

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TRANSPORTE ESPERMÁTICO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ÉGUA
APÓS A INSEMINAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
ESPERMATOZÓIDES

SANDRA MARA DA ENCARNAÇÃO FIALA

PORTO ALEGRE
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TRANSPORTE ESPERMÁTICO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ÉGUA
APÓS A INSEMINAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
ESPERMATOZÓIDES

SANDRA MARA DA ENCARNAÇÃO FIALA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias na área de Reprodução Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

PORTO ALEGRE
2004

SANDRA MARA DA ENCARNAÇÃO FIALA

**TRANSPORTE ESPERMÁTICO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA ÉGUA
APÓS A INSEMINAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
ESPERMATOZÓIDES**

APROVADA POR:

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Alves Pimentel
Membro da Comissão

Prof. Dra Monique de Albuquerque Lagares
Membro da Comissão

Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Rodrigo Costa Mattos pela amizade, e orientação durante este período.

A Dra. Ana Luisa Gelpi Mattos pela acolhida e pelo auxílio na revisão da tese.

Ao Dr. Cláudio Alves Pimentel pela amizade, e pela possibilidade de utilização das instalações do Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária da UFPel.

Aos colegas do Reprolab, principalmente aos amigos Magda Jochims Vieira, Cristina Trein, Ênio Brito, Andréa Keller e Adriana Pires Neves que me ajudaram a sentir como em casa, mesmo estando longe.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Veterinária da UFPel, pelo auxílio na realização dos exames bacteriológicos.

Ao Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira, pelo empréstimo dos garanhões para a coleta de sêmen e aos estagiários do HCV (Hospital de Clínica Veterinária) da Faculdade de Veterinária da UFPel.

A direção e funcionários da FAURGS pela utilização do espaço e equipamentos durante a confecção da tese.

A Dra. Marta Amaral pelo auxílio fundamental na confecção das lâminas de histologia.

Ao Paulo e a Elizabeth Chagas pelo auxílio na parte experimental.

Aos amigos e estagiários do Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária da UFPel, (Bruna Cúrcio, Cristiane Ferreira, Marta Rodrigues, Marcelo Mendonça, Rouget Wrege, Eduardo Xavier) alguns hoje já formados, pelo auxílio durante a execução do experimento.

Aos colegas Gabriel Ribas Pereira, Paulo Henrique Soares Fetter e Leonardo Porto Alves, pela grande amizade e por terem trocado muitas horas de lazer pelo trabalho no frigorífico, independente do clima....

A colega e amiga Dra. Marilise Mesquita Horn, pelo incentivo, e amizade que se fortaleceu no decorrer destes anos.

A direção e funcionários do Frigorífico Miramar, os quais possibilitaram a realização do experimento e, conseqüentemente, da tese.

A minha família pelo apoio incondicional.

A CAPES pela bolsa de estudos e ao CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização do experimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
REVISÃO DE LITERATURA.....	13
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	13
RESFRIAMENTO DE SÊMEN.....	15
PLASMA SEMINAL.....	16
COMPONENTES DO PLASMA SEMINAL.....	16
EFEITO DO PLASMA SEMINAL NO ÚTERO.....	18
DILUENTES.....	21
MECANISMOS DE DEFESA UTERINA.....	24
BARREIRAS FÍSICAS.....	24
LIMPEZA MECÂNICA.....	25
MECANISMOS CELULARES E IMUNOLÓGICOS.....	25
RESPOSTA INFLAMATÓRIA PÓS-COBERTURA OU PÓS-INSEMINAÇÃO.....	25
TRANSPORTE ESPERMÁTICO.....	28
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	30
CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS.....	70

RESUMO

Transporte espermático e resposta inflamatória uterina na égua após inseminação com diferentes concentrações de espermatozóides

Normalmente, após a cobertura ou a inseminação artificial de éguas, ocorre uma endometrite aguda transitória em resposta ao sêmen e bactérias no útero. O objetivo deste estudo foi verificar se o transporte espermático e a intensidade da reação inflamatória uterina, 2h, 4h ou 24h após a inseminação com sêmen resfriado, são influenciados pela concentração espermática na dose inseminante. Para tal, foram utilizadas 192 éguas em cio, com folículo dominante ≥ 35 mm, sem crescimento bacteriano e livres de PMNs aos exames uterinos complementares. As éguas foram distribuídas aleatoriamente em grupos e inseminadas com 20 ml contendo 100×10^6 (n=30), 500×10^6 (n=27) ou 1000×10^6 (n=31) espermatozóides diluídos em solução de 3 ml de plasma seminal e 17 ml de leite desnatado, refrigerado e armazenado por 18 a 22 horas, ou infundidas com 20 ml de plasma seminal (n=33), ou com 20 ml de leite desnatado (n=38). As éguas foram abatidas duas, quatro ou 24h após as inseminações ou infusões. O grupo controle (n=33) não recebeu nenhum tratamento. Os ovidutos foram separados do útero, sendo útero e ovidutos lavados separadamente com PBS. Uma amostra do lavado de cada oviduto foi examinada para contagem de espermatozóides e uma amostra de cada lavado uterino foi utilizada para contagem de leucócitos. Após as lavagens, foi retirada uma amostra de endométrio para exame histopatológico. As éguas inseminadas e infundidas apresentaram reação inflamatória significativamente maior que as éguas do grupo controle, no decorrer das 24 horas. A reação inflamatória foi significativamente maior nas éguas inseminadas que nas infundidas. A reação inflamatória apresentou correlação com a concentração espermática ($r=0,389$). O número de éguas apresentando espermatozóides nos ovidutos não foi diferente nos grupos inseminados. Concluiu-se que componentes da dose inseminante provocam uma resposta inflamatória, sendo esta tanto

mais severa e de resolução mais rápida, quanto maior for a concentração espermática. Por outro lado, até as quatro horas pós-inseminação, o transporte espermático independe da concentração espermática utilizada.

ABSTRACT

Sperm transport and uterine inflammatory response in the mare after
insemination with different sperm concentrations

A transitory and acute endometritis normally occurs, after natural breeding or artificial insemination (AI), as an inflammatory reaction against semen and bacteria. The aim of this study was to detect if either the sperm transport, or the intensity of inflammatory reaction 2, 4 and 24 hours after AI with cooled semen, depends on the sperm count in the insemination dose. One hundred and ninety two mares in estrus with dominant follicle ≥ 35 mm, free of bacterial growth and without PMNs in uterine smears were used. Mares were randomly assigned to groups and received a 20 ml insemination dose with 100×10^6 (n=30), 500×10^6 (n=27) or 1000×10^6 (n=31) spermatozoa diluted in 3ml seminal plasma and 17ml skim milk, cooled and stored for 18 to 22 h, or a 20 ml seminal plasma (n=33), or a 20 ml skim milk (n=38) uterine infusion, being slaughtered 2, 4 or 24 h later. The control group (n=33) received no treatment. The oviducts were dissected from the uterus and both, uterus and oviducts, were flushed with PBS. A sample from each tubal flush was examined for sperm count and a sample of each uterine flush was examined for leukocytes search and count. After flushes, an endometrial sample was collected for histopathological examination. Inseminated and infused mares showed a significantly greater inflammatory reaction than control group, throughout 24 h. The inflammatory reaction was correlated with sperm count ($r=0,389$). The number of mares showing sperm in the oviducts was not different among distinct insemination groups. It was concluded that compounds in the insemination dose induce uterine inflammatory response, that is as more intense and faster, as sperm count increases. On the other hand, during the first four hours after insemination, the sperm transport does not depend on sperm count.

1 INTRODUÇÃO

Por ocasião da cobertura, ou da inseminação artificial, o sêmen é depositado no trato genital da égua, mas apenas um pequeno número de espermatozóides férteis e em estágio adequado de maturação é transportado até os ovidutos (Katila, 1997).

O transporte espermático é influenciado pela concentração espermática. Em éguas inseminadas após a ovulação, o número de espermatozóides no oviduto é extremamente baixo nas primeiras duas horas após a inseminação, aumentando substancialmente quatro horas após e diminuindo após seis horas (Bader, 1980; Bader & Krause, 1982). Em éguas inseminadas antes da ovulação, espermatozóides móveis são observados no oviduto quatro horas após a inseminação (Scott, *et al.*, 1994).

Na maioria das espécies, a junção útero-tubárica parece ser o local de armazenamento de espermatozóides, sendo igualmente sugerido que esta região atue como reservatório de espermatozóides em éguas, antes da ovulação (Bader, 1982; Scott *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1995).

Logo após a cobertura, ou a inseminação artificial, o útero se torna um ambiente hostil para os espermatozóides, devido à ocorrência de uma reação inflamatória contra as bactérias e o sêmen (Kotilainen *et al.*, 1994; Troedsson *et al.*, 1995b). Esta endometrite aguda transitória é considerada fisiológica e visa a remoção do excesso de espermatozóides, plasma seminal e contaminantes, antes da entrada do embrião no útero (Troedsson, 1997). Assim, o transporte rápido é extremamente importante para que os espermatozóides alcancem o oviduto e possam fertilizar o oócito (Troedsson *et al.*, 1998).

Vários estudos demonstram a importância do sêmen na regulação da inflamação pós-cobertura, em éguas (Troedsson, 1995; Troedsson *et al.*, 1995a; Troedsson *et al.*, 1995b; Troedsson *et al.*, 1998). Os espermatozóides são capazes de induzir a quimiotaxia de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), da circulação sangüínea para o lúmen uterino, através da ativação do sistema do complemento (Troedsson *et al.*, 1995a). Trinta minutos após a inseminação, já são detectados os primeiros

neutrófilos no lúmen uterino, sendo os maiores níveis atingidos 4 a 24 horas após a introdução do sêmen (Katila, 1995).

O volume inseminado e a concentração espermática influenciam a intensidade da resposta inflamatória uterina. Os pequenos volumes, ao provocarem menor drenagem mecânica do útero, e as altas concentrações, ao causarem maior irritação pelo contato dos espermatozóides com o endométrio, predisõem a reações inflamatórias mais intensas (Kotilainen *et al.*, 1994).

Troedsson e colaboradores, (Troedsson *et al.*, 1998; Troedsson *et al.*, 1999) demonstraram que o plasma seminal, ao contrário dos espermatozóides, inibe a ativação do complemento e a quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares, além de suprimir temporariamente a fagocitose dos espermatozóides pelos PMNs. Desta forma, o plasma seminal possibilitaria que um número suficiente de espermatozóides atingisse os ovidutos antes da ocorrência da resposta inflamatória, sem serem fagocitados, permitindo a fertilização.

Por outro lado, vários trabalhos demonstram que o plasma seminal influencia negativamente a sobrevivência de espermatozóides *in vitro* (Marden & Whertessen, 1956; Pickett *et al.*, 1975; Varner *et al.*, 1987; Padilla & Foote, 1991; Jasko *et al.*, 1991; Jasko *et al.*, 1992; Kneissl, 1993; Keller *et al.*, 2001), mas não *in vivo*, já que os espermatozóides perdem contato rapidamente com o plasma seminal no trato genital feminino (Ahlemeyer, 1991).

Na preservação do sêmen, é fundamental a presença de diluentes para prolongar a sobrevivência dos espermatozóides e protegê-los contra condições ambientais desfavoráveis, como temperaturas extremas (Pickett & Amann, 1987). O leite é um dos ingredientes mais utilizados em diluentes de sêmen equino (Ebertus, 1963). Quando infundido no útero de éguas, provoca uma menor resposta inflamatória, em comparação à provocada pelos espermatozóides (Kotilainen *et al.*, 1994; Bergman & Kruiff, 1997).

O presente estudo objetivou verificar se a intensidade da reação inflamatória uterina e a presença de espermatozóides no oviduto, duas, quatro ou 24 horas após a inseminação com sêmen resfriado e preservado,

são dependentes da concentração espermática utilizada na dose inseminante.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Acredita-se que os árabes tenham introduzido a técnica de inseminação artificial em eqüinos, em 1322, mas o primeiro registro real de investigação nesta área foi feito por Spalanzani, em 1776 (Bowen, 1969). A mecanização dos transportes e da agricultura e o incremento nas comunicações, ao diminuírem o interesse pela criação de eqüinos, bem como a proibição do uso da inseminação artificial por algumas associações de raça, impediram que as técnicas de reprodução assistida se desenvolvessem, nesta espécie, da mesma forma que nas espécies destinadas à alimentação humana.

Na Rússia, em 1953, a inseminação foi utilizada em 450.000 cavalos (Swire, 1962). No Japão, em 1956, foram inseminadas 10.000 éguas, correspondendo a mais de 7% dos animais destinados à reprodução naquele ano (Nishikawa, 1959). De acordo com Mies Filho (1977), as primeiras inseminações no Brasil ocorreram nos anos de 1931 e 1932, na coudelaria do exército, em Saican, no Rio Grande do Sul.

Atualmente, a inseminação artificial é uma técnica amplamente utilizada em reprodução eqüina e permitida por diversas associações de raça no Brasil (Mattos, 1995), uma vez que, na espécie eqüina, os índices de fertilidade obtidos com a inseminação podem ser similares ou superiores aos obtidos com a monta natural (Kenney *et al.*, 1975; Palmer, 1984; Mattos & Cavalheiro, 1988).

Em 225 ciclos, durante três temporadas, Mattos & Cavalheiro (1988) obtiveram taxas de prenhez por ciclo superiores, através da inseminação com sêmen fresco (78,7%), do que com a monta natural (65,3%). Amann *et al.* (1987), no entanto, verificaram que a inseminação com sêmen congelado proporcionou taxas de prenhez 75% inferiores às obtidas com sêmen fresco. A composição individual do plasma seminal, ao afetar a congelabilidade do sêmen dos garanhões, pode ter sido responsável pela baixa fertilidade verificada (Aurich *et al.*, 1996).

O número mínimo de espermatozóides móveis necessário para que se obtenha uma porcentagem de prenhez ótima ainda não foi estabelecido, embora a dose de 500×10^6 espermatozóides móveis seja recomendada (Pickett & Back, 1973; Pickett *et al.*, 1974). Alguns autores, no entanto, não observaram diferença nas taxas de prenhez após inseminação com 100×10^6 espermatozóides (63%) ou com 500×10^6 espermatozóides móveis (75%) (Demick *et al.*, 1976). Squires *et al.* (1998) testaram a hipótese que éguas inseminadas com duas vezes a dose recomendada de sêmen resfriado (2×10^9 espermatozóides) apresentariam taxas de prenhez superiores às inseminadas com uma única dose de 1×10^9 espermatozóides, ou àquelas inseminadas duas vezes, com doses de 1×10^9 espermatozóides, num intervalo de dois dias entre as inseminações. Para tal, os espermatozóides foram diluídos em leite desnatado-glicose, a uma concentração de 25×10^6 espermatozóides móveis/ml (volume total 40 ml) e resfriados a 5°C por 24 ou 48 h. As éguas inseminadas com 1×10^9 espermatozóides a cada dois dias apresentaram taxas de prenhez mais altas do que as inseminadas com uma dose única de 1×10^9 espermatozóides ou de 2×10^9 espermatozóides.

Sieme *et al.* (2003) verificaram que o ideal, em relação à inseminação com sêmen congelado, é uma única inseminação, realizada preferentemente entre 12 horas antes e 12 horas após a ovulação. Ao utilizarem sêmen resfriado, os autores obtiveram melhores índices de prenhez quando o procedimento ocorreu entre 24 horas antes e 12 horas após a ovulação.

Jones (1995), após a infusão de 30, 60, 120 ou 250 ml de PBS (*phosphate buffered saline*), observou que, independentemente do volume, o líquido não se distribui uniformemente dentro do útero, e que o relaxamento completo da cérvix pode provocar um refluxo de até 60 % do líquido infundido. O efeito do volume da inseminação (10, 100 ou 200 ml) na taxa de coleta de embriões foi estudado por Rowley *et al.* (1990), que observaram que volumes maiores que 100 ml diminuem a fertilidade. Entretanto, após inseminar éguas com 30 ou 120 ml de sêmen resfriado diluído, contendo 50×10^6 espermatozóides/ml, Bedford & Hinrichs (1994) não observaram diferença nas taxas de prenhez entre os dois grupos (78 e 100%, respectivamente). A utilização de um maior volume com uma menor

concentração de espermatozóides móveis proporciona uma menor porcentagem de embriões coletados do que a obtida quando se utiliza o mesmo volume com uma concentração maior de espermatozóides móveis (Jasko *et al.*, 1992). Por outro lado, Allen *et al.* (1976) obtiveram boas taxas de prenhez utilizando 0,6 ml de sêmen congelado.

