ativação leva a opsonização, ativação e lise celular do alvo. O componente C3 do complemento é o mais importante na opsonização de bactérias, sendo considerado o principal fator quimiotático das secreções uterinas de éguas (TROEDSSON *et al.*, 1993), tendo participação na opsonização e fagocitose de espermatozoides após a cobertura ou inseminação (DAHMS;TROEDSSON, 2002).

2.2.2.2 Resposta imune celular

O endométrio equino é uma membrana mucosa e a resposta imune predominante é caracterizada por uma resposta imune celular (CHRISTOFFERSEN;TROEDSSON, 2017), composta basicamente por células fagocíticas.

2.2.2.2.1 Neutrófilo

No útero os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) são as principais células de defesa, sendo as primeiras células a chegarem ao local da inflamação (LEHRER, 1988), onde são observados dentro de 30 minutos no lúmen uterino após a inseminação, atingindo o pico inflamatório em 12 horas (KATILA, 1995; TROEDSSON, 1997). São responsáveis por realizar a fagocitose de restos celulares, bactérias, espermatozoides mortos, defeituosos ou em excesso, buscando remover os contaminantes presentes no ambiente uterino, auxiliando assim na resolução do processo inflamatório.

O deslocamento de PMNs para o útero ocorre em resposta à liberação de fatores quimiotáticos resultantes da ativação do sistema complemento presente na secreção uterina. Dentre estes fatores estão, o leucotrieno B₄, a prostaglandina E e a prostaglandina F₂^a (LEES *et al.*, 1986; WATSON *et al.*, 1997; PYCOCK & ALLEN, 1988, 1990).

Dentro do arsenal de mecanismos que o neutrófilo utiliza para eliminar o alvo estão, a fagocitose, a degranulação e a formação de armadilhas extracelulares (NETs).

A fagocitose realizada pelos neutrófilos é a primeira linha de defesa do útero. Este evento inicia através da extensão de pseudópodes, mecanismo mediado via receptores que envolve alvos opsonizados, que após a ligação com o receptor, parecem se “afundar” no meio intracelular em fagossomos. O fagossomo se une aos grânulos citoplasmáticos, iniciando a maturação, o que dará origem ao fagolisossomo, que assume uma capacidade microbicida, levando à degradação do seu conteúdo, seja por meio do arsenal granular dos neutrófilos ou pela formação de espécies reativas de oxigênio (MAYADAS *et al.*, 2013; BORREGAARD, 2010; DIACOVO *et al.*, 1996; STROKA *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2013).

Se os fagócitos encontram material que não pode ser facilmente ingerido, todo o conteúdo dos grânulos primário, secundário e os produtos oxidantes formados durante o *burst* oxidativo são lançados para o tecido causando danos extensivos às células do hospedeiro (BORREGAARD, 2010; NORDENFELT; TAPPER, 2011; BORREGAARD; COWLAND, 1997; HAMPTON *et al.*, 1998).

Os grânulos são distribuídos em três grandes grupos: primários, também conhecidos como azurófilos ou MPO-positivos (contém mieloperoxidase, defensinas, lisozima, neutrófilo elastase, BPI, protease 3 e catepsina 3); secundários, MPO-negativos ou específicos (lactoferrina e lisozima); e terciários, MPO-negativos ou gelatinase (têm poucas proteínas antimicrobicidas, porém serve como estoque de metaloproteinases, tais como gelatinase) (BORREGAARD, 2010; DIACOVO *et al.*, 1996; CARMAN *et al.*, 2007).

Descobertas recentes colocam os neutrófilos não somente como o principal tipo celular responsável pelo processo de inflamação aguda, mas como uma célula com potencial modulador desta resposta. São células que contribuem de maneira importante para o recrutamento, ativação e programação de células apresentadoras de antígenos. Além disso, produzem sinais quimiotáticos que atraem monócitos e células dendríticas, e influenciam a diferenciação de macrófagos para um estado predominantemente pró ou anti-inflamatório (BENNOUNA *et al.*, 2003; CHERTOV *et al.*, 1997; VAN GISBERGEN *et al.*, 2005).

Individualmente, o neutrófilo secreta um menor número de moléculas de uma determinada citocina, quando comparado a macrófagos e linfócitos, no entanto, neutrófilos frequentemente se sobrepõem a leucócitos mononucleares em locais de inflamação aguda, portanto, podem ser fontes importantes de citocinas como o TNF α (SCHUBERTH *et al.*, 2008).

A tomada de decisão que define se estas células contribuirão para a ativação ou para a supressão de outros mecanismos imunes, como por exemplo a ativação dos linfócitos T, é provavelmente guiada pela influência do plasma seminal (SCHUBERTH *et al.*, 2008).

2.2.3 Características da égua suscetível

Éguas suscetíveis são éguas que depois de cobertas ou inseminadas, não são capazes de resolver o processo inflamatório uterino em até 48h (KATILA, 1995). Sendo que em condições experimentais, a égua é considerada susceptível quando não é capaz de debelar o processo inflamatório em até 96 horas (TROEDSSON, 1995).

De um modo geral, éguas suscetíveis apresentam características em comum, como: idade avançada, histórico de falha reprodutiva em várias temporadas, de endometrites e de perdas gestacionais (TROEDSSON, 1997). Porém, o ponto central da susceptibilidade parece ser a menor capacidade de limpeza física uterina destas éguas em relação àquelas classificadas como resistentes.

Quando comparadas com éguas resistentes, éguas suscetíveis apresentam um retardo no início da resposta contrátil e uma duração menor em relação ao observado em éguas resistentes (TROEDSSON *et al.*, 1993). Além disso, Reitzenstein *et al.* (2002), observaram que a direção das contrações das fibras musculares uterinas em éguas suscetíveis ocorre em direção à ponta do corno uterino, não apresentando um padrão rítmico, o que dificulta a eliminação de conteúdo pelo órgão. Éguas susceptíveis também apresentam uma menor liberação de prostaglandina F 2α , após a inseminação artificial ou à administração de ocitocina exógena, o que ajuda a explicar a menor capacidade contrátil do útero destes animais

(NIKOLAKOPOULOS *et al.*, 2000). Além de apresentarem falhas no mecanismo de limpeza contrátil do útero, éguas suscetíveis também apresentam uma drenagem linfática mais lenta (LEBLANC *et al.* 1995).

Com relação aos mecanismos de limpeza uterina de natureza imunológica, estudos em câmaras quimiotáticas constataram que neutrófilos polimorfonucleares nas secreções uterinas de éguas suscetíveis têm menor capacidade de migrar e fagocitar bactérias quando comparados com éguas resistentes (LIU *et al.*, 1986; WATSON, 1988). Mais tarde, Troedsson *et al.* (1993) sugeriram que esta deficiência na fagocitose realizada pelos neutrófilos de éguas suscetíveis não seria uma questão funcional do neutrófilo, mas sim uma interferência negativa da secreção uterina destas éguas sobre a quimiotaxia e a fagocitose, por apresentar uma menor concentração de opsoninas quando comparado com a secreção de éguas resistentes.

Além disso, Woodward *et al.* (2013) observaram uma diferença significativa na expressão de mRNAs de citocinas endometriais de papel importante, entre éguas suscetíveis e resistentes, sugerindo que uma resposta anti-inflamatória deficiente pode estar envolvida na patofisiologia desta condição.

Nesta categoria de éguas os resultados da incapacidade de limpar o ambiente uterino são: um acúmulo de fluido na luz uterina, por vários dias após a cobertura, acompanhado de um quadro inflamatório persistente e, na maioria dos casos, de uma infecção bacteriana (LEBLANC, 2003), culminando com perdas embrionárias precoces.

Alguns fatores podem auxiliar ou atrapalhar uma égua suscetível em sua tentativa de resolver o processo inflamatório após a cobertura, sendo que alguns deles podem acabar por predispor clinicamente algumas éguas que normalmente seriam capazes de debelar esta inflamação a desenvolverem uma endometrite persistente, resultando na diminuição dos índices de prenhez (TROEDSSON *et al.*, 2001).

2.3 Fatores provenientes do sêmen que influenciam na reação inflamatória uterina pós-cobertura

O sêmen é composto por duas frações distintas: os espermatozoides, que compõem menos que 1% do volume total e o plasma seminal (WITE, 1988).

