

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA ENDOMETRIAL DE JUMENTAS (*Equus asinus*)
DA RAÇA PÊGA AO SÊMEN FRESCO, EXTENDIDO E
CONGELADO DE JUMENTO**

Carmen Zilda Pereira de Toledo

Médica Veterinária

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA ENDOMETRIAL DE JUMENTAS (*Equus asinus*)
DA RAÇA PÊGA AO SÊMEN FRESCO, EXTENDIDO E
CONGELADO DE JUMENTO**

Carmen Zilda Pereira de Toledo

Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

T649r Toledo, Carmen Zilda Pereira de
Resposta endometrial de jumentas (*Equus asinus*) da raça Pêga
ao sêmen fresco, extendido e congelado de jumento / Carmen Zilda
Pereira de Toledo. -- Jaboticabal, 2014
viii, 69 p. ; il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Gilson Hélio Toniollo

Coorientadora: Márcia Rita Fernandes Machado

Banca examinadora: Benedito Dias de Oliveira Filho, Lindsay
Unno Gimenes, Marion Burkhardt de Koivisto, Tais Harumi de Castro
Sasahara

Bibliografia

1. Jumenta. 2. Ciclo estral. 3. Sêmen. 4. Biopsia endometrial. 5.
Neutrófilo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.183



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: RESPOSTA ENDOMETRIAL DE JUMENTAS (*Equus asinus*) DA RAÇA PÉGA AO SÊMEN FRESCO, EXTENDIDO E CONGELADO DE JUMENTO

AUTORA: CARMEN ZILDA PEREIRA DE TOLEDO

ORIENTADOR: Prof. Dr. GILSON HELIO TONIOLLO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MARCIA RITA FERNANDES MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GILSON HELIO TONIOLLO

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. MARION BURKHARDT DE KOIVISTO

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

Prof. Dr. BENEDITO DIAS DE OLIVEIRA FILHO

Departamento de Produção Animal / Escola de Veterinária / UFG / Goiânia/GO

Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. TAIS HARUMI DE CASTRO SASAHARA

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 18 de junho de 2014.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CARMEN ZILDA PEREIRA DE TOLEDO – nascida em 02 de setembro de 1956, em São João da Boa Vista, SP. Em agosto de 1974, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, que foi concluído em dezembro de 1978. Foi bolsista pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e monitora junto à Disciplina de Cirurgia Veterinária durante a graduação. De 1979 a 1995 exerceu a função de Médica Veterinária Autônoma em Clínica, Cirurgia e Reprodução de Equídeos. E, a partir de 1996, exerceu a função Administrativa e Responsabilidade Técnica pelo Laboratório de Transferência de Embriões Bovinos e Equídeos na Fazenda Olaria, Orlandia, SP. Assistência técnica em Produção, Clínica, Cirurgia e Reprodução de Bovinos e Equinos até a presente data. Em março de 2008, iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV/Unesp, obtendo o Título de Mestre em Cirurgia Veterinária em dezembro de 2009. Em março de 2010, ingressou no curso de doutorado, novamente junto ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV/Unesp.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, por que o mundo pertence a quem se atreve. E a vida é muito bela para ser insignificante.”

Charles Chaplin

Ao Sr. Octavio Junqueira Leite de Moraes,
In memoriam

Patrão por tantos anos

Aos meus filhos,

Maria Carolina
Marco Aurélio
Maria Angélica
Marcelo Augusto,

Por aceitarem-me como mãe

AGRADECIMENTO

A Deus, pela vida e saúde.

Aos Professores Doutores Gilson Hélio Toniollo e Márcia Rita Fernandes Machado pela orientação e co-orientação, respectivamente, deste estudo.

Ao Sr. Orandi, do Laboratório de Morfologia e Anatomia, e a Claudinha, do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela colaboração na confecção do material histológico.

A amiga e colega Pós-doutoranda Tais Harumi de Castro Sasahara, pela captura das imagens do material histológico.

Aos Professores Doutores Fernando Zara, Lizandra Amoroso e Maria Rita Pacheco, pela colaboração na interpretação do material de histologia deste estudo.

Ao colega Juan Carlos Rios Alva, pela colaboração na análise estatística.

Aos amigos e colegas: Annita Morais Girardi, Cássia Maria Coelho, Edmilson Rodrigo Daneze, Renata Lemos Nagib Jorge e tantos outros, que passaram a fazer parte da minha vida e são muito queridos.

À amiga e colega Cássia Maria Orlandi, pela amizade, coleguismo, parceria de tanto tempo e apoio constante.

Aos estagiários e futuros colegas de profissão, Ricardo Silva Maia, Vinícius Fachini, Juniocésar Cardoso de Melo e Jonatas Ferreira (Baxinho), pelo auxílio na colheita de materiais para este estudo, a qualquer dia e hora.

E como não poderia deixar de ser, meu eterno agradecimento especial e incondicional às jumentas que fizeram parte deste estudo, como se entendessem e aceitassem a importância da colaboração.

SUMÁRIO

	Página
Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. O plasma seminal.....	18
2.2. Transporte, capacitação espermática e reação acrossômica.....	19
2.3. Reação inflamatória do útero induzida pela cobertura.....	20
2.3.1. Mecanismos de defesa uterina.....	20
2.3.2. Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios.....	21
2.3.3. Variações hormonais.....	23
2.3.4. Exames histopatológicos do endométrio.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
4. METODOLOGIA	25
4.1. Localização.....	25
4.2. Animais e manejo.....	25
4.3. Caracterização do ciclo estral.....	26
4.4. Seleção e acompanhamento dos animais para biopsia endometrial.....	27
4.5. Sêmen utilizado	28
4.5.1. Sêmen fresco (MN).....	28
4.5.2. Coleta e preparo do sêmen extendido e congelado.....	29
4.5.2.1. Sêmen extendido (SE).....	30
4.5.2.2. Sêmen congelado (SC).....	30
4.6. Biópsias endometriais.....	30
4.6.1. No diestro.....	30
4.6.2. Nos grupos experimentais.....	31

4.7. Técnicas para avaliações histológicas.....	33
4.6.1. Quantificação das células inflamatórias	34
4.8. Lavado uterino.....	37
4.9. Análise estatística.....	37
5. RESULTADOS	38
5.1. Caracterização da ciclicidade em jumentas Pêga.....	38
5.2. Histologia das biópsias endometriais.....	41
5.2.1. Diestro.....	41
5.2.2. Estro.....	43
5.2.3. Monta Natural (MN).....	46
5.2.4. Inseminação com sêmen estendido.....	48
5.2.5. Inseminação artificial com sêmen congelado.....	50
5.3. Lavado uterino.....	52
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÃO.....	58
8. REFERÊNCIAS	59



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 03291/14 do trabalho de pesquisa intitulado "**Resposta endometrial de jumenta (*Equus asinus*) da raça pèga ao sêmen fresco, estendido e congelado de jumento**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de março de 2014.

Jaboticabal, 11 de março de 2014.

Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora - CEUA

“RESPOSTA ENDOMETRIAL DE JUMENTAS (*Equus asinus*) DA RAÇA PÊGA AO SÊMEN FRESCO, EXTENDIDO E CONGELADO DE JUMENTO”

RESUMO – O objetivo geral deste estudo foi descrever as respostas inflamatórias de jumentas Pêga ao sêmen fresco (MN), sêmen estendido (SE) e sêmen congelado (SC) de jumento, tendo como objetivo específico correlacionar esses achados com os baixos índices de gestações de jumentas Pêga por inseminação artificial (IA) com SC. Foram avaliadas diariamente 25 jumentas, através de rufiações, palpações transretais e exames ultrassonográficos durante maio de 2012 a março de 2013. Foram observados 234 estros, sendo 33 (14,22%) estros anovulatórios e 11 (4,74%) duplas ovulações; o comprimento do ciclo estral foi de $28,88 \pm 0,95$ dias, com sinais externos de estro de $4,50 \pm 0,35$ dias e o tempo de ovulação em relação ao término do estro de $8,0 \pm 2,45$ horas entre as 25 jumentas. Diante dos resultados obtidos, as jumentas não apresentaram sazonalidade reprodutiva. Selecionaram-se 12 jumentas ao acaso, as quais foram biopsiadas em diestro para avaliação reprodutiva e nos ciclos estrais subsequentes, as mesmas foram submetidas à uma das técnicas: monta natural (MN), IA-SE e IA-SC próximo à ovulação, realizando-se biópsia endometrial 10 horas após cada evento. Os fragmentos foram conservados em formalina a 10%, solução de Bouin e solução de glutaraldeído tamponado a 10% para análise em microscopia de luz (ML), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). As amostras endometriais das jumentas em diestro apresentaram pregas e sulcos do endométrio, células microvilosas e ciliadas, livre de processos patológicos incompatíveis com a reprodução; em estro apresentaram epitélio colunar simples, evidenciando células microvilosas e células ciliadas, com núcleos ovalados, cromatina condensada e, no citoplasma, presença de mitocôndrias, vacúolos e corpúsculos elétron-densos. Formações semelhantes a bolhas estavam presentes nas superfícies das células microvilosas. As glândulas endometriais continham secreções e evidenciavam as aberturas nos sulcos ou nas pregas, cercadas de células microvilosas ou ciliadas, capilares sub-epiteliais esparsos e raros neutrófilos, assim como linfócitos. Após a MN, IA-SC e IA-SE, as células microvilosas apresentavam grânulos de secreção na parte apical, atividade secretória e presença expressiva de neutrófilos e número menor de linfócitos. As respostas endometriais das jumentas foram expressas pela quantificação de neutrófilos e linfócitos, obtendo resultados semelhantes para a MN e IA-SC, independente do volume e número de células espermáticas para cada evento. Para IA-SE, os resultados tiveram diferença significativa, analisados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). De acordo com os resultados, a resposta endometrial da jumenta Pêga foi semelhante ao descrito para resposta uterina da égua, porém apresentando diferença em relação a IA-SE, sendo necessários estudos comparando taxas de gestações com MN e IA-SE na jumenta Pêga.

Palavras-chave: jumenta, ciclo estral, sêmen, biópsia endometrial, neutrófilo.

“ENDOMETRIAL RESPONSE OF PEGA JENNIES (*Equus asinus*) TO FRESH, EXTENDED AND FROZEN SEMEN FROM DONKEY”

SUMMARY – The general objective of this study was to describe the inflammatory responses in Pêga Jennies from fresh (NM), extended (ES) and frozen (CS) semen from Jackass. The specific objective was to correlate these responses with low pregnancy rates in Jennies after artificial inseminations (AI) with frozen semen. Twenty five Jennies were daily evaluated by teasing, rectal examination and ultrasound from May 2002 to March 2013. Estrous cycles (n=234) were followed, with 33 (14.22%) non- ovulatory estrous and 11 (4.74%) double ovulations. The estrous cycle length was 32.68 ± 0.76 days, with external heat signs of 4.49 ± 0.23 days and time of ovulation in relationship to end of estrous of 5.68 ± 7.18 hours for Jennies during the observed period. The estrous cycle was 28.88 ± 0.95 days; with external heat signs of 4.50 ± 0.35 days and time to ovulation in relation to end of estrous of 8.0 ± 2.45 hours among 25 Jennies. Thus, considering the obtained results there was no reproductive seasonality. Twelve Jennies were casually selected for biopsy during diestrous being reproductively evaluated and subsequently submitted to one of those: natural mount (NM), AI- ES and AI-CS near the time of ovulations; and then submitted to endometrial biopsy 10 hours latter. Each fragment was maintained in formalin 10%, Bouin solution and Buffer glutaraldehyde 10% for Ligh Microscopy (LM), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM). The endometrial samples from Jennies in diestrous presented folds and endometrial grooves, microvillus cells and ciliated cells, free of process that could compromise reproduction. The estrous samples presented simple columnar epithelium, circled nuclei, condensed chromatin and at the cytoplasm, mitochondrial vacuoles and electro- dense corpuscles. Similar structures to blebs were present at the microvilli cell surface. The endometrial glands were completed by secretions that were shown with major evidence by opening on grooves or folds, which were circled by either microvilli or ciliated cells. Sub- epithelial capillary was presented as sparse with rare neutrophils and lymphocytes. After NM, AI-CS and AI-ES, microvilli cells presented granules of secretion at the apical region, secretory activity and expressive amount of neutrophils and less lymphocytes. Endometrial responses of Jennies were expressed by neutrophils quantification, with similar results as obtained after NM and AI-CS, independent from volume and sperm cell numbers for each event. For AI – ES, significant difference was observed by Tukey test ($p < 0.05$). According to the results, endometrial response of Pega Jennies is similar to the uterine response encountered in mares. However, the difference in relation to AI- ES makes necessary to perform further studies comparing pregnancy rates of NM and AI-ES in Pêga Jennies.

Keywords: jennies, estrous cycle, semen, endometrial biopsy, neutrophil.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus Celsius
%: porcentagem
B-Gase: B-glicuronidase
Ca: cálcio
cm: centímetro
cm²: centímetro quadrado
CRISP-3: cysteine-rich secretory protein
FTN-a: fator de necrose tumoral-alfa
HE: hematoxilina e eosina
IA: inseminação artificial
IA-SC: inseminação artificial com sêmen congelado
IA-SE: inseminação artificial com sêmen estendido
IL-1: interleucina 1
IL-6: interleucina 6
IL-10: interleucina 10
IL-1B: interleucina-1-beta
keV: quilo elétron-volt
kg: quilograma
m: metro
mc: microclima
MET: microscopia eletrônica de transmissão
MEV: microscopia eletrônica de varredura
mg/kg: miligrama por quilo
MHz: megahertz
min: minuto
ML: microscopia de luz
mL: mililitro
mm: milímetro
µm: micrometro
mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

nº: número

NAGase: N-acetil-B-D-glicosaminidase

nm: nanômetro

ON: óxido nítrico

P: fósforo

PGF2 α : prostaglandina F2 α

PMNs: polimorfonucleares

TM: tricrômico de Masson

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Delineamento utilizado nas 12 jumentas envolvidas no experimento. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.....	31
Tabela 2. Comprimento médio do ciclo estral, duração do estro e tempo de ovulação durante o período de maio/2012 a março/2013 (inverno, primavera e verão) para cada jumenta. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.....	38
Tabela 3. Quantificação de neutrófilos e linfócitos das biopsias endometriais das jumentas dos grupos experimentais. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.....	52

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 2.	Lote de jumentas que participaram do experimento. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.....	26
Figura 2.	Sinais externos característicos de estro em jumentas. Em A, mastigação: orelhas abaixadas e olhos fechados; em B, ato de monta; em C; urina (→) com cor leitosa no piso do curral; em D, monta de uma jumenta sobre a outra e cauda em bandeira. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.....	27
Figura 3.	Colheita de sêmen de jumento da raça Pêga. Em A, fase de excitação do macho; em B, ereção e desvio para a vagina artificial; em C, movimentos ejaculatórios; em D, ejaculação; em E, pós-ejaculação; em F, abertura da torneira da vagina artificial. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.....	29
Figura 4.	Materiais para biópsia. 1, pinça boca de jacaré; 2, luvas para palpação trans-retal; 3, tubo Falcon com meio de conservação; 4, placa acrílica para fragmentação da biópsia; 5, navalha; 6, recipiente contendo fixador. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.....	33
Figura 5.	Esquema utilizado na amostragem para a definição das áreas de contagem. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.....	36
Figura 6.	Médias do comprimento do ciclo estral entre as 25 jumentas durante o tempo monitorado. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014..	39
Figura 7.	Média em dias de estro das 25 jumentas durante o tempo monitorado. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.....	40
Figura 8.	Médias do número de estros das 25 jumentas durante o tempo monitorado. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.....	40
Figura 9.	Endométrio de jumenta da raça Pêga (<i>Equus asinus</i>) em diestro. A, fotomicrografia corada com Tricrômico de Masson; B, fotomicrografia corada com Hematoxilina-eosina; C e D, fotomicrografia eletrônica de varredura. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.....	42
Figura 10.	Endométrio de jumenta da raça Pêga (<i>Equus asinus</i>) em estro. A, foto-micrografia corada com Hematoxilina-eosina; B, fotomicrografia corada com Tricrômico de Masson; C e D, fotomicrografia eletrônica de varredura. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.....	44

- Figura 11. Endométrio de jumenta da raça Pêga (*Equus asinus*) em estro. Fotomicrografia eletrônica de transmissão; A (5.000X); B (10.000X); C (20.000X) e D (5.000X). FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014..... 45
- Figura 12. Endométrio de jumenta da raça Pêga (*Equus asinus*) dez horas após a monta natural. A, fotomicrografia corada com Hematoxilina-eosina; B, fotomicrografia corada com PAS; C, fotomicrografia corada com Alcian Blue; D, fotomicrografia corada com PAS e Alcian Blue. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014..... 47
- Figura 13. Endométrio de jumenta da raça Pêga (*Equus asinus*) dez horas após a monta natural. A e B, fotomicrografia eletrônica de varredura; C e D, fotomicrografia eletrônica de transmissão (10.000X). FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014..... 48
- Figura 14. Endométrio de jumenta da raça Pêga (*Equus asinus*) dez horas após a inseminação artificial com sêmen extendido. A e B, fotomicrografia corada com Tricrômico de Masson. C e D, fotomicrografia eletrônica de varredura. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014..... 49
- Figura 15. Endométrio de jumenta da raça Pêga (*Equus asinus*) dez horas após a inseminação artificial com sêmen congelado. A, fotomicrografia corada com Hematoxilina-eosina; B, fotomicrografia corada com Tricrômico de Masson; C, fotomicrografia eletrônica de varredura; C e D, fotomicrografia eletrônica de varredura; E, fotomicrografia eletrônica de transmissão (14.000X); F, fotomicrografia eletrônica de transmissão (5.000X). FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014..... 51

1. INTRODUÇÃO

Os asininos são usados no mundo todo como animais de guarda para proteção de pequenos ruminantes, animais de companhia, para tração de cargas, treinamento de animais jovens, como potros e bezerras e, atualmente, também na produção de muares (PUGH, 2002). O crescente interesse dos criadores de cavalos pela produção de muares, fruto do acasalamento de éguas com jumento (*Equus caballus* x *Equus asinus*), tornou necessários os estudos sobre a eficiência reprodutiva desses híbridos, visto que não se sabe como o útero equino reage ao sêmen de outra espécie (SANTOS et al., 2013).