2.2 RESFRIAMENTO DE SÊMEN

A liberação do uso da inseminação, por algumas associações de raça, fez com que o transporte de sêmen equino resfriado aumentasse consideravelmente nos últimos anos, permitindo um melhor aproveitamento de determinados garanhões.

Como os espermatozóides são mais sensíveis ao resfriamento rápido entre +20°C e +5°C (Kayser *et al.*, 1992), são necessárias curvas apropriadas de resfriamento que permitam o armazenamento de espermatozóides por um longo período (Mattos, 1995; Meirelles *et al.*, 1998; Lagares *et al.*, 2000; Keller *et al.*, 2001).

O resfriamento lento (<0,3° C/minuto) até +5° C (Douglas-Hamilton *et al.*, 1984), associado à diluição em meio adequado, reduz os efeitos prejudiciais do resfriamento sobre o sêmen. Isto foi comprovado por Varner *et al.* (1988), que compararam três curvas de resfriamento (0,3; 0,9 e 1,31°C /min) até +4°C, em relação à motilidade progressiva, à motilidade total e à velocidade espermática do sêmen diluído em leite desnatado-glicose. Os autores observaram que a curva mais lenta proporcionou resultados superiores nas três variáveis. Entretanto, Province *et al.* (1985) testaram o resfriamento de espermatozóides equinos de +37°C a +5°C, com uma taxa linear de 1°C/ min, e verificaram que a motilidade progressiva não foi diferente das amostras resfriadas a 0,5 ou 0,21°C/min.

Embora o resfriamento geralmente apresente sucesso, a qualidade do sêmen do garanhão, após resfriamento e armazenamento, pode variar consideravelmente em função de características individuais do animal (Douglas-Hamilton *et al.*, 1984).

Malmgren, (1998), em um estudo realizado visando comparar a eficácia de dois recipientes de transporte de sêmen equino na manutenção

da motilidade espermática e da integridade de membrana, após 24 h de armazenamento, em temperatura ambiente de +20° ou +37°C, verificou que as características do sêmen mantido em temperatura ambiente mais extremas (+ 37° C) durante o período de armazenamento, foram melhor preservadas quando se utilizou como meio de acondicionamento de sêmen durante o resfriamento o Equitainer¹. Atualmente o Equitainer é o recipiente mais utilizado para transporte do sêmen equino resfriado, sendo demonstrado que o sêmen transportado dessa forma permite obtenção de boas taxas de prenhez .

O sêmen resfriado, mantido a +4°C por 24h, apresenta índices de fertilidade que não se diferenciam do obtido com sêmen fresco (Mattos, 1995; Keller *et al.*, 2001). Taxas de prenhez por ciclo obtidas com sêmen resfriado por 24 horas, a +5°C, podem atingir 70%, demonstrando que a qualidade do sêmen permanece após este período (Varner *et al.*, 1989; Picket 1993; Meirelles *et al.*, 1998; Lagares *et al.*, 2000), enquanto o armazenamento de sêmen por 48 horas geralmente reduz as taxas de prenhez à metade das obtidas com sêmen fresco (Picket, 1993).

2.3 PLASMA SEMINAL

2.3.1 Componentes do plasma seminal

O sêmen é composto por espermatozóides e pelo plasma seminal, produto das vias espermáticas e glândulas acessórias, liberado durante a ejaculação.

O plasma seminal funciona como um veículo que transporta os espermatozóides do trato reprodutivo do macho para o trato reprodutivo da fêmea. Carneiros e touros ejaculam rapidamente, ocorrendo uma mistura dos componentes seminais. Já o garanhão, o porco e o cão emitem o sêmen

¹ Equitainer Minitüb GmbH Alemanha

de forma fracionada, correspondendo às secreções das diferentes partes do trato reprodutivo (Mann, 1964).

O plasma seminal contém fatores estimuladores da motilidade espermática que podem ser divididos em dois grandes grupos: o primeiro deles é constituído por fatores de ativação catalítica, como certos íons, nucleotídeos e ativadores específicos, provavelmente de origem protéica, encontrados em diversas glândulas acessórias, principalmente na próstata; o outro grupo é formado por nutrientes, que fornecem a energia metabólica exigida para a motilidade e sobrevivência dos espermatozóides (Mann & Lutwak-Mann, 1981). Algumas características físico-químicas do plasma seminal são influenciadas pela estação do ano (Mann *et al.*, 1956; Nishikawa, 1959; Pickett *et al.*, 1970; Gebauer *et al.*, 1976).

Diversos autores estudaram o efeito do plasma seminal no armazenamento de sêmen e concluíram que, embora o plasma seminal contenha substâncias benéficas para o espermatozóide, não é o meio ideal para seu resfriamento e armazenamento. Altas concentrações de plasma seminal possuem efeito negativo na sobrevivência de espermatozóides *in vitro* (Marden & Whertessen, 1956; Pickett *et al.*, 1975; Varner *et al.*, 1987; Padilla & Foote, 1991; Jasko *et al.*, 1991; Jasko *et al.*, 1992; Kneissl, 1993), prejudicando os espermatozóides durante o resfriamento e a estocagem (Pickett *et al.*, 1975), fato este que não ocorre *in vivo*, já que os espermatozóides perdem rapidamente contato com o plasma seminal no trato genital feminino (Ahlemeyer, 1991). Estudos mostraram que a retenção de 5% a 20% de plasma seminal exerce efeito positivo sobre o sêmen resfriado ou congelado (Pickett *et al.*, 1975; Ahlemeyer, 1991; Jasko *et al.*, 1992).

Keller *et al.* (2001) avaliaram a influência da concentração de plasma seminal na manutenção da motilidade espermática do sêmen preservado a +4°C. Após a coleta, o sêmen foi diluído em leite desnatado com três diferentes concentrações de plasma seminal (1,95%, 6,29% e 17,78%) e examinado às 24, 48 e 72 horas. A fração contendo 1,95% de plasma seminal apresentou motilidade progressiva e total superior em relação à que continha 17,78% nas 24 h e nas 48h.

Schmitt (2002), estudando a influência de diferentes concentrações de plasma seminal (0%, 2,5%, 5% e 10%) na motilidade, funcionalidade e na integridade da membrana plasmática de espermatozóides eqüinos resfriados, verificou que concentrações de até 5% de plasma seminal não afetam esses parâmetros. A centrifugação e a remoção parcial do plasma seminal aumentaram a porcentagem de espermatozóides com motilidade progressiva e limitaram a redução na motilidade progressiva do sêmen de garanhões com baixa tolerância ao resfriamento, após 48 horas de armazenamento (Brinsko *et al.*, 2000). Da mesma forma, a adição de 2,5% de plasma seminal proveniente de garanhões com alta qualidade de sêmen melhorou a motilidade espermática total de garanhões com baixa qualidade de sêmen (Schmitt, 2002).

O efeito prejudicial do plasma seminal pode ser reduzido através de coleta e diluição apenas da fração rica do ejaculado (Varner *et al.*, 1987), ou utilizando altas proporções de diluente:sêmen (Jasko *et al.*, 1991; Varner *et al.*, 1987).

O plasma seminal contém um grande número de proteínas, parcialmente originárias do plasma sangüíneo e parcialmente sintetizadas e secretadas pelos testículos, epidídimo e vesículas seminais (Manjunath *et al.*, 1994). Brandon *et al.* (1999) correlacionaram três proteínas com a fertilidade (SP-2, SP-3, SP-4). Schmitt (2002) encontrou 17 bandas protéicas, 10 delas presentes em todos os garanhões analisados. As bandas denominadas 5 (75-80 kDa; 8,5-8,7 PI) e 19 (20-25 kDa; 8,5-8,7 PI) não foram identificadas nos garanhões que possuíam baixa qualidade de sêmen; as bandas 3 (75-80 kDa; 8,0-8,2 PI) e 17 (20-25 kDa; 8,0-8,2 PI) apresentaram densidade óptica superior nas amostras de garanhões de baixa qualidade de sêmen; a banda protéica 31 (20-25 Kda; 3,2-3,4 PI) foi superior nos animais de alta qualidade, sugerindo que estas proteínas sejam marcadores da qualidade do sêmen.

O plasma seminal de humanos e de diversas espécies animais contém TGF-beta, (Transforming Growth-Factor), considerado o principal agente estimulante da reação inflamatória pós-cobertura e essencial na indução da tolerância imune aos antígenos seminais (Robertson, *et al.*, 2002).

2.3.2 Efeito do plasma seminal no útero

O plasma seminal possui importante interação com o útero, participando da resposta imunológica fisiológica que ocorre após a inseminação (Bischof *et al.*, 1994; Kotilainen *et al.*, 1994; Rozeboom *et al.*, 1999). O plasma seminal tem ação imunossupressora em bovinos (Fahmi *et al.*, 1985) e suínos (Rozeboom *et al.*, 1998), embora, na égua, uma diminuição do afluxo de PMNs ao útero, *in vivo*, ainda não tenha sido demonstrada (Kotilainen *et al.*, 1994). Além disso, o plasma seminal eqüino contém fatores envolvidos na capacitação e na reação acrossômica (Calvete *et al.*, 1997; Brandon *et al.*, 1999), necessários para a fertilidade normal, e possui substâncias que causam contração da musculatura do trato reprodutivo de coelhos (Overstreet & Tom, 1982).

Espermatozóides atingem os ovidutos mais rapidamente quando diluídos em plasma seminal do que em solução salina em caprinos e coelhos (Einarsson & Viring, 1973; Overstreet & Tom, 1982). A ocitocina está presente no sêmen do garanhão, principalmente na fração gel, e parece ter importância na contratilidade e no transporte espermático (Watson *et al.*, 1999).

O plasma seminal bovino induz a inibição de PMNs (Gilbert & Fales, 1996). Também parece não haver quimiotaxia de PMNs pelo plasma seminal de suíno (Rozeboom *et al.*, 2001). Troedsson *et al.* (1999) observaram que o plasma seminal eqüino ao contrário dos espermatozóides, inibe a ativação do complemento e suprimir a quimiotaxia dos PMNs, além de suprimir temporariamente a fagocitose dos espermatozóides pelos PMNs (Troedsson *et al.*, 1998; Troedsson *et al.*, 1999).

Troedsson (1995) sugeriu que a remoção do plasma seminal do sêmen congelado aumentaria a reação inflamatória depois da inseminação com sêmen congelado, mas isto não foi demonstrado por Kotilainen *et al.* (1994), que verificaram que a adição de plasma seminal ao sêmen congelado provocou um acréscimo no número de neutrófilos, semelhante ao causado pela inseminação com sêmen congelado. Estes autores também encontraram PMNs em lavados uterinos após infusão de plasma seminal

congelado, atribuindo a ocorrência de um maior número de leucócitos, em duas éguas, à presença de alguns espermatozóides no plasma seminal, após a centrifugação. Tyler (1977) verificou a presença de grande número de leucócitos na cérvix de coelhas 30 minutos após a cobertura, ou após a inseminação, mas não após a infusão de plasma seminal, ou cobertura com um macho vasectomizado. Da mesma forma, Cohen (1984) não constatou presença de neutrófilos após a infusão de plasma seminal sem espermatozóides em mulheres. Verificando o efeito dos espermatozóides, do plasma seminal e do diluente no útero de éguas, e a dinâmica da resposta inflamatória depois da inseminação, Parlevliet *et al.* (1997) não encontraram diferença na concentração de PMNs 24 horas após inseminação com sêmen resfriado ou após infusão com plasma seminal.

Bischof *et al.* (1994) estudaram a influência imunológica e fisiológica do plasma seminal no ambiente uterino e em linfonodos, tanto em porcas cobertas por porco vasectomizado, como em porcas não cobertas. A cobertura com porco vasectomizado induziu uma resposta inflamatória aguda transitória no endométrio, resultando em mudanças na presença e na distribuição de leucócitos. Este fato sugere que o plasma seminal depositado no útero representa o estímulo fisiológico e imunológico primário para o início de uma resposta inflamatória pós-cobertura, envolvendo mudanças dinâmicas no tecido e nos componentes celulares uterinos. Tal estímulo pode ser útil na preparação do útero para a implantação e contribuir para o sucesso da gestação.

Um estudo sobre a reação inflamatória no útero de porcas após inseminação com espermatozóides (5×10^9) diluídos em plasma seminal ou em PBS (solução salina fosfatada tamponada), ou infusões de plasma seminal ou de PBS (100 ml), demonstrou que, embora existissem PMNs no útero por até 36 horas após os tratamentos, a magnitude e o tempo de limpeza foram altamente dependentes da presença de plasma seminal (Rozeboom *et al.*, 1999).

Rozeboom *et al.* (2000), a fim de estudarem o efeito da inflamação uterina na fertilidade, provocaram uma reação inflamatória no útero de porcas, através da infusão de espermatozóides mortos ou de lipopolissacarídeos bacterianos. Após esta infusão, as porcas foram

inseminadas com doses contendo 3×10^9 espermatozóides diluídos em plasma seminal, ou em diluente enriquecido com estrógenos, que facilitariam o transporte espermático. Os autores verificaram taxas de concepção maiores nas fêmeas que receberam espermatozóides diluídos em plasma seminal, demonstrando que a fertilidade de uma segunda inseminação pode ser prejudicada quando o sêmen é depositado num ambiente uterino inflamado criado por uma inseminação prévia, sendo este efeito diminuído pela inclusão de plasma seminal na inseminação subsequente.

Em estudo semelhante, Troedsson *et al.* (2002) induziram uma reação inflamatória em éguas através da infusão de espermatozóides mortos ou de diluente de sêmen, inseminando as éguas 12 horas após o estabelecimento da inflamação com espermatozóides diluídos em plasma seminal ou em diluente. A taxa de prenhez foi superior com os espermatozóides diluídos em plasma seminal (17/22), comparada com a resultante da diluição dos espermatozóides em diluente (1/22), sugerindo que o plasma seminal tenha restabelecido a fertilidade.

2.4 DILUENTES

Não é possível preservar o sêmen por muito tempo sem o uso de um diluente. Embora o resfriamento do sêmen eqüino permita aumentar a longevidade da motilidade espermática, através da redução da atividade metabólica, o emprego de apenas este processo é ineficaz.

A utilização de um diluente adequado é essencial para a proteção do espermatozóide eqüino durante sua estocagem (Batellier *et al.*, 1997). Os diluentes prolongam a vida dos espermatozóides, estabilizando os sistemas enzimáticos e mantendo a integridade da membrana. Além disso, protegem o espermatozóide de condições ambientais desfavoráveis, como choque térmico, dos efeitos prejudiciais do plasma seminal e de produtos tóxicos produzidos pelo espermatozóide, prevenindo o crescimento de microorganismos, aumentando o volume a ser inseminado e melhorando a motilidade espermática (Picket & Amann, 1987). Os diluentes também são

utilizados para aumentar a viabilidade do sêmen de garanhões subfêrteis (Blanchard *et al.*, 1987). A escolha do diluente deve ser feita com base no intervalo entre a coleta e a inseminação (Sieme *et al.*, 1997) e também nas características individuais do animal, pois nenhum diluente é ideal para todos os garanhões (Province *et al.*, 1984).

Os diluentes devem ter pH e pressão osmótica similares aos do sêmen (Pickett & Amann, 1987). Como a osmolalidade do fluido seminal é de aproximadamente 300 mOsmol/kg (Pickett *et al.*, 1976), o diluente deve ter osmolalidade entre 300 e 400 mOsmol/kg, considerando-se ideal 350 mOsmol/kg (Varner *et al.*, 1991). O pH deve variar entre 6,7 e 7,2, sem interferir na viabilidade espermática durante o armazenamento (Brinsko & Varner, 1992).

Um dos diluentes mais utilizados para sêmen eqüino é o leite (Ebertus, 1963). O efeito do leite, inativado ou não, como diluente foi testado por vários autores (Mattos, 1995; Lagares *et al.*, 2000; Keller *et al.*, 2001), que observaram não existir diferença significativa entre a fertilidade do sêmen diluído em leite desnatado por 24 h e a do sêmen diluído em leite desnatado e utilizado até uma hora após a coleta.

Bedford *et al.* (1995), ao compararem a motilidade e a taxa de recuperação embrionária após inseminação com sêmen conservado a +5° C em leite desnatado, em leite desnatado adicionado de 4% de gema de ovo e em leite desnatado com 4 % de glicerol, verificaram taxa de recuperação embrionária superior quando foi utilizado apenas leite desnatado. Em contrapartida, a motilidade progressiva foi superior nas amostras diluídas com leite desnatado mais gema de ovo do que em leite desnatado mais glicerol, ou somente leite desnatado.