2.3.1 Espermatozoide

Cohen (1984) observou que a introdução de espermatozoides no trato reprodutor feminino produz uma forte resposta neutrofílica em várias espécies animais. Particularmente em éguas, Kotilainen *et al.* (1994) e Troedsson *et al.* (1995) constataram que a inseminação com espermatozoides livres de bactérias resulta em um influxo de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) para o lúmen uterino, gerando uma resposta inflamatória similar a desencadeada após a inoculação de bactérias no útero. Este influxo é acompanhado de uma suprarregulação de citocinas pro e anti-inflamatórias, resultando na ativação de múltiplas rotas inflamatórias (WOODWARD *et al.*, 2013).

Kotilainen *et al.* (1994) demonstraram que, quanto maior o número total de espermatozoides da dose inseminante, mais intensa é a resposta leucocitária. Da mesma forma, Fiala *et al.* (2007) observaram que a quantidade de neutrófilos na luz uterina 2 e 4 horas após a inseminação, foi maior em éguas inseminadas com um bilhão de espermatozoides do que em éguas inseminadas com um menor número de células espermáticas.

Em amostras coletadas de éguas resistentes à endometrite, 48 horas após a inseminação artificial com 20 bilhões de espermatozoides, através de lavagem uterina com pequeno volume, foi encontrado um menor número de neutrófilos quando comparado com amostras de éguas inseminadas com dois bilhões (NIKOLAKOPOULOS; WATSON, 2000). Da mesma forma, foi observado que 24 horas após a IA, o número de neutrófilos, no estrato compacto de éguas inseminadas com um bilhão de espermatozoides, é semelhante ao de éguas não inseminadas, e menor do que o número observado em éguas inseminadas com 100 e 500 milhões (FIALA *et al.*, 2007). Resultados que indicam que, aparentemente, uma reação inflamatória inicial mais intensa favorece uma recuperação mais rápida do endométrio.

Em estudo *in vitro* não foi encontrado efeito quimiotático particular à célula espermática, sobre os PMNs. Mas quando espermatozoides foram incubados na presença do sistema complemento não ativado, um efeito quimiotático significativo foi observado. Em contrapartida a inativação por calor do sistema complemento removeu este efeito. Com isso, concluiu-se que o efeito quimiotático dos espermatozoides sobre os PMNS tem início na ativação do sistema complemento (TROEDSSON, 1995).

A ativação do sistema complemento leva à clivagem dos fatores C5a e C3b. Como a secreção uterina é rica em complemento, acredita-se que a interação com o espermatozoide leve à uma quimiotaxia de neutrófilos mediada por C5a (TROEDSSON *et al.* 2001).

Após expostos aos espermatozoides através de armadilhas extracelulares (NETs) ou através da ligação com o fator C3b e de um mecanismo ainda desconhecido que é independente do sistema complemento (DAHMS; TROEDSSON, 2002), os PMNs ligam-se às células espermáticas exclusivamente pela cabeça (ALGHAMDI *et al.*, 2004). Esse evento é seguido de um aumento na síntese de citocinas anti-inflamatórias, que se considera serem responsáveis pela resolução da inflamação (FEDORKA *et al.*, 2017).

2.3.1.1 Transporte espermático e as diferentes populações de espermatozoides

Durante o transporte espermático, menos de 1% dos espermatozoides inseminados chega ao oviduto com sucesso (SCOTT *et al.*, 1995; BADER; KRAUSE, 1980), ou seja, 99% permanece no ambiente uterino junto de outros componentes do ejaculado/dose até ser removido do trato genital da égua por fagocitose (MERKT *et al.*, 1982; KOTILAINEN *et al.*, 1994) ou através da limpeza física (LEBLANC *et al.*, 1994).

Um mecanismo de seleção de espermatozoides ocorre durante o transporte espermático, tendo em vista que a maioria dos gametas com anormalidades morfológicas não atinge a junção útero tubárica, ou não desenvolve interações normais com o epitélio do oviduto (SCOTT *et al.*, 2000). No trato genital feminino, proteínas aderidas à membrana espermática seriam responsáveis pela opsonização seletiva e pelo reconhecimento das diferentes populações de espermatozoides (TROEDSSON *et al.*, 2006).

Kotilainen *et al.* (1994), observando uma maior reação inflamatória após a inseminação com sêmen congelado, sugeriram que esta poderia ter sido causada pelo grande número de espermatozoides mortos presentes na dose. No entanto, Katila (1997) não constatou diferença no número de neutrófilos recuperados 5 horas após a inseminação com espermatozoides vivos ou mortos. Contudo, existe a possibilidade de o método utilizado por Katila (1997), para matar as células espermáticas, através do uso de forno microondas, ter interferido no resultado ao interagir de maneira negativa com as proteínas presentes no plasma seminal do garanhão utilizado ou até mesmo com a estrutura e proteínas espermáticas. Dahms e Troedsson (2002) ao incubarem espermatozoides e PMNs na presença de plasma seminal e plasma seminal exposto a diferentes tratamentos de calor e carvão, observaram que os tratamentos com calor (95°C/45min) influenciaram negativamente na opsonização dos espermatozoides e também removeram o efeito supressor do plasma seminal sobre a fagocitose das células espermáticas.

Ao avaliarem a reação inflamatória frente inseminações com sêmen congelado considerado de alta e de baixa qualidade, Serrano-Recalde *et al.* (2014), não observaram diferença na magnitude da reação inflamatória 6 horas após a inseminação, sendo que no grupo de baixa qualidade, metade das palhetas da dose inseminante passaram pelo processo de congelamento rápido, matando os espermatozoides.

Já Lüttgenau *et al.* (2018) avaliando o efeito de infusões com solução salina ou com espermatozoides mortos por congelamentos e descongelamentos consecutivos à 50°C sobre o fluxo sanguíneo uterino e ovariano 3, 6 e 12 horas após as infusões, concluíram que inseminações com espermatozoides mortos ocasionaram um aumento na perfusão uterina quando comparadas à inseminações com solução salina.

Outro estudo envolvendo as diferentes populações espermáticas foi realizado por Fedorka *et al.* (2014), onde foram analisadas as expressões de IL-1 β , IL-1RN, IL-6, IL-8, e IL-10 pelo endométrio de 6 éguas, 6 horas após inseminação com espermatozoides vivos e mortos, com a remoção do plasma seminal através de centrifugação. Neste estudo, os autores constataram que a expressão de mRNA para IL-6 encontrava-se aumentada em éguas que foram inseminadas com espermatozoides mortos quando comparada à expressão após inseminação com espermatozoides vivos. O motivo deste aumento não foi determinado neste estudo, sendo sugerido que o resultado obtido partiu da perda ou relocação de proteínas espermáticas que estão envolvidas na regulação da resposta inflamatória uterina.

A IL-6 pode ser secretada por vários tipos celulares, como macrófagos ativados, adipócitos e células musculares esqueléticas (FEBBRAIO; PEDERSEN, 2002), atuando tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. A produção de IL-6 pode ser estimulada por citocinas como IL-1 β e TNF- α . Na imunidade inata, atua como estímulo para a produção de neutrófilos e de proteínas de fase aguda; já na imunidade adaptativa, atua na diferenciação de linfócitos B em plasmócitos (YOON *et al.*, 2009). Além disso, tem sido crescente o número de trabalhos que demonstram a ambigüidade da IL-6, por possuir tanto efeitos anti-inflamatórios quanto pró-inflamatórios. Gabay *et al.* (1997) demonstraram que a IL-6 pode ser considerada também uma citocina antiinflamatória, inibindo a liberação de IL-1 β e TNF- α e favorecendo a produção do receptor de TNF solúvel. Por estas razões, a IL-6 tem sido considerada também uma citocina regulatória.

Observa-se que a habilidade do espermatozoide de estimular uma resposta imune é modulada por interações com o plasma seminal (VESELSKY *et al.*, 1996; IMADE *et al.*, 1997; FILIPPINI *et al.*, 2001).

2.3.2 Plasma seminal

O plasma seminal é um fluido composto por enzimas, hormônios, íons e proteínas, produzido pela rede testis, epidídimo e glândulas acessórias, sendo expelido em frações durante a ejaculação por meio de contrações uretrais (KARESKOSKI;KATILA, 2008).

A grande maioria das enzimas encontradas no plasma seminal funciona como agente antioxidante, prevenindo a peroxidação dos lipídeos de membrana pelas espécies reativas ao oxigênio e, conseqüentemente, fragmentação do DNA espermático (ALMEIDA, 2006). Dos hormônios presentes no plasma seminal de equinos, as prostaglandinas (PGF2 α e PGE2), o estrógeno e a ocitocina estão associados ao transporte espermático e à eliminação de espermatozoides não viáveis, auxiliando na limpeza uterina de éguas susceptíveis à endometrite (TROEDSSON *et al.*, 2005). Já a composição iônica do plasma seminal varia entre as frações do ejaculado. As concentrações de cálcio, fosfato inorgânico e magnésio são maiores na fração espermática, composta por secreções do epidídimo e da ampola do ducto deferente (KARESKOSKI;KATILA, 2008).