A resposta inflamatória uterina de éguas ao sêmen de garanhões vem sendo estudada há algum tempo (KOTILAINEN et al., 1994). Como também não é bem esclarecido o comportamento do útero de jumenta ao sêmen do equino. Allen et al. 1993, investigaram 159 tentativas de prenhez, em sucessivas estações, com 51 jumentas e seis pôneis de fertilidade conhecida, usando monta natural ou inseminação artificial. Ocorreram somente 18 concepções (14%).

O sêmen criopreservado de jumento tem excelente qualidade, resultando com sucesso na concepção de éguas (JEPSEN et al., 2010; CANISSO et al., 2011). Contudo, Rota et al. (2012) observaram que os crioprotetores usados em seu estudo preservaram a motilidade e fertilidade do sêmen, porém ambos desencadearam a resposta inflamatória no endométrio das jumentas, pós inseminação artificial. Os resultados de Vidament et al. (2009), usando sêmen congelado de jumento, mostram que se foram de 36% de gestações em éguas e 11% em jumentas. A habilidade da jumenta para conceber, após ser inseminada com sêmen congelado é menor do que a égua (VIDAMENT et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012; CANISSO et al., 2011). Os protocolos de inseminação artificial usados para jumentas são os mesmos seguidos para éguas (VIDAMENT et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012), mesmo já existindo estudos demonstrando diferenças fisiológicas espécie-específicas entre ambas (VENDRAMINI et al., 1998; RENNER-MARTIN et al., 2009; MIRÓ et al., 2011; CLIMENT et al., 2012; VILÉS et al., 2013).

Nesse sentido, o presente trabalho procurou estabelecer a sazonalidade para a jumenta Pêga e a relação entre os achados histopatológicos endometriais com

diferentes protocolos para o uso do sêmen (fresco, estendido e congelado) correlacionando esses resultados com os baixos índices de gestação de jumentas quando inseminadas com sêmen congelado de jumento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Devido as características anatômicas da égua e as mudanças fisiológicas que ocorrem durante o estro, a cérvix mantém-se aberta, ocorrendo, sua completa adaptação ao processo uretral do macho, exposto durante a ereção da glândula e a ejaculação ocorrer em jatos, o sêmen é depositado no útero da fêmea (PICKETT et al., 1989).

A resposta inflamatória endometrial é um processo fisiológico para que ocorra a eliminar da luz uterina o excesso de espermatozoides, bactérias e outros agentes contaminantes ocorre naturalmente após a monta natural ou inseminação artificial em éguas. O processo inflamatório que é induzido pelos espermatozoides através do efeito de quimiotaxia sobre as células do sistema imunológico, propiciando a ativação de componentes do sistema complemento (WATSON, 2000). Uma resposta inflamatória mais prolongada, devido a ausência do plasma seminal, foi associada a inseminação artificial com sêmen congelado, ou ainda a uma reação de hipersensibilidade aos componentes dos crioprotetores utilizados (KOTILAINEN et al. 1994, DAHMS; TROEDSSON, 2002). Essa reação é espécie-específica e varia com o tipo de inseminação (sêmen crio-preservedo ou sêmen coletado fresco) (KOTILAINEN et al., 1994; KATILA, 2005, 2012; FIALA et al., 2007).

2.1. O plasma seminal

O plasma seminal é composto por moléculas que funcionam como um meio de transporte para o espermatozoide e possui propriedades espécies-específicas inibitórias e estimulatórias (ROBERTSON, 2005), facilita a interação entre os gametas masculinos competentes e o útero, aumentando a probabilidade de concepção e viabilidade do embrião (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005; ROBERTSON, 2007).

A supressão da ligação de neutrófilos e da fagocitose de espermatozóides vivos em comparação as células mortas e apoptóticas (TROEDSSON et al., 2006), e a inibição da ativação dos componentes C5 e C3 do complemento, que atuam na quimiotaxia de neutrófilos e na opsonização da fagocitose (TROEDSSON et al., 2000). As proteínas aderidas à membrana espermática seriam as responsáveis pela opsonização seletiva e pelo reconhecimento de diferentes populações de espermatozóides no trato genital feminino (TROEDSSON et al., 2006). A produção e inibição de diferentes citocinas durante o processo inflamatório pós cóbrição, participando da imunotolerância, essencial para a implantação e desenvolvimento do embrião também são ligados ao plasma seminal. (O'LEARY et al., 2004; ROBERTSON, 2005; JIWAKANON et al., 2011; SHARKEY et al., 2012).

2.2. Transporte, capacitação espermática e reação acrossômica

A interligação que ocorre entre o transporte espermático e a capacitação espermática in vivo, pode ser um ponto crítico para o controle da chegada ao oviduto de células capazes de fertilização (YANAGIMACHI, 1994). A junção útero-tubárica funciona com um reservatório de espermatozóides (THOMAS et al., 1994; SCOTT et al., 2000), onde mediado por proteínas espermáticas que se ligam à glicoproteínas do oviduto, ocorre uma adesão dos espermatozoides com a superfície da porção inicial da tuba uterina (BALL et al., 2003) e estando ligados às células do oviduto apresentam viabilidade prolongada e mantém o cálcio intracelular em níveis basais, prevenindo a capacitação prematura (DOBRINSKI et al., 1997). A fase do ciclo estral tem influência na ligação dos espermatozóides às células do epitélio do oviduto, que é maior na região do istmo do que na ampola da tuba uterina, (THOMAS et al., 1995). A variação na expressão das proteínas são devidos à fase do ciclo estral, e a fatores individuais em éguas na mesma fase do ciclo (BATTUT et al., 1995) assim também como a produção de muco, esteróides endógenos ou do conteúdo protéico da secreção do oviduto (THOMAS et al., 1994).

As alterações que possibilitam reação acrossômica é precedida pela capacitação espermática como um processo preparatório da mesma (AMANN; GRAHAM, 1993). A alteração do padrão de motilidade espermática, que é chamada de hiper-ativação ou hipermotilidade, também faz parte desse processo. O

espermatozóide adquire uma cobertura glicoprotéica durante a sua passagem pelo epidídimo que é adicionada de outras proteínas do plasma seminal, que são liberadas no momento da ejaculação. Essas proteínas mantêm a integridade da membrana espermática durante sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e são removidas no processo de capacitação espermáticas, permitindo a exposição dos receptores de membranas da célula espermática, ocorrendo também a retirada de componentes que recobrem a cauda do espermatozóide e que impediriam a alteração do padrão da motilidade (NOYES, 1953). A desestabilização da membrana plasmática do espermatozóide é necessária para possibilitar sua capacidade de fertilização e ocorre através da ligação do colesterol da membrana com proteínas da tuba uterina e de origem folicular (PARKS; EHRENWALD, 1990).

A reação acrossômica é essencial para a fertilização, sendo um processo irreversível onde ocorre a fusão e a formação de uma vesícula da membrana do acrossoma com a membrana plasmática da célula espermática, permitindo a liberação de suas enzimas hidrolíticas. Essa reação ocorre após a ligação do espermatozóide com a zona pelúcida, sendo parcialmente induzida por um componente glicoprotéico da zona pelúcida (YANAGIMACHI, 1994). A baixa incidência de reação *in vitro* que ocorre nos equinos, citado por Ellington et al. (1993b) e Meyers et al. (1996), sugere que componentes fisiológicos adicionais, como a progesterona presente no fluido folicular seja necessária, o que foi demonstrado por Cheng et al., (1998) mediante o efeito aditivo da progesterona do fluido folicular com proteínas da zona pelúcida na indução da reação acrossômica, confirmando ser a progesterona é o mais importante componente do fluido folicular necessário para este evento ocorra na espécie equina.

2.3. Reação inflamatória do útero induzida pela cobertura

2.3.1. Mecanismos de defesa uterina

O espermatozóide é o maior responsável pela indução da resposta inflamatória aguda do endométrio, além das proteínas do plasma seminal e bactérias do sêmen e do pênis do garanhão em um grau, quando o sêmen é depositado na luz uterina por monta natural ou inseminação artificial (TROEDSSON, 1997).

A contratilidade uterina é um dos mais importantes mecanismos para limpeza física da luz uterina, eliminando o agente indutor, componentes e subprodutos inflamatórios (EVANS et al.; 1987; LEBLANC et al.; 1994; TROEDSSON et al., 1993).

Os componentes C3 e C5 do sistema complemento, e as demais imunoglobulinas produzidas pela mucosa uterina e provenientes do plasma sanguíneo, atraem e facilitam a fagocitose por neutrófilos, a primeira e mais importante célula de defesa do útero, em resposta imediata pós o contato do sêmen com o interior do útero (TROEDSSON, 1997). Neutrófilos já estão presentes na luz uterina 30 minutos após a cobertura, ocorrendo o pico inflamatório ocorre em 12 horas, sendo um processo fisiológico, necessário para a eliminação de espermatozóides mortos ou com anormalidades morfológicas, bactérias, células inflamatórias e subprodutos da inflamação (KATILA, 1995; TROEDSSON, 1997).

Sendo o espermatozóide o principal causador da inflamação uterina (KOTILAINEN et al., 1994), éguas que receberam infusão de plasma seminal, a quantidade de neutrófilos coletados da luz uterina não foi diferente entre 2, 4 ou 24 horas (FIALA et al., 2002). Os estudos de Kotilainen et al. (1994), comparando o efeito da inseminação com sêmen congelado, sêmen fresco e diluentes de sêmen, demonstraram que quanto maior a concentração e o número de espermatozóides da dose inseminante, mais intensa é a resposta leucocitária. Comparando doses inseminantes de 100 milhões, 500 milhões e 1 bilhão de espermatozóides em um volume de 20 mL. A quantidade de neutrófilos observada por Fiala et al. (2007) na luz uterina foi maior nas éguas inseminadas com 1 bilhão do que naquelas inseminadas com menor concentração de espermatozóides nas 2 horas e 4 horas após a inseminação. Independente da dose inseminante, o número de neutrófilos no útero nas 24 horas foi significativamente menor do que o observado nas coletas realizadas 4 horas após a inseminação, ficando demonstrado o início da resolução da inflamação e que está completa após 48 horas (KATILA, 1995).

2.3.2. Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios

O processo inflamatório inicia-se liberando os mediadores pró-inflamatórios que são liberados pelos neutrófilos, pelas células do endotélio vascular e células

endometriais lesadas e pelos macrófagos ativados pela inflamação. Esses mediadores têm a função de atrair mais células de defesa para o local da inflamação, facilitando o acesso dessas células e melhorando a eficiência na eliminação do agente agressor. As prostaglandinas induzem alterações na permeabilidade vascular, as citocinas mantêm a inflamação ativa e as collagenases, elastases e gelatinases favorecem o aporte celular e iniciam o processo de reparação. O óxido nítrico (ON) é responsável pela lise de bactérias no interior dos neutrófilos (McKAY, 2000).

Na inflamação aguda, altas concentrações de lisosima estão presentes e estas são potentes opsoninas para neutrófilos. A plasmina é uma enzima fibrinolítica, propiciando a liberação de fragmentos peptídicos que são quimiotáticos para os neutrófilos (TIZARD, 1998). Nos granulócitos dos equinos, a atividade da N-acetil-B-D-glicosaminidase (NAGase) e da fosfatase ácida é alta, enquanto a da enzima B-glicuronidase (B-Gase) é menor, nos granulócitos, quando comparados aos leucócitos mononucleares nos equinos (REILAS, 2001).

Comparando aos níveis basais, a expressão de mRNA para Interleucina-1-beta (IL-1B), Fator de Necrose Tumoral-Alfa (FTN-a) e Interleucina 6 (IL-6) aumentou 24 horas após a inseminação artificial, em éguas resistentes a endometrite pós-cobertura (FUMOSO et al., 2003). A atividade da interleucina-8 (IL-8), uma citocina pró-inflamatória com potente efeito quimiotático sobre os neutrófilos (McKAY, 2000), também varia em resposta à inseminação artificial (FUMOSO et al., 2006). Os mediadores pró-inflamatórios que são liberados induzidos por um estímulo, promove o aparecimento de mecanismos e moléculas que atuam encerrando o processo inflamatório, tão logo ele deixe de ser necessário. Essas moléculas atuam inibindo a produção de citocinas, bloqueando receptores celulares ou induzindo a morte celular. A Interleucina 10 (IL-10) tem a função exclusiva de inibir a produção de mediadores pró-inflamatórios. As células produzem um subtipo de IL-1, que não age como citocina, mas que bloqueia receptores para a IL-1B, impedindo seus efeitos. A interleucina 6 (IL-6), que é uma citocina pró-inflamatória na fase aguda, num estágio mais avançado, pode induzir a apoptose dos neutrófilos e eliminar subprodutos inflamatórios, evitando a liberação no próprio tecido (McKAY, 2000).

2.3.3. Variações hormonais

Os mecanismos de defesa uterina são influenciados pelos hormônios esteróides, e sob o domínio estrogênico há edemaciação, aumento da produção de muco e hiperemia, favorecendo o aporte de neutrófilos, apresentando contrações miometriais de forma rítmica, propiciando a limpeza uterina através da cérvix que, nesta fase, encontra-se aberta. Com altas concentrações de progesterona, a cérvix encontra-se fechada e as contrações miometriais apresentam períodos longos de contração, com baixa amplitude. Todos estes fatores fazem com que a égua em diestro esteja menos apta a eliminar uma possível contaminação e inflamação uterina (EVANS et al., 1987; JONES et al., 1991).

2.3.4. Exames histopatológicos do endométrio

O exame histopatológico do endométrio permite avaliar alterações morfológicas e processos inflamatórios, permitindo o diagnóstico de afecções endometriais como o prognóstico gestacional, além das fases decorrentes da estacionalidade e do ciclo estral da égua (KENNEY, 1975). A resposta inflamatória observada na biópsia endometrial pode ser aguda, crônica ou combinadas. Os neutrófilos são células predominantes em casos de inflamação aguda, sendo mais evidentes no estrato compacto e epitélio luminal. Nas inflamações crônicas, são mais caracterizadas as infiltrações linfocitárias, aparecendo com menor frequência os plasmócitos, siderófilos e eosinófilos (KENNEY; DOIG, 1986).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Avaliar a resposta inflamatória endometrial em jumentas após a exposição ao sêmen fresco, sêmen estendido e sêmen congelado sob o aspecto morfológico e quantitativo.