Schmitt (2002), estudando a influência do leite desnatado e do leite desnatado-glicose na motilidade, na funcionalidade e na integridade da membrana plasmática de espermatozóides eqüinos resfriados por até 72 horas, verificou que essas características foram melhor preservadas em leite desnatado do que em leite desnatado-glicose.

Antimicrobianos podem ser adicionados ao sêmen com o objetivo de eliminar bactérias ou retardar o seu crescimento, diminuindo a possibilidade de doenças venéreas ou a indução de endometrites bacterianas

(Pickett *et al.*, 1987). A adição de antimicrobianos, no entanto, poderia causar efeitos negativos na motilidade espermática. Vieira *et al.* (2002), estudando o efeito da adição de antimicrobianos ao diluente de sêmen sobre alguns parâmetros espermáticos, observaram maior motilidade progressiva e total no leite desnatado e no leite desnatado-gentamicina-penicilina, em comparação com leite desnatado-gentamicina, leite desnatado-amicacina e leite desnatado-amicacina-penicilina.

O grau de diluição é extremamente importante na preservação do sêmen resfriado. Uma proporção sêmen:diluente de, pelo menos, 1:3, otimiza a motilidade espermática quando a concentração final atinge 25 a 50×10^6 espermatozoides/ml (Jasko *et al.*, 1991; Varner *et al.*, 1987).

Vários trabalhos descreveram a importância dos diluentes de sêmen na resposta inflamatória do útero de éguas e de fêmeas de outras espécies (Kotilainen *et al.*, 1994; Rozeboom *et al.*, 1999; Quetin, 2001). Kotilainen *et al.* (1994) verificaram que, após a diluição de sêmen congelado equino com diluente à base de leite desnatado, a magnitude da reação inflamatória foi grandemente reduzida, enquanto que a infusão de apenas leite desnatado causou uma resposta inflamatória semelhante à observada após monta natural ou inseminação com sêmen fresco diluído. Um maior número de PMNs foi coletado do útero de porcas inseminadas, em comparação com porcas que receberam infusão de diluente. O pico da resposta inflamatória, após a infusão de diluente, foi atingido às seis horas, declinando em torno das 12 horas (Rozeboom *et al.*, 1999).

Para determinar a duração da resposta inflamatória em éguas, Quetin (2001) realizou biópsias endometriais seis e 48 horas após a infusão de espermatozoides, de plasma seminal, de diluente (INRA 82), de NaCl (0,9%) e após inseminação com $0,3 \times 10^6$ espermatozoides móveis. Foi verificado maior número de PMNs nas éguas que receberam infusão de espermatozoides, de plasma seminal, ou inseminação, sendo que o diluente à base de leite causou uma resposta inflamatória menor, mas foi o menos eficaz na redução da concentração de PMNs.

2.5 MECANISMOS DE DEFESA UTERINA

As éguas podem apresentar inflamações uterinas pós-cobertura, pós-inseminação, pós-parto, ou após manipulação intra-uterina. Éguas normais eliminam as bactérias e os restos da inflamação rapidamente. Algumas éguas, no entanto, não são capazes de fazê-lo. O útero dispõe de mecanismos de defesa, físicos e celulares, para promover uma rápida eliminação dos agentes causais da inflamação (Hughes & Loy, 1969; Peterson *et al.*, 1969). Os mecanismos físicos são constituídos pelas barreiras físicas e pela limpeza mecânica, enquanto os celulares se referem à resposta imunológica local.

Estudos experimentais envolvendo imunoglobulinas, opsoninas, quimiotaxia e migração de neutrófilos e fagocitose não forneceram dados suficientes para explicar a susceptibilidade às infecções uterinas. As diferenças entre éguas susceptíveis e resistentes são melhor explicadas por fatores envolvendo limpeza uterina, como a dilatação da cérvice, contratilidade miometrial e drenagem linfática (Katila, 1996).

2.5.1 Barreiras Físicas

As barreiras físicas são constituídas pela vulva, vestíbulo e cérvice, que impedem a entrada de ar, material fecal e urina no útero. Os defeitos na conformação do períneo interferem nas barreiras que separam o ambiente uterino do meio exterior (Caslick, 1937), ocasionando pneumovagina e expondo o útero a agentes irritantes e contaminantes e favorecendo o estabelecimento de infecção (Pascoe, 1979). Além disso, aderências e lacerações de cérvice dificultam a limpeza mecânica do útero durante o estro, podendo causar acúmulo excessivo de líquido durante o diestro e impedindo o fechamento adequado da cérvice, o que impede a manutenção da prenhez.

2.5.2 Limpeza mecânica

A eficiência na limpeza do útero é influenciada por fatores como idade, número de partos e particularidades anatômicas do trato reprodutivo (Evans *et al.*, 1987).

O grau de relaxamento da cérvix é importante na limpeza mecânica do útero (Evans *et al.*, 1986; LeBlanc *et al.*, 1994). Durante o estro, os altos níveis de estrógenos provocam a abertura da cérvix, o aumento da contratilidade miometrial e maior produção de muco pelas glândulas endometriais, facilitando a remoção de partículas da luz uterina (Le Blanc *et al.*, 1991). De acordo com Leblanc *et al.* (1995), o sistema linfático pode ser importante na remoção de partículas e resíduos inflamatórios que permanecem no útero após o fechamento da cérvix.

2.5.3 Mecanismos celulares e imunológicos

Uma importante primeira linha de defesa, dentro do útero da égua, é a fagocitose das bactérias pelos neutrófilos (Hughes e Loy, 1969; Peterson *et al.*, 1969). As células fagocíticas migram para o interior do útero cerca de 30 minutos após a contaminação (Pycock & Allen, 1988). Imunoglobulinas, IgG, IgT, IgA e IgM, foram encontradas nas secreções uterinas de éguas (Kenney & Khaleel, 1975), sendo observadas concentrações mais altas de imunoglobulinas nas secreções uterinas do que no soro, o que demonstra a produção de imunoglobulinas pelo endométrio (Liu *et al.*, 1981; Widders *et al.*, 1984).

2.6 RESPOSTA INFLAMATÓRIA PÓS-COBERTURA OU PÓS-INSEMINAÇÃO

A introdução de espermatozoides na genitália da fêmea produz uma forte resposta neutrofílica em várias espécies animais (Cohen, 1984), inclusive em éguas (Kotilainen *et al.*, 1994). O propósito dessa inflamação é limpar o útero do excesso de espermatozoides, dos espermatozoides

defeituosos ou mortos e de outros agentes contaminantes (Troedsson, 1999).

Espermatozóides eqüinos, tanto *in vivo* como *in vitro*, são capazes de induzir quimiotaxia de PMNs através da ativação do complemento, sendo a atividade do complemento previamente identificada no útero da égua (Asbury *et al.*, 1982; Watson *et al.*, 1987; Troedsson *et al.*, 1993). Estudos com suínos concordam com esta idéia, mas sugerem, também, que os componentes do sêmen, espermatozóides e plasma seminal, possuem diferente importância na iniciação, na supressão da migração neutrofílica e na limpeza uterina (Rozeboom *et al.*, 1999). Rozeboom *et al.* (2000) observaram que o plasma seminal de porco não foi quimiotático para PMN, o que demonstra que o espermatozóide possui uma importância ativa no início da endometrite pós-cobertura, ou seja, o plasma seminal parece suprimir a migração de PMNs ao útero após a inseminação e facilita a resolução da inflamação.

A fim de evitar a ação de anticorpos, ou a resposta imune celular contra os espermatozóides no trato reprodutivo da fêmea, componentes do sistema imunológico, sem memória específica, precisam atuar na limpeza uterina do excesso de sêmen e contaminantes introduzidos no útero no momento da cobertura. Os neutrófilos podem responder rapidamente a um sinal quimiotático do útero (Pycock & Allen, 1990) e seu influxo ao lúmen uterino resulta na fagocitose de espermatozóides e bactérias e na liberação de $\text{PGF}_2\alpha$, a qual causa as contrações miométriais necessárias para a limpeza uterina através da cérvix ou dos vasos linfáticos (Troedsson *et al.*, 1993; Troedsson, 1999). Além disso, a liberação endógena de ocitocina, em resposta à cobertura e à interação social com o garanhão, pode ser um importante mecanismo de limpeza uterina após a cobertura (Alexander *et al.*, 1995).

A resposta neutrofílica é muito rápida. Em mulheres, neutrófilos são coletados da cérvix 15 minutos após a relação sexual (Cohen, 1984). Katila (1995), objetivando determinar o início e a duração da reação inflamatória em éguas, após a inseminação com dose entre 500 e 800×10^6 espermatozóides, encontrou os primeiros neutrófilos 30 minutos após a IA, sendo que os níveis mais altos foram observados entre quatro e 24 horas,

com ponto máximo às oito horas. Bergmann & de Kruiff (1997) também observaram uma maior resposta oito horas após a infusão de 20 ml de diluente, gema de ovo, leite desnatado, ou NaCl a 0,9%, ou após a inseminação com sêmen fresco ou sêmen fresco diluído. Hughes & Loy (1969) e Peterson *et al.* (1969) demonstraram que a endometrite pós-cobertura em eqüinos é transitória e tem resolução entre 48 e 72 horas. Rozeboom *et al.* (1998) caracterizaram a resposta inflamatória em porcas, após a inseminação, e verificaram que a infiltração era constituída predominantemente por PMNs (92-99%). Matthijs *et al.* (2003) estudaram o recrutamento de leucócitos e a fagocitose dos espermatozóides depois da inseminação, em porcas múltiparas inseminadas com várias concentrações de espermatozóides e plasma seminal, ou diferentes volumes inseminados. Para tal, coletaram material de porcas abatidas quatro horas após inseminação, através de refluxo da vulva ou de lavagem do trato genital com PBS, verificando que o recrutamento leucocitário não foi dependente da presença do plasma seminal ou de espermatozóides.

Pycock & Allen (1989) verificaram presença de neutrófilos 30 minutos após a inoculação de *Streptococcus zooepidemicus* no útero de éguas. 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 espermatozóides mortos. Katila (1997) não verificou diferença na resposta inflamatória após inseminação com 1×10^9 espermatozóides vivos ou mortos. Reilas (2001) sugeriu que as taxas de prenhez mais baixas, após a inseminação com sêmen congelado, foram causadas pela maior reação inflamatória, já que a inseminação com sêmen congelado é realizada perto da ovulação e que o período de tempo antes do fechamento da cérvix é curto, o que impediria que éguas susceptíveis eliminassem o material inflamatório em tempo hábil.

Os leucócitos parecem aptos a distinguir espermatozóides frescos e capazes de fertilizar, daqueles senis, que constituem um problema para o útero. Isto foi demonstrado em coelhas, após um estudo com duas coberturas, no qual foi observado que os espermatozóides frescos passavam por áreas com grande infiltração neutrofílica sem sofrer danos (Taylor, 1982).

Kotilainen *et al.*, (1994) observaram que a reação inflamatória é maior quando o sêmen está mais concentrado, devido ao efeito irritante do espermatozóide no útero. Da mesma forma, um volume pequeno resultaria em prejuízo na drenagem mecânica, enquanto volumes maiores (100 ml) provocariam maior refluxo de espermatozoides através da cérvix. Por outro lado, Nikolakopoulos & Watson (2000) detectaram números maiores de PMNs 48 horas após a infusão de 40 ml PBS ou de 40 ml de sêmen diluído contendo apenas 2×10^9 espermatozoides do que após infusão de 500 ml PBS ou de 40 ml PBS contendo 20×10^9 espermatozoides.

2.7 TRANSPORTE ESPERMÁTICO

A distribuição dos espermatozoides e sua função na fêmea são influenciadas pelo local de deposição do sêmen, pelas características seminais, pela anatomia do trato genital feminino e pelo micro-ambiente do lúmen. A duração do transporte espermático depende do intervalo entre a inseminação e a ovulação e da meia-vida funcional do espermatozóide no trato genital da fêmea (Scott, 2000). As contrações musculares do trato reprodutivo, os movimentos ciliares, a corrente de fluido e a atividade flagelar dos espermatozoides constituem os mecanismos primários do transporte espermático (Hunter, 1981).

Mann *et al.* (1956) observaram a presença de componentes seminais no oviduto de éguas uma hora após a inseminação, enquanto Bader (1982) verificou a presença de espermatozoides em ovidutos de éguas inseminadas duas horas após a ovulação. Neste caso, o transporte espermático parece estar completo em torno de seis horas após a inseminação artificial. Quando é realizada lavagem uterina com produto espermicida duas horas após a inseminação, a taxa de prenhez diminui, em comparação com o grupo controle, o que indica número insuficiente de espermatozoides no oviduto neste momento (Brinsko *et al.*, 1990). Em vacas, foi observado que uma população de espermatozoides suficiente para uma máxima fertilização está estabelecida nos ovidutos uma e duas horas após a cobertura, sendo protegida da invasão PMN que aparece neste momento (Hunter, 1981). Em

ovelhas de diversos estados reprodutivos, foi observada presença de espermatozóides no oviduto 30 minutos após a inseminação, sendo o número maior observado após 4 horas (Marinov & Petkov, 1983). Lane *et al.* (1993) observaram um número maior de espermatozóides no istmo e na ampola de ovelhas 22 horas após a inseminação, comparado com duas horas. Em porcas, espermatozóides com capacidade fertilizante chegam aos ovidutos em menos de uma hora (Hawk, 1983). Viring & Einarsson (1981) não observaram variação no número de espermatozóides coletados da junção útero-tubárica (JUT) de porcas inseminadas em relação ao tempo (doze horas).

O transporte espermático depende da proximidade da ovulação. Estudando a influência da inseminação pré ou pós-ovulação na distribuição dos espermatozóides no oviduto, Kaeoket *et al.* (2002) observaram espermatozóides no oviduto de todas as porcas inseminadas antes da ovulação, e em apenas uma das inseminadas após. Em coelhas, doze horas após inseminação intravaginal sem indução da ovulação, poucos espermatozóides foram observados na ampola; no entanto, quando a ovulação foi induzida, a distribuição dos espermatozóides no trato reprodutivo da fêmea depois da inseminação não diferiu da observada após monta natural (Overstreet & Cooper, 1979).

É importante que o transporte espermático no útero da égua seja rápido, pois, conforme previamente descrito, o útero, após a cobertura, se torna um ambiente hostil para os espermatozóides, que devem alcançar o oviduto em até quatro horas, a fim de sobreviver e fertilizar o óocito (Troedsson *et al.*, 1998).

Espermatozóides podem persistir por seis, 24 ou 48 horas após a inseminação ou a monta natural no útero de éguas (Kotilainen *et al.*, 1994; Katila, 1995; Watson & Nikolakopoulos, 1996), 12 h no de porcas (Viring & Einarsson, 1981), 24 h no de ruminantes (Mattner, 1968), enquanto que, em mulheres, espermatozóides férteis foram observados no muco cervical até 80 horas após a cópula (Gould *et al.*, 1984). Os espermatozóides são removidos do trato genital da fêmea por fagocitose (Austin, 1957; Merkt *et al.*, 1982; Kotilainen, *et al.*, 1994) ou por limpeza física (LeBlanc *et al.*, 1994). Os espermatozóides são armazenados no istmo do oviduto antes da

fertilização em muitas espécies (Hunter 1981; Hunter *et al.*, 1991; Hunter & Nichol, 1983; Smith & Yanagimachi 1991; Overstreet *et al.* 1987; Suarez, 1987). Já o espermatozóide do garanhão pode ser armazenado no trato genital da égua por muitos dias, permitindo que coberturas férteis sejam realizadas vários dias antes da ovulação (Day, 1942). Estudos *in vitro* desenvolvidos por Thomas *et al.* (1994) demonstraram a existência de um reservatório de espermatozóides no istmo do oviduto da égua. Viring & Einarsson (1981), ao examinarem o trato reprodutivo de porcas abatidas após a inseminação, verificaram que o número de espermatozóides encontrados na junção útero-tubárica não variou no decorrer do tempo.

O transporte espermático é afetado tanto por fatores inerentes ao garanhão, quanto inerentes à égua, estando prejudicado em éguas com contratilidade miometrial diminuída, em éguas inseminadas com sêmen de garanhões subférteis e em éguas inseminadas com sêmen congelado (Troedsson *et al.*, 1998).

