

JOSÉ ANTONIO DELL'AQUA JUNIOR

**EFEITO DA CÓRTICO-TERAPIA E PLASMA SEMINAL NA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA E FERTILIDADE DE ÉGUAS
SUBMETIDAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Área de Concentração: Reprodução Animal).

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu – SP

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Dell' Aqua Junior, José Antonio.

Efeito da córtico-terapia e plasma seminal na resposta inflamatória e fertilidade de éguas submetidas à inseminação artificial / José Antonio Dell' Aqua Junior. – 2004.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2004.

Orientador: Frederico Ozanam Papa.

Assunto CAPES: 50504002

1. Reprodução animal.

CDD 636.0824

Palavras-chave: Corticóide; Equino; Plasma seminal; Sêmen congelado; Resposta inflamatória uterina.

**Aos meus Pais que tanto amo;
os quais sempre acreditaram
em meu potencial e pelo apoio
incondicional, e a meus
irmãos.**

DEDICO.

**A minha namorada Camila, que
passou a fazer parte de minha
vida e em tão pouco tempo
conquistou meu coração.**

TE AMO.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP – Campus de Botucatu – São Paulo – Brasil e ao Curso de Pós-graduação da Área de Reprodução Animal pela oportunidade concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho..

Ao Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa, pela orientação permanente, pelo exemplo de profissionalismo e, principalmente, por ter acreditado em minha capacidade profissional, além da grande amizade estabelecida durante estes anos.

Aos professores: Marco Antonio Alvarenga, João Pessoa Araújo Junior, Maria Denise Lopes e Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, não só pela ajuda, orientações e sugestões apresentadas no decorrer do desenvolvimento deste projeto, mas principalmente pela contribuição para minha formação.

Também aos Professores: Eunice Oba, Sony Dimas Bicudo, Cezinande de Meira, João Carlos Pinheiro Ferreira e Nereu Carlos Prestes, pela amizade e pelos muitos ensinamentos e constantes incentivos ao longo de todos estes anos.

Ao doutorando Antonio Sylvio Lopes de Medeiros, pelo companheirismo e colaboração, que possibilitaram o crescimento científico de ambos.

A mestranda Letícia pela ajuda colaboração no desenvolvimento do trabalho, tornando possível à realização do mesmo.

As pós-graduandas e residentes do Laboratório Clínico, pela realização dos testes, que propiciaram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Médicos Veterinários Mário e Marília, que colaboraram na realização do teste de fertilidade, propiciando a obtenção de dados importantes ao trabalho.

Aos Professores do Curso de Pós-graduação, pela formação do aluno.

Aos colegas da Pós-graduação, pelo convívio e colaboração.

Ao servidor técnico-administrativo: Miguel Alves da Silva, pelo auxílio com os animais e pela amizade cativada no decorrer destes anos.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo apoio durante a execução deste trabalho.

Às funcionárias da Biblioteca do Campus de Botucatu, pelo suporte e colaboração na ficha catalográfica.

Ao mestre de Estatística, Prof. Dr. Paulo Curi, pelos ensinamentos e orientação na análise estatística.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com a execução deste experimento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ESQUEMA.....	x
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE GRÁFICOS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Inflamação.....	03
2.2. Ação dos Corticosteróides no Sistema Imune.....	07
2.3. Mecanismos de Defesa Uterina.....	08
2.3.1. Resposta Celular.....	12
2.3.2. Resposta Humoral.....	15
2.3.3. Defesa Física do Endométrio.....	17
2.4. Ação do Plasma Seminal.....	18
2.5. Métodos de Avaliação Condição Uterina.....	20
2.5.1. Palpação Retal e Ultra-Sonografia.....	20
2.5.2. Citologia Cérvico-Uterina.....	21

2.5.3. Histologia Uterina.....	21
2.6. Técnicas de Avaliação da Função Neutrófila.....	23
2.6.1. Metabolismo Oxidativo de Neutrófilos.....	22
2.6.2. Avaliação do Metabolismo Oxidativo de Neutrófilos por meio do Teste de Redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT).....	24
2.6.3. Metabolismo Oxidativo de Neutrófilos associado ao Cortisol e outros Corticosteróides.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Local da pesquisa.....	30
3.2. Animais.....	30
3.3. Organograma da Divisão dos Grupos, Colheitas de dados e Materiais.....	31
3.4. Divisão dos Grupos.....	31
3.5. Obtenção do Plasma Seminal.....	33
3.6. Protocolo da Corticóide-Terapia.....	34
3.7. Procedimento de Congelação do Sêmen.....	34
3.8. Análises do Sêmen Pós-Descongelção.....	35
3.9. Procedimento das Colheitas e Análise de Dados e Materiais.....	37
3.9.1. Ultra-Sonografia Uterina.....	37
3.9.2. Leucograma.....	39

3.9.3. Redução do NBT.....	40
3.9.4. Obtenção do Lavado Uterino.....	43
3.9.5. Quantificação da Imunoglobulina A.....	44
3.9.6. Citologia Cérvico-Uterina.....	48
3.9.7. Histologia Uterina.....	50
3.10. Teste de Fertilidade.....	52
3.11. Análise Estatística.....	55
4. RESULTADOS.....	56
5. DISCUSSÃO.....	70
6. CONCLUSÕES.....	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTAS DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Prova Não Estimulada de Redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT-NE). Neutrófilos segmentados reativos (NR) com a presença de formazan no interior do citoplasma.	42
Figura 2 - Prova Estimulada de Redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT-E). Neutrófilos segmentados reativos (NR) com a presença de formazan no interior do citoplasma (seta) e neutrófilos segmentados não reativos (NNR).	43
Figura 3 - Células Endometriais (Citologia Cérvico-Uterina)	49
Figura 4 - Inflamação Moderada (Citologia Cérvico-Uterina)	49
Figura 5 - Inflamação Severa (Citologia Cérvico-Uterina)	50

LISTA DE