3.2. Objetivos específicos

Caracterização do ciclo estral de jumentas da raça Pêga.

Descrição estrutural e ultraestrutural do endométrio de jumentas expostas ao sêmen fresco, estendido e congelado.

Quantificação de neutrófilos e linfócitos do endométrio de jumentas expostas ao semen fresco, estendido e congelado.

4. METODOLOGIA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), em reunião realizada no dia 11 de março de 2014, sob protocolo nº 03291/14.

4.1. Localização

Foi realizado em uma fazenda de produção situada no município de Orlandia, SP, região da Alta Mogiana, com latitude de 20° 39' 01.33"S, longitude 47° 48.19' 57"S e elevação de 629 m, mc 45 com precipitação pluviométrica anual de 1.228 mm.

4.2. Animais e manejo

Foram utilizadas fêmeas adultas da espécie asinina (*Equus asinus*), da raça Pêga, criadas e recriadas a campo (Figura 1). O lote monitorado era composto por 25 jumentas, sendo todas registradas, submetidas às avaliações raciais e morfológicas pela Associação Brasileira de Criadores de Jumentos Pêga (ABCJPêga - Belo Horizonte, MG).

As jumentas tinham idade de $10,5 \pm 6,5$ anos e peso de 330 ± 42 kg, sendo este mantido até o fim do experimento. As jumentas eram nulíparas (3) e pluríparas (22), todas não prenhes e apresentavam-se normais quanto à ciclicidade. As jumentas foram identificadas individualmente com a numeração de registro e número de controle da propriedade, marcadas a fogo.

Durante todo o período experimental, maio de 2012 a março de 2013, as jumentas foram mantidas em piquetes formados por diferentes tipos de gramíneas [coast-cross (*Cynodon dactylon*), estrela africana (*Cynodon nlemfuensis* vr. *nlemfuensis*), colômbio (*Panicum maximum* Jacq vr. Colômbio) e grama batatais (*Paspalum notatum*)], recebiam sal mineral com relação Ca:P de 3:1 em cocho coberto, abastecido diariamente *ad libitum*, e a água era fornecida em caixas de metal, canalizada de nascentes da mesma propriedade. Os animais receberam

ração balanceada nos meses de inverno (junho-julho e agosto) na proporção de 1:100 kg do peso corporal.



Figura 1. Lote de jumentas que participaram do experimento. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

4.3. Caracterização do ciclo estral

O lote de jumentas foi monitorado durante os meses de maio de 2012 a março de 2013. As fêmeas foram rufiadas por jumento com libido e fertilidade conhecidas. As rufiações foram feitas diariamente no período da manhã, colocando o jumento em curral próximo ao das fêmeas. Eles tinham contatos visuais e podiam ter contato físico através da cerca de separação. Os sinais externos característicos de estro foram observados e anotados. Esses sinais foram: micção em grandes jatos, urina de odor característico acentuado e coloração leitosa, abrir e fechar de boca (mastigação) com intensa salivação, cauda levantada e estendida, montas mútuas e interesse pelo macho (Figura 2). As jumentas que manifestavam estro foram acompanhadas por exames de palpação transretal e ultrassonografia, logo após a rufiação e até serem observados folículos pré-ovulatórios, quando as jumentas passavam a ser examinadas a cada 12 horas, até o momento da ovulação. Com essas observações houve a possibilidade de caracterização dos ciclos estrais

das jumentas. Foram realizadas mensurações (em dias) do comprimento do ciclo estral, a duração do tempo de manifestação externa do estro (em dias) e a ocorrência da ovulação com relação ao término do estro (dias ou horas). Também foi possível comparar as diferenças dessas medições entre as 25 jumentas estudadas.



Figura 2. Sinais externos característicos de estro em jumentas. Em A, mastigação; orelhas abaixadas e olhos fechados; em B, ato de monta; em C; urina (→) com cor leitosa no piso do curral; em D, monta de uma jumenta sobre a outra e cauda em bandeira. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

4.4. Seleção e acompanhamento dos animais para biopsia endometrial

Deste total de 25 jumentas, 12 foram separadas ao acaso, somente pelas identificações individuais (numeradas de 1 a 12) e divididas em 4 sub-grupos de 3 fêmeas, porém mantendo-se juntas no mesmo manejo. As fêmeas selecionadas receberam uma aplicação de 1,0 mL (0,265mg) de PGF2 α ¹, por via intramuscular. A rufiação teve início no terceiro dia pós-aplicação, sendo realizada uma vez ao dia. As

¹ Ciosin®. MSD Saúde Animal. São Paulo-SP.

fêmeas que apresentavam sinais de estro foram acompanhadas por exames de palpação transretal e ultrassonografia, logo após a rufiação. Esse procedimento era executado até serem observados folículos pré-ovulatórios, passando as avaliações para cada 12 horas, até o momento da ovulação. A realização dos exames ocorria em brete convencional para colheita de embriões e o aparelho de ultrassom usado era da marca Myndray – modelo 75 L 50 EAV com transdutor linear de 5 MHz.

As jumentas dos grupos experimentais foram cobertas ou inseminadas próximo a ovulação e permaneceram em um piquete de espera, por um período de 10 horas, quando foram efetuadas as biópsias.

4.5. Sêmen utilizado

4.5.1. Sêmen fresco (MN)

As montas naturais foram efetuadas por jumento da raça Pêga, com fertilidade já conhecida. Durante 10 dias consecutivos, colheu-se sêmen para obtenção da concentração espermática aproximada que foi de 8×10^9 células em um volume de plasma seminal de aproximado de 80 ± 12 mL.

A vagina artificial (modelo Colorado) utilizada foi a mesma usada para equinos, sendo preparada semelhantemente. Era composta por um tubo rígido e duas mucosas, sendo uma de látex e uma de plástico descartável. A temperatura no interior da vagina foi dada pela água colocada entre a estrutura rígida e a mucosa de látex. Foram colocados de 1,5 a 2,0 litros de água com aproximadamente 45°C , completando o volume necessário com ar insuflado, mimetizando a vagina da jumenta, possibilitando a penetração e ejaculação. A lubrificação foi feita com gel neutro. Na extremidade da mucosa descartável, foi fixado um recipiente, onde foi depositado o sêmen ejaculado. O ejaculado foi filtrado em filtro próprio para sêmen, realizada a aferição do volume em mL e concentração das células espermáticas em câmara de Newbawer.

A colheita do sêmen do jumento ocorreu como demonstrada na sequência de fotos abaixo (Figura 3).



Figura 3. Colheita de sêmen de jumento da raça Pêga. Em A, fase de excitação do macho; em B, ereção e desvio para a vagina artificial; em C, movimentos ejaculatórios; em D, ejaculação; em E, pós-ejaculação; em F, abertura da torneira da vagina artificial. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

4.5.2. Colheita e preparo do sêmen estendido e congelado

Do mesmo jumento utilizado para as rufiações e montas naturais foram também feitas as colheitas do sêmen a ser usado nos grupos de sêmen estendido e congelado.

4.5.2.1. Sêmen estendido (SE)

A extensão do sêmen foi feita, baseando-se na quantidade de células espermáticas no volume ejaculado de 80 ± 12 mL, com concentração de 8×10^9 de espermatozoides totais.

Diluiu-se o semen com extensor BotuSêmen² na proporção de 1:1, do qual foi usado a metade do volume total obtido para as inseminações, sendo esse volume semelhante ao volume do ejaculado total. A dose inseminante foi de aproximadamente 4×10^9 de células espermáticas, sendo depositado na parte medial do corno uterino, ipsilateral à ovulação.

4.5.2.2. Sêmen congelado

Após a colheita do sêmen, este foi filtrado usando filtro próprio para sêmen, estendido com o BotuSêmen, centrifugado para a separação das células espermáticas e re-suspendido em BotuCrio³, que foi o meio usado para o congelamento.

A contagem de células espermáticas foi feita em câmara de Neubauer, seguindo os padrões já estabelecidos, para se obter a concentração usada para a congelação, que foi de 3×10^6 de espermatozoides por dose inseminante. O sêmen foi envazado em palhetas de 0,5 mL e colocado para resfriamento em geladeira a 4°C, durante 20 minutos, depois foi colocado no vapor de nitrogênio a 9,0 cm de altura do nitrogênio líquido, durante 20 minutos, em seguida foi mergulhado no nitrogênio líquido a -196°C. O descongelamento foi feito no momento da inseminação, usando água aquecida a 42°C de temperatura, durante 20 segundos. Foram usadas três palhetas para cada inseminação, sendo o sêmen depositado na parte medial do corno uterino, ipsilateral à ovulação.

4.6. Biópsias endometriais

4.6.1. No diestro

Para avaliar a integridade do endométrio, as fêmeas selecionadas foram sincronizadas e, na fase de diestro, foi feita biópsia endometrial no 3º dia após a ovulação.

² BotuSêmen®. Botupharma Biotecnologia Animal. Botucatu-SP.

³ BotuCrio®. Botupharma Biotecnologia Animal. Botucatu-SP.

4.6.2. Nos grupos experimentais

Após as biópsias feitas nas jumentas em diestro, prosseguiu-se com o mesmo manejo de rufiação e detecção de estros. Os protocolos, para as 12 jumentas envolvidas no experimento, seguiram os parâmetros de acordo com a tabela abaixo no período de maio de 2012 a março de 2013 (Tabela 1).

Tabela 1. Delineamento utilizado nas 12 jumentas envolvidas no experimento. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

Período	Jumentas			
	1 – 2 – 3	4 – 5 – 6	7 – 8 – 9	10 – 11 – 12
Mai-Jun-Jul-	MN	IA-SE	IA-SC	Estro
Ago-Set-Out	IA-SE	MN	Estro	IA-SC
Nov-Dez-Jan	IA-SC	Estro	MN	IA-SE
Fev- Mar	Estro	IA-SC	IA-SE	MN

MN, monta natural; IA-SE, inseminação artificial com sêmen extendido; IA-SC, inseminação artificial com sêmen congelado; E, estro.

As biópsias endometriais foram realizadas no terceiro dia após os sinais característicos de estro, constituindo o grupo testemunha; e 10 horas após a MN ou IA-SE ou IA-SC, para os grupos experimentais.

As jumentas foram colocadas no brete de contenção, mantendo-se em posição quadrupedal, contidas somente pelas laterais do mesmo. A cauda era protegida por luva plástica e presa na lateral esquerda do brete. A limpeza do reto era feita usando luvas de palpação transretal e procedia-se a higienização da região perineal, usando água e detergente neutro, secagem com papel toalha e a assepsia era com álcool 70%, através de um borrifador de plástico.

Os lábios vulvares foram separados por um auxiliar e a pinça de biópsia⁴ (comprimento de 70 cm e parte cortante de 20x4x3mm – “boca de jacaré”) era introduzida no interior da vagina, até alcançar a cérvix. Para auxiliar a introdução para o interior do útero, a cérvix era aprisionada entre os dedos indicador e médio,

⁴Hauptner. Alemanha.

sendo a ponta da pinça guiada com o dedo polegar para o óstio externo da cérvix, chegando até o lúmen uterino, mantendo a parte cortante da pinça fechada. A mão esquerda era retirada da vagina e colocada no reto, para guiar a ponta da pinça. A trava da pinça era liberada, abrindo a parte cortante da mesma. Fazendo-se uma leve pressão na parede do útero sobre a parte cortante da pinça e apertando-se a trava com a mão direita, o corte era feito em uma única vez. O fragmento era retirado do local onde ocorre a implantação do embrião, na junção entre corpo e corno direito ou esquerdo (RICKETTS, 1975; SILVA et al., 1987; QUEIROZ, 1991), de acordo com a técnica desenvolvida para égua, segundo Kenney e Doig (1986) e Silva et al. (1987). A pinça era removida do interior do útero contendo fragmento de aproximadamente 2,0 cm de endométrio, sendo representativo de todo o órgão, segundo Kenney (1978). A técnica usada para as biópsias endometriais das jumentas seguiu aquela descrita para éguas, segundo os autores citados, com algumas adaptações feitas para jumentas. Logo após a realização das biópsias foram administrados analgésicos [dipirona⁵ (10 mg/kg, via endovenosa) e fenilbutazona⁶ (2,2 mg/kg, via intramuscular)] para evitar desconforto doloroso para o animal.

Os materiais usados para as biópsias compunham kit contendo luvas de palpação retal de cinco dedos, seringa de 20 mL, placas de Petri de 60 mm, navalha para fragmentação da amostra, solução fisiológica e pinça específica para biópsia uterina (Figura 4).

⁵ D-500®. Fort Dodge Saúde Animal Ltda. Campinas-SP.

⁶ Equipalazone®. Marcolab Saúde Animal. Duque de Caxias-RJ.



Figura 4. Materiais para biópsia. 1, pinça boca de jacaré; 2, luvas para palpação trans-retal; 3, tubo Falcon; 4, placa acrílica para fragmentação da biópsia; 5, navalha; 6, recipiente contendo fixador. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

As amostras biopsiadas foram colocadas em placas de Petri e fragmentadas em cortes menores e colocadas em solução de formaldeído 10% e solução de Bouin para análise posterior em microscopia de luz, e em solução de glutaraldeído a 2,5% para microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.

4.7. Técnicas para avaliações histológicas

Para as análises histológicas das amostras do endométrio foram usadas: Microscopia de luz (ML), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Para o estudo histológico em microscopia de luz, os fragmentos endometriais foram fixados em solução de Bouin e formaldeído a 10% e, posteriormente, incluídos em paraplast (Histosec® - Merck) mediante realização de rotina histológica convencional, seguida de microtomia em micrótomo automático (Leica - RM2155) com auxílio de navalhas descartáveis. Cortes de cinco micrômetros foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômico de Masson (TM) e Alcian Blue, de acordo com as técnicas descritas. As preparações histológicas foram analisadas em microscópio de luz (Leica, DM5000 B) ao qual está acoplada a câmera Leica

DFC300FX para a fotodocumentação. Os procedimentos foram efetuados no Setor de Microscopia do Laboratório de Anatomia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, UNESP.

Para a microscopia eletrônica de varredura, seguindo metodologia estabelecida pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV/UNESP, fragmentos das biópsias endometriais foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) por 48 horas, lavadas em tampão fosfato, tratadas com ósmio a 1% , lavadas novamente em tampão fosfato, desidratadas em série crescente de alcoóis (30 a 100%), durante pelo menos 20 min cada etapa, secas ao ponto crítico no aparelho EMS® 850, metalizadas com átomos de ouro em aparelho DESK II⁷ e examinadas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL®⁸, operando com feixe de elétrons de 15 keV, onde alguns espécimes foram documentados.

Para a microscopia eletrônica de transmissão, seguindo metodologia estabelecida pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica da FMRP/USP, fragmentos das biópsias endometriais foram fixados em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) por 48 horas e, após esse tempo, lavadas em tampão fosfato. Em seguida, foram pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2% por duas horas. Em seguida, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, a infiltração foi feita com cola araldite e acetona e a inclusão em cola araldite. Foram realizados cortes semi-finos em micrótomo com lâmina de vidro com 0,5 µm de espessura, e corados com azul de toluidina a 1% em ácido bórico saturado. Os melhores cortes foram selecionados, obtendo-se os cortes ultrafinos com navalha de diamante a 60 nm de espessura, os quais foram contrastados, observados e eletronicografados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL - JEM 1010).

4.7.1. Quantificação das células inflamatórias

A quantificação das células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos) baseou-se, primeiramente, na amostragem aleatória e sistemática, com o uso de tabela de números aleatórios, para posteriormente promover a contagem. Esta amostragem

⁷ DESK II®. Deton Vaccun, NJ, EUA.

⁸ JEOL®. JSM 5410, Tokyo, Japão

objetivou minimizar o erro e efetuar uma estimativa mais eficiente dos números de neutrófilos e linfócitos. Foram feitas quatro amostragens sucessivas para a seleção das lâminas histológicas, das secções histológicas, dos campos (1) de amostragem, dos campos (2) de amostragem para, então, finalmente definir as áreas de contagem. As imagens dos campos (1), dos campos (2) e das áreas de contagem foram capturadas em câmera digital DFC 300FX acoplada ao microscópio Leica DM5000B utilizando, respectivamente, as objetivas de 5x, 20x e 40x. As áreas de contagem eram formadas por quatro quadrantes e em cada quadrante foi aplicada uma frame de contagem cuja área total era de 182 cm². Os neutrófilos e linfócitos que se encontravam dentro desta frame eram contados. Nos quadrantes que, por ventura, não apresentavam as células inflamatórias assumia-se valor igual a zero. Cada evento era formado por 12 lâminas, sendo cada lâmina representativa de uma égua. Cada lâmina apresentava, por sua vez, oito secções histológicas.