3 ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Transporte espermático e resposta inflamatória uterina na égua após inseminação com diferentes concentrações de espermatozóides

Sperm transport and uterine inflammatory response in the mare after insemination with different sperm concentrations

S.M. Fiala^a, C.A. Pimentel^b, A.L.G. Mattos^c, R.M. Gregory^a, R.C. Mattos^a

^aReprolab – UFRGS Caixa Postal 15039, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil

^bFaculdade de Veterinária – UFPel, Pelotas, RS, Brasil

^cCurso de Medicina Veterinária, ULBRA, Canoas, Brasil

RESUMO

Normalmente, após a cobertura ou a inseminação artificial de éguas, ocorre uma endometrite aguda transitória em resposta à presença de sêmen e bactérias no útero. O objetivo deste estudo foi verificar se o transporte espermático e a intensidade da reação inflamatória uterina, 2h, 4h ou 24h após a inseminação com sêmen resfriado, são influenciados pela concentração espermática na dose inseminante. Para tal, foram utilizadas 192 éguas em cio, com folículo dominante ≥ 35 mm, sem crescimento bacteriano e livres de PMNs aos exames uterinos complementares. As éguas foram distribuídas aleatoriamente em grupos e inseminadas com 20 ml contendo 100×10^6 (n=30), 500×10^6 (n=27) ou 1000×10^6 (n=31) espermatozóides diluídos em solução de 3 ml de plasma seminal e 17 ml de leite desnatado, refrigerado e armazenado por 18 a 22 horas, ou infundidas com 20 ml de plasma seminal (n=33), ou com 20 ml de leite desnatado (n=38). As éguas foram abatidas duas, quatro ou 24h após as inseminações ou infusões. O grupo controle (n=33) não recebeu nenhum tratamento. Os ovidutos foram separados do útero, sendo útero e ovidutos lavados separadamente com PBS. Uma amostra do lavado de cada oviduto foi

examinada para contagem de espermatozoides e uma amostra de cada lavado uterino foi utilizada para contagem de leucócitos. Após as lavagens, foi retirada uma amostra de endométrio para realização de exame histopatológico. As éguas inseminadas e infundidas apresentaram reação inflamatória significativamente maior que as éguas do grupo controle, no decorrer das 24 horas. A reação inflamatória foi significativamente maior nas éguas inseminadas que nas infundidas. A reação inflamatória apresentou correlação com a concentração espermática. O número de éguas apresentando espermatozoides nos ovidutos foi similar nos diferentes grupos inseminados. Concluiu-se que componentes da dose inseminante provocam uma resposta inflamatória, sendo esta mais severa e de resolução mais rápida, quanto maior for a concentração espermática. Por outro lado, até as quatro horas pós-inseminação, o transporte espermático independe da concentração espermática utilizada.

ABSTRACT

Sperm transport and uterine inflammatory response in the mare after insemination with different sperm concentrations

A transitory and acute endometritis normally occurs, after natural breeding or artificial insemination (AI), as an inflammatory reaction against semen and bacteria. The aim of this study was to detect if either the sperm transport, or the intensity of inflammatory reaction 2, 4 and 24 hours after AI with cooled semen, depends on the sperm count in the insemination dose. One hundred and ninety two mares in estrus with dominant follicle ≥ 35 mm, free of bacterial growth and without PMNs in uterine smears were used. Mares were randomly assigned to groups and received a 20 ml insemination dose with 100×10^6 (n=30), 500×10^6 (n=27) or 1000×10^6 (n=31) spermatozoa diluted in 3ml seminal plasma and 17ml skim milk, cooled and stored for 18 to 22 h, or a 20 ml seminal plasma (n=33), or a 20 ml skim milk (n=38) uterine infusion, being slaughtered 2, 4 or 24 h later. The control group (n=33) received no treatment. The oviducts were dissected from the uterus and both, uterus and oviducts, were flushed with PBS. A sample from each tubal flush was examined for sperm count and a sample of each uterine flush was examined for leukocytes search and count. After flushes, an endometrial sample was collected for histopathological examination. Inseminated and infused mares showed a significantly greater inflammatory reaction than control group, throughout 24 h. The inflammatory reaction was correlated with sperm count ($r=0,389$). The number of mares showing sperm in the oviducts was not different among distinct insemination groups. It was concluded that compounds in the insemination dose induce uterine inflammatory response, that is as more intense and faster, as sperm count increases. On the other hand, during the first four hours after insemination, the sperm transport is not affected by concentration.

INTRODUÇÃO

Após a cobertura ou a inseminação artificial de éguas, ocorre, normalmente, uma endometrite aguda transitória (Kotilainen *et al.*, 1994; Troedsson *et al.*, 1995b). Este é um processo fisiológico que objetiva a remoção do excesso de espermatozóides, de plasma seminal e de contaminantes antes da entrada do embrião no útero (Troedsson, 1997).

O sêmen tem um papel importante na regulação da inflamação pós-cobertura em éguas (Troedsson, 1995; Troedsson *et al.*, 1995a; 1995b; Troedsson *et al.*, 1998). Segundo Troedsson *et al.*, (1995a) os espermatozóides induzem a quimiotaxia de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) da circulação sangüínea para o lúmen uterino, através da ativação do sistema do complemento. Os primeiros neutrófilos já se fazem presentes no lúmen uterino trinta minutos após a inseminação, atingindo os níveis mais elevados entre oito e 24 horas após a entrada do sêmen (Katila 1995). Como logo após a cobertura o útero se torna um ambiente hostil para os espermatozóides, é importante que estes alcancem o oviduto rapidamente, em até quatro horas, a fim de sobreviver e, conseqüentemente, fertilizar o oócito (Troedsson *et al.*, 1998).

Diluentes são fundamentais na preservação do sêmen, a fim de prolongar a sobrevivência dos espermatozóides e protegê-los contra condições ambientais desfavoráveis (Pickett & Amann, 1987). Um dos diluentes mais utilizados para sêmen eqüino é o leite (Ebertus, 1963).

O volume inseminado e a concentração espermática aumentam a intensidade da resposta inflamatória uterina (Kotilainen *et al.*, 1994). O plasma seminal, parece inibir a ativação do sistema do complemento e a quimiotaxia dos PMNs, suprimindo temporariamente a fagocitose dos espermatozóides pelos PMNs e possibilitando que estes atinjam o oviduto antes da ocorrência da resposta inflamatória (Troedsson *et al.*, 1998; Troedsson *et al.*, 1999).

A presença de componentes seminais foi observada no oviduto de éguas uma hora após a cópula (Mann *et al.*, 1956), sendo a presença de espermatozóides nas trompas detectada duas horas após a inseminação artificial (IA) com sêmen fresco ou congelado (Bader, 1982). Um grande

número de espermatozoides no oviduto foi observado quatro horas após a inseminação (Bader & Krause, 1980), sendo que, aparentemente, o transporte espermático está completo em torno de seis horas (Bader, 1982).

O presente trabalho objetivou verificar se o transporte espermático e a intensidade da reação inflamatória uterina, 2h, 4h ou 24h após a inseminação com sêmen resfriado, são influenciados pela concentração espermática utilizada na dose inseminante.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais - Foram utilizadas 192 éguas em estro, destinadas ao abate, apresentando folículo dominante de tamanho igual ou superior a 35 mm, ausência de neutrófilos no exame citológico e sem crescimento bacteriano uterino (Mattos *et al.*, 1984), e com tônus uterino e abertura de cérvix condizentes com estro. Para a coleta do sêmen e do plasma seminal, foram utilizados dois ganhões de fertilidade comprovada.

Plasma Seminal – Para a obtenção de plasma seminal (PI), o sêmen foi centrifugado logo após a coleta através de vagina artificial, a 1500 x g durante 25 minutos. O sobrenadante foi retirado, examinado e, caso não fossem detectados espermatozoides, armazenado em sacos plásticos, em alíquotas de 3 ml ou 20 ml, a -20° C por, no máximo, 10 dias, para uso posterior, evitando, desta forma, desnaturação de proteínas.

Resfriamento do Sêmen – Logo após a coleta através de vagina artificial, o sêmen foi diluído em EDTA-glicose² (1+1) e centrifugado a 700x g, durante 5 minutos. Após a retirada do sobrenadante, a dose foi adequada às concentrações totais finais de 100×10^6 , 500×10^6 e 1000×10^6 espermatozoides, em 20 ml de solução de 3 ml de plasma seminal previamente preparado (15%) e 17 ml de leite desnatado. O diluente foi preparado utilizando leite desnatado UHT³ (LD). O sêmen preparado foi acondicionado em sacos plásticos e resfriado em Equitainer⁴ a 5° C, por 18 a 22 horas, até sua utilização.

² Merck 1 Minitüb GmbH Alemanha

³ Leite UHT Elege – Elege Alimentos Brasil

⁴ Equitainer Minitüb GmbH Alemanha

Protocolo - As éguas selecionadas receberam aleatoriamente um dos seguintes tratamentos e foram abatidas 2h, 4h ou 24h após a inseminação: **100**: IA na dose de 100×10^6 espermatozoides (2h: n=9; 4h: n=10; 24h: n=11); **500**: IA na dose de 500×10^6 espermatozoides (2h: n=10; 4h: n=10; 24h: n=7); **1000**: IA na dose de 1000×10^6 espermatozoides (2h: n=10; 4h: n=12; 24h: n=9); **PI**: Infusão de 20 ml de plasma seminal (2h: n=13; 4h: n=10; 24h: n=10); **LD**: Infusão de 20 ml de leite desnatado (2h: n=15; 4h: n=11; 24h: n=12); **Cont** (Controle): sem infusão ou inseminação (n=33).

A escolha do período após de tempo entre a inseminação e o abate foi feita em função do horário de abate e funcionamento do frigorífico.

Até 30 minutos após o abate, o útero foi separado dos ovidutos e da junção útero-tubárica e lavado 3 vezes com 50 ml de PBS (solução salina fosfatada tamponada), através de catéter de Foley introduzido pela extremidade do corno direito, estando a abertura da cérvix e extremidade distal do corno esquerdo obstruídas por pinças. O fluido coletado em três lavagens foi reservado e, ao final, uma alíquota de cada amostra de líquido foi examinada em microscópio óptico, sendo feita a contagem dos leucócitos através de câmara de Neubauer.

O oviduto ipsilateral ao folículo dominante foi lavado com 10 ml de PBS, a partir do infundíbulo, e uma amostra do lavado foi colocada em câmara de Neubauer para a contagem de espermatozoides.

Após a lavagem, o útero foi aberto, com o auxílio de uma tesoura, e um fragmento do endométrio foi coletado para exame histológico, colocado em formalina tamponada a 4% e, posteriormente, processado e corado com hematoxilina-eosina (HE). Por ocasião da leitura das lâminas, foi verificado o grau de fibrose (0-4), sendo considerado como 0: inexistência de alterações degenerativas; 1: menos de 5% do epitélio glandular comprometido; 2: entre 6 e 20% do epitélio glandular comprometido; 3: entre 21 e 50% do epitélio glandular comprometido; 4: mais de 51% do epitélio glandular comprometido (Pimentel *et al.*, 1989), sendo realizada a contagem de neutrófilos e linfócitos em 5 campos no estrato compacto e 5 no estrato esponjoso.

Delineamento experimental - Os dados foram transformados em logaritmo, sendo realizada análise de variância, teste T, correlação, regressão linear e Qui-quadrado, utilizando LSD (Least Significant Difference) para comparação de médias. Foram consideradas variáveis independentes tratamento e hora e, como dependentes, número de leucócitos no lavado, número de células inflamatórias no estrato compacto e no estrato esponjoso, número de espermatozóides e fibrose.

RESULTADOS

O número de leucócitos após as lavagens é observado na Figura1.

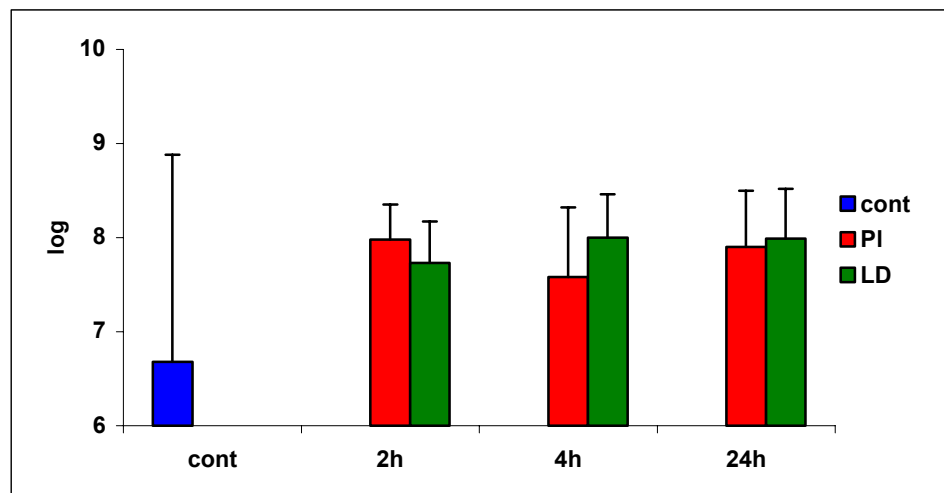


Figura1 - Número de leucócitos uterinos verificados, após lavagem uterina, no grupo Controle (Cont) e nos diferentes tempos após infusão de Plasma Seminal (PI) e Leite Desnatado (LD)

Trinta, das 33 éguas pertencentes ao grupo controle, apresentaram leucócitos após a lavagem. O número médio de leucócitos uterinos observados nas 33 éguas do grupo controle, após as três lavagens com PBS, foi 39×10^6 .

As éguas que receberam infusão de plasma seminal apresentaram uma reação inflamatória semelhante ($p > 0,139$) duas horas (137×10^6

leucócitos), quatro horas (104×10^6 leucócitos) e 24 horas após a infusão (138×10^6 leucócitos). Entretanto, neste grupo de animais, observou-se um maior número de leucócitos no lúmen uterino às duas horas ($p=0,002$), quatro horas ($p=0,05$) e 24 horas ($p=0,006$) do que nas éguas do grupo controle.

As éguas submetidas à infusão com leite desnatado se comportaram de maneira semelhante, não se observando diferença significativa ($p>0,148$) na reação inflamatória causada pelo diluente no decorrer das horas. Duas horas após a infusão, foram coletados 83×10^6 leucócitos, nas quatro horas 156×10^6 leucócitos, e nas 24 horas 169×10^6 leucócitos. Em todos os tempos avaliados, a infusão com leite desnatado provocou uma maior ($p<0,021$) inflamação do que a observada no grupo controle.

O número de leucócitos nas éguas infundidas com plasma seminal foi semelhante ao observado nas éguas do grupo leite desnatado, às duas horas ($p=0,119$), quatro horas ($p=0,142$) e 24 horas ($p=0,734$).

Na figura 2 estão representados os valores médios de leucócitos observados no lúmen uterino, nos diferentes tempos, em éguas inseminadas com 100×10^6 , 500×10^6 e 1000×10^6 espermatozóides.

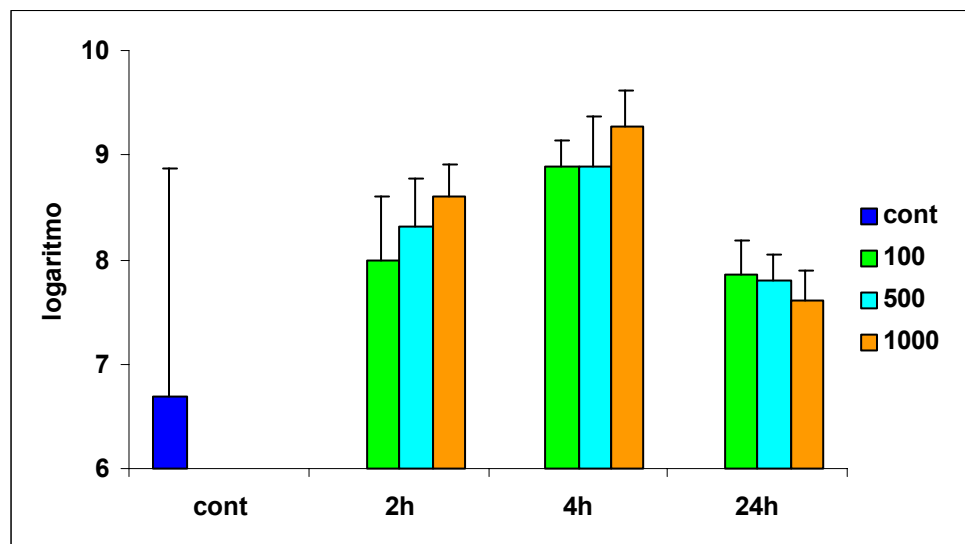


Figura2 - Número de leucócitos uterinos verificados após lavagem uterina, no grupo controle (Cont) e nos diferentes tempos após inseminação com 100×10^6 (100), 500×10^6 (500) e 1000×10^6 (1000) espermatozóides

Ao se analisar a Figura 2, observa-se que as éguas inseminadas apresentaram uma reação inflamatória significativamente maior ($p < 0,023$) do que as éguas do grupo controle, em todos os tempos avaliados. A concentração espermática provocou, em todos os tempos, um aumento significativo ($p < 0,001$) do número de leucócitos no lúmen uterino, explicado pelo coeficiente de determinação $r^2 = 0,1512$.