Até o momento, sabe-se que a maioria das proteínas seminais pertence a três grupos: proteínas transportadoras de dois ou quatro módulos de fibronectina tipo II (Fn-2) ao qual pertencem as proteínas HSP-1 e HSP-2 que representam 70-80% das proteínas totais do plasma seminal equino (EKHALASI-HUNDRIESER *et al.*, 2005), proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs), e espermadesinas (KARESKOSKI-KATILA, 2008).

Contudo, a composição do plasma seminal não é a mesma entre indivíduos. Ao compararem a composição do plasma seminal entre garanhões férteis e subférteis, GUAUSTI *et al.*, 2014, observaram que há variabilidade individual e diferenças no número total de proteínas, sendo que o conteúdo proteico foi maior no grupo de garanhões férteis. Segundo Jobim *et al.* (2011), as diferenças podem ser utilizadas como marcadores de fertilidade.

Além do seu papel direto sobre a fertilidade, estudos sugerem que enquanto o sêmen de determinados garanhões provoca uma reação inflamatória exacerbada, o sêmen de outros é responsável por uma resposta inflamatória mais branda independente da égua ser ou não susceptível à endometrite persistente pós-cobertura (TROEDSSON *et al.*, 2000; TROEDSSON *et al.*, 2001), indicando que as diferenças na composição do plasma seminal também têm influência sobre a reação inflamatória uterina.

Outros papéis já identificados do plasma seminal envolvem uma influência sobre a característica e o grau da reação inflamatória, quando inserido no ambiente uterino isoladamente ou acompanhado dos outros componentes da dose inseminante (FIALA *et*

al.,2007), um efeito supressor sobre a ativação do complemento, sobre a quimiotaxia de PMNs, sobre a fagocitose e sobre a atividade hemolítica do complemento *in vitro* em éguas (TROEDSSON *et al.*, 2000; DAHMS & TROEDSSON, 2002).

O plasma seminal também é responsável por modular a resposta inflamatória a espermatozoides (TROEDSSON *et al.*, 2001), por conter um fator proteico envolvido na redução da ligação entre neutrófilos e espermatozoides, de maneira dose dependente, auxiliando na fertilidade do sêmen na presença de um processo inflamatório prévio e na limpeza uterina. Esta substância pode ser precipitada do plasma seminal, aquecida por até 3h à 56,8°C e armazenada congelada sem perder suas propriedades biológicas. Com relação a dose efetiva, um total de 6mg/ml de proteína bruta precipitada do plasma seminal preveniu a ligação entre neutrófilos e espermatozoides em um nível similar ao obtido com plasma seminal fresco. Esta função protetiva pode ser específica a uma população de espermatozoides e apenas ocorrer durante uma janela específica de tempo, permitindo o transporte espermático. Dados *in vitro* sugerem que esta janela dura por pelo menos 4h após a inseminação (ALGHAMDI; FOSTER; TROEDSSON, 2004).

Tendo sido observada a importância do plasma seminal na inflamação uterina pós-cobertura e na fertilidade, estudos começaram a ser realizados para identificar as moléculas nele responsáveis pela modulação destes processos. Dentre as proteínas já identificadas encontram-se as proteínas CRISP-3 e a lactoferrina.

2.3.2.1 Crisp-3

A CRISP-3 é a principal proteína do plasma seminal equino (SCHAMBONY *et al.*, 1998). Sua ocorrência não se restringe apenas aos órgãos genitais masculinos e seu gene é predominantemente expresso nas ampolas dos ductos deferentes (e nas glândulas salivares), contribuindo assim, para a alta concentração desta proteína (1mg/mL) no plasma seminal desta espécie. Quantidades superiores desta proteína foram positivamente correlacionadas, com a taxa de concepção no primeiro ciclo, resultados que indicam que esta proteína pode atuar como um marcador de fertilidade em equinos (NOVAK *et al.*, 2010).

Ao incubarem espermatozoides vivos, espermatozoides mortos e *E. coli* na presença de PMNs e plasma seminal, CRISP-3 purificada ou meio Hank, Troedsson *et al.* (2010) obtiveram resultados que sugerem que a Crisp-3 protege de maneira seletiva espermatozoides vivos da ligação com PMNs, o que pode permitir o transporte espermático até o oviduto na presença de inflamação.

No mesmo estudo de Troedsson *et al.* (2010) foi também observado que na ausência de plasma seminal os espermatozoides mortos se ligaram pouco aos PMNs, que na presença de CRISP-3 purificada não houve efeito sobre esta ligação e que na presença de plasma seminal a ligação foi alta, indicando que outro fator presente no plasma seminal é responsável por promover a ligação dos PMNs aos espermatozoides mortos, fator este que mais tarde seria identificado como a proteína lactoferrina.

2.3.2.2 Lactoferrina

Uma porção menor do plasma seminal é composta por diversas proteínas que não fazem parte dos três principais grupos de proteínas já citadas. Uma dessas proteínas é a lactoferrina, uma glicoproteína de ligação de ferro que tem papel importante na interação intercelular e em funções imunes (TROEDSSON *et al.*, 2014).

Ao incubarem espermatozoides mortos na presença de PMNs e plasma seminal, meio Hank ou lactoferrina purificada, Troedsson *et al.* (2014) observaram que a lactoferrina purificada foi capaz de reproduzir o efeito do plasma seminal sobre a ligação dos PMNs com os espermatozoides mortos, dados que sugerem que um dos papéis desta proteína é aumentar a interação intercelular dos PMNs com os espermatozoides mortos, auxiliando na eliminação destas células.

Alghamdi *et al.* (2014) incubando espermatozoides com sondas fluorescentes específicas para lactoferrina equina observaram que espermatozoides imóveis apresentaram um padrão específico de fluorescência nas regiões do acrossoma e do flagelo, enquanto que espermatozoides móveis não apresentaram fluorescência positiva. Além de apoiar as constatações anteriores de que a lactoferrina promove seletivamente a ligação de neutrófilos à espermatozoides mortos, estes resultados também indicam os possíveis locais de ligação desta proteína à célula espermática.

2.4 Técnicas para diagnóstico e avaliação de endometrites na égua

Para um diagnóstico preciso e um tratamento de sucesso em casos de endometrite, é necessário relacionar o histórico da égua, achados clínicos obtidos através da palpação transretal, vaginoscopia e exame ultrassonográfico, com os resultados dos exames de bacteriologia, citologia, e em alguns casos de histologia (LEBLANC, 2011).

2.4.1 Ultrassonografia

A ultrassonografia trata-se de uma técnica não invasiva utilizada frequentemente na reprodução equina para examinar o sistema genital da égua, permitindo, além do acompanhamento do ciclo estral, o diagnóstico de gestação precoce, manejo de gestações gemelares, detecção de mortalidade embrionária e anormalidades uterinas tais como: presença de ar, líquido, secreção inflamatória, cistos e neoplasias, função e anormalidades ovarianas (MCKINNON, 1996).

Com relação ao diagnóstico de endometrites em éguas, McKinnon (1987) observou que a ultrassonografia é tão eficaz quanto os outros métodos diagnóstico, ao identificar alterações como presença de líquido intrauterino e edemas patológicos.

Além de sua relação com processos inflamatórios pré-existentes, estudos indicam que o acúmulo de líquidos antes mesmo da cobertura, sendo este maior que dois centímetros, também atua como indicativo de suscetibilidade em éguas. Embora não necessariamente apresentando natureza inflamatória de origem bacteriana (LEBLANC, 2010), a presença deste líquido indica que a égua tem dificuldade em realizar a limpeza física do útero. Dentre os demais parâmetros, este é o que apresenta maior concordância com a endometrite persistente pós-cobertura (BRINSKO, 2003).

2.4.2 Exame bacteriológico

Em casos de infecções, as bactérias mais encontradas são: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Proteus* spp (BARRELET, 2009)

Culturas falso-positivas têm sido associadas com a contaminação dos instrumentos de coleta, enquanto que culturas falso-negativas têm sido associadas com amostragens inadequadas do endométrio (LEBLANC, 2011). Constatações que indicam que os resultados obtidos por este exame devem ser avaliados com cautela.