Na figura 5 encontra-se o esquema para auxiliar o entendimento da amostragem para a definição das áreas de contagem. Nota-se que para cada um dos eventos foi aplicada esta mesma metodologia.

Amostragem 1 – Lâminas histológicas: do total de 12 lâminas foram selecionadas aleatoriamente quatro lâminas. Para a escolha da primeira lâmina foi utilizada a tabela de números aleatórios e posteriormente a fração de 1/3 para a escolha das três outras lâminas.

Amostragem 2 – Secções histológicas: partindo-se das lâminas amostradas no item anterior, do total de oito secções histológicas, foram amostradas quatro secções por lâmina. Foi utilizada a tabela de números aleatórios, para a escolha da primeira secção histológica, e aplicada a fração de 1/2 para a escolha das demais secções.

Amostragem 3 – Campo (1) de amostragem: Em cada secção amostrada anteriormente, foram capturados, no aumento de 5x, dois campos de amostragem. Porém, apenas um campo foi amostrado a partir da aplicação da fração de 1/2 e da tabela de números aleatórios.

Amostragem 4- Campo (2) de amostragem: do campo 1 amostrado anteriormente, foram capturados, no aumento de 20x, três campos de amostragem.

Porém apenas um campo foi amostrado. Para tanto, utilizou-se a tabela de números aleatórios e a fração de 1/3.

Definição da área de contagem: Selecionado o campo (2) de amostragem, foi definida a área de contagem, no aumento de 40x. A área de contagem era composta por quatro quadrantes e em cada quadrante foi feita a contagem de células inflamatórias.

Sumarizando, para cada evento, foram utilizadas um total de quatro lâminas, 16 secções histológicas, 16 campos (1) de amostragem, 16 campos (2) de amostragem e 16 áreas de contagem com quatro quadrantes cada, totalizando 64 quadrantes, onde efetivamente foram feitas as contagens de células inflamatórias.

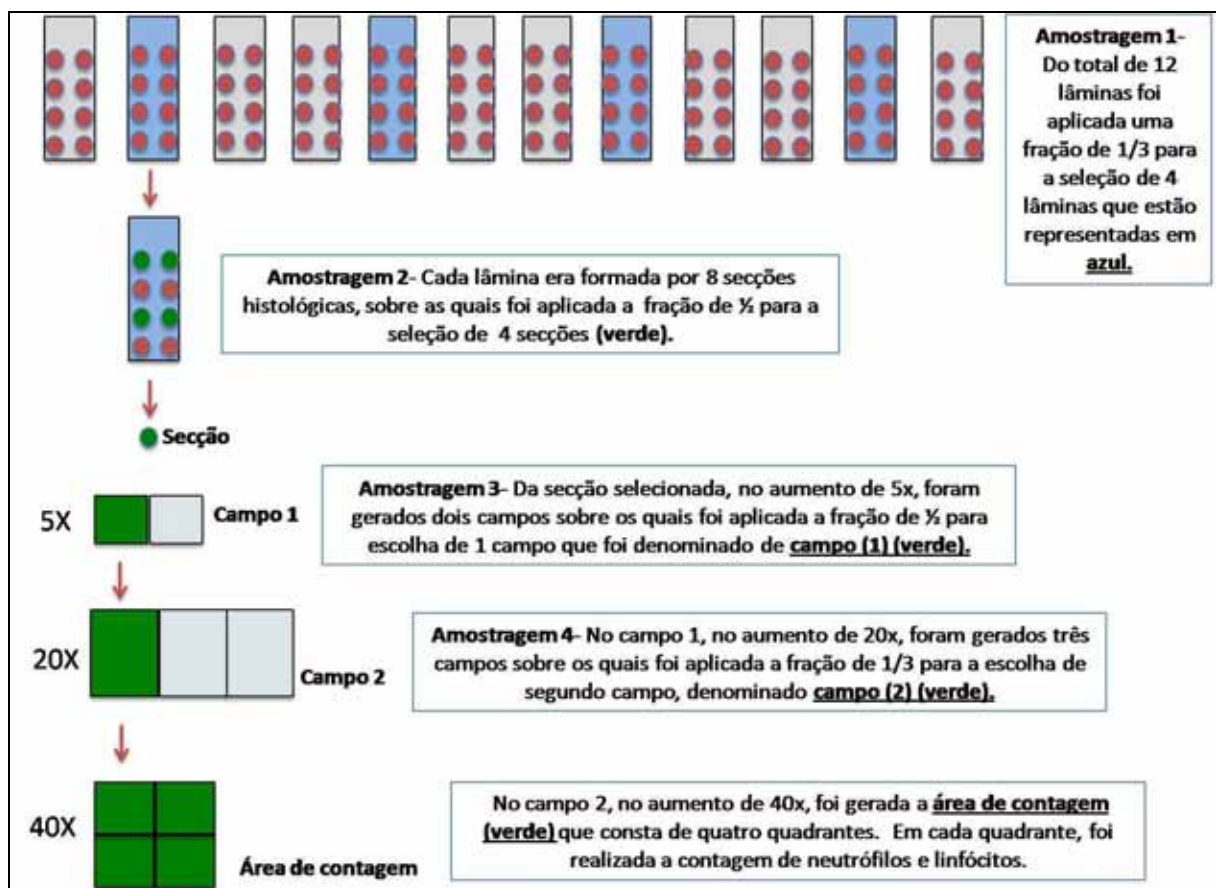


Figura 5. Esquema utilizado na amostragem para a definição das áreas de contagem. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

4.8. Lavado uterino

Os lavados uterinos foram feitos entre o 7º e o 9º dia após a MN, IA-SE e IA-SC para evitar a possibilidade de ocorrer gestações, tornando-se necessário a retirada dessa fêmea do experimento. Para o processo, foi utilizado solução de Ringer com lactato, à temperatura de 37°C, volume de 1,0 litro por jumenta, usando sonda, equipo e filtro para colheita de embriões.

4.9. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância de medidas repetidas (ANOVA). Constatada a significância, foi aplicado o teste Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias. Os dados obtidos foram apresentados como valores médios \pm erro padrão da média (EPM).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da ciclicidade em jumentas Pêga

A caracterização do ciclo estral da jumenta Pêga em relação aos intervalos de sinais externos de estro, tempo de duração dos sinais externos de estro (comprimento do ciclo estral) e tempo de ovulação em relação ao término do estro estão descritos na Tabelas 2.

Tabela 2. Comprimento médio do ciclo estral, duração do estro e tempo de ovulação durante o período de maio/2012 a março/2013 (inverno, primavera e verão) para cada jumenta. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

Jumenta	Número de estros	Comprimento do ciclo estral (dias)	Duração média do estro (dias)	Tempo médio de ovulação / término do estro (horas)	Número deaios anovulatórios
1	9	35,37	4,55	6	2
2	11	31,70	4,67	12	2
3	10	32,78	4,5	0	2
4	9	33,12	4,75	6	0
5	10	30,22	4,34	18	2
6	10	33,25	4,25	6	2
7	8	34,57	4,12	10	1
8	10	37,5	4,78	18	1
9	10	33,75	4,25	0	1
10	9	32,28	4,40	6	2
11	10	30,0	4,25	-12	1
12	10	32,77	4,87	6	0
13	10	30,11	4,78	0	2
14	9	37,87	4,14	6	1
15	9	29,87	4,28	6	1
16	8	36,85	4,50	0	1
17	9	35,25	4,22	12	1
18	9	29,75	4,57	6	1
19	9	27,75	4,50	0	2
20	8	37,42	4,25	6	1
21	9	32,12	4,85	12	1
22	10	30,33	4,37	0	1
23	10	32,0	4,60	-6	2
24	9	26,75	4,71	18	1
25	10	33,5	4,75	6	2
	9,4±0,76	32,68±2,98	4,49±0,23	5,68±7,18	1,32±0,63

A média dos intervalos entre os ciclos estrais foi de $24,7 \pm 3,0$ dias durante o período observado entre as 25 jumentas (Figura 6). A média do tempo de sinais característicos de estro foi de $4,50 \pm 0,35$ dias por período entre as 25 jumentas observadas (Figura 7).

As ovulações ocorreram com tempo médio de $12 \pm 2,4$ horas em relação ao término do cio por ciclo estral de cada jumenta e $8,0 \pm 2,45$ horas por período entre as 25 jumentas observadas durante o período. Ocorreram 33 (14,22%) estros anovulatórios e 11 (4,74%) duplas ovulações em um total de 234 estros durante o tempo observado (Figura 8). O peso médio das jumentas, que era de 330 ± 42 kg, manteve-se até o término do experimento.

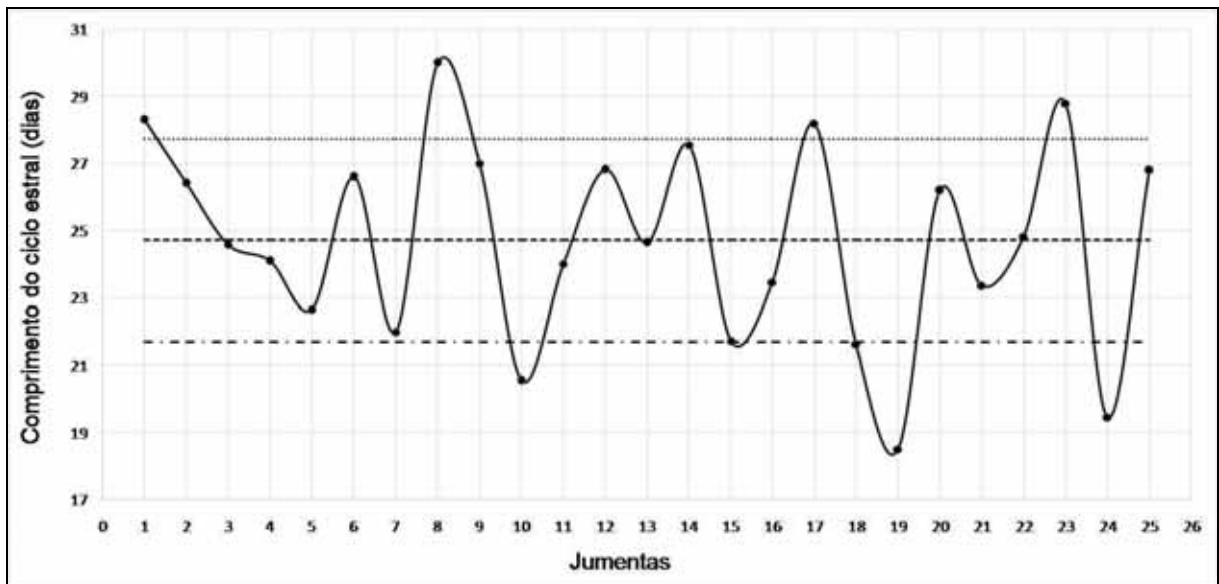


Figura 6. Médias do comprimento do ciclo estral entre as 25 jumentas durante o tempo monitorado. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

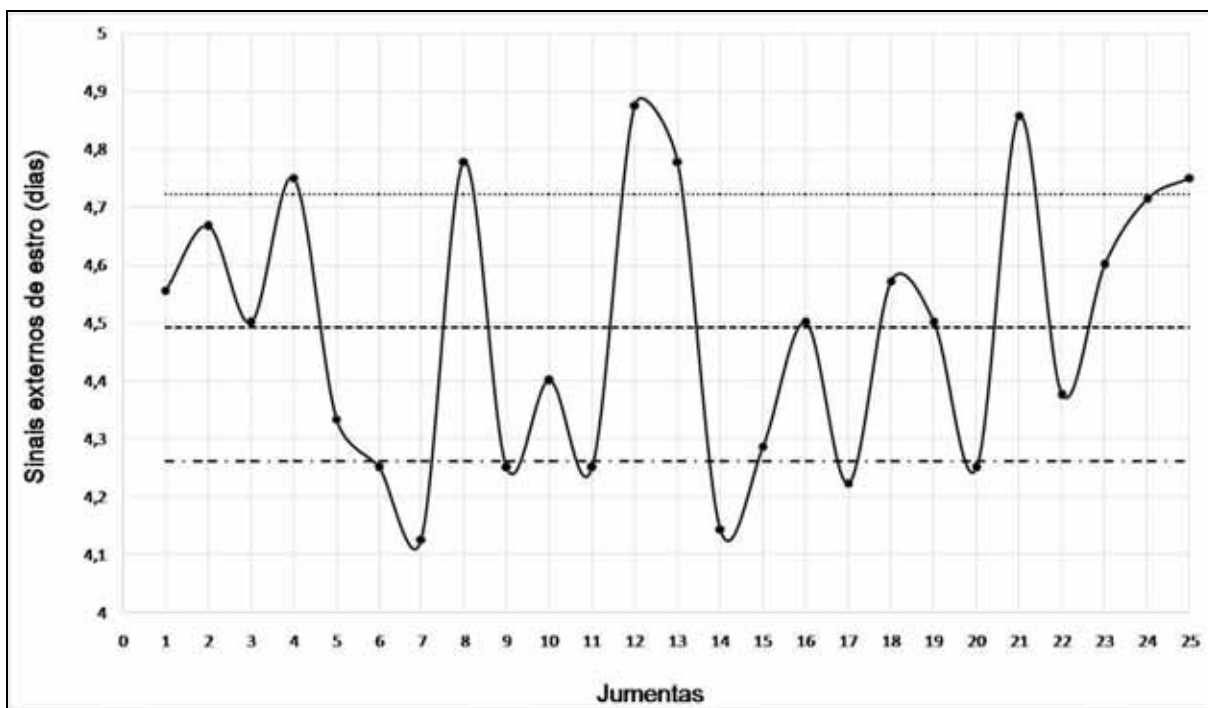


Figura 7. Média em dias de estro das 25 jumentas durante o tempo monitorado. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

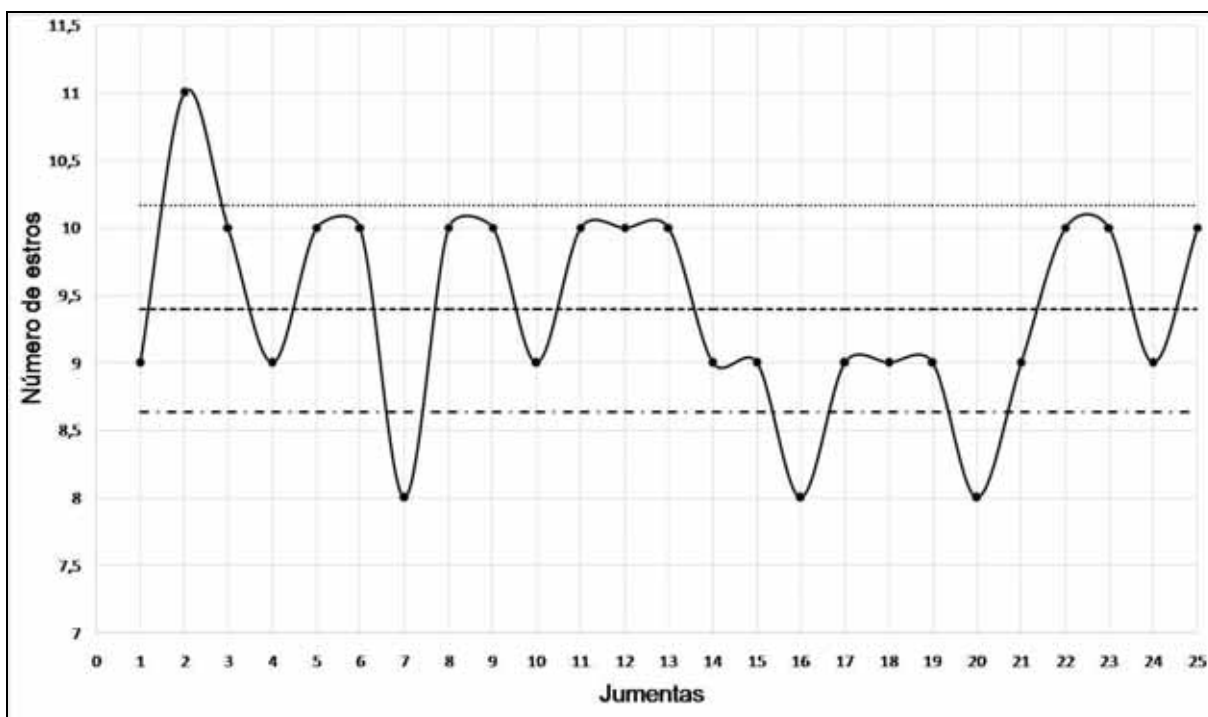


Figura 8. Médias do número de estros das 25 jumentas durante o tempo monitorado. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

5.2. Histologia das biopsias endometriais

5.2.1. Diestro

À microscopia de luz, o endométrio de jumenta em diestro apresentou um epitélio colunar cilíndrico com células ciliadas e microvilosas, núcleos redondos ou ovalados, dispostos mais na porção basal da célula. A lâmina própria, subjacente constituída de tecido conjuntivo frouxo, evidenciando as glândulas endometriais, com lúmen contraído e sem secreção. Estas glândulas mostraram-se revestidas por epitélio simples com células ciliadas e microvilosas. Presença de vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos e raros linfócitos (Figura 9, A e B).