As éguas inseminadas com 100 milhões de espermatozóides apresentaram reação inflamatória superior ($p < 0,002$) quatro horas após a inseminação (908×10^6) do que duas horas (207×10^6) e 24 horas (94×10^6) após. Não se observaram diferenças significativas ($p = 0,555$) no número de leucócitos entre as duas e as 24 horas. As éguas inseminadas com 100 milhões não se diferenciaram ($p > 0,239$) em nenhum momento das inseminadas com 500 milhões, mas apresentaram reação inflamatória menor ($p < 0,002$) que as inseminadas com um bilhão, nas duas e nas quatro horas.

O número de leucócitos observado duas horas após a inseminação com 500 milhões (322×10^6) e com um bilhão de espermatozóides (503×10^6) foi significativamente menor ($p < 0,011$) que o observado quatro horas após (1308×10^6 e 2443×10^6 , respectivamente). Após 24 horas, o número de leucócitos diminuiu significativamente ($p < 0,001$) em relação ao observado às duas horas e às quatro horas, tanto nas éguas inseminadas com uma concentração espermática de 500 milhões (75×10^6), como nas éguas inseminadas com um bilhão (48×10^6). As éguas inseminadas com 500 milhões de espermatozóides apresentaram reação inflamatória menor ($p = 0,047$) que as do grupo um bilhão, nas quatro horas pós-inseminação.

As éguas infundidas com leite desnatado e com plasma seminal não se diferenciaram ($p > 0,275$), na resposta inflamatória, das inseminadas com 100 milhões de espermatozóides nas duas horas, mas apresentaram reação inflamatória inferior ($p < 0,001$) à observada nas éguas inseminadas com um bilhão de espermatozóides. As éguas inseminadas com 500 milhões apresentaram, nas duas horas, maior número de leucócitos ($p = 0,006$) do que o observado nas infundidas com leite desnatado, não se diferenciando das infundidas com plasma seminal ($p = 0,087$). A reação inflamatória provocada

nas éguas inseminadas foi significativamente superior ($p < 0,001$) àquela observada nas éguas infundidas com plasma seminal e com leite desnatado, nas quatro horas. Entretanto, nas 24 horas não se observaram diferenças significativas ($p > 0,06$) entre os tratamentos.

Na figura 3 está expresso o número médio de neutrófilos observado no exame histopatológico dos estratos compacto e esponjoso do endométrio das éguas abatidas, após os diferentes tratamentos.

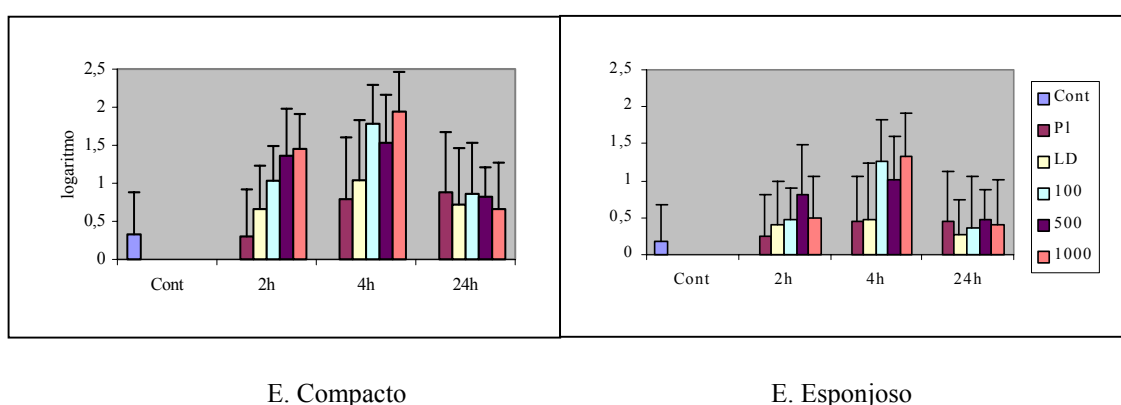


Figura3. Número de neutrófilos observado no exame histopatológico dos estratos compacto e esponjoso do endométrio de éguas do grupo Controle (Cont), nos diferentes tempos após infusão com Plasma Seminal (P1), Leite Desnatado (LD) e inseminação com 100×10^6 (100), 500×10^6 (500) e 1000×10^6 (1000) espermatozóides

Os resultados dos exames histopatológicos mostraram uma correlação positiva ($r=0,653$) entre o número médio de neutrófilos observado no estrato compacto e no estrato esponjoso.

Foram observados, em média, 7,18 neutrófilos no estrato compacto e 5,54 no estrato esponjoso no grupo controle, não havendo diferença ($p > 0,05$) em relação ao número de neutrófilos observado nos dois estratos nas éguas submetidas à infusão de plasma seminal nas duas, quatro e 24 horas.

Quatro horas após a infusão de diluente, verificou-se um maior número ($p=0,001$) de neutrófilos no estrato compacto, não havendo

diferença ($p>0,05$) nas duas ou nas 24 horas, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, no estrato esponjoso, não foi observada diferença ($p>0,05$) entre o grupo controle e o grupo infundido com diluente, em nenhum momento. Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$), em nenhum tempo, no número de neutrófilos no estrato compacto ou no estrato esponjoso, quando se comparou o grupo infundido com diluente e com plasma seminal.

A inseminação, com qualquer concentração, promoveu um aumento significativo ($p<0,001$) do número de neutrófilos no estrato compacto, em todos os tempos, em relação ao grupo controle, com exceção ($p=0,187$) da inseminação com um bilhão de espermatozoides, nas 24 horas. No estrato esponjoso observou-se que, duas horas após a inseminação, apenas o grupo 500 apresentou aumento significativo ($p=0,012$) do número de neutrófilos. Entretanto, nas quatro horas após a inseminação, independentemente da concentração, as éguas inseminadas apresentaram aumento ($p<0,001$) do número de neutrófilos, em relação ao controle. Nas 24 horas, o número de neutrófilos no estrato esponjoso foi semelhante ($p>0,116$) entre as éguas inseminadas e as do grupo controle. Não se observaram diferenças significativas ($p>0,118$) no número de neutrófilos no estrato esponjoso e no compacto no exame histopatológico das éguas inseminadas com diferentes concentrações de espermatozoides.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) no grau de fibrose entre as éguas, nos diferentes tempos. Observou-se uma correlação fraca entre grau de fibrose e presença de leucócitos no lúmen uterino ($r=0,169$), bem como entre grau de fibrose e número médio de neutrófilos nos estratos compacto ($r=0,191$) e esponjoso ($r=0,246$).

Na figura 4 está expresso o número médio de linfócitos nos estratos compacto e esponjoso observado no exame histopatológico do endométrio das éguas abatidas após os diferentes tratamentos.

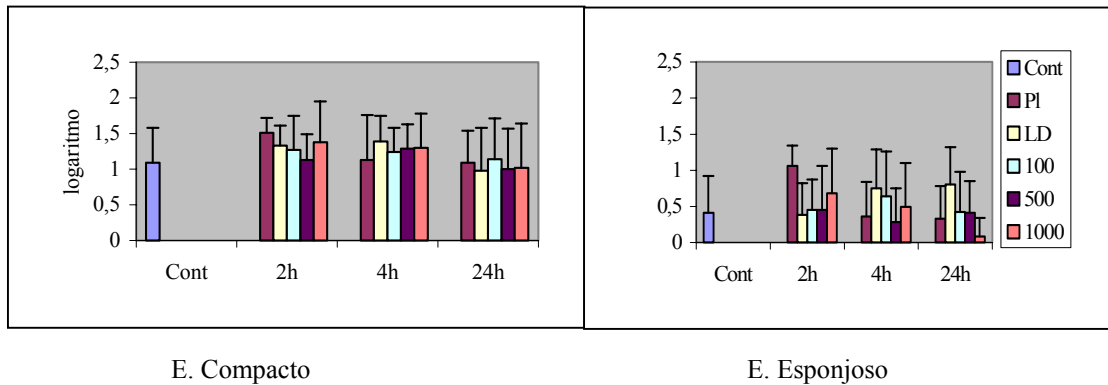


Figura 4 Número de linfócitos observado no exame histopatológico dos estratos compacto e esponjoso do endométrio de éguas do grupo Controle (Cont), nos diferentes tempos após infusão com Plasma Seminal (PI), Leite Desnatado (LD) e inseminação com 100×10^6 (100), 500×10^6 (500) e 1000×10^6 (1000) espermatozóides

Ao se analisar a Figura 4, observa-se que, no estrato compacto, apenas a infusão de plasma seminal, nas duas horas, e de leite desnatado, nas duas e quatro horas, provocaram aumento ($p < 0,046$) do número de linfócitos, em relação ao grupo controle. As éguas inseminadas não se diferenciaram ($p > 0,17$) do grupo controle em nenhum momento. No estrato esponjoso, assim como no estrato compacto, a infusão de plasma seminal aumentou ($p = 0,002$) o número de linfócitos, nas duas horas com relação ao grupo controle. Entretanto, o grupo leite só se diferenciou do grupo controle nas 24 horas ($p = 0,048$). Da mesma forma que no estrato compacto, as éguas inseminadas não apresentaram, em nenhum momento, número de linfócitos superior ($p > 0,246$) ao apresentado pelo grupo controle.

Na figura 5, observa-se o número de espermatozóides encontrados no oviduto e na junção útero-tubárica (JUT).

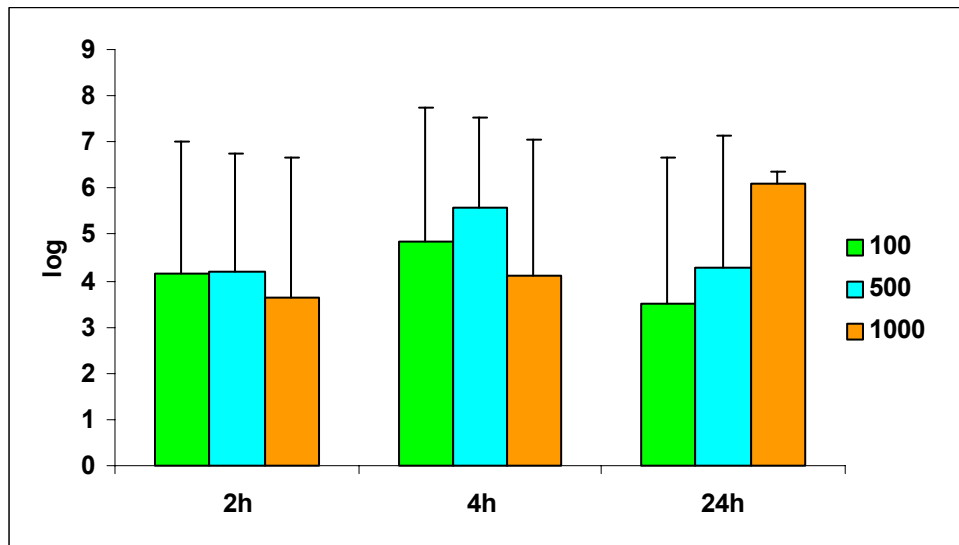


Figura5. Número de espermatozóides presentes no oviduto e na JUT após inseminação com 100×10^6 (100), 500×10^6 (500) e 1000×10^6 (1000) espermatozóides

Ao se analisar a Figura 5, observa-se que o número de células espermáticas no oviduto e JUT, nas éguas inseminadas com 100 ou com 500 milhões de espermatozóides não foi diferente ($p=0,199$) em função do tempo. Entretanto, as éguas inseminadas com um bilhão, apresentaram maior número ($p<0,015$) de espermatozóides nas trompas às 24 horas que às duas e às quatro horas.

Duas horas após a IA, não foi encontrada diferença ($p> 0,417$) no número de espermatozóides coletados do oviduto e na JUT, entre os tratamentos, independentemente da concentração espermática utilizada. Quatro horas após a inseminação, observou-se que as éguas inseminadas com 500 milhões de espermatozóides apresentavam maior número de espermatozóides no oviduto e na JUT, quando comparado com o obtido após inseminação com um bilhão de espermatozóides ($p=0,059$), mas semelhante ($p=0,479$) ao das éguas inseminadas com 100 milhões. Entretanto, nas 24 horas após a inseminação, observou-se que as éguas inseminadas com um bilhão de espermatozóides apresentavam maior número ($p=0,010$) de células espermáticas no oviduto e na JUT do que as

inseminadas com 100 milhões, mas número semelhante ($p=0,417$) às inseminadas com 500 milhões.

Na Tabela 1 observa-se a porcentagem de éguas em que foram encontrados espermatozóides no oviduto e na JUT.

Tabela1. Porcentagem de éguas que apresentavam espermatozóides no oviduto e na JUT após inseminação com 100×10^6 (100), 500×10^6 (500) e 1000×10^6 (1000) espermatozóides ($\chi^2 P=0,177$)

Dose inseminante	2h	4h	24h
100×10^6 espermatozóides	66,7	80	54,5
500×10^6 espermatozóides	70,0	90	71,4
1000×10^6 espermatozóides	54,5	66,7	100,0

Ao se analisar a Figura 6, não se encontra diferença significativa ($p=0,177$) entre os tratamentos e os tempos em relação ao número de éguas com e sem espermatozóides no oviduto e na JUT. Mais de 54% das éguas apresentaram presença de espermatozóides nas trompas nas duas horas. Já nas quatro horas, este percentual foi de 66% e nas 24 horas de 54%.

DISCUSSÃO

A presença de leucócitos no lúmen uterino de éguas é um indicativo de inflamação uterina (Knudsen, 1964). Entretanto, neste estudo, foi observada presença de células inflamatórias também nas éguas do grupo controle. Isto provavelmente se deve à realização de exame citológico prévio, com manipulação da cérvix, concordando com os achados de Williamson *et al.* (1987), que observaram neutrofilia transitória após a manipulação da cérvix e do útero. Em experimento efetuado por Kotilainen *et al.* (1994), não foram observadas células nos lavados uterinos do grupo controle. Entretanto, não foi realizada manipulação uterina prévia aos lavados. Por outro lado, Mattos *et al.* (1999), utilizando a mesma

técnica empregada neste trabalho, não detectaram presença de neutrófilos ao exame citológico, o que confirmaria os achados de Ball *et al.* (1988), em que a lavagem uterina permitiu uma melhor amostragem em exames citológicos e bacteriológicos.

Em todos os tratamentos utilizados neste experimento, o número de leucócitos obtido após as lavagens uterinas foi superior ($p < 0,05$) ao observado nas éguas do grupo controle, demonstrando que a infusão de plasma seminal, de diluente e de espermatozóides provoca uma resposta inflamatória. Houve diferença no padrão da resposta inflamatória entre os tratamentos, conforme o esperado, uma vez que os componentes da dose inseminante, espermatozóides, plasma seminal e diluente, influenciam, de diferentes maneiras, a característica e o grau da reação inflamatória (Sieme *et al.*, 1997).

A infusão de plasma seminal ou de leite promoveu um aumento do número de leucócitos no lúmen uterino a partir das duas horas, mantendo-se constante até as 24 horas, resultados de acordo com os observados por Kotilainen *et al.* (1994) e Quetin, (2001). Esta leucocitose poderia estar associada a glicoproteínas da família TGF-beta (Transforming Growth Factor), de peso molecular em torno de 25 Kda, presentes no plasma seminal humano e de diversas espécies animais e no leite (Robertson *et al.*, 2002). A TGF-beta, no plasma seminal, demonstrou ser o principal indutor da resposta inflamatória pós-cobertura. Embora sua presença não tenha sido relatada no equino (Mc Dowell *et al.*, 1996; Brandon *et al.*, 1999), Schmitt (2002) descreveu cinco bandas protéicas de peso molecular semelhante ao da TGF-beta, identificando somente três delas. Entretanto, a intensidade da reação inflamatória verificada nos estratos compacto e esponjoso foi menor do que a observada no lúmen uterino comparada com o controle. Provavelmente, o leite e o plasma seminal promoveram um menor estímulo das defesas do útero, impedindo a detecção de diferenças no exame histopatológico. Troedsson *et al.* (2000) observaram que o plasma seminal provocaria uma redução, *in vitro*, da quimiotaxia e da fagocitose dos neutrófilos através da supressão da opsonização dos espermatozóides (Damhs & Troedsson, 2002).