2.4.3 Citologia endometrial

Desde que foi descrita nos anos 60, a citologia endometrial se tornou uma ferramenta de rotina no diagnóstico de inflamação endometrial na reprodução equina (KNUDSEN, 1964). Quando utilizada em conjunto com o exame reprodutivo minucioso, éguas com

endometrites ativas podem ser identificadas rapidamente e decisões a respeito do manejo reprodutivo a ser aplicado, podem ser tomadas sem a necessidade de esperar o resultado de culturas microbiológicas (LEBLANC, 2011).

Para realização desta técnica pode ser utilizado *swab*, escova citológica (ALVARENGA;PASTORELLO, 1994) ou um lavado uterino de baixo volume (BALL *et al.*, 1988).

Na avaliação de esfregaço endometrial busca-se a presença de neutrófilos polimorfonucleares (MATTOS *et al.*, 1984). A presença de leucócitos polimorfonucleares é sempre um indicativo de inflamação do endométrio (COUTO;HUGHES 1984), independente da fase do ciclo estral, caracterizando um diagnóstico de citologia positivo. No entanto, a presença de polimorfonucleares é esperada, em éguas saudáveis, no pós-parto, após a cobertura ou nos primeiros cios após o anestro (WINGFIELD; RICKETTS, 1982).

Alguns autores citam métodos de avaliação que levam em conta a proporção de neutrófilos para células endometriais, variando de 0.5% a 5%, como indicativos positivos para inflamação (BALL *et al.*, 1988; COUTO;HUGHES, 1984; LACOUR; SPRINKLE, 1985; RICKETTS;MACKINTOSH, 1987; WINGFIELD-DIGBY, 1978), enquanto outros autores sugerem a contagem de neutrófilos em 10 campos de microscopia (KNUDSEN, 1964; ASBURY, 1983; RIDDLE; LEBLANC; STROMBERG, 2007; BROOK, 1984), sendo consideradas normais éguas com 0-2 neutrófilos por campo, 3-5 éguas como inflamação endometrial moderada e > 5 inflamação severa. Contudo, no presente trabalho, os parâmetros utilizados para a avaliação dos esfregaços citológicos foram de acordo com o proposto por COUTO e HUGHES (1984).

Avaliando a sensibilidade do exame citológico quando comparado ao exame bacteriológico do útero, estudos divergem quanto a confiabilidade deste exame. Alguns estudos indicam que nem todos os patógenos uterinos estão associados com citologias positivas. Riddle; LeBlanc e Stromberg (2007) observaram que exames bacteriológicos positivos para *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* foram associados com mais citologias positivas (65%) do que *E. coli* (55%) ou *Pseudomonas* (52%), indicando que certos patógenos, como a *E.coli* podem não estimular significativamente a resposta inflamatória uterina. Em contrapartida, em estudo mais recente, Camozzato *et al.* (2014) observaram que todas as éguas inoculadas com diferentes cepas de *E. coli* apresentaram leve (< 10 neutrófilos/campo) a grave (>20 neutrófilos/campo) neutrofilia endometrial 24h após a inoculação, sendo que 92,6% das éguas apresentaram sinais vaginais e líquido intrauterino,

concluindo que a endometrite causada por *E. coli* provoca citologia positiva e na maioria dos casos, sinais clínicos, não havendo diferença entre as diferentes cepas.

2.4.4 Biópsia endometrial

Em geral, o exame citológico do útero é indicado no diagnóstico de processos inflamatórios agudos, não sendo indicado no diagnóstico de processos inflamatórios crônicos ou degenerativos do endométrio, sendo a biópsia a técnica mais indicada nestes casos (BRUM MÉDICI, 1992; REISWIG, 1993).

A biópsia endometrial tem sido um procedimento padrão para avaliação da saúde do útero da égua há várias décadas (RICKETTS; BARRELET, 1997) e é um método de coleta que consiste na retirada de uma amostra de endométrio de tamanho apropriado (20 x 4 x 3mm) para análise histológica, podendo ser coletado de qualquer região do útero (LOVE, 2011).

Quanto ao número de amostras e locais indicados para obtenção da amostra, há estudos que demonstram que uma única amostra é representativa do endométrio como um todo (BERGMAN; KENNEY, 1975; BLANCHARD *et al.*, 1987), enquanto que estudos mais recentes observaram que uma amostra não representa o endométrio inteiro no diagnóstico de mudanças degenerativas (DYBDAI *et al.*, 1999; FIALA *et al.*, 2010), resultados divergentes que indicam ser necessário cautela ao gerar prognósticos reprodutivos em situações onde apenas uma amostra foi obtida e analisada.

Para uma boa avaliação de uma amostra de biópsia é importante ter conhecimento das características histológicas uterinas. O útero equino é composto por três camadas denominadas de endométrio, miométrio e perimétrio, sendo que cada uma destas camadas apresenta características particulares (KENNEY, 1978; BARROS; MASUDA, 2009; MASSENO, 2012).

No endométrio encontramos o epitélio luminal que consiste em uma camada simples de células que variam de cúbicas a cilíndricas altas, dependendo da fase do ciclo estral; sendo no estro essa camada pseudoestratificada. Uma membrana basal separa o epitélio luminal da lâmina própria subjacente (VAN CAMP, 1988), sendo esta dividida em estrato compacto e esponjoso (KENNEY, 1978).

O estrato compacto é caracterizado por maior densidade de células estromais e se encontra junto ao epitélio luminal, apresenta ductos glandulares que se abrem no epitélio luminal, porém não possui glândulas. No estrato esponjoso, encontram-se as glândulas

uterinas em meio a um estroma com menor densidade de células. São observadas ainda, nesta porção, artérias, veias e vasos linfáticos. Os ramos das glândulas endometriais se encontram no estrato compacto e seu aspecto histológico muda conforme a fase do ciclo estral (BARROS;MASUDA, 2009).

Dentro das principais alterações que podem ser diagnosticadas no exame de biopsia uterina, as inflamações do endométrio e suas sequelas são a grande maioria das alterações identificadas. As inflamações em particular, podem ser classificadas como agudas e crônicas (BARROS;MASUDA, 2009).

2.4.4.1 Caracterização de inflamações endometriais agudas

Inflamações agudas se caracterizam por um infiltrado predominantemente constituído por PMNs na lâmina própria. Em geral, este infiltrado é mais intenso no estrato compacto e nas porções adjacentes do estrato esponjoso. Polimorfonucleares podem também ser encontrados na luz das glândulas. Marginação de leucócitos, principalmente PMNs, pode ser vista em vênulas do estrato esponjoso não só nas endometrites agudas, mas também durante o estro (BARROS;MASUDA, 2009).

2.4.4.2 Caracterização de inflamações endometriais crônicas

Já inflamações crônicas do endométrio são caracterizadas pela predominância de células inflamatórias mononucleares (linfócitos, plasmócitos, mastócitos e macrófagos) tanto no estrato compacto quanto no estrato esponjoso, variando de acordo com a intensidade e distribuição do infiltrado celular na lâmina própria, sendo então classificadas como discretas, moderadas ou acentuadas. Em algumas oportunidades, endometrites crônicas podem sofrer reagudização, processo que é caracterizado por intensa infiltração do estroma por PMNs em um quadro de endometrite crônica com células mononucleares (BARROS;MASUDA, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas 20 éguas destinadas ao abate em frigorífico, sendo distribuídas aleatoriamente 10 éguas para cada grupo experimental. Estas foram examinadas através de exame de palpação, onde foi avaliado tônus, grossura e simetria uterina, e através de exame ultrassonográfico, sendo selecionadas ao apresentarem um folículo dominante de ± 35 mm, edema uterino e ausência de líquido intrauterino. Atendidos os parâmetros citados, foi realizado exame citológico uterino, com o uso de uma escova citológica e uma pinça de citologia. As amostras coletadas para exame citológico foram coradas com panótico rápido e analisadas em microscópio óptico. Durante a análise microscópica buscava-se a presença de células endometriais e a ausência de polimorfonucleares.

Apresentando citologia negativa, as éguas foram distribuídas aleatoriamente para um de dois grupos: *LIVE* – inseminação com espermatozoides mortos e *DEAD* - inseminação com espermatozoides vivos. Em ambos os grupos as éguas foram inseminadas com 900×10^6 espermatozoides. Quatro horas após a inseminação, as éguas foram abatidas de maneira humanitária e tiveram seus úteros coletados.

Os úteros coletados foram lavados com 50mL de PBS (solução salina fosfatada tamponada), através da introdução e fixação de uma sonda foley pela cérvix. O fluido coletado foi reservado em um recipiente para posterior análise em câmara de Neubauer.