À microscopia eletrônica de varredura, o útero da jumenta em diestro, apresentou-se com pregas nos cornos uterinos, dispostos paralelos e longitudinalmente em direção ao corpo do útero. Ao longo das pregas primárias são observadas pregas menores ou secundárias. As aberturas das glândulas endometriais são raramente visíveis. As células do epitélio luminal apresentaram-se com aspecto poligonal na sua superfície apical, exibindo dois tipos de células que são as células ciliadas e as células microvilosas. Os tufo de cílios das células ciliadas abrem-se em formato de galho e as células vilosas são recobertas de microvilos e “bolhas” de secreção. As células ciliadas mostram-se em menor número do que as células vilosas no epitélio luminal do endométrio da jumenta em diestro. O endométrio apresentou epitélio luminal com células colunares, sendo de dois tipos de células, as ciliadas com cílios bem desenvolvidos e microvilosos com pequenos microvilos. As células microvilosas apresentavam na sua porção apical do citoplasma os depósitos de glicogênio e as células ciliadas mostravam vacúolos, mitocôndrias e corpúsculos elétron-densos. Na parte apical, entre as células, foram notadas a zona de oclusão e a zona de aderência e entre as membranas celulares, estavam presentes os desmossomos. Os núcleos apresentavam-se com formato ovalados e com a heterocromatina condensada, estando dispostos mais basais nas células. As células da parede das glândulas endometriais foram semelhantes às células do epitélio luminal. Na luz da glândula foi observado conteúdo das atividades secretórias das células. As interligações do espaço intercelular foram observadas (Figura 9, C e D).

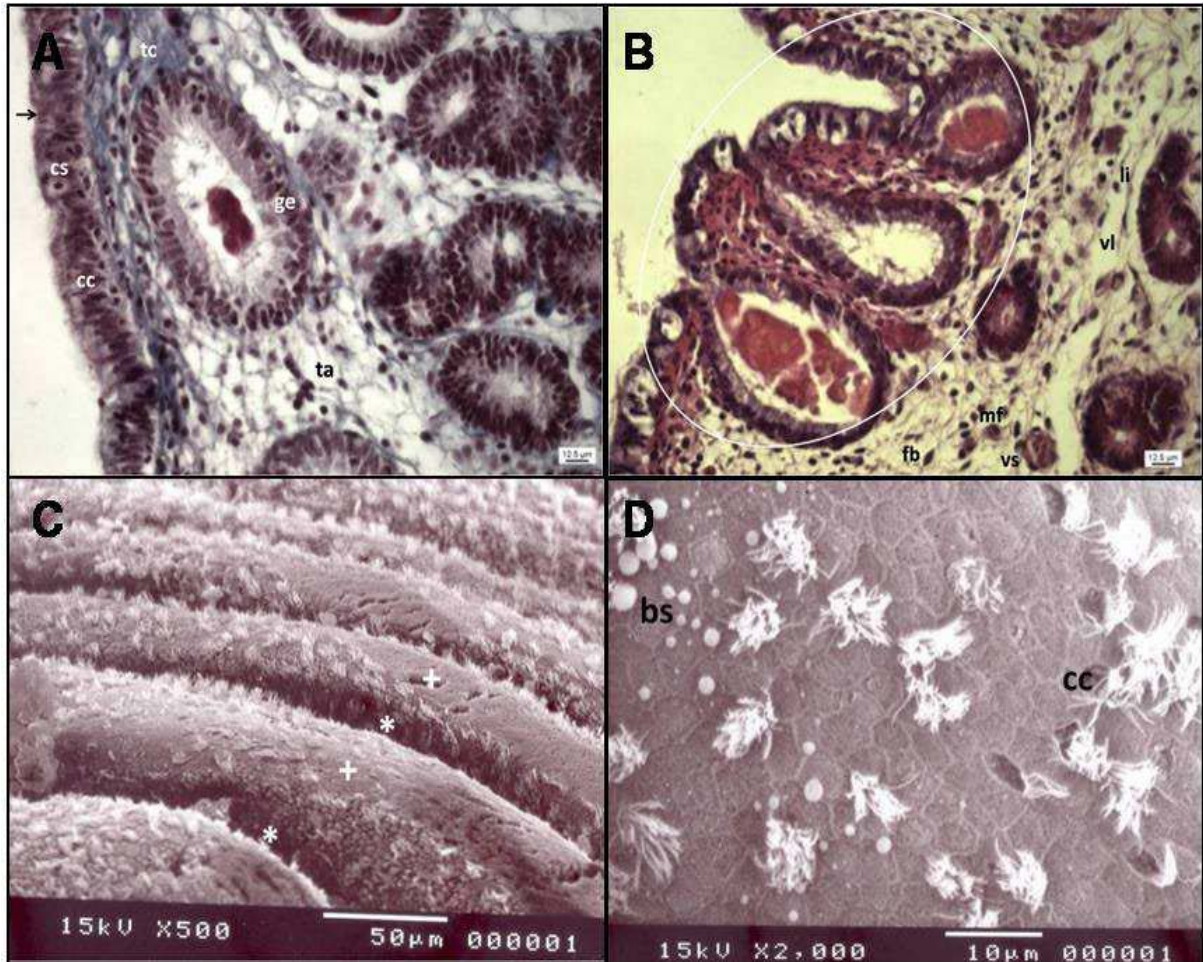


Figura 9. Endométrio de jumenta da raça Pêga (*Equus asinus*) em diestro. A, fotomicrografia corada com Tricrômico de Masson; B, fotomicrografia corada com Hematoxilina-eosina; C e D, fotomicrografia eletrônica de varredura. Legenda: epitélio simples cilíndrico (→), células ciliadas (cc), células secretoras (cs), tecido conjuntivo frouxo (tc), tecido adiposo (ta), glândulas endometriais (ge), pregas endometriais (elipse), vasos sanguíneos (vs), vasos linfáticos (vl), fibroblastos (fb), linfócitos (li), macrófagos (mf); dobras (+), sulcos (*) e bolhas de secreção (bs). FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

5.2.2. Estro

À microscopia de luz, o endométrio de jumenta em estro mostrou-se como um epitélio simples cilíndrico com células ciliadas e microvilosas. A lâmina própria subjacente apresentou-se formada por tecido conjuntivo frouxo, contendo fibroblastos, vasos sanguíneos e glândulas endometriais formados com o mesmo tipo de epitélio. Essas glândulas apresentavam-se sinuosas, distendidas e apresentando secreção luminal. Presença de vasos sanguíneos entre as glândulas, raros neutrófilos e linfócitos (Figura 10, A e B).

À microscopia eletrônica de varredura, o endométrio da jumenta em estro apresentou uma superfície pregueada, cujas dobras eram separadas por sulcos. As pregas apresentavam-se dispostas de modo irregular no corpo do útero, e mostravam-se paralelas e longitudinalmente organizadas nos cornos uterinos. Ao longo das pregas primárias foram observadas pregas menores ou secundárias. Subjacente à lâmina própria estavam presentes as glândulas uterinas cujos ductos abertos mais frequentemente nos sulcos e em menor número foram observadas na superfície das pregas. O epitélio luminal era composto de dois tipos de células que se diferenciavam claramente em células ciliadas e células microvilosas. Esses dois tipos de células variavam muito quanto às suas distribuições no endométrio uterino. As células microvilosas são em maior número do que as células ciliadas nos cornos uterinos. As células secretoras são poligonais e apresentam-se em sua superfície apical, os microvilos e as “blebs” que tinham o aspecto de bolhas. As células ciliadas são cobertas por tufo de cílios que se distendiam em várias direções na luz uterina (em formato de galhos) (Figura 10, C e D).

À microscopia eletrônica de transmissão, a superfície do epitélio luminal apresentava células colunares ou pseudoestratificadas. As células eram ciliadas com cílios bem desenvolvidos ou células microvilosas com pequenos microvilos. O núcleo de ambos os tipos celulares eram ovalados com heterocromatina condensado associada com uma fina membrana nuclear. Ambos os tipos de células estavam presos na membrana basal e na parte apical mostravam-se ligados pelo complexo unitivo (Figura 11).

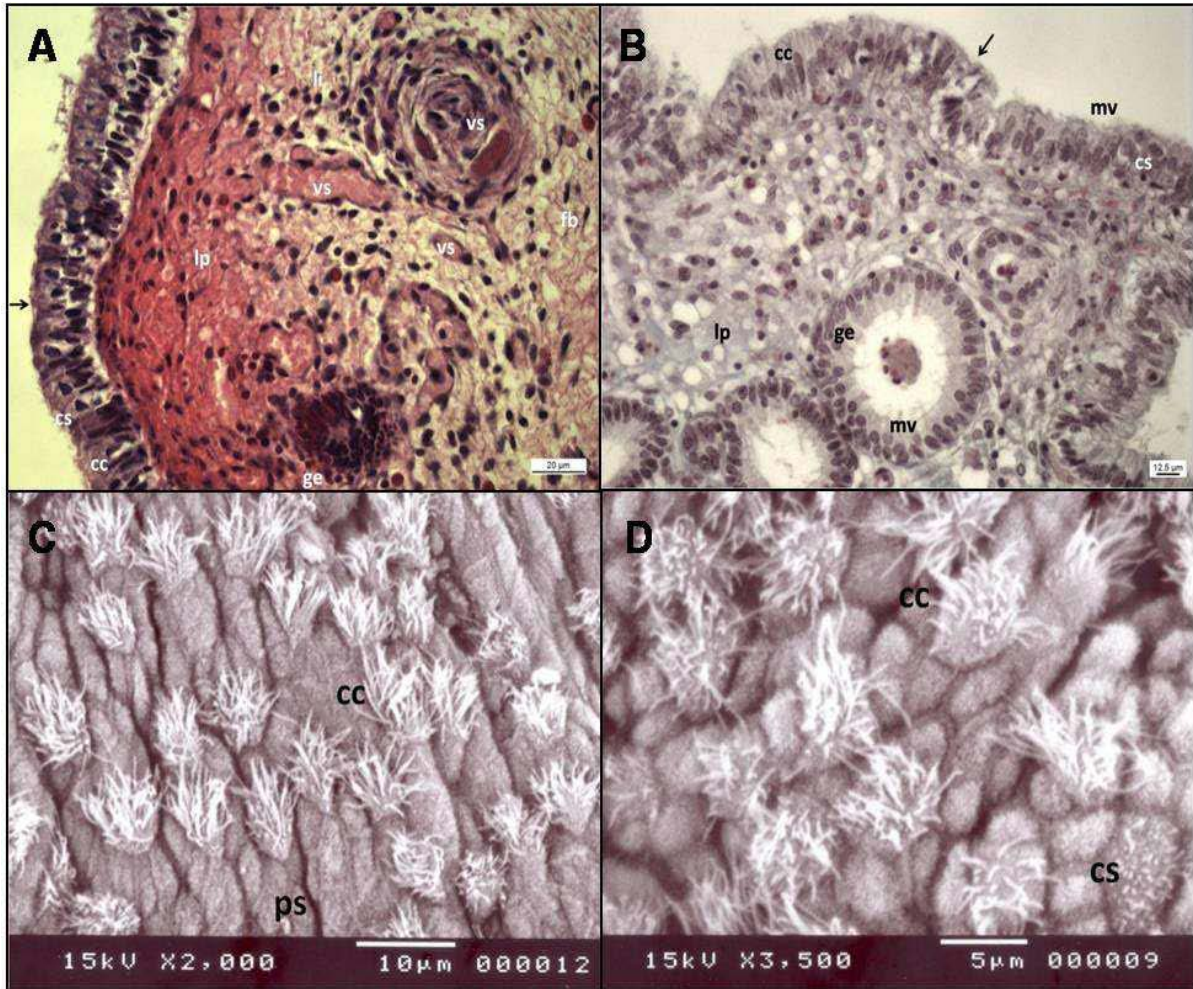


Figura 10. Endométrio de jumenta da raça Pêga (*Equus asinus*) em estro. A, fotomicrografia corada com Hematoxilina-eosina; B, fotomicrografia corada com Tricrômico de Masson; C e D, fotomicrografia eletrônica de varredura. Legenda: epitélio simples cilíndrico (→), células ciliadas (cc), células secretoras (cs), lâmina própria (lp), vasos sanguíneos (vs), glândula endometrial (ge), fibroblastos (fb), linfócitos (li), microvilos (mv) e pregas secundárias paralelas (ps). FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

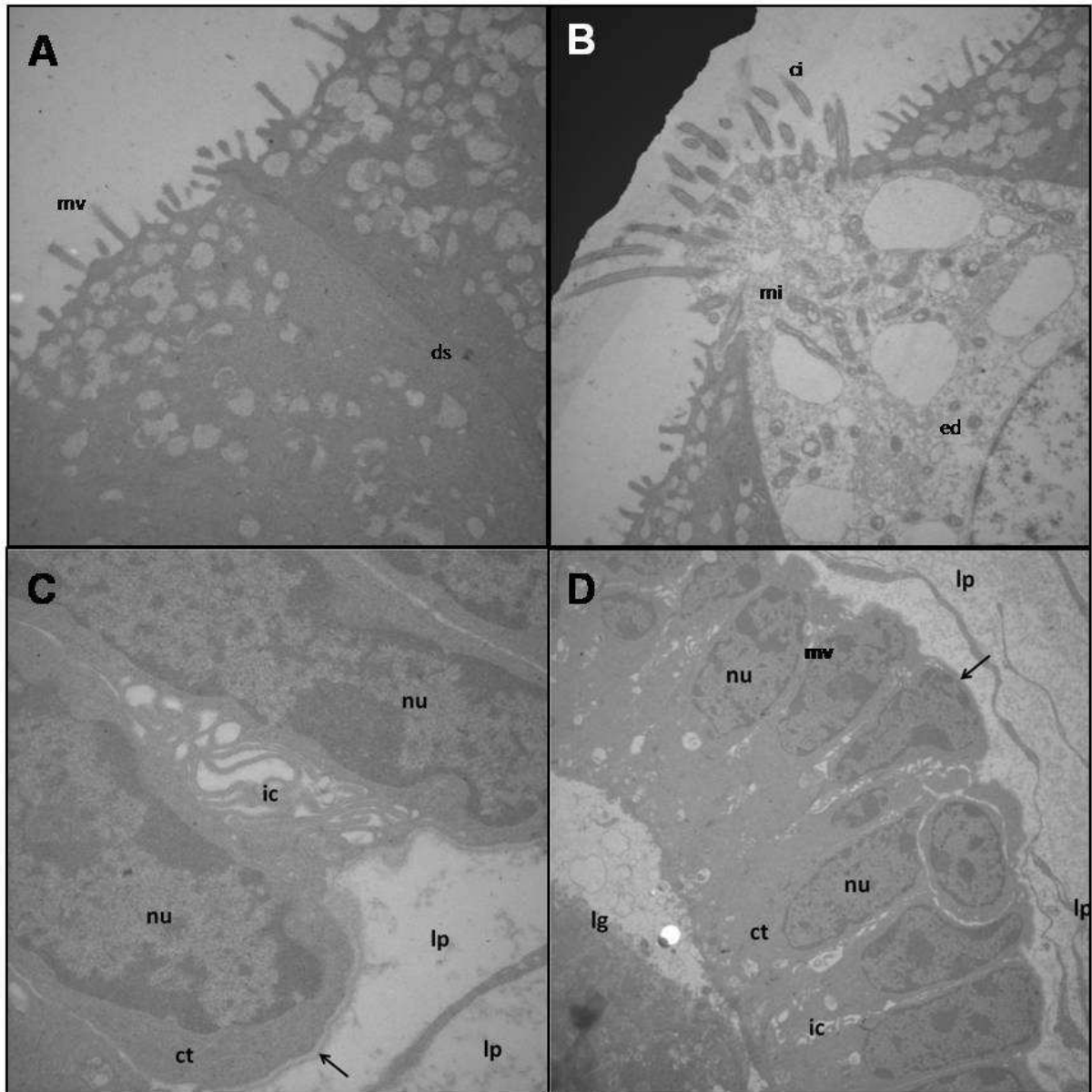


Figura 11. Endométrio de jumenta da raça Pêga (*Equus asinus*) em estro. Fotomicrografia eletrônica de transmissão; A (5.000X); B (10.000X); C (20.000X) e D (5.000X). Legenda: em A, células secretoras com microvilos (mv) e desmossomo (ds); em B, células ciliadas com cílios (ci), mitocôndrias (mi) e corpúsculos electrón-densos (ed); em C, núcleo (nu) com heterocromatina condensada, citoplasma (ct) basal, lâmina basal (→), lâmina própria (lp) e interdigitação celular (ic); em D, células que compõem o epitélio de uma glândula endometrial, evidenciando núcleo (nu) com heterocromatina condensada, citoplasma (ct), lâmina basal (→), lâmina própria (lp), interdigitação celular (ic) e luz da glândula (lg). FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

5.2.3. Monta Natural (MN)

À microscopia de luz, o endométrio de jumenta após 10 horas da monta natural (MN), apresentou epitélio simples cilíndrico com células ciliadas e microvilosas, lâmina própria rica em vasos sanguíneos e vasos linfáticos, marcada presença de neutrófilos, macrófagos e linfócitos. As glândulas endometriais tortuosas, mostrando o lúmen distendido com presença de secreção (Figura 12).