O aparecimento de PMNs em lavados uterinos, após a infusão do plasma seminal, não pode ser atribuído, no presente experimento, à presença de alguns espermatozóides no plasma (Kotilainen *et al.*, 1994), já que diversas amostras foram avaliadas quanto à presença de células espermáticas antes do congelamento.

A reação inflamatória provocada pelas inseminações com diferentes doses foi significativamente superior, nas quatro horas, do que a causada pelo plasma seminal e pelo leite. A reação inflamatória foi dependente do número total inseminado ou da concentração espermática. Provavelmente, o maior número de espermatozóides, introduzidos no útero com a dose de um bilhão, tenha provocado maior estímulo quimiotático, através do complemento e de outros mediadores inflamatórios, que as concentrações espermáticas menores. No presente experimento, embora se utilizassem volumes constantes, a concentração espermática nas doses inseminantes variou entre 5×10^6 /espermatozóides/ml e 50×10^6 /espermatozóides/ml. Kotilainen *et al.* (1994) observaram, seis horas após a inseminação, que altas concentrações com pequenos volumes provocam um processo inflamatório maior do que o ocorrido em éguas inseminadas com volumes maiores e concentrações menores. Isto explicaria a maior reação inflamatória ocorrida com o sêmen mais concentrado (50×10^6 /espermatozóides/ml) veiculado no mesmo volume.

Ao contrário do verificado com a infusão de plasma seminal e de leite desnatado, a presença de espermatozóides provocou uma maior reação inflamatória nas quatro horas, mas a resolução do processo ocorreu até as 24 horas. Esta resolução foi tanto maior, quanto maior a dose inseminante. Provavelmente, esta limpeza mais acelerada possa ser explicada pela natureza do agressor, isto é, o espermatozóide causaria uma agressão maior e, com isso, um maior estímulo das defesas do útero, tendo como consequência uma resolução mais rápida do processo. Estes resultados se repetiram, também, no número de neutrófilos presentes no exame histopatológico, tanto no estrato compacto, como no estrato esponjoso. Estes dados confirmam os descritos por Nikolakopoulos & Watson (2000), que observaram que menores agressões ao endométrio resultam em inflamações residuais mais prolongadas. Por outro lado, os resultados do

presente experimento concordam parcialmente com os de Katila (1995). Em ambos os experimentos, ocorreu um rápido aumento do número de leucócitos logo após a inseminação, mas a resolução da inflamação foi mais lenta no estudo de Katila (1995), onde as éguas só conseguiram efetivar a limpeza uterina nas 48 horas. Provavelmente, estas diferenças se devam aos métodos de coleta utilizados e a variações individuais entre os animais.

A fibrose endometrial não influenciou o número de leucócitos no lúmen uterino, nem o número de neutrófilos nos estratos compacto e esponjoso, concordando com os achados de Zerbe *et al.* (2001). Estes resultados estão de acordo com os observados por Vieira *et al.* (2002), que não observaram relação entre éguas susceptíveis a endometrite e éguas com diferentes graus de endometrose.

O número de linfócitos nos estratos compacto e esponjoso foi semelhante, em todos os tempos, entre as éguas do grupo controle e as inseminadas com diferentes concentrações espermáticas. A não existência de resposta imunológica está associada, em humanos, roedores e suínos, à presença da proteína TGF-beta no plasma seminal. Esta proteína, além do efeito estimulador da resposta inflamatória, apresenta função essencial na indução da tolerância imune a antígenos seminais (Robertson *et al.*, 2002). Entretanto, as éguas infundidas com plasma seminal e com leite apresentaram um aumento do número de linfócitos em relação ao controle, mas não se diferenciaram dos grupos de éguas inseminadas.

Não se observou diferença no número de espermatozóides presentes no oviduto e na JUT entre as éguas inseminadas com 500 milhões e 100 milhões, nos diferentes tempos. As éguas inseminadas com um bilhão de espermatozóides tiveram um menor transporte espermático que as éguas inseminadas com 500 milhões, nas quatro horas, e um transporte espermático maior que as éguas inseminadas com 100 milhões, nas 24 horas. Por outro lado, as éguas do grupo um bilhão apresentaram um maior número de espermatozóides no oviduto e na JUT, nas 24 horas após a inseminação, do que nas duas e quatro horas. Aparentemente, o menor transporte espermático das éguas inseminadas com um bilhão de espermatozóides, nas quatro horas, pode estar relacionado à maior reação inflamatória apresentada por estas éguas, e como a resolução do processo

foi mais rápida, houve a possibilidade de que um maior número de espermatozóides atingissem os ovidutos após este momento. Estes resultados coincidem parcialmente com os observados por Alghamdi *et al.* (2000), que verificaram que a presença de PMNs na secreção uterina causou, *in vitro*, uma supressão da motilidade espermática.

O número de espermatozóides recuperados dos ovidutos e da JUT foi superior ao relatado por Parker *et al.* (1975) e por Bader (1982). Provavelmente, estas diferenças se devam a concentrações espermáticas, volumes da dose inseminante, métodos de preservação e técnicas de avaliação diferentes entre os experimentos.

O percentual de éguas apresentando espermatozóides na JUT e nos ovidutos, em todos os tempos observados, não se diferenciou entre as diversas concentrações e foi semelhante ao descrito por Scott *et al.* (2002). Duas horas após a inseminação, com qualquer das três concentrações, já haveria quantidade suficiente de espermatozóides para a fertilização na JUT de mais de 54% das éguas, sendo este percentual aumentado para mais de 66% nas quatro horas. Estes resultados confirmam os de Brinsko *et al.*, (1990, 1991), que verificaram que lavagens uterinas realizadas antes das quatro horas pós-inseminação diminuem as taxas de prenhez na égua.

Conclui-se que os componentes da dose inseminante provocam uma resposta inflamatória uterina na égua, sendo esta mais severa, e de resolução mais rápida, quanto maior for a concentração espermática. Por outro lado, o transporte espermático, até quatro horas após a inseminação, independe da concentração espermática utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALGHAMDI, A., TROEDSSON, M.H.T., LASCHKWITSCH, T., XUE, J.L. Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters motion characteristics *in vitro*. **Theriogenology** v. 55, p. 1019-1028, 2000.

BADER, H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. **J. Reprod. Fertil.** v. 32, p. 59-64, 1982.

BADER H., KRAUSE, A. Investigations about the transport, distribution and the fate of the spermatozoa in the genital tract of the mare. **Proc. 9th Int Cong Anim. Reprod. & AI** v. 5, p. 197-205, 1980.

BALL, B.A., SHIN, S.J., PATTEN, V.H., LEIN, D.H., WOODS, G.L. Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. **Theriogenology** v. 29, p. 1269-1283, 1988.

BRANDON, C.I., HEUSNER, G.L., CAUDLE, A.B, FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52 p.863-873, 1999.

BRINSKO, S.P, VARNER, DD., BLANCHARD, T.L., MEYERS, S.A. The effect of post-breeding uterine lavage on pregnancy rate in mares. **Theriogenology** v. 33, n. 2, p. 465-475, 1990.

BRINSKO, S.P., VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L. The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rates in mares. **Theriogenology** v. 35, p. 1111-1119, 1991.

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

EBERTUS, R.. The dilution of stallion semen with whole cow milk. **An Breed.** v. 31, p. 313, 1963.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammation response of mares with fresh semen. **Biol. Reprod. Mono** v.1, p. 515-517, 1995.

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

KNUDSEN, O. Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. **Cornell Vet.** v. 54, p. 415-422, 1964.

MANN, T., POLGE, C., ROWSON, L.E.A. Participation of seminal plasma during the passage of spermatozoa in the female reproductive tract of the pig and horse. **J. Endocr.** v. 13, p. 133-140, 1956.

MATTOS, R.C., MATTOS, A.L.G., KLUG, E., G:UNZEL, A.R., Citologia endometrial na égua como método diagnóstico auxiliar e complementar. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 8, n. 2, p. 83-90, 1984.

MATTOS, R.C., MEIRELLES, L.S., MALSCHITZKY, E., CASTILHO, L.F.F., NEVES, A.P., MATTOS, A.L.G., VIEIRA, M.J., KELLER, A., HOTT, A.C., GREGORY, R.M. Oxytocin, plasma containing leukocytes or combination of both as treatment of postbreeding endometritis in the horse. **Pferdeheilkunde**, v.15, p. 584-587, 1999.

MCDOWELL, K. J., LITTLE, T. V., TIMONEY, P. J., ADAMS, M. H. Characterisation of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and supplemented with testosterone. **Res. Vet. Sci.**, v. 61, n. 1, p. 33-37, 1996.

NIKOLAKOPOULOS E., WATSON, E.D.. Effct of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. **Eq. Vet. J.**, v. 32, n 2, p. 164-166, 2000.

PARKER, W.G., SULLIVAN, J.J., FIRST, N.L. Sperm transport and distribution in the mare. **J. Reprod. Fertil.** v. 66, p. 601-606, 1975.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 7, n. 5, p.289-302, 1987.

PIMENTEL, C.A., SANTOS, P.F.M., ALVES, A.N., HAMMES, A.M., Biópsia endometrial em equinos. Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, UFPel, p. 47-64, 1989.

QUETIN, M. Klinisch gynäkologische und histopathologische Untersuchungen zur Beurteilung der endometrialen Reaktion auf

besamungsrelevante Medien (Samenverdünner, Seminalplasma, Spermien) bei Warmblutstuten. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, 2001, 113p..

ROBERTSON, S.A., INGMAN, W.A., O'LEARY, S., SHARKEY, D.J., TREMELLEN, K.P. Transforming growth factor β - a mediator of immune deviation in seminal plasma **J. Reprod. Immunol.** v. 57 n.1-2, p. 109-128, 2002.

SCHMITT, F.L., Concentração, composição e qualidade do plasma seminal na preservação do sêmen eqüino a + 4°C Dissertação de Mestrado. Faculdade de Veterinária, UFRGS., Set. 2002, 102p..

SCOTT, M.A., VARNER, D.D., LIU, I.K.M, ENDERS, A.C. Presumptive evidence of a preovulatory reservoir in the mare: morphological investigation using scanning electron microscopy. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 639-642, 2002.

SIEME H, KLUG E, SCHOON H-A. Critical valuation of practical methods to term ovulation and AI in relation to endometrial reaction in the mare **Pferdeheilkunde** v.13, n. 5, p. 499, 1997.

TROEDSSON, M.H.T., Uterine response to semen deposition in the mare. In: **Proc. from Ann. Meet. of Soc. for Theriog.**, San Antonio, Texas, p.130-134, 1995.

TROEDSSON, M.H.T., STEIGER, B.N, IBRAIHM, N.M., FOSTER, D.N., CRABO, B.G. Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. **Biol. Reprod., Suppl.** v. 52, p. 307, 1995 a.

TROEDSSON, M.H.T., CRABO, B.G, IBRAIHM, N.M., SCOTT, M., ING, M. Mating induced endometritis: Mechanisms, clinical importance, and consequences. **Proc. AAEP** v. 41, p. 11-12, 1995 b.

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

TROEDSSON, M.H.T., LIU, I.K.M, CRABO, B.G. Sperm transport and survival in the mare. **Theriogenology** v.49, p. 905-915, 1998.

TROEDSSON, M.H.T.; FRANKLIN, R.K.; CRABO, B.G. Suppression of PMN-chemotaxis by different molecular weight fractions of equine seminal plasma. **Pferdeheilkunde**, v.15, p.568-573.1999.

TROEDSSON, M.H.T.; LEE, C-S., FRANKLIN, R.K.; CRABO, B.G. The role of seminal plasma in the post-breeding uterine inflammation. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 56, p. 341-349, 2000.

VIEIRA, M.J., HÖTT, A. K., KELLER, A., WALD, V.B., MATTOS, A.L.G., GREGORY, R.C., MATTOS, R.C. Antimicrobial agents in extender and their effect on semen preservation and pregnancy rate of inseminated mares. **Theriogenology** v. 58, p. 667-670, 2002.

WILLIAMSON, P., MUNYUA, S., MARTIN R., PENHALE, W.J., Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. **J. Reprod. Fertil. Suppl** v. 35, p. 317-325, 1987.

ZERBE, H., ENGELKE, F., LEIBOLD, W., SCHOON, H-A., KLUG, E. Immunophenotypical and functional properties of equine uterine neutrophils of mares with or without degenerative endometrial changes . **Pferdeheilkunde** v. 17, n. 6, p. 650-652, 2001.

4 CONCLUSÕES

Conclui-se que:

- A severidade da resposta inflamatória uterina na égua, depende dos componentes da dose inseminante.
- Quanto maior for a concentração espermática, mais rápida é a resolução do processo inflamatório.
- O transporte espermático, até quatro horas após a inseminação, independe da concentração espermática utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLEMEYER, B. **Tiefgefrierkonservierung von Seminalplasma auf Motilität und Kopfkappenintegrität der Samenzellen.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, 1991.

ALEXANDER, S.L., IRVINE, C.H.G., SHAND, N., EVANS, M.J. Is luteinizing hormone secretion modulated by endogenous oxytocin in the mare? Studies on the role of oxytocin and factors affecting its secretion in estrous mares. **Biol. Reprod. Mono**, v. 1, p. 361-371, 1995.

ALGHAMDI, A., TROEDSSON, M.H.T., LASCHKWITSCH, T., XUE, J.L. Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters motion characteristics *in vitro*. **Theriogenology** v. 55, p. 1019-1028, 2000

ALLEN W.R., BOWEN, J.M., FRANK, C.J., JEFFCOTT, L.B., ROSSDALE, P.D. The current position of AI in horse breeding. **Eq. Vet. J.** v. 8, p. 72-74, 1976.

AMANN, R.P., CRISTANELLI, M.J., SQUIRES, E.L. Proteins in stallion seminal plasma. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 35, p.113-120, 1987.

ASBURY, A.C., SCHULTZ, K.T., KLEISIUS, P.H., FOSTER, G.W., WASHBURN, S.M., Factors affecting phagocytosis of bacteria by neutrophils in the mare's uterus. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 32, p. 151-159, 1982.

AURICH, J.E., KUHNE, A., HOPPE, H., AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after criopreservation. **Theriogenology**.v.46, p. 791-797, 1996.

AUSTIN, C.R. Fate of spermatozoa in the uterus of the mouse and rat. **J Endocr** v. 14, p. 335-343, 1957.

BADER, H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare.. **J. Reprod. Fertil.**, v. 32, p. 59-64, 1982.

BADER H., KRAUSE, A. Investigations about the transport, distribution and the fate of the spermatozoa in the genital tract of the mare. **Proc. 9thInt Cong Anim. Reprod. & AI** v. 5, p.197-205, 1980.

BALL, B.A., SHIN, S.J., PATTEN, V.H., LEIN, D.H., WOODS, G.L. Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. **Theriogenology** v. 29 p. 1269-1283, 1988.

BATTELIER, F., MAGISTRINI, M., FAUQUANT, T.J., PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 391-410, 1997.

BEDFORD, S.J., HINRICHS, K. The effect of insemination volume on pregnancy rates of pony mares. **Theriogenology**, v. 42, p. 571-578, 1994.

BEDFORD, S.J., JASKO, D.J., GRAHAM, J.K., AMANN, R.P., SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glicerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, p 955-967, 1995.

BERGMANN, H.J., de KRUIFF, A. Preliminary evaluation of the inflammatory response of the endometrium on semen, extender and its components in mares. **Pferdeheilkunde**, v. 13, n 5, p. 543, 1997.

BISCHOF, R.J., LEE, C-S., BRANDON, M.R., MEEUSEN E. Inflammatory response in the pig uterus induced by seminal plasma. **J Reprod. Immun** v. 26, p. 131-146, 1994.

BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D., LOVE, C.C., HURTGEN, J.P., CUMMINGS, M.R., KENNEY, R.M. Use of a semen extender containing antibiotics improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Theriogenology**. v.28, n. 4, p. 541-546, 1987.