Terminado o lavado, foram coletados 3 fragmentos de endométrio para análise histológica: 01 do corno uterino contralateral ao folículo dominante, 01 do corno uterino ipsilateral e 01 do corpo uterino. Os fragmentos foram armazenados em recipientes contendo formalina tamponada a 4%, para posteriormente serem processados e analisados.

3.2 Sêmen

Foi utilizado o sêmen de 02 garanhões, previamente congelado e estocado no REPROLAB-UFRGS em palhetas de 0,5mL na concentração de 200×10^6 /mL para o garanhão A e de 400×10^6 /mL para o garanhão B.

Para cada inseminação, foram utilizadas 06 palhetas, sendo feito um *pool* do sêmen de ambos os garanhões, onde 03 palhetas de cada garanhão compunham a dose final, totalizando 900×10^6 espermatozoides.

3.2.1 Sêmen com espermatozoides mortos

Foram descongeladas 03 palhetas de cada garanhão durante 30 segundos na temperatura de 37°C. Após o descongelamento, todas as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido, sendo então descongeladas novamente de acordo com o protocolo já mencionado. Prévio as inseminações amostras foram avaliadas, onde se buscava observar 0% de espermatozoides móveis.

3.2.2 Sêmen com espermatozoides vivos

Foram descongeladas 03 palhetas de cada garanhão durante 30 segundos na temperatura de 37°C. As inseminações foram realizadas apenas com doses que atendessem os parâmetros espermáticos mínimos definidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) para sêmen descongelado equino.

3.3 Contagem em câmara de Neubauer

Uma amostra de 50µL do lavado uterino foi diluída em 150µL de ringer lactato, sendo posteriormente analisada em microscópio óptico para a contagem de leucócitos com o uso da Câmara de Neubauer.

3.4 Análise histológica

Os fragmentos de endométrio foram processados, corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados. Durante a análise histológica, foi realizada a contagem de neutrófilos em 5 campos no estrato compacto e 5 campos no estrato esponjoso com o auxílio do programa de análise de imagens Image J[®]. Posteriormente foi realizada a soma dos valores obtidos por campo e a média por campo foi calculada, para cada estrato e para cada égua.

3.5 Métodos de análise estatística

Os valores para edema uterino e diâmetro folicular foram avaliados utilizando o Test T, enquanto que o número de leucócitos no lavado uterino foi avaliado pelo Mann Whitney Test.

Para a avaliação dos resultados da análise histológica foi utilizada análise de variância ANOVA, onde foi considerada como variável dependente o número de neutrófilos, e como variáveis independentes, o local (S), os grupos (G) e sua interação (S*G).

Em todos os testes foi considerado significativo um $P \leq 0,05$ e uma tendência de $0,05 < P \leq 0,1$.

4 RESULTADOS

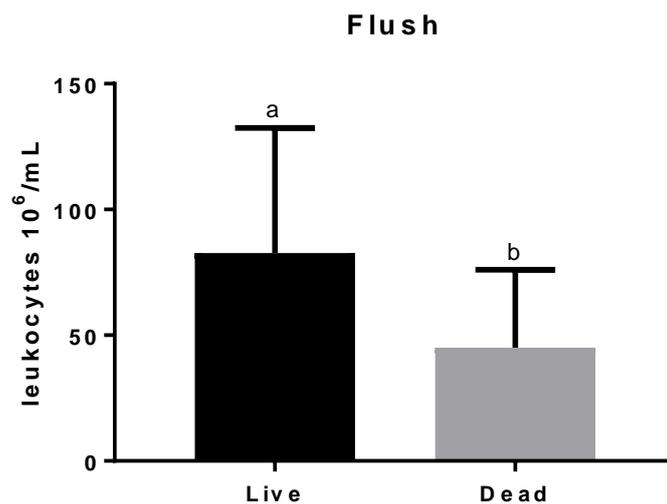
4.1 Edema uterino e diâmetro folicular

Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) no grau de edema uterino e no diâmetro folicular entre o grupo de éguas inseminadas com espermatozoides vivos (*LIVE*) e o grupo de éguas inseminadas com espermatozoides mortos (*DEAD*).

4.2 Contagem em câmara de Neubauer

O número de leucócitos recuperados nas lavagens uterinas é observado na Figura 1.

Figura 1 – Número de leucócitos (+ Desvio Padrão) observados após lavagem uterina, no grupo de éguas inseminadas com espermatozoides vivos (*LIVE*) e no grupo de éguas inseminadas com espermatozoides mortos (*DEAD*)



Caracteres diferentes indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$)

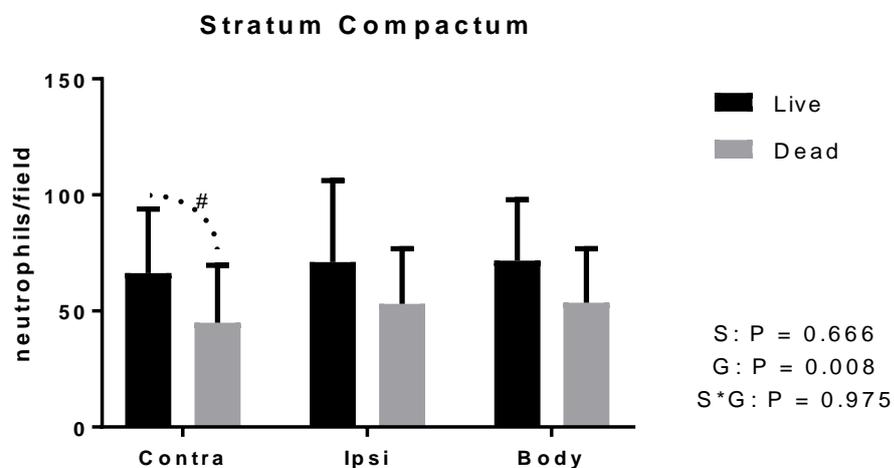
Fonte: O próprio autor

Ao analisar a Figura 1, observa-se que o número de leucócitos recuperados no lavado de éguas inseminadas com espermatozoides mortos (*DEAD*) é significativamente menor ($P=0,05$) do que o recuperado em éguas inseminadas com espermatozoides vivos (*LIVE*).

4.3 Análise histológica

Na figura 2 está expresso o número médio de neutrófilos por campo, por local do útero, observado no exame histopatológico do estrato compacto do endométrio das éguas abatidas, após os diferentes tratamentos.

Figura 2 – Número de neutrófilos por campo (+ Desvio Padrão) do estrato compacto de amostras do endométrio do corno contralateral (*Contra*), ipsilateral (*Ipsi*) e do corpo uterino (*Body*), de éguas pertencentes ao grupo de éguas inseminadas com espermatozoides vivos (*LIVE*) e ao grupo de éguas inseminadas com espermatozoides mortos (*DEAD*)



Tendência ($0,05 < P \leq 0,1$) é representada por #

Local (S), Grupos (G) e Interação (S*G)

Fonte: O próprio autor

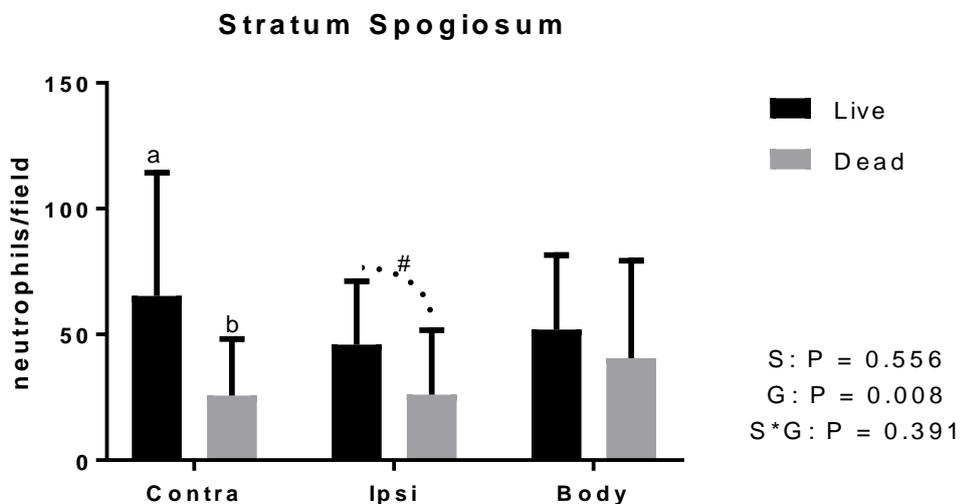
Ao analisar a Figura 2, observa-se que o número de neutrófilos por campo do estrato compacto foi significativamente menor ($P = 0,008$) no grupo de éguas inseminadas com espermatozoides mortos (*DEAD*), sendo que em nenhum dos dois grupos houve influência do local (*Contra*, *Ipsi* e *Body*) na intensidade do infiltrado neste estrato ($P = 0,666$), assim como não houve interação entre os grupos ($P = 0,975$).