À microscopia eletrônica de varredura, o epitélio endometrial da jumenta, após a monta natural, apresentou evidência de grande atividade secretora das células microvilosas, mostrando as aberturas das glândulas endometriais rodeadas por células ciliadas, que são mais frequentes nos sulcos entre as pregas endometriais. Na superfície apical das células microvilosas do lúmen uterino, nota-se uma projeção formada de secreção, ou ainda com formato de bolhas. A presença de células pró-ciliadas também foi observada. As células ciliadas estavam em número maior do que as células microvilosas. Os cílios abrem-se com galhos em direções distintas (Figura 13, A e B).

À microscopia eletrônica de transmissão, o endométrio da jumenta, 10 horas após a monta natural (MN), apresentou o citoplasma das células microvilosas e ciliadas com vesículas secretórias grânulos de secreções mais localizados em sua parte apical, núcleos basais e presença dos desmossomos nos espaços intercelulares. Não foi notada a presença dos corpúsculos eletrôn-densos. As células da parede glandular foram semelhantes às células do epitélio luminal. A luz das glândulas mostrava-se repleta de grânulos de secreção (Figura 13, C e D).

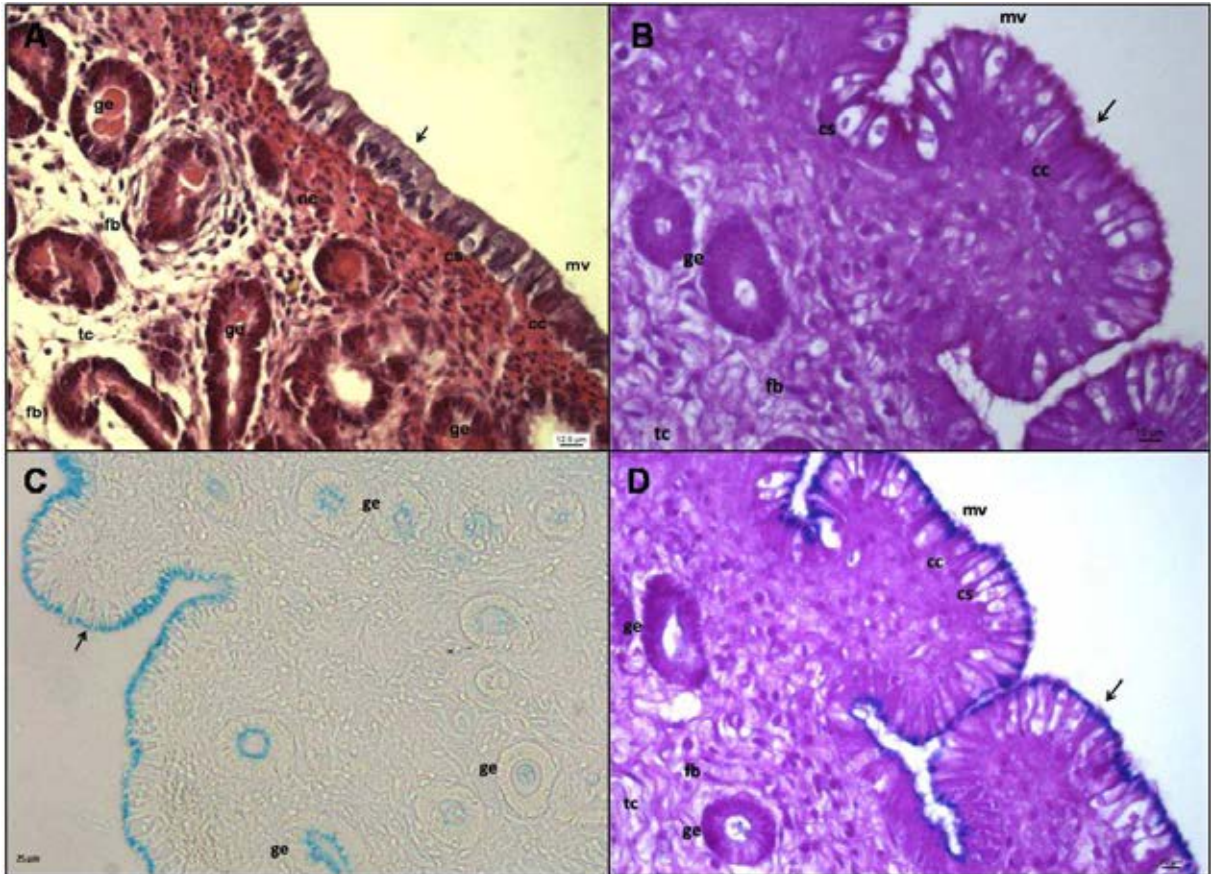


Figura 12. Endométrio de jumenta da raça Pêga (*Equus asinus*) dez horas após a monta natural. A, fotomicrografia corada com Hematoxilina-eosina; B, fotomicrografia corada com PAS; C, fotomicrografia corada com Alcian Blue; D, fotomicrografia corada com PAS e Alcian Blue. Legenda: epitélio simples cilíndrico (→), células ciliadas (cc), células secretoras (cs), microvilos (mv), neutrófilo intraepitelial (*), tecido conjuntivo frouxo (tc), glândulas endometriais (ge), fibroblastos (fb), neutrófilos (ne) e linfócitos (li). FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

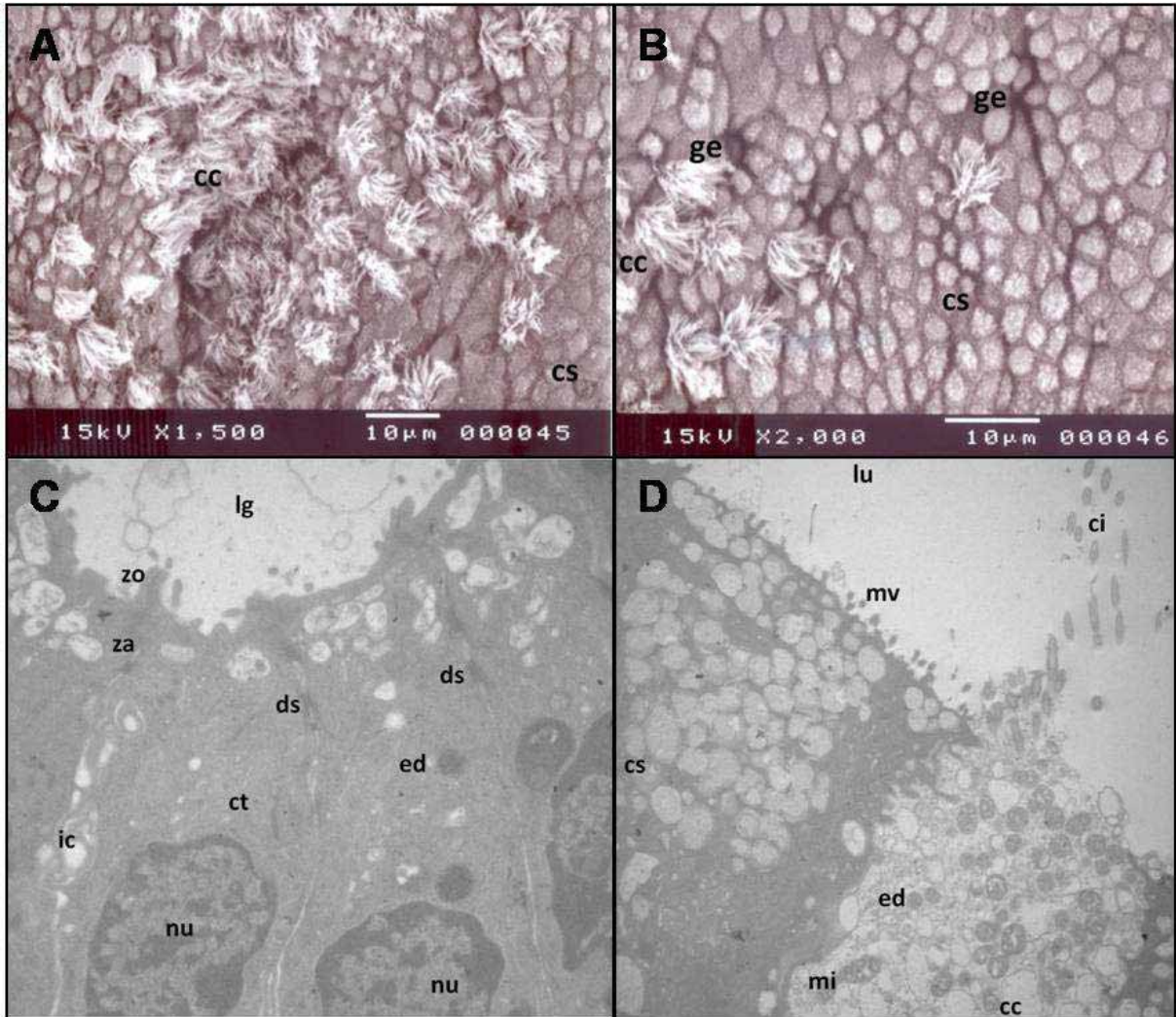


Figura 13. Endométrio de jumenta da raça Pêga (*Equus asinus*) dez horas após a monta natural. A e B, fotomicrografia eletrônica de varredura; C e D, fotomicrografia eletrônica de transmissão (10.000X). Legenda: células ciliadas (cc), células secretoras (cs), microvilos (mv), cílios (ci), mitocôndrias (mi), lúmen uterino (lu), glândula endometrial (ge), núcleo (nu), citoplasma (ct), interdigitação celular (ic), zona de oclusão (zo), zona de aderência (za), corpúsculos elétron-densos (ed), desmossomos (ds) e luz da glândula (lg). FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

5.2.4. Inseminação com sêmen estendido

À microscopia de luz, o endométrio de jumenta, 10 horas após a inseminação artificial com sêmen estendido, apresentou-se com um epitélio luminal simples cilíndrico com células microvilosas e secretoras. A lâmina basal mostrando os

fibroblastos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos. As glândulas endometriais distendidas evidenciando grande atividade secretora (Figura 14, A e B).

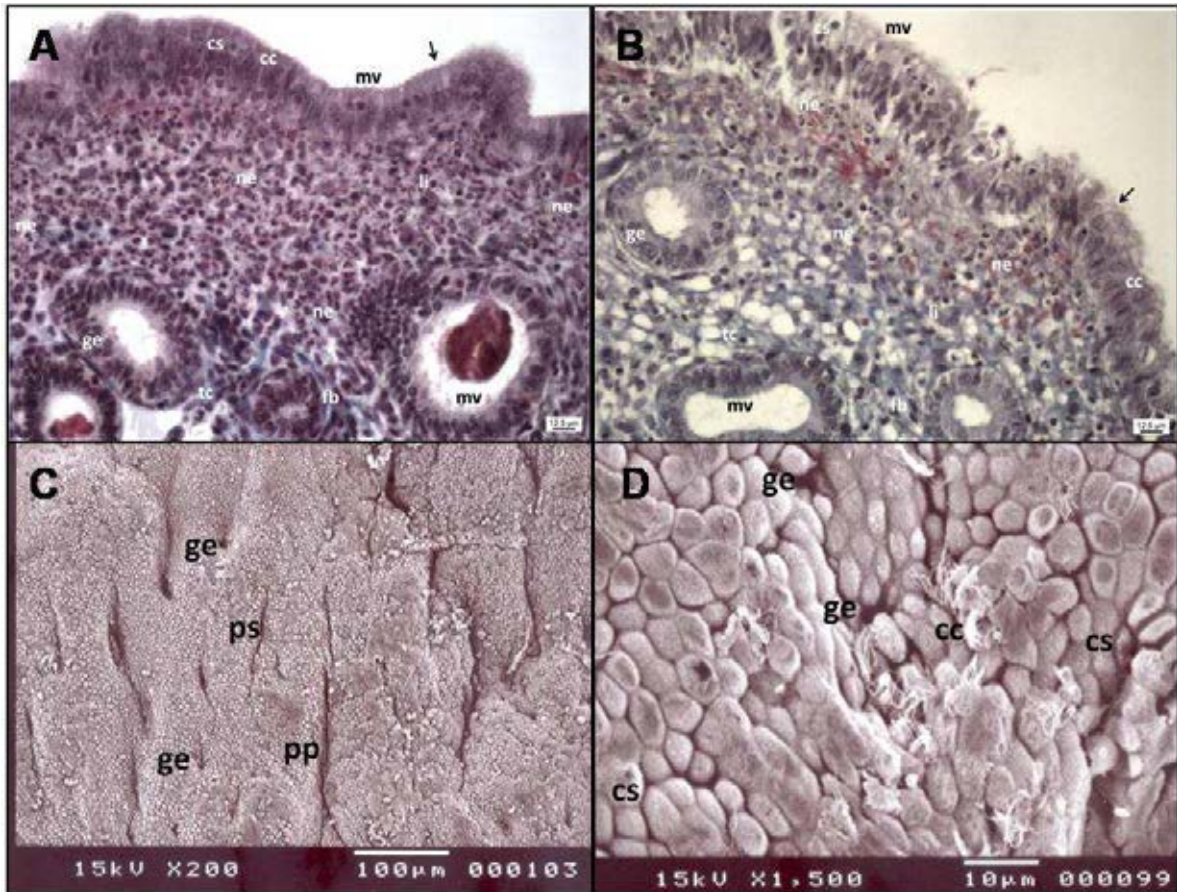


Figura 14. Endométrio de jumenta da raça Pêga (*Equus asinus*) dez horas após a inseminação artificial com sêmen estendido. A e B, fotomicrografia corada com Tricrômico de Masson. C e D, fotomicrografia eletrônica de varredura. Legenda: epitélio simples cilíndrico (→), células ciliadas (cc), células secretoras (cs), microvilos (mv), tecido conjuntivo frouxo (tc), glândulas endometriais (ge), fibroblastos (fb), neutrófilos (ne), linfócitos (li), pregas primárias (pp) e secundárias (ps). FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

À microscopia eletrônica de varredura, o epitélio do endométrio de jumenta após 10 horas da inseminação artificial com sêmen estendido (ou diluído) apresentou-se com as pregas endometriais paralelas e disposta longitudinalmente, com pregas menores ou secundárias, nas mesmas disposições das pregas

primárias. Apresentam aberturas de glândulas endometriais que são mais frequentes nos sulcos entre as pregas do epitélio endometrial. As células microvilosas e ciliadas que compõem o epitélio luminal do endométrio apresentam-se com as bordas apicais distendidas e os tufo de cílios dispostos indistintamente. Apresentam bolhas de secreção sobre os ápices das células microvilosas. As aberturas das glândulas apresentam-se cercadas por células ciliadas ou nos sulcos, rodeadas por células microvilosas (Figura 14, C e D).