BOWEN, J. M. Artificial insemination in the horse. **Equine Vet. J.**, v. 1, p. 98-110, 1969.

BRANDON,C.I., HEUSNER, G.L., CAUDLE, A.B., FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polycrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52, p.863-873, 1999.

BRINSKO, S.P., VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L., MEYERS, S.A. The effect of post breeding uterine lavage on pregnancy rate in mares. **Theriogenology**, v. 33, p. 465-475, 1990.

BRINSKO, S.P., VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L. The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rates in mares. **Theriogenology** v. 35, p. 1111-1119, 1991.

BRINSKO, S.P., VARNER, D.D. Artificial insemination and preservation of semen. **Vet. Clin. North America- Eq. Pract.** v.8, p. 205-218, 1992.

BRINSKO, S.P., CROCKETT, E.C., SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p. 129-136, 2000.

CASLICK E.A. The vulva and the vulvo-vagina orifice and its relation to genital health of the Thoroughbred mare. **Cornell Vet.**, n 27, p. 178-187, 1937.

CALVETE, J., RAIDA, M., GENTZEL, M., URBANKE, C., SANZ, L., TOPFER-PETERSEN, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorilcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. **FEBS Lett.**, v. 407, n. 2, p. 201-206, 1997.

COHEN J. Immunological aspects of sperm selection and transport. In Crighton DB (ed.), **Immunological Aspects of Reproduction in Mammals** Kent: Butterworths; p. 77-89, 1984.

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

DAY FT: Survival of spermatozoa in the genital of the mare. **J Agric Sci**; v. 32, p.108-111, 1942.

DEMICK DS, VOSS JL, PICKET BW. Effect of cooling, storage glycerolization and spermatozoal numbers on equine fertility. **J Anim Sci** , v. 43, p. 633-637, 1976.

DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of the fertility of transported equine semen. **Theriogenology**. v.22, p. 291-304, 1984.

EBERTUS, R. The dilution of stallion semen with whole cow milk. **An Breed**. v. 31, p. 313, 1963.

EINARSSON, S., VIRING, S. Distribution of frozen-thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different time intervals after insemination. **J. Reprod. Fertil**. v. 32, p. 117-120, 1973.

EVANS, M.J., HAMER, J.M., GRASON, L.M., GRAHAM, C.S., ASBURY A.C., IRVINE, C.H.G. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: effect of steroid hormone environment. **Theriogenology**. v. 26, p. 37-50, 1986.

EVANS, M.J., HAMER, J.M., GRASON, L.M., IRVINE, C.H.G. Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. **J. Reprod. Fertil Suppl** v.35, p. 327-334, 1987.

FAHMI, H.A., HUNTER, A.G., MARKHAM, R.J.F., SEQUIN, B.E. Immunossuppressive activity of bovine seminal plasma on bovine lymphocytes *in vitro* . **J. Dairy Sci**. v. 68,. p. 2315-2321, 1985.

GEBAUER, M.R., PICKETT, B.W., FAULKNER, L.C., REMMENG, E.E., BERNDSTON, W.E. Reproductive Phisiology of the stallion VII. Chemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa. **J. An Sci**. v. 43, n 3, p. 626-632, 1976.

GILBERT, R.O., FALES, M.H. The effect of bovine seminal plasma on the function and integrity of bovine neutrophils. **Theriogeneology** v.46, p. 649-658,1996.

GOULD, J.E., OVERSTREET, J.W., HANSON, F.W. Assessment of human sperm function after recovery from the female reproductive tract **Biol Reprod** v. 31, p. 888-894, 1984.

HAWK, H.W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **J Dairy Sci**. v.66, p. 2645-2660, 1983.

HUGHES, J.P., LOY, R.G. Investigations on the effect of intrauterine inoculation of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. **Proc. 15th AAEP**, 289-292, 1969.

HUNTER, R.H.F. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation **J. Reprod. Fertil.** v 63, p. 109-117, 1981.

HUNTER, R.H.F., NICHOL, R. Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. **J. Exp. Zool.** v. 228, p. 121-128, 1983.

HUNTER, R.H.F., FLECHON, B., FLECHON, J.E., Distribution morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviducts before and after ovulation: A scanning electron microscope study. **Tissue & Cell** v. 23, p. 641-656, 1991.

JASKO, D.J., MORAN, D. M., FARLIN, M.E., SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.36, p. 1059-1067, 1991.

JASKO, D.J., HATHAWAY, J.A., SCHALTNBRAND, V.L. SIMPER, W.D. SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma end egg yolk on motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**. v. 37, p. 1241-1252, 1992.

JONES, D. Fluid distribution and cervical loss following intrauterine infusion in the mare. **Eq. Pract.** v. 17, n.1, p. 12-19, 1995.

KAEOKET, K., PERSSON, E., DALIN, A-M. The influence of pre- and post- ovulatory insemination on sperm distribution in the oviduct, accessory sperm to the zona pellucida, fertilisation rate and embryo development in sows. **An. Reprod. Sci.** v. 71, p. 239-248. 2002.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammation response of mares with fresh semen. **Biol. Reprod. Mono** v. 1, p. 515-517, 1995.

KATILA, T. Uterine defence mechanisms in the mare **An.Reprod. Sci.** v. 42, n 1-4, p. 197-204, 1996.

KATILA, T.. Interactions of the uterus and semen. **Pferdeheilkunde**, v. 13 , n. 5, p. 508-511, 1997.

KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, E.L.; JASKO, D.J.; PICKETT, E.W. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p. 601-614, 1992.

KELLER, A., MALSCHITZKY, E., HÖTT, A., VIEIRA, M.J., GREGORY, R.M., MATTOS, R.C. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Anim. Repr. Sci. Proceedings. 3rd Int. Symp. Stallion Reprod** .Colorado-E.U.A. p. 318-319, 2001.

KENNEY, R.M.; KHALEEL, S.A. Bacteriostatic activity of the mare uterus: a progress report on immunology. **J. Repr. Fert., Suppl.** v.23, p. 357-358, 1975.

KENNEY RM, BERGMAN RV, COOPER WL, MORSE GW. Minimum contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. **Proc. 21th AAEP** 327-336,1975.

KNEISSL, S. Tiefgefrierkonservierung von Pferdesperma: Einfluss der Samen- entnahmetechnik, Zentrifugation, Konfektionierungsform und Einfriermethode auf die Motilität und Membranintegrität der Samenzellen. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) Hannover, Tierärztl. Hochsch. 1993.

KNUDSEN, O. Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. **Cornell Vet.** v. 54, p. 415-422, 1964.

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

LAGARES, M.A.; MEIRELES, L.S.; WALD, V.B.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Efeito de diferentes diluidores sobre a membrana plasmática do espermatozóide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **Rev. Bras. Ciên. Vet.** v. 7, n.3, p. 153-156, 2000.

LANE, M.A., BERARDINELLI, J.G., CARDENAS, H., STAIGMILLER, R.B. Sperm transport and distribution during the puberal transition in ewe lambs. **J. Anim. Sci.** v. 71, n. 3, p. 707-713, 1993.

LEBLANC, M.M., WARD, L., TRAN, L., WIDDERS, P. Identification and opsonic activity of immunoglobulins recognizing *Streptococcus zooepidemicus* antigens in the uterine fluids of mares. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v.44, p. 289-296, 1991.

LEBLANC MM, NEUWIRTHL, ASBURY AC,: Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Vet J** v.26, p. 109-113, 1994.

LEBLANC, M.M., JHONSON, R.D., CALDERWOOD M.B., VALDERRAMA, C. Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis **Biol. Reprod. Mono** v.1, p. 501-506, 1995.

LIU, I.K.M., MITCHELL, G., PERRYMAN, L.E., STEWART, E.W. Immunological defence mechanisms of the uterus in the mare. **Proc. Ann. Meeting of Soc. Theriogenology**, p. 265-267, 1981.

MALMGREN, L., Effectiveness of two systems for transporting equine semen. **Theriogenology** v. 50, p. 833-839, 1998.

MANJUNATH, P., SOUBEYRAND, S., CHANDONNET, L., ROBERTS, K.D. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. **Biochem. J.** v. 1, n 303, p. 121-128, 1994.

MANN, T., POLGE, C., ROWSON, L.E.A. Participation of seminal plasma during the passage of spermatozoa in the female reproductive tract of the pig and horse. **J. Endocr.** v. 13, p. 133-140, 1956.

MANN, T. Metabolism of Semen: fructolysis, respiration and sperm energetics. In: **The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.** Ed: T. Mann. New York, Barnes and Noble, p. 265-307, 1964.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: MANN, T.; LUTWAK-MANN,C. **Male reproduction and semen.** New York, Springer Verlag, p. 23-28, 1981.

MARDEN, W., WERTHESEN, N.T. Influence of seminal fluid on sperm motility. **Fertil. Steril.** v.7, n. 6, p.508-515, 1956.

MARINOV, M.F., PETKOV, Z. Sperm forward movement in the female genital tract of sheep **Vet. Med. Nauki**. v. 20, n. 3-4, p. :28-33, 1983.

MATTHIJS, A., ENGEL, B., WOELDERS, H. Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender. **Reproduction** v. 125, n. 3, p. 357-367 2003.

MATTNER, P.E., The distribution of spermatozoa and leucocytes in the female genital tract in goats and cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 17, p. 253-261, 1968.

MATTOS, R.C., MATTOS, A.L.G., KLUG, E., G:UNZEL, A.R. Citologia endometrial na égua como Método diagnóstico auxiliar e complementar. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.8, n.2, p. 83-90, 1984.

MATTOS, R.C.; CAVALHEIRO, E.P. Monta natural e inseminação artificial com sêmen fresco em éguas cruza árabe. In: **Congresso Estadual de Medicina Veterinária**, Porto Alegre. **Anais**, Porto Alegre, Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 10, p.46, 1988.

MATTOS, R. Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Veterinária, UFRGS.1995.

MATTOS, R.C., MEIRELLES, L.S., MALSCHITZKY, E., CASTILHO, L.F.F., NEVES, A.P., MATTOS, A.L.G., VIEIRA, M.J., KELLER, A., HOTT, A.C., GREGORY, R.M. Oxytocin, plasma containing leukocytes or combination of both as treatment of postbreeding endometritis in the horse **Pferdeheilkunde**, v.15, p.584-587, 1999.

MCDOWELL, K. J.; LITTLE, T. V.; TIMONEY, P. J.; ADAMS, M. H. Characterisation of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and supplemented with testosterone. **Res. Vet. Sci.**, v. 61, n. 1, p. 33-37, 1996.

MEIRELES, L.S.; NEVES, A.P.; VIEIRA, M.J.; KELLER, A.; HÖTT, A.K.; MORAES, I.M.A.; GARBADE, P. GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Uso do leite em pó desnatado não inativado e do leite desnatado UHT na preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28,n. 3, p. 467-470, 1998.

MERKT H, BADER H, KLUG E: Die Bedeutung klinisch andrologischer Untersuchungen bei Hengsten für deren praktischen Zuchteinsatz. **Dtsch. Tierarztl. Wschr.**; v. 89, p. 219-223, 1982.

MIES FILHO, A., História, vantagens e limitações da Inseminação Artificial, In: Reprodução dos Animais Domésticos e Inseminação , 4^o ed., Porto Alegre, Sulina, 1977, v.2, p. 353-364.

NIKOLAKOPOULOS, E., WATSON, E.D. Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. **Equine Vet. J.** v. 32, n.2, p. 164-166, 2000.

NISHIKAWA, Y. **Studies on reproduction in horses.** Singularity and artificial control in reproductive phenomena. **Koei Kvoto**, Tokyo, Japan. 340 p, 1959.

OVERSTREET, JW; COOPER, GW., KATZ, F.D., Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit :II The sustained phase of transport. **Biol. Reprod.** v. 19, p. 115-132, 1978.

OVERSTREET, JW; COOPER, GW. Effect of ovulation and Sperm motility on the migration of rabbit spermatozoa to the site of fertilization. **J. Reprod. Fertil.** v. 55, p. 53-59, 1979.

OVERSTREET, J.W., TOM, R.A. Experimental studies of rapid sperm transport in rabbits. **J.Reprod.Fert.Suppl.** v. 23, p. 115-121, 1982.

PADILLA, A . W.; FOOTE, R.H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. **J. Anim. Sci.**, v. 69, p. 3308-3313, 1991.

PALMER, E. L'insemination artificielle des juments: bilan de 5 années de recherché et utilization pratique. In: **Le cheval, Reproduction Selection, Alimentation Explotation, INRA** (ed), p. 133, 1984.

PARKER, W.G., SULLIVAN, J.J., FIRST, N.L. Sperm transport and distribution in the mare. **J. Reprod. Fertil.** v. 66, p. 601-606, 1975.

PARLEVLIET, J.M., TREMOLEDA, J.M., CHENG, F.P., PYCOCK, J.F. COLENBRADER, B. Influence of semen, extender and seminal plasma on the defence mechanisms of the mare's uterus. **Pferdeheilkunde**, v. 13 , n. 5, p. 540, 1997.

PASCOE, R.R. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. **J. Reprod. Fertil.** v.27, p. 299-305, 1979.

PETERSON, F.B.; McFEELY, R.A., DAVID, J.S.E. Studies on the pathology of endometritis in the mare. **Proc. 15th Am Assoc. Eq. Pract.** Houston, p. 279-287, 1969.

PICKETT, B.W., FAULKNER, L.C., SUTHERLAND, T.M. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behaviour **J. Anim. Sci.** v. 31, p. 713, 1970.

PICKETT, B.W., BACK, D.G., Procedures for preparation, collection evaluation and insemination of stallion semen. Colorado State University Exp. Sta. Anim. Reprod. Lab. Gen. Series. 935, 1973.

PICKETT, B.W., BACK, D.G., BURWASH, L.D., VOSS, J.L. The effect of extenders, spermatozoal numbers and rectal palpation on equine fertility. **Proc. NAAB Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod.** v. 5, p. 47-58, 1974.

PICKETT, B.W., SULLIVAN, J.J., BYERS, W.W., PACE, M.M., REMMENGA, E.E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Am. Fert. Soc.**, v.26, n.2, 1975.

PICKETT, B.W.;FAULKNER, L.C.; SEIDEL, G.E.; BERNDTSON, W.E; VOSS, J.L. Reproductive physiology of stallion VI. Seminal and behavioral characteristics. **J. Anim. Sci.**, 43,p. 617-625, 1976.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 7, n. 5, p.289-302, 1987.

PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Laboratory.** Colorado State University, 1987.

PICKETT, B.W. Seminal extender and cooled semen. In: MCKINNON, A. O., VOSS, J.L., **Equine reproduction**. Filadélfia, : Lea & Febiger, p.746-754.1993.

PIMENTEL, C.A., SANTOS, P.F.M., ALVES, A.N., HAMMES, A.M., Biópsia endometrial em equinos. Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, UFPel, p. 47-64, 1989.

PYCOCK, J.P., ALLEN, W.E. Pre-chemotatic and chemotatic properties of uterine fluid from mares with experimentally induced endometritis. **Vet. Rec.** n. 123, p. 193-195, 1988.

PYCOCK, J.P., ALLEN, W.E. The early chemotactic reaction of the equine uterus to acute inflammatory stimulation **Tierarztl Prax Suppl** v. 4, p. 17-20, 1989.

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

PROVINCE, C.A., AMANN, R.P., PICKETT, B.W., SQUIRES, E.L., Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5⁰ C. **Theriogenology** v.23, p. 409-415, 1984.

PROVINCE, C.A., SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W., AMANN, P.R. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extender equine spermatozoa. **Theriogenology**. v.23, p. 925-934, 1985.

QUETIN, M. Klinisch gynäkologische und histopathologische Untersuchungen zur Beurteilung der endometrialen Reaktion auf besamungsrelevante Medien (Samenverdünner, Seminalplasma, Spermien) bei Warmblutstuten. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, 2001, 113p.

REILAS, T. Uterine environment in the mare. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Helsinki, 2001. 78p.

ROBERTSON, S.A., INGMAN, W.A., O'LEARY, S., SHARKEY, D.J., TREMELLEN, K.P. Transforming growth factor β - a mediator of immune

deviation in seminal plasma **J. Reprod. Immunol.** v. 57 n.1-2, p. 109-128, 2002.

RODGER, J.C. Seminal plasma, na unnecessary evil? **Theriogenology** v.3, p. 237, 1975.

ROZEBOOM, K.J., TROEDSSON, M.H.T., HODSON, H.H., SHURSON, G.C., CRABO, B.G. The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine **J. An Sci** v. 78, n. 2, p. 443-448, 1998.