Também pode ser observado que houve uma tendência de o infiltrado neutrofílico ser menor no estrato compacto do corno contralateral de éguas inseminadas com espermatozoides

mortos quando comparado ao mesmo local no grupo de éguas inseminadas com espermatozoides vivos.

Na Figura 3 está expresso o número médio de neutrófilos por campo observado no exame histopatológico do estrato esponjoso do endométrio das éguas abatidas, após os diferentes tratamentos.

Figura 3 – Número de neutrófilos por campo (+ Desvio Padrão) do estrato esponjoso de amostras do endométrio do corno contralateral (*Contra*), ipsilateral (*Ipsi*) e do corpo uterino (*Body*), de éguas pertencentes ao grupo de éguas inseminadas com espermatozoides vivos (*LIVE*) e ao grupo de éguas inseminadas com espermatozoides mortos (*DEAD*)



Caracteres diferentes indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$)

Tendência ($0,05 < P \leq 0,1$.) é representada por #

Local (S), Grupos (G) e Interação (S*G)

Fonte: O próprio autor

Ao analisar a Figura 3, observa-se que o número de neutrófilos por campo do estrato esponjoso foi significativamente menor ($P = 0,008$) no grupo de éguas inseminadas com espermatozoides mortos (*DEAD*), sendo que em nenhum dos dois grupos houve influência do local (*Contra*, *Ipsi* e *Body*) na intensidade do infiltrado neste estrato ($P = 0,556$), assim como não houve interação entre os grupos ($P = 0,391$).

O número de neutrófilos por campo do estrato esponjoso do corno contra lateral foi significativamente menor no grupo de éguas inseminadas com espermatozoides mortos.

Também pode-se observar que houve uma tendência de o infiltrado neutrofílico ser maior no estrato esponjoso do corno ipsilateral de éguas inseminadas com espermatozoides vivos quando comparado ao mesmo local no grupo de éguas inseminadas com espermatozoides vivos.

5 DISCUSSÃO

O tipo celular predominantemente encontrado no lavado uterino e na avaliação das amostras histológicas foi o neutrófilo, resultado previsto em decorrência de estudos anteriores que definem que o neutrófilo é o principal tipo celular responsável pela resposta inflamatória ao sêmen (COHEN, 1984; KOTILAINEN *et al.* 1994; TROEDSSON *et al.* 1995; FIALA *et al.* 2007).

No contagem de leucócitos foi observado que o número de leucócitos recuperados no lavado de éguas inseminadas com espermatozoides mortos (*DEAD*) é significativamente menor ($P=0,05$) do que o recuperado em éguas inseminadas com espermatozoides vivos (*LIVE*). Resultado que discorda com resultados previamente obtidos por Katila (1997). É possível que a discrepância entre os resultados entre ambos os estudos existam em decorrência da metodologia utilizada e do momento das avaliações. No caso do estudo realizado por Katila (1997) foram utilizadas 5 éguas e o sêmen de apenas um garanhão, o que não permite excluir o fator individual como uma influência sobre os resultados. Além disso, o sêmen para o grupo de espermatozoides mortos passou por tratamento de calor, com temperatura e tempo não determinado, fato que pode ter tido efeito deletério sobre as propriedades moduladoras do plasma seminal (DAHMS;TROEDSSON 2002).

Na avaliação histopatológica dos estratos compacto e esponjoso, se observou que éguas inseminadas com espermatozoides mortos apresentaram um infiltrado neutrofílico menos intenso, sendo este um possível indicador de uma menor quimiotaxia desencadeada pela inseminação com espermatozoides mortos. Não foi observada diferença no número de neutrófilos por campo entre as regiões do útero amostradas em cada grupo, o que pode ser em decorrência da distribuição dos espermatozoides ser similar nos cornos uterinos e independente do local do folículo dominante (FIALA *et al.*, 2010), conferindo um estímulo inflamatório uniforme e generalizado.

Conforme demonstrado pela avaliação do lavado uterino e da análise histopatológica, a reação inflamatória 4 horas após a inseminação de espermatozoides mortos é menos intensa. Estes resultados podem estar relacionados com as diferentes relações intercelulares entre espermatozoides vivos e mortos com os neutrófilos, mediadas pelo plasma seminal.

A CRISP-3 pode influenciar consideravelmente o processo inflamatório pós-cobertura ao impedir que o PMN ligue-se ao espermatozoide viável e o fagocite (TROEDSSON *et al.* 2010). Esta interferência pode caracterizar um processo de fagocitose frustrada para o neutrófilo, ativando mecanismos pró-inflamatórios através da liberação de citocinas e da lesão

tecidual gerada pela liberação do conteúdo dos grânulos e ROS para o meio extracelular. (BORREGAARD, 2010; NORDENFELT; TAPPER, 2011; BORREGAARD; COWLAND, 1997; HAMPTON *et al.*, 1998). No entanto, no processo de resolução da inflamação, este evento pode não ser de todo ruim, já que aparentemente, uma reação inflamatória inicial mais intensa favorece uma recuperação mais rápida do endométrio (NIKOLAKOPOULOS; WATSON, 2000; FIALA *et al.*, 2007).

Já a lactoferrina, ao estimular a fagocitose de espermatozoides mortos (TROEDSSON *et al.*, 2014), pode acabar por facilitar a remoção de um estímulo pró-inflamatório importante que é a célula espermática. Além disso, o favorecimento da fagocitose pode levar a redução da intensidade dos danos teciduais e de citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos neutrófilos. Em casos onde a reação inflamatória é, de maneira geral, menos intensa, a recuperação do endométrio tende a ser mais lenta. Isto pode ser um fator determinante na resolução da inflamação uterina de éguas suscetíveis a endometrite persistente pós-cobertura, onde os mecanismos de limpeza uterina já são comprometidos (TROEDSSON *et al.*, 1993; LEBLANC *et al.* 1995; NIKOLAKOPOULOS *et al.*, 2000; TROEDSSON *et al.*, 2001; REITZENSTEIN *et al.* 2002; WOODWARD *et al.* 2013).

Contudo é importante ressaltar que no processamento realizado prévio ao congelamento, o plasma seminal é descartado, sendo mantido em média, apenas 5% do total. É possível que mesmo com o plasma seminal sendo removido, algumas proteínas como a CRISP – 3 se mantenham aderidas a superfície dos espermatozoides vivos devido ao contato prévio à centrifugação, mantendo seus efeitos sobre a fagocitose. No entanto, os espermatozoides pertencentes ao grupo de mortos, não apresentavam este *status* previamente a centrifugação, possivelmente não interagindo com moléculas de lactoferrina presentes no plasma seminal, por este motivo, se cogita que moléculas de lactoferrina provenientes de outras origens, como do próprio neutrófilo ou do endométrio, possam passar a auxiliar na fagocitose destas células.

A ausência ou baixa concentração de plasma seminal, com seu possível papel ausente ou reduzido, também acaba por levantar o questionamento sobre a influência da motilidade espermática sobre o processo inflamatório e do metabolismo espermático como uma fonte de fatores quimiotáticos e pró-inflamatórios.

6 CONCLUSÃO

Através deste trabalho conclui-se que a reação inflamatória 4 horas após a inseminação com espermatozoides mortos é menor do que a desencadeada pela inseminação com espermatozoides vivos. Além disso, também se observou que o número de estudos in vivo nesta linha de pesquisa ainda são poucos, tornando a reação inflamatória desencadeada pelas diferentes populações espermáticas, um campo propício para mais estudos.