5.2.5. Inseminação artificial com sêmen congelado

À microscopia de luz, o endométrio de jumenta, 10 horas após a inseminação artificial com sêmen congelado, mostrou um epitélio luminal simples cilíndrico com células secretoras e microvilosas. A lâmina própria subjacente era constituída por tecido conjuntivo frouxo, com fibroblastos, com uma quantidade expressiva de neutrófilos, macrófagos e linfócitos. As glândulas endometriais evidenciaram o lúmen distendido com secreção mucosa. Presença de vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 15, A e B).

À microscopia eletrônica de varredura, o endométrio uterino da jumenta após a inseminação com sêmen congelado, apresentou-se um epitélio luminal com células poligonais na sua superfície apical e mostrando células do tipo viloso e células do tipo ciliadas. Os cílios apresentam-se em feixes ou abertos em galhos. O epitélio apresenta as bolhas de secreção sobre as células microvilosas, que são as células secretoras. Visualmente, as células ciliadas apresentam-se em menor número do que as células microvilosas. A superfície do epitélio luminal mostra-se com cílios formando um emaranhado, recoberto por secreções e as bolhas de secreção sobre as células microvilosas. As aberturas das glândulas endometriais apresentam-se no epitélio do endométrio cercadas de células microvilosas ou por células ciliadas (Figura 15, C e D).

À microscopia eletrônica de transmissão, o endométrio da jumenta, 10 horas após a inseminação com sêmen congelado, apresentou o citoplasma das células com poucos grânulos de secreção, pouco corpúsculo eletrôn-denso. A luz da glândula endometrial mostrava-se com vesículas de secreção (Figura 15, E e F).

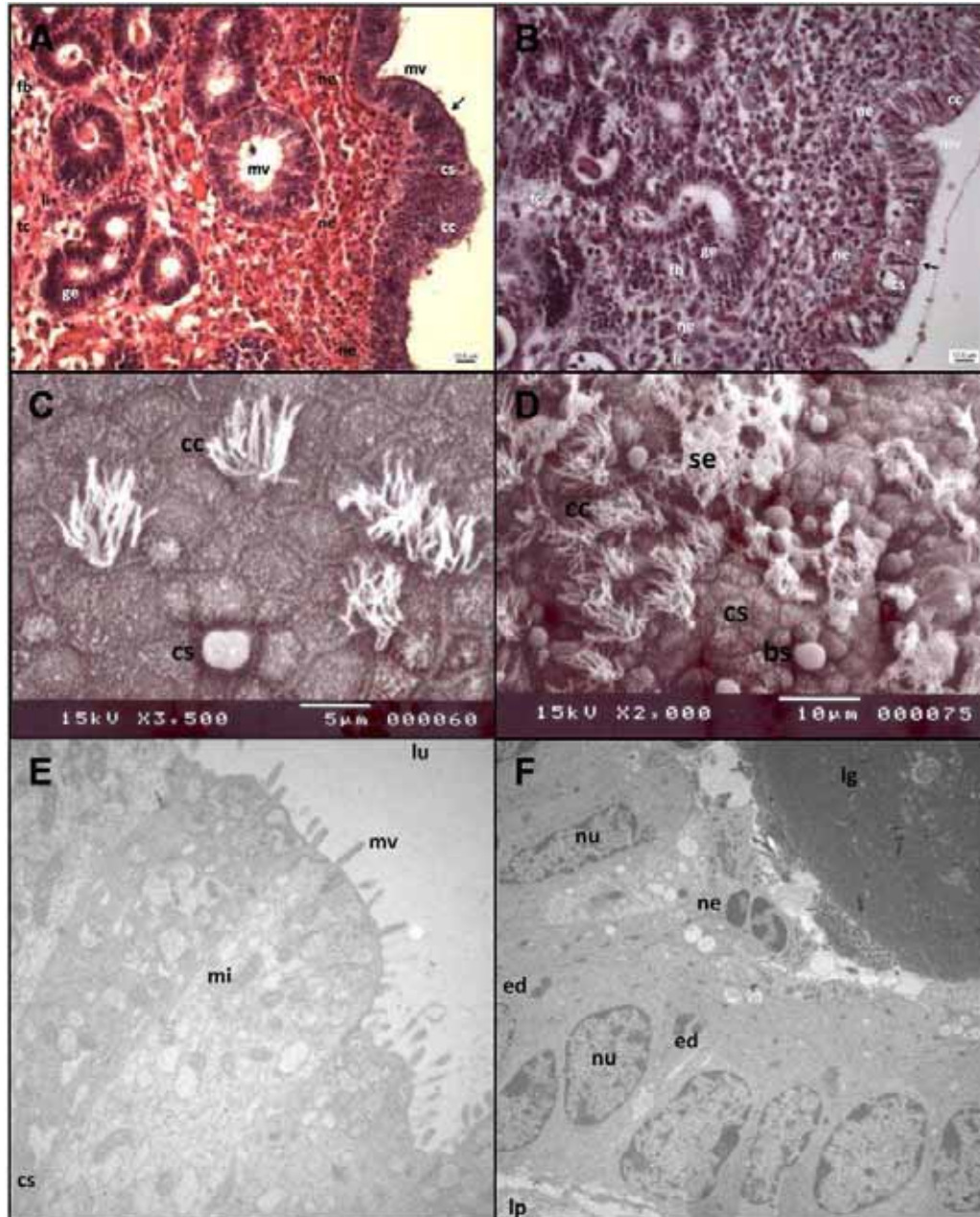


Figura 15. Endométrio de jumenta da raça Pêga (*Equus asinus*) dez horas após a inseminação artificial com sêmen congelado. A, fotomicrografia corada com Hematoxilina-eosina; B, fotomicrografia corada com Tricrômico de Masson; C, fotomicrografia eletrônica de varredura; C e D, fotomicrografia eletrônica de varredura; E, fotomicrografia eletrônica de transmissão (14.000X); F, fotomicrografia eletrônica de transmissão (5.000X). Legenda: epitélio simples cilíndrico (→), células ciliadas (cc), células secretoras (cs), microvilos (mv), tecido conjuntivo frouxo (tc), glândulas endometriais (ge), fibroblastos (fb), neutrófilos (ne), linfócitos (li), neutrófilo intraepitelial (*), células ciliadas com secreção (se) sobre os cílios, mitocôndrias (mi), lúmen uterino (lu), lâmina própria (lp), núcleo (nu), corpúsculos electrón-densos (ed) e luz da glândula (lg). FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

Tabela 3. Quantificação de neutrófilos e linfócitos das biopsias endometriais das jumentas dos grupos experimentais. FCAV/Unesp, Jaboticabal – 2014.

	Neutrófilos (log)	Linfócitos (log)
Monta natural	2,80 b	2,93
Sêmen congelado	1,87 b	1,72
Sêmen estendido	12,47 a	4,56
Estro	0,25 b	1,67
Coeficiente de variação	44,94	41,19
Valor de p	0,0014	0,0937
Frequência	9,92	2,68
DMS	0,4947	0,4462

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

5.3. Lavado uterino

Mesmo tendo sido realizadas as biopsias 10 horas após a cobertura ou inseminação, foram feitos lavados uterinos em todas as jumentas entre o 7º e 9º dias após cada evento, com o objetivo de manter a jumenta livre de possível gestação e possibilitando o seu uso dentro do protocolo experimental.

6. DISCUSSÃO

Embora normalmente comparada à égua, a jumenta possui comportamento sexual e atividade ovariana próprios da espécie. Henry et al. (1987) evidenciaram que para os asininos a estação reprodutiva era semelhante aos equinos, ou seja, maior luminosidade e abundância alimentar e as manifestações externas de estro, são características da espécie, quando comparadas com éguas pôneis (CLAYTON et al., 1981). Nas condições apresentadas para o presente estudo, a jumenta da raça Pêga, apresentou ciclicidade durante o período analisado, sendo de inverno, primavera e verão, mantendo o comprimento dos ciclos estrais, comprimento do estro e tempo de ovulação com relação ao término do estro. Foram acompanhados 234 estros de 25 jumentas, ocorrendo 33 (14,22%) cios anovulatórios distribuídos no tempo monitorado, diferente de Vendramini (1997), que observou cios anovulatórios quando os períodos de estros eram mais longos.

No presente trabalho, ocorreram 11 (4,74%) cios com duplas ovulações, valores inferiores quando comparado aos resultados encontrados por Hagstron (2004) e Taberner et al. (2008) que, trabalhando com jumentas Catalã, observaram um número expressivo de duplas e triplas ovulações, afirmando ser maiores os números de partos gemelares em jumentas do que em éguas. Neste estudo, as variações relacionadas à sazonalidade não alteraram a ciclicidade da jumenta Pêga (nas condições em que foi mantido o plantel estudado). A égua apresenta ovulação horas antes ou coincidente com o final do estro, diferente da jumenta da raça Pêga onde a ovulação ocorre próxima, coincidente ou após os sinais externos de estro, colaborando com as baixas taxas de gestação quando são inseminadas. Assim sendo, inferimos que em decorrência da concentração espermática usada nas inseminações em jumentas, que são similares aos protocolos usados para éguas, em função da reação inflamatória do endométrio da jumenta e do tempo até que ocorra a ovulação, os espermatozóides viáveis perdem a competência para fertilização.

Nas éguas o sêmen é depositado diretamente na luz uterina, por monta natural ou por inseminação artificial, ocorrendo resposta inflamatória que causa aumento na liberação de muco no endométrio e quimiotaxia (CAUSEY, 2007). No presente estudo, as biópsias foram feitas 10 horas após cada evento (MN, IA-SE e

IA-SC), pois os neutrófilos, que são as principais células de defesa do útero, podem estar presentes na luz uterina 30 minutos após o contato do sêmen com o endométrio, ocorrendo um pico inflamatório com 12 horas (KATILA, 1995; TROEDSSON, 1997). A marginação dos neutrófilos ocorre em resposta a um desafio uterino, quando os polimorfonucleares (PMNs) associam-se intimamente ao endotélio dos capilares, vênulas e veias, processo que ocorre no estro e na inflamação. No estro os PMNs margeiam, mas não migram para dentro do lúmen uterino (marginação sem migração), diferenciando do que ocorre após a cobertura ou inseminação artificial, onde há migração para dentro do lúmen uterino (marginação e migração) (PETER, 1994).

A resposta inflamatória uterina de éguas ao sêmen de garanhões vem sendo estudada há algum tempo (KOTILAINEN et al., 1994). A reação inflamatória do endométrio da égua ao sêmen de jumentos apresentou uma intensa resposta leucocitária, provavelmente devido a ativação da cascata do complemento estimulada pelo espermatozóide (SANTOS et al., 2013), como foi demonstrado por Troedsson et al. (1995) para o espermatozóide equino. A intensidade da resposta inflamatória do endométrio da égua ao sêmen de jumento foi diretamente proporcional à concentração espermática utilizada, provavelmente intensificando a quimiotaxia e estimulando a migração dos PMNs. Embora tenha ocorrido uma intensa resposta inflamatória quatro horas após a inseminação com sêmen fresco e congelado de jumento, às 24 horas a quantidade de neutrófilos foi numericamente menor (SANTOS et al., 2013). Demonstrou-se que o sêmen congelado de jumento não produziu uma resposta inflamatória uterina mais intensa e prolongada como descrito por Kotilainen et al. (1994) para o sêmen equino, o único estudo encontrado na literatura consultada que efetivamente comparou a ação do sêmen fresco *versus* congelado sobre o endométrio.

Em jumentas, foram obtidas gestações com uso de inseminações com sêmen fresco ou resfriado, porém o uso de sêmen congelado não teve resultados satisfatórios (TRIMECHE et al., 1998; VIDAMENT et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). O processo inflamatório que ocorre depois da inseminação envolve muitos mecanismos que são modulados pelo plasma seminal, mas ainda não se conhece totalmente a sua atuação sobre o endométrio da fêmea, e a mesma parece variar

entre as espécies (ALGHAMDI et al., 2009). Os componentes do sêmen que estabelecem a otimização das condições intra-uterinas ainda necessitam de mais pesquisas, porém estudos mostram que o plasma seminal não afeta o influxo de PMNs para o endométrio da jumenta, portanto estudos *in vitro* mostraram um efeito inibitório do plasma, sobre a ligação de PMNs com células espermáticas em jumentas (ALGHAMDI et al., 2004; TROEDSSON et al., 2005; LI et al., 2012; MIRÓ; VILÉS, 2012). Recentemente, foi demonstrada que a CRISP3 (cysteine-rich secretory protein), proteína presente no plasma seminal de humanos e equinos, e armazenada em grânulos neutrofílicos (SCHAMBONY et al., 1998; UDBY et al., 2005), é capaz de reduzir a resposta inflamatória, ou seja, a ligação dos PMNs às células espermáticas (DOTY et al., 2011).

No presente estudo, foram observadas, através das imagens microscópicas, respostas inflamatórias endometriais ao sêmen de jumento, mediante a presença de neutrófilos. Essas respostas foram comparadas usando a quantificação das células nas amostras endometriais, feitas 10 horas após cada evento. A diferença entre MN e SC não foi significativa, demonstrando que o processo inflamatório endometrial ocorreu com a presença do sêmen no lúmen uterino, independentemente do plasma seminal (MN) ou dos componentes do crioprotetor (SC) de acordo com os achados de Santos et al. (2013), que trabalharam com sêmen de jumento em útero de égua.

Kotilainen et al. (1994), obtiveram resposta inflamatória mais intensa em éguas inseminadas com sêmen congelado em relação ao sêmen fresco, divergindo dos nossos achados. A taxa de influxo de neutrófilos, que ocorreu com 10 horas após o SE, corroboram com as pesquisas de Katila (1995) e Troedsson (1997), estudando o endométrio de éguas e observaram pico inflamatório após 12 horas da inseminação. A resposta inflamatória endometrial com SE foi significativa em relação ao MN e SC. Alghamdi et al. (2004) obtiveram taxas de prenhez maiores (77%) quando as inseminações foram feitas com plasma seminal, contra inseminações retirando o plasma seminal (5%). Proteínas presentes no plasma seminal foram sugeridas como responsáveis pela supressão da ligação de neutrófilos e da fagocitose de espermatozoides vivos, selecionando as células mortas e apoptóticas (TROEDSSON et al., 2006). No presente estudo, a resposta inflamatória endometrial da jumenta apresentou influxo significativo de neutrófilos 10 horas após a IA-SE ao

comparando-se com os demais eventos, sendo esse resultado similar aos observados em éguas, quando o sêmen congelado foi re-extendido antes da inseminação com solução de leite desnatado (PORTUS et al., 2005). Em éguas, o plasma seminal apresenta-se como sendo o maior indutor de reação inflamatória do que outros extensores. A resposta inflamatória apresenta um tempo menor para a completa resolução pela presença do plasma seminal (TROEDSSON et al., 2001; FIALA et al., 2002). Nos estudos de Palm et al. (2008), foi evidenciado uma resposta inflamatória maior, com um elevado número de PMNs, no endométrio de égua mediante ao uso de plasma seminal e ao extensor de sêmen contendo leite desnatado, do que ao extensor contendo gema de ovo. A reação de hipersensibilidade contra a caseína e lactoglobulinas do leite tem sido sugerida como causadora da resposta inflamatória aos extensores com leite desnatado (WAL, 2004). Outros componentes do leite, como o caseinato, glicina, e demais proteínas e açúcares (PAGL et al., 2006), também necessitam ser estudados. O plasma seminal suprime a quimiotaxia e a fagocitose dos espermatozóides pelos PMNs através inibição da ativação do complemento (TROEDSSON et al., 2002), porém não exclui os efeitos pró-inflamatórios das proteínas do plasma seminal sobre o endométrio (ASSREUY et al., 2002).