ROZEBOOM, K.J., TROEDSSON, M.H.T, CRABO, B.G. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. **J. An. Sci** v. 77, n. 8, p. 2201-2206, 1999.

ROZEBOOM, KJ; TROEDSSON, MHT; HODSON, HH; SHURSON, GC; CRABO, BG The importance of seminal plasma on viability of subsequent artificial insemination in swine. **J. An. Sci.** v. 78, p. 443-448, 2000.

ROZEBOOM, KJ; TROEDSSON, MH; ROCHA, G., CRABO, BG. The chemotatic properties of porcine seminal plasma components toward neutrophils **J. An. Sci.** v.79, p. 996-1002, 2001.

ROWLEY, M.S., SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W. Effect of insemination on embryo recovery in mares. **Equine. Vet. Sci.** v. 10, p. 298-300, 1990.

SCHMITT, F.L. Concentração, composição e qualidade do plasma seminal na preservação do sêmen equino a + 4°C **Dissertação Mestrado UFRGS**, 2002

SCOTT M.A., LIU, I.K.M., ROBERTSON, K.R., HANRATH, M., OVERSTRETT, J.W., DROBNIS, E.Z., Acrossosomal status and movement characteristics of sperm in the oviducts of normal mares. **Proc. Int. Symposium Eq. Reprod.**, Caxambu, Brasil, p. 173-174, 1994

SCOTT M.A., LIU, I.K.M., OVERSTREET, J.W. Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implications **Proc. AAEP.** n.41, p.1-2, 1995.

SCOTT M.A. A glimpse at aperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. **Anim. Reprod. Sci.** n. 60-61, p. 337-348, 2000.

SCOTT, M.A., VARNER, D.D., LIU, I.K.M, ENDERS, A.C. Presumptive evidence of a preovulatory reservoir in the mare: morphological investigation using scanning electron microscopy. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 639-642, 2002

SIEME H, KLUG E, SCHOON H-A. Critical evaluation of practical methods to term ovulation and AI in relation to endometrial reaction in the mare **Pferdeheilkunde** v. 13, n. 5, p. 499, 1997.

SIEME H, SCHÄFER, T., STOUT, T.A.E., KLUG E., WABERSKI, D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**, v.60, p.1153-1164, 2003.

SMITH, T.T., YANAGIMACHI, R. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. **J. Reprod. Fertil.** v. 91, p.567-573, 1991.

SQUIRES, E.L., AMANN, R.P., MCKINNON, A. O., PICKETT, B.W. Fertility of equine spermatozoa cooled to 5 or 20°C. In: **International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination**, 11., 1998, Haia. Proceedings. Haia, 1998, v.3,p.297-299.

SUAREZ, S.S. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observation in situ. **Biol. Reprod.** v. 36, p. 203-210, 1987.

SWIRE, P.W. Artificial insemination in horse. In: **The semen of animals and artificial insemination**. Commonwealth Agricultural Bureaux. England 1962, p. 281-297.

TAYLOR, N.J. Investigation of sperm-induced cervical leucocytosis by a double mating study in rabbits. **J Reprod Fertil** v. 66, p. 157-160, 1982.

THOMAS P.G.A., BALL, B.A., BRINSKO, S.P. Interaction of equine spermatozoa with oviduct epithelial cell explants is affected by estrous cycle and anatomic origin of explant. **Biol. Reprod.** v.51, p. 221-228, 1994.

TROEDSSON, M.H.T., LIU. I.K.M., THURMOND, M. Function of uterine and blood-derived polymorphonuclear neutrophils in mares

susceptible and resistant to chronic uterine infection: Phagocytosis and chemotaxis. **Biol. Reprod.** v.49, p. 507-514, 1993.

TROEDSSON, M.H.T. Uterine response to semen deposition in the mare. **Proc. For Ann. Meet. Of Soc. For Theriog.**, San Antonio, Texas, p. 130-134, 1995.

TROEDSSON, M.H.T., STEIGER, B.N, IBRAIHM, N.M., FOSTER, D.N., CRABO, B.G., Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. **Biol. Reprod., Suppl.** v. 52, p. :307, 1995 a.

TROEDSSON, M.H.T., CRABO, B.G, IBRAIHM, N.M., SCOTT, M., ING, M. Mating induced endometritis: Mechanisms, clinical importance, and consequences. **Proc. AAEP** v. 41, p. 11-12, 1995 b.

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

TROEDSSON, M.H.T., LIU, I.K.M, CRABO, B.G. Sperm Transport and survival in the mare. **Theriogenology** v. 49, p. 905-915, 1998.

TROEDSSON, M.H.T.; FRANKLIN, R.K.; CRABO, B.G. Suppression of PMN-chemotaxis by different molecular weight fractions of equine seminal plasma. **Pferdeheilkunde**, v.15, p.568-573, 1999.

TROEDSSON, M.H.T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, n. 3. p. 461-471, 1999.

TROEDSSON, M.H.T.; LEE, C-S., FRANKLIN, R.K.; CRABO, B.G. The role of seminal plasma in the post-breeding uterine inflammation. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 56, p. 341-349, 2000.

TROEDSSON, M.H.T., ALGHAMDI, A.S., MATTISEN, J. Equine seminal plasma protects the fertility of spermatozoa in an inflamed uterine environment. **Theriogenology**, v. 58, p. 453-456, 2002.

TYLER, K.R. Histological changes in the cervix of the rabbit after coitus. **J.Reprod. Fertil.** v. 49, p. 341-345, 1977.

VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.L., GARCIA, M.C., KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.28, n.5, p.709-723, 1987.

VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.L., GARCIA, M.C., KENNEY, R.M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1043-1054, 1988.

VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L., MEYERS, P.J., MEYERS, S.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20° C **Theriogenology**, v. 32, p. 515-525, 1989.

VARNER, D.D., SCHUMACHER, J., BLANCHARD, T.L., JOHNSON, L. Breeding soundness examination. IN: VARNER, D.D., SHUMACHER, J., BLANCHARD, T.L., JOHNSON, L. **Diseases and management of the breeding stallions**. Goleta- Califórnia: Am. Vet. Public., 1991, p. 97-116.

VIEIRA, M.J., HÖTT, A. K., KELLER, A., WALD, V.B., MATTOS, A.L.G., GREGORY, R.C., MATTOS, R.C. Antimicrobial agents in extender and their effect on semen preservation and pregnancy rate of inseminated mares. **Theriogenology** v. 58, p. 667-670, 2002.

VIRING, S., EINARSSON, S. Sperm distribution within the genital tract of naturally inseminated gilts. **Nord. Vet. Med.** v. 33, n. 3, p. 145-149, 1981.

WATSON, E.D., STOKES, C.R., BOURNE, F.J. The influence of administration of ovarian steroids on the function of neutrophils isolated from the blood and uterus of ovariectomized mares. **J. Endocrinol.** v.112, p. 443-448, 1987.

WATSON, E.D., NIKOLAKOPOULOS, E. Sperm longevity in the mare's uterus. **J. Eq. Vet. Sci** v. 16, p. 390-392, 1996.

WATSON, E.D., NIKOLAKOPOULOS, E., GILBERT, C., GOODE, J., Oxytocin in the semen and gonads of the stallion **Theriogenology** v. 51, p. 855-865, 1999.

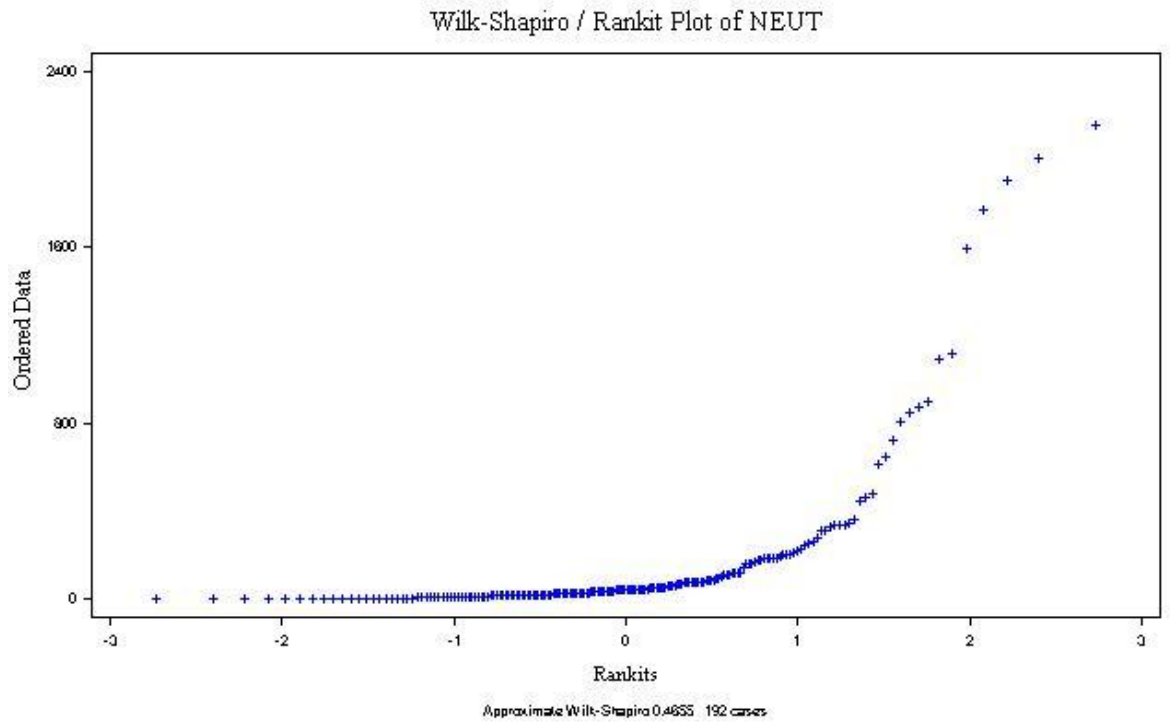
WIDDERS, P.R., STOKES, C.R., DAVID, J.S.E., BOURNE, F.J. Immunological studies in the local immune system in the reproductive tract of the mare. **Res. Vet. Sci.** v. 38, p. 88-95, 1984.

WILLIAMNSON, P., MUNYUA, S., MARTIN R., PENHALE, W.J., Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and physical manipulation of the reproductive tract in the mare. **J. Reprod. Fertil. Suppl**, v. 35, p.317-325, 1987.

ZERBE, H., ENGELKE, F., LEIBOLD, W., SCHOON, H-A., KLUG, E. Immunophenotypical and functional properties of equine uterine neutrophils of mares with or without degenerative endometrial changes . **Pferdeheilkunde** v. 17, n.. 6, p. 650-652, 2001.

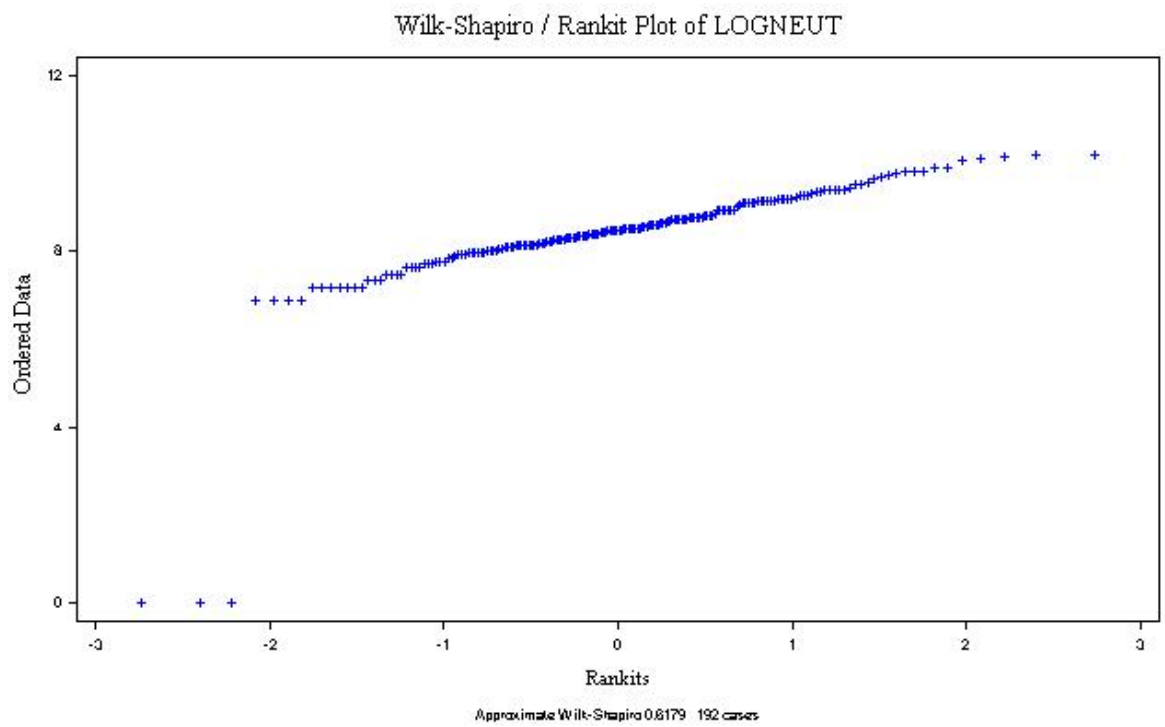
ANEXO1. CURVA DO TESTE DE NORMALIDADE

Número de neutrófilos no lavado



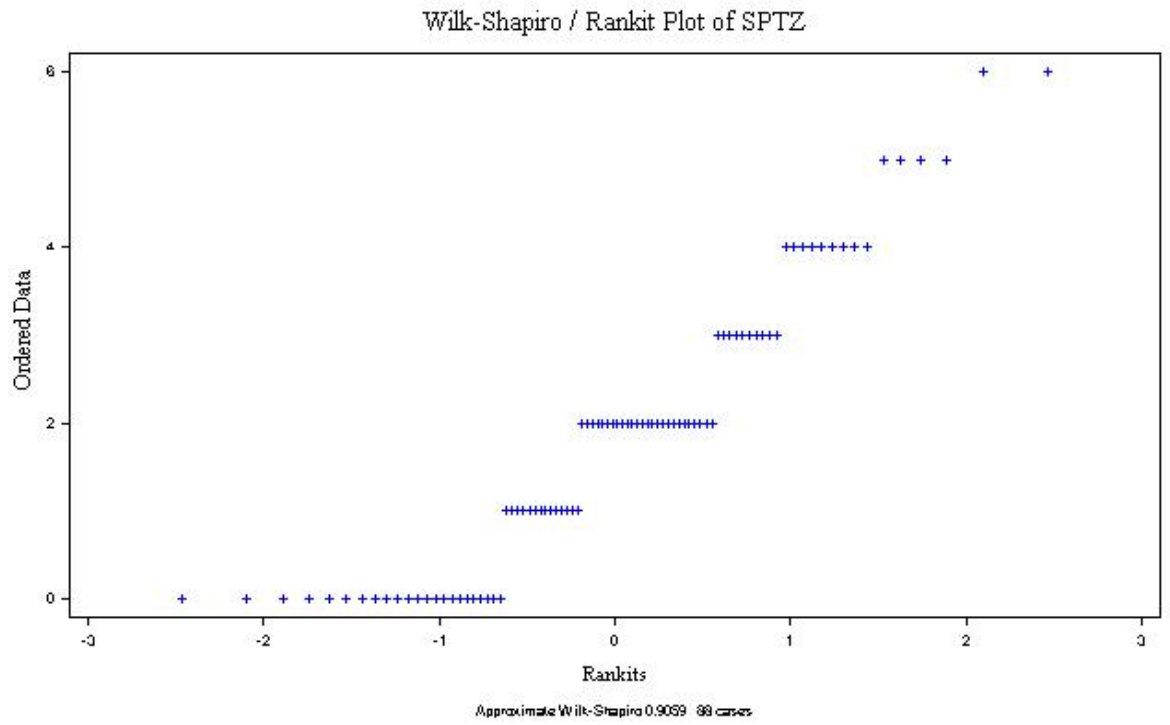
ANEXO2. CURVA DO TESTE DE NORMALIDADE

Número de neutrófilos no lavado, transformado em logaritmo



ANEXO3. CURVA DO TESTE DE NORMALIDADE

Número de espermatozóides no lavado



ANEXO4. CURVA DO TESTE DE NORMALIDADE

Número de espermatozóides no lavado, após a transformação para logaritmo