REFERÊNCIAS

- ALGHAMDI, A. *et al.* Localization of lactoferrin binding sites on equine spermatozoa. **International Symposium of Equine Reproduction Proceedings**, v. 11, n. 156, 2014.
- ALGHAMDI, A.; FOSTER, D.; TROEDSSON, M. Equine seminal plasma binding to polymorph nuclear neutrophils (PMN) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. **Reproduction**. v. 127, p. 593-600, 2004.
- ALMEIDA J. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino [dissertação]. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília; 2006
- ALVARENGA, M.; PASTORELLO, M. Comparação entre a eficiência da escova ginecológica e swab de algodão na coleta de material endometrial de éguas. *In: Congresso Brasileiro de Medicina Equina*, São Paulo, v.1,1994.
- ASBURY A. Bacterial endometritis. In: Robinson NE (ed.) **Current Therapy in Equine Medicine**. Philadelphia: Saunders, 1983; pp. 410–14.
- BADER, H.; KRAUSE, A. Investigations about the transport, distribution and the fate of the spermatozoa in the genital tract of the mare. **Proceedings International Congress on Animal Reproduction**. v. 5, p. 197-205, 1982.
- BALL, B. *et al.* Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. **Theriogenology**. v. 29, n. 6, p. 1269-1283, June. 1988.
- BARRELET, A. How to: obtain and interpret endometrial cytology samples. *In: British Equine Veterinary Association Congress BEVA*, 48., UK, 2009.
- BARROS, S.; MASUDA, E. **Biopsia endometrial na égua: Diagnóstico e Prognóstico**. ed.1, Santa Maria, 2009.
- BENNOUNA, S. *et al.* Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. **Journal of Immunology** v. 171, p. 6052-6058, 2003.
- BERGMAN, R. V.; KENNEY, R. M. Representativeness of a uterine biopsy in the mare. *In: Proceedings of American Association of Equine Practitioners*, v. 21. p. 355-362, 1975.
- BETTERIDGE, K. *et al.* Development of horse embryos up to twenty-two days after ovulation: Observations on fresh specimens. **Journal of Anatomy**. v. 135, 191-209, 1982.
- BLANCHARD, T. *et al.* Investigation of the representativeness of a single endometrial sample and the use of trichrome staining to aid in the detection of endometrial fibrosis in the mare. **Theriogenology**. v. 28, p 445-450, 1987.

BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-670, Nov. 2010.

BORREGAARD, N.; COWLAND, J. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood Journal**, v. 89, n. 10, p. 3.503-3.521, maio. 1997.

BRINSKO, S. *et al.* A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. *In: Annual Convention of AAEP*, New York, 2003.

BROOK, D. Uterine culture in mares. **Modern veterinary practice**. v. 65, p. 3-8, 1984.

BRUM-MEDICI, E. *et al.* Considerations on the use of ancillary diagnostic aids in the diagnosis of endometritis due to infection in mares. **Journal of reproduction and fertility**. v. 44, p. 700-703, 1991.

CAMOZZATO, G. *et al.* Endometritis in mares experimentally infected with three different strains of *E. coli*. **Pferdeheilkunde** v. 30, p. 57-60, 2014

CARMAN, C. *et al.* Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. **Immunity**, v. 26, n. 6, p. 784-797, jun. 2007.

CASLICK, E. The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the thoroughbred mare. **The Cornell Veterinarian**. v. 27. p. 178-187. 1937.

CHERTOV, O. *et al.* Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. **The Journal of Experimental Medicine** v. 186, p. 739-747.

COHEN, J. Immunological aspects of sperm selection and transportation. *In: CRIGHTON, D. B. Immunological Aspects of Reproduction in Mammals*. Kent: Butterworth-Heinemann, 1984. p. 77-89.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte, 2013, cap.6, p. 46.

COUTO, M.; HUGHES, J. Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 4, p 265-273, 1984.

CHRISTOFFERSEN, M.; TROEDSSON, M. Inflammation and fertility in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 52, n.6, p.14-20, Aug. 2017.

DAHMES, B.; TROEDSSON, M. The effect of seminal plasma components on opsonisation and PMN-phagocytosis of equine spermatozoa. **Theriogenology**. v. 58, p. 457-460, 2002.

DIACOVO, T. *et al.* Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. **Blood Journal** v. 88, n.1, p. 146-157, jul. 1996.

DOTY, A. *et al.* Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. **Biology of Reproduction**. v. 85, p. 157-164, July. 2011.

DYBDAL, N. *et al.* Investigation of the reliability of a single endometrial biopsy sample, with a note on the correlation between uterine cysts and biopsies grade. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v. 44, p. 697, 1991.

EKHALASI-HUNDRIESER, M. *et al.* Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction and Development**. v. 70, p. 45-57, 2005.

EVANS, M. *et al.* Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v. 35, p. 327-334, 1987.

FEBRAIO, M.; PEDERSEN, B. Muscle-derived interleukin-6: Mechanisms for activation and possible biological roles. **The FASEB Journal**. v. 16, p. 1335-1347, 2002.

FEDORKA, C. *et al.* Immune response of the equine uterus after insemination with live versus dead spermatozoa. **Proceedings for the 11th International Symposium on Equine Reproduction**. Hamilton New Zealand, 2014.

FIALA, S. *et al.* Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**. vol. 67, p. 556-562, 2007.

FIALA, S. *et al.* Endometrial fibrotic changes. Is one biopsy enough to diagnose degenerative changes?. **Animal Reproduction Science**, v.121, p.89-90, June. 2010.

FILIPPINI, A. *et al.* Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen. **Human Reproduction Update**, v. 7, p. 444-449, 2001.

GABAY, C. *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) is an acute-phase protein. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 2930-2940, 1997.

GUASTI, P. *et al.* Protein content of equine seminal plasma and sperm plasma membrane in subfertile stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 84-85, 2014.

GUYTON, A. **The lymphatic system**. In: GUYTON, A.; HALL, J. **Text-book of Medical Physiology**, Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. p. 180-184.

HAMPTON, M.; KETTLE, A.; WINTERBOURN, C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood Journal**, v. 92, n. 9, p. 3.007-3.017, Nov. 1998.

HUGHES, J.; LOY, R. Investigations on the effect of intrauterine inoculations of Strep, zooepidemicus in the mare. **Proceedings of the 15th annual convention of the American Association of Equine Practitioners**. p. 289-292, 1969.

IMADE, G. *et al.* Immunosuppressive activities in the seminal plasma of infertile men: relationship to sperm antibodies and autoimmunity. **Human Reproduction**, v. 12, p. 256-262, 1997.

- JOBIM, M.I., *et al.* Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**. v.76. p. 765-771. 2011.
- JONES, D.; FIELDEN, E.; CARR, D. Some physiological and pharmacological factors affecting uterine motility as measured by electromyography in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Oxford, v. 44. p. 357-358. 1991.
- KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 249-256, 2008.
- KATILA, T. Neutrophils in uterine fluid after insemination with fresh live spermatozoa or with killed spermatozoa. **Pferdeheilkunde**, v.13, p. 540, 1997.
- KATILA, T., Onset and duration of uterine inflammation of mares with fresh semen. **Biology of Reproduction**. v. 52, p. 515–517, Jan. 1995.
- KENNEY, R. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on embryonic death. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 172, p. 241-262, 1978.
- KENNEY, R.; KALEEL, S. Bacteriostatic activity of the mares uterus: A progress report on immune-globulins. **Journal Reproduction of Fertility Supplement**. v. 23, p. 357-358, 1975..
- KNUDSEN, O. Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. **Cornell Vet**. v. 54, p. 414-422, 1964.
- KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**. v. 41, p. 629-636, Feb. 1994.
- LA COUR, A.; SPRINKLE, T. Relationship of endometrial cytology and fertility in the broodmare. **Equine Practice**. v. 7, p. 27–36, 1985.
- LANGONI, H. *et al.* Estudo microbiológico e citológico do trato genital de éguas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. vol. 46, n. 6, p. 623-636, 1994.
- LEBLANC, M. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin. v. 45, n. 2, p. 21-27, Jun. 2010.
- LEBLANC, M. Persistent mating-induced endometritis. *In*: ROBINSON, N. **Current Therapy in Equine Medicine**. Philadelphia: WB Saunders, 2003. p. 234-237.
- LEBLANC, M. Oxytocin – the new wonder drug for treatment of endometritis? **Equine Veterinary Education**. v. 6, p. 39-43, 1994.