No presente estudo, houve uma elevada resposta inflamatória uterina na jumenta Pêga, representada pelo influxo de neutrófilos para o epitélio e extrato compacto do endométrio, em números absolutos, 10 horas após a MN, IA-SE ou IA-SC, sugerindo que biópsias seriadas poderiam elucidar a dinâmica da resposta inflamatória. De acordo com os trabalhos de Rota et al. (2012), onde o número absoluto de PMNs, obtidos por lavados uterinos, não foi diferente para 6 e 10 horas pós IA, com sêmen re-suspendido com plasma seminal, resultando em aumento das taxas de gestações (8/13, 61,5%).

Resultados com aumento de prenhez em jumentas foram obtidos com sêmen congelado, fazendo inseminações nas extremidades dos cornos uterinos e com maiores concentrações de espermatozóides (OLIVEIRA et al., 2012). Essas altas concentrações de células espermáticas, além de acelerar a resolução do processo inflamatório, em éguas (FIALA et al., 2007), levaria a saturação de PMNs e de espermatozóides livres, estariam aptos para a fertilização, ou a IA feita próxima

ao oviduto, podendo evitar o contato com PMNs, que ocorre naturalmente no endométrio (MIRÓ et al., 2013).

7. CONCLUSÃO

A jumenta Pêga não apresentou variação da ciclicidade em relação à sazonalidade nas condições ambientais, de manejo e estado nutricional nos quais foi mantido o plantel monitorado.

A resposta inflamatória endometrial na jumenta Pêga, visualizada através das imagens microscópicas, foi semelhante nos grupos estudados com sêmen fresco (MN) e sêmen congelado (IA-SC), porém apresentou uma expressiva resposta inflamatória ao sêmen estendido (IA-SE).

Como ainda não se tem resultados de gestações obtidas com sêmen estendido em comparação ao sêmen fresco para a jumenta Pêga, as avaliações das expressões de pró e anti-inflamatórios precisam ser estudadas.

8. REFERÊNCIAS

ALGHAMDI A.; LOVAAS, B.; BIRD, S.; LAMB, G.; RENDAHL, A.; TAUBE, P.; FOSTER, D. N. Species-specific interaction of seminal plasma on sperm–neutrophil binding. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.331–344, 2009.

ALGHAMDI, A. S.; FOSTER, D. N.; TROEDSSON, M. H. T. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. **Reproduction**, v.127, p.593-600, 2004.

ALLEN, W. R.; SKIDMORE, J. A.; STEWART, F.; ANTCZAK, D. F. Effects of fetal genotype and uterine environment on placental development in equids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.97, p. 55-60, 1993.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Sperm Function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. p.715-745.

ASSREUY, A. M.; CALVETE, J. J.; ALENCAR, N. M. N.; CAVADA, B. S.; ROCHA-FILHO, D. R.; MELO, S. C.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1796–1803, 2002.

BALL, B. A.; SABOUER, K.; LABONTY, E. Characterization of a sperm protein responsible for sperm reservoir formation in the oviduct of the mare. **UCLA- Davis, Research Preview 2004-2005**, UC-Davis, p.29, 2003.

BATTUT, I.; PALMER, E.; DRIANCOURT, M. A. Proteins syntetised and released by equine oviducts: Characterization, variations, and interactions with spermatozoa. **Biology of Reproduction, MonographSeries**, v.1, p.131-140, 1995.

CANISSO, I. F.; CARVALHO, G. R.; MOREL, M. D.; KER, P. G.; RODRIGUES, A. L.; SILVA, E. C.; COUTINHO DA SILVA, M. A. Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey jack semen after insemination of horse mares. **Equine Veterinary Journal**, v.43, n.2, p179-183, 2011.

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

CHENG, F. P.; GADELLA, B. M.; VOORHOUT, W. F.; FAZELI, A.; BEVERS, M. M.; COLENBRANDER, B. Progesterone-induced acrosome reaction in stallion

spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. **Biology of Reproduction**, v.59, n.4, p.733-742, 1998.

CLAYTON, H. M.; LINDSAY, F. E. F.; FORBES, A. C.; HAY, L. A. Some studies of comparative aspects of sexual behaviour in ponies and donkeys. **Applied Animal Ethology**, v.7, n.2, p.169-174, 1981.

CLIMENT, F.; VILÉS, K.; MIRÓ, J. Vaginoplastia in two young infertile Catalan jennies. A clinical case. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.113, 2012.

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

DOBRINSKI, I.; SMITH, T. SUAREZ, S.; BALL, B. A. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. **Biology of Reproduction, MonographSeries**, v.56, n.4, p.861-869, 1997.

DOTY, A.; BUHI, W. C.; BENSON, S.; SCOGGIN, K. E.; POZOR, M.; MACPHERSON, M.; MUTZ, M.; TROEDSSON, M. H. Equine CRISP3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils. **Biology of Reproduction**, v.85, p.157-164, 2011.

ELLINGTON, J. E.; IGNOTZ, G. G.; VARNER, D. D.; MARCUCIO, R. S.; BALL, B. A. *In vitro* interaction between oviduct epithelia and equine sperm. **Archives of Andrology**, v.31, p.79-86, 1993b.

ELLINGTON, J.; BALL, B. A.; YANG, X. Binding of Stallion spermatozoa to the equine zona pellucida after coculture with oviductal epithelial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p.203-208, 1993a.

EVANS, M. J.; HAMER, J. M.; GASON, L. M.; GRAHAM, C. S.; ASBURY, A. C.; IRVINE, C. H. C. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intrauterine inoculation into maiden mares: effect of steroid hormone environment. **Theriogenology**, v.26, p.37-50, 1987.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. A.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare **Theriogenology**, v.67, n.3, p.556-562, 2007.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. A.; STEIGER, K.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of skim milk and seminal plasma uterine infusions in mares. **Theriogenology**, v.58, n.2, p.491-494, 2002.

FUMUSO, E.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; DAVID, O.; WADE, J.; ROGAN, D. Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. **Animal Reproduction Science**, v.94, p282-285, 2006.

FUMUSO, E.; GIGUÈRE, S.; WADE, J.; ROGAN, D; VIDELA-DORNA, I.; BOWDEN, R.A. Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA transcriptions in mares resistant or susceptible to persistent post-breeding endometritis. Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.96, p.31-41, 2003.

HAGSTRON, D. J. Donkeys are different: an overview of reproductive variations from horses. **Equine Extension Specialist**, University of Illinois. Written: January, 2004.

HENRY, M.; FIGUEIREDO, A. Z. F.; PALHARES, M. S.; CORYN, M. Clinical and endocrine aspects of the oestrus cycle in donkeys (*Equus asinus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, n.35, p.297-303, 1987.

JEPSEN, R. J.; EVANS, L. E.; YOUNGS, C. R. Use of direct thaw insemination to establish pregnancies with frozen-thawed semen from a standard jack. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.30, n.11, p.651-656, 2010.

JIWAKANON, J.; PERSSON, E.; BERG, M.; DALIN, A. Influence of seminal plasma, spermatozoa and semen extender on cytokine expression in the porcine endometrium after insemination. **Animal Reproduction Science**, v.123, p.210-220, 2011.

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

KATILA, T. Effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.31-38, 2005.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response in mares after insemination with fresh semen. **Biology of Reproduction, Monograph Series**, v.1, p.515-518, 1995.

KATILA, T. Post-mating inflammatory responses of the uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.31–41, 2012.

KENNEY, R. M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on embryonic death. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.172, p.241-262, 1978.

KENNEY, R. M. Prognostic value of endometrial biopsy of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23 (suppl), p.347-348, 1975.

KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. IN: MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology**. 2 ed. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p.723-729.

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

LEBLANC, M. M.; NEUWIRTH, L.; ASBURY, A. C.; TRAN, T.; MAURAGIS, D.; KLAPSTEIN, E. Scintigraphic measurements of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n.2, p.109-113, 1994.

LI, J.; YAMAGUCHI, S.; FUNAHASHI, H. Boar seminal plasma or hen's egg yolk decrease the in-vitro chemotactic and phagocytotic activities of neutrophils when co-incubated with boar or bull sperm. **Theriogenology**, v.77, p.73–80, 2012.

McKAY, R. J. Inflammation in horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.16, n.1, p.15-27, 2000

MEYERS, S. A.; LIU, I. K. M.; OVERSTREET, J. W. Sperm-zona pellucida binding and zona-induced acrossome reactions in the horse: comparison between fertile and infertile males. **Theriogenology**, v.46, p.1277-1288, 1996.

MIRÓ, J.; VILÉS, K. Seminal plasma to control induced acute endometritis by frozen semen in jennies. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.58–115, 2012.

MIRÓ, J.; VILÉS, K.; FERNÁNDEZ, N.; SOARES, J.; FÁBREGAS, N.; GARCÍA, W. Induced acute endometritis by frozen semen insemination in donkey. **Reproduction in Domestic Animals**, 2011;v.46, p.130, 2011.

MIRÓ, J.; VILÉS, K.; GARCÍA, W.; JORDANA, J.; YESTE, M. Effect of donkey seminal plasma on sperm movement and sperm-polymorphonuclear neutrophils attachment in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.140, p.164–172, 2013.

NOYES, W. R. The fertilizing capacity of spermatozoa. **Western Journal of Surgery, Obstetrics and Gynecology**, v.61, p.342-349, 1953.

O'LEARY, S.; JASPER, M. J.; WARNES, G. M.; ARMSTRONG, D. T.; ROBERTSON, S. A. Seminal plasma regulates endometrial cytokine expression, leukocyte recruitment and embryo development in the pig. **Reproduction**, v.128, p.237–247, 2004.

OLIVEIRA, J. V.; PAPA, F. O.; MELO-OÑA, C. M.; MONTEIRO, G. A.; PUOLI-FILHO, J. N. P.; ALVARENGA, M. A. New procedures to freeze donkey semen and its influence on mares and jennies fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.503–504, 2012.

OLIVEIRA, J.; OZANAM, F.; MONTEIRO, J.; MARINI, C.; ALVARENGA, M. Nascimento do primeiro jumento a partir de espermatozoides congelados no Brasil. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 12, Campinas, São Paulo, Brasil. **Anais...** Campinas: ABRAVEQ, 2011. p.203.

PAGL, R.; AURICH, J. E.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. **Theriogenology**, v.66, p.1115–1122, 2006.

PARKS, J. E.; EHRENWALD, E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. In: BAVISTER, B.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. (Eds). **Fertilization in mammals**. Norwell, Mass: Serono Symposia, 1990. p.155-168.

PETER, A. T. Uterine defence mechanisms in the mare. **The Veterinary Annual**, v.34, p.107-115, 1994.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P.; MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VOSS, J. L. **Management of the Stallion for maximum reproductive efficiency, II**. Fort Collins: Colorado State University, 1989.

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

PUGH, D. G. Donkey reproduction. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v.48, p.113-114, 2002.

QUEIROZ, F. J. R. 1991. **Biópsia endometrial como método auxiliar de diagnóstico da subfertilidade e da infertilidade na égua (*Equus caballus*, L. 1728)**. 1991. 75f. Dissertação (Mestrado em Reprodução). Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Niterói-RJ, 1991.

REILAS, T. **Uterine luminal environment of the mare**. 2001. 391f. Academic Dissertation. Department of Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki. Ypäjä (Finlândia), 2001.

RENNER-MARTIN, T. F. P.; FORSTENPOINTNER, G.; WEISSENGRUBER, G. E.; EBERHARDT, L. Gross anatomy of the female genital organs of the domestic donkey (*Equus asinus* Linné, 1758). **Anatomia Histologia Embryologia**, v.38, p.133–138, 2009.

RICKETTS, S. W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, p.341-345, 1975.

ROBERTSON, S. A. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. **Journal of Animal Science**, v.85, p.E36–E44, 2007.

ROBERTSON, S. A. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. **Cell and Tissue Research**, v.322, p.43–52, 2005.

ROTA, A.; PANZANI, D.; SABATINI, C.; CAMILLO, F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. **Theriogenology**, v.78, p.1846–1854, 2012.

SANTOS, C. S.; JESUS, V. L. T.; PEREIRA, R. C. G.; GUEDES JÚNIOR, D. S.; SANTOS, M. A. J.; JACOB, J. C. F. Resposta inflamatória uterina em éguas inseminadas com sêmen fresco e congelado de jumento. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, n.2, p.155-162, 2013.

SCHAMBONY, A.; GENTZEL, M.; WOLFES, H.; RAID, M.; NEUMANN, U.; TOPFER-PETERSEN, E. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1387, 206-216, 1998.

SCOTT, M. A.; LIU, I. K. M.; OVERSTREET, J. W.; ENDERS, A. C. The structural morphology and epithelium association of spermatozoa at the uterotubal junction: A descriptive study of equine spermatozoa in situ, using scanning electron microscopy. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl.56, p.415-421, 2000.

SHARKEY, D. J.; TREMELLEN, K. P.; JASPER, M. J.; GEMZELL-DANIELSSON, K.; ROBERTSON, S. A. Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. **Journal of Immunology**, v.188, p.2445–2454, 2012.

SILVA, C. A. M.; BARROS, S. S.; ESQUERRE, R. A.; SILVA, J. H. S. A biópsia endometrial na avaliação da fertilidade na égua. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, n.4, p.131-133, 1987.

TABERNER, E.; MEDRANO, A.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; MIRÓ, J. Oestrus cycle characteristics and prediction of ovulation in Catalanian jennies. **Theriogenology**, v.70, p.1489-1497, 2008.

THOMAS, P. G. A.; BALL, B. A.; BRINSKO, S. Changes associated with induced capacitation influence the interaction between equine spermatozoa and oviductal epithelial cell monolayers. **Biology of Reproduction, Monograph Series**, v.1, p. 697-705, 1995.

THOMAS, P. G.; BALL, B. A.; BRINSKO, S. P. Interaction of equine spermatozoa with oviductal epithelial cell expellant is affected by estrous cycle and anatomic origin of explants. **Biology of Reproduction**, v.51, n.2, p. 222-228, 1994

TIZARD, I. **Imunologia veterinaria**. São Paulo, Roca, 1998. 545p.

TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.159-170, 2005.

TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER, D. A procedure for poitou jackass sperm criopreservation. **Theriogenology**, v.50, p.793-806, 1998.

TROEDSSON, M. H. T. Diseases of the uterus. In: ROBINSON, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine 4**. Philadelphia: WB Saunders, 1997. p.517-524.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine response to semen deposition in the mare. IN: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1995. **Proceedings...** San Antonio, Texas: Society for Theriogenology, 1995. p.130-134.

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.

TROEDSSON, M. H. T.; DESVOUGES, A. L.; HANSEN, P. J.; BUHI, W. C. Equine seminal plasma proteins protect live spermatozoa from PMN-binding and phagocytosis, while providing a mechanism for selective sperm elimination of apoptotic and dead spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.4, p. 60-61, 2006.

TROEDSSON, M. H. T.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A. S.; DAHMS, B.; DOW, C. A.; HAYNA, J. et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.171–186, 2005.

TROEDSSON, M. H. T.; LEE, C. S.; FRANKLIN, R. D.; CRABO, B. G. The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl.56, p.341–349, 2000.

TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M.; ING, M.; PASCOE, J. THURMOND, M. J. Multiple site electromyographic recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, p.307-313, 1993.

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

UDBY, L.; BJARTELL, A.; MALM, J.; EGESTEN, A.; LUNDWALL, A.; COWLAND, J. D.; BORREGAARD, N.; KJELDSSEN, L. Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. **Journal of Andrology**, v.26, n.3, p.333–342, 2005.

VENDRAMINI, O. M.; GUINTARD, C.; BRUYAS, J. F.; TAINTURIER, D. Oestrus synchronization in the donkey preparatory to embryo transfer. **Journee de la Recherche Equine**, v.23, p.167-173, 1997.

VENDRAMINI, O. M.; GUINTARD, C.; MOREAU, J.; TAINURIER, D. Cervix conformation: a first anatomical approach in Baudet du Poitou jenny asses. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.741–744, 1998.

VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; MARTIN, F. X.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.22-35, 2009.

VILÉS, K.; RABANAL, R.; RODRÍGUEZ-PRADO, M.; MIRÓ, J. Effect of ketoprofen treatment on the uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen. **Theriogenology**, v.79, p.1019–1026, 2013.

WAL, J. M. Bovine milk allergenicity. **Annals of Allergy and Asthma Immunology**, v.93, p.2-11, 2004.

WATSON, E. D. Post-breeding endometritis in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.221–232, 2000.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **The physiology of reproduction**, 2 ed. New York: Raven Press, 1994. p.198-317.