- LEBLANC, M.; ASBURY, A.; LYLE, S. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. **American Journal Veterinary Research**. v. 50, p. 864-867, 1989.
- LEBLANC, M. *et al.* Lymphatic clearance of India Ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. **Biology of Reproduction**. v. 1. p. 501-506. 1995.
- LEBLANC, M. *et al.* Scintigraphic measurements of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Veterinary Journal**. v. 26, p. 109-113, 1994.
- LEBLANC, M.; MAGSIG, J.; STROMBERG, A. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**. v. 68, p. 403-412, 2007.
- LEBLANC, M. Uterine cytology *In: McKinnon, A., et al. Equine Reproduction*. 2nd ed. West Sussex, United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2011. cap. 204, p.1922-1928.
- LEE, W.; HARRISON, R.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 14, p. 1.299-1.306, 2003.
- LEES, P.; DAWSON, J.; SEDGWICK, A. Eicosanoid and equine leukocyte locomotion in vitro. **Equine Vet. J.** v.18, p.493-497, 1986.
- LEHRER, R. I. *et al.* Neutrophils and host defense. **Annals of Internal Medicine**, v.109, p.127-142, 1988.
- LIU, I.; CHEUNG, A. Immunoglobulin and neutrophil defense against uterine infection in mares resistant and susceptible to chronic endometritis: a review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 189, p. 700-702, 1986.
- LOVE, C. Endometrial biopsy *In: McKinnon, A., et al. Equine Reproduction*. 2nd ed. West Sussex, United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2011. cap.205, p.1929-1939.
- LÜTTGENAU, J. *et al.* Ovarian and Uterine Blood Flow in Cycling Mares After Intrauterine Infusion of Killed Deep-frozen Semen or Physiologic Saline. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.66, p. 142, 2018.
- MACKAY, R. Inflammation in horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 16, p. 15-27, 2000.
- MASSENO, A. Avaliação da fibrose endometrial e dos miofibroblastos nas endometrioses ativa e inativa das éguas. 2012. 95 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.
- MAYADAS, T.; CULLERE, X.; LOWELL, C. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology**, v. 9, p. 181-218, 2013.
- MATTOS, R.C. *et al.* Citologia endometrial na égua como método diagnóstico auxiliar e complementar. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 8, n. 2, p. 83-90, 1984.

MCKINNON, A. Reproductive ultrasonography. *In: Equine Stud Medicine Proceedings*. p. 375-430, 1996

MCKINNON, A. et al. Diagnostic ultrasonography of uterine pathology in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 8, n. 4, p. 329-333, July/Aug. 1988.

McKinnon, A.; Squires, E.L. and Voss, J.L. 1987. Ultrasonic evaluation of the mare's reproductive tract. Part II. Compendium on continuing education for the practicing veterinarians 7: 472-82

MERKT H.; BADER, H.; KLUG, E. Die Bedeutung klinisch andrologischer Untersuchungen bei Hengsten für deren praktischen Zuchteinsatz. **Deutsche tierärztliche Wochenschrift**, v. 89, p. 219-223, 1982.

NEELY, D. *et al.* Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v.2 7. p. 181-189. 1979.

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

NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E. Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, p. 164-166, 2000.

NORDENFELT, P.; TAPPER, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 90, n. 2, p. 271-284, August. 2011.

NOVAK, S. *et al.* Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. **Theriogenology**. v. 74, p. 956-967, 2010.

PASCOE, R. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v. 27. p. 299-305. 1979.

PETERSON, F.; McFEELY, R.; DAVID, J. studies on the pathology of endometritis in the mare. **Proceedings of the 15th annual convention of the American Association of Equine Practitioners** p. 279-287, 1969.

PYCOCK, J.F., ALLEN, W. Pre-chemotactic and chemotactic properties of uterine fluid from mares with experimentally induced endometritis. **Vet. Rec.** v. 123, p.193–195, 1988.

PYCOCK, J.; ALLEN, W. Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. **Equine Vet J**, v.22, p.422-425, 1990.

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

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X02008476>>. Acesso em: 19 out. 2018.

REISWIG, J.; THRELFALL, W.; ROSOL, T. A comparison of endometrial biopsy, culture and cytology during oestrus and dioestrus in the horse. **Equine Veterinary Journal**. v. 25, p. 240-241, 1993.

RICKETTS, S.; MACKINTOSH, M. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v. 35, p. 343-351, 1987.

RICKETTS, S.W.; BARRELET, A. A retrospective review of the histopathological features seen in a series of 4241 endometrial biopsy samples collected from UK thoroughbred mares over a 25-year period. **Journal Pferdeheilkunde**, Baden-Baden, v. 13, p. 525–530, set. 1997.
RIDDLE, W.; LEBLANC, M.; STROMBERG, A. Relationships between uterine culture, citology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**. v. 68, p. 395-402, Aug. 2007.

SCHAMBONY, A. *et al.* Expression of crisp proteins in the male equine genital tract. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v. 53, p. 67-72, 1998.

SCHUBERTH, H. *et al.* Immunological responses to semen in the female genital tract. **Theriogenology**, v.70, p.1174- 1181, 2008.

SCOTT, M. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. **Animal Reproduction Science**. v. 60-61, p. 337-348, 2000.

SCOTT, M.; LIU, I.; OVERSTREET, J. Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implications. **Proceedings American Association of Equine Practitioners** v. 41, p. 1-2, 1995.

SERRANO-RECALDE, E. Influência da qualidade do sêmen criopreservado equino sobre a taxa de prenhez, hemodinâmica uterina e endometrite pós-cobertura. 2014, 104f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014.

STROKA, K.; HAYENGA, H.; ARANDA-ESPINOZA, H. Human neutrophil cytoskeletal dynamics and contractility actively contribute to trans-endothelial migration. **PLoS One**. v. 8, n. 4, p. 61377, abr. 2013.

TRAUB-DARGATZ, J.; SALMAN, M.; VOSS, J. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. **Journal of American Veterinary Association**. v. 198, p. 1745-1747. May 1991.

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

TROEDSSON, M. *et al.* Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**. v. 89, p. 171-86, 2005.

TROEDSSON, M. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**. v. 52, p. 461-471, Aug. 1999.

TROEDSSON, M. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. **Pferdeheilkunde**. v. 13, n. 5, p. 516-520, Sept./Oct. 1997.

TROEDSSON, M. Uterine response to semen deposition in the mare. *In: Proceedings of the Society for Theriogenology Annual Meeting*. San Antonio, USA. p. 130-135, Sept. 1995.

TROEDSSON M. *et al.* CRISP-3 in equine seminal plasma is involved in selective uterine sperm transport. **Animal Reproduction Science**; v. 121, p.192–193, 2010.

TROEDSSON, M. *et al.* Equine seminal plasma derived lactoferrin regulates binding of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) to spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 34, p. 49, Jan. 2014.

TROEDSSON, M. *et al.* Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science**. v. 68, p. 273-278, 2001.

TROEDSSON, M. *et al.* Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 99, p. 307-313, 1993.

TROEDSSON, M.; LIU, I.; THURMOND, M. Function of uterine and blood derived polymorphonuclear neutrophils (PMN) in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: Phagocytosis and chemotaxis. **Biology of Reproduction**. v. 49, p. 507-514, 1993.

TROEDSSON, M. *et al.* Interaction between equine semen and the endometrium: The inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.273–278, 2001.

TROEDSSON, M. *et al.* Mechanisms of sperm induced endometritis in the mare. **Biology of Reproduction**. v.52, p.307, 1995.

TROEDSSON, M. *et al.* The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.56, p.341-349, 2000.

VAN CAMP, S. Endometrial biopsy of the mare: A review and update. **The Veterinary Clinics of North America**. v. 4, p. 229-245, 1988.

VAN GISBERGEN, K. *et al.* Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 201, p. 1281-1292, 2005.

VESELSKY, L. *et al.* Effect of boar seminal immunosuppressive fraction on B lymphocytes and on primary antibody response. **Biology of Reproduction**. v. 55, p. 194-199, 1996.

WATSON, E. Uterine defense mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: a review. **Equine Veterinary Journal**. v. 20, p. 397-400, 1988.

WATSON, E.; STOKES, C.; BOURNE, F. Cellular and humoral mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. *Vet. Immunol. Immunopathol*, v.16, p.107–121, 1997.

WATSON, E.; STOKES, C.; BOURNE, F. Influence of arachidonic acid metabolites in vitro and in uterine washings on migration of equine neutrophils under agarose. *Res. Vet. Sci.* v.43, p.203–207, 1997.

WIDDERS, P. *et al.* Specific antibody in the equine genital tract following systemic and local immunisation. *Immunology*, Londres. v. 54, n. 4, p. 763-769, Apr. 1985. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1453547/>>. Acesso em: 02 out. 2018.

WINGFIELD-DIGBY, N. Studies of endometrial cytology in mares. *Equine Veterinary Journal*. v. 10, p. 167-170, 1978.

WINGFIELD-DIGBY, N.; RICKETTS, S. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. v. 32, p. 181-185, 1982.

WITE, R. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. *In*: HAFEZ, E. **Reprodução animal**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1988. p. 212-228.

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

YOON, S. *et al.* Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 125, p. 286-290, 2009.

ZENT, W.; TROEDSSON, M.; XVE, J. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of Thoroughbred mares: a field study. *Proceedings of American Association of Equine Practitioners*, v. 44, p. 64-65, 1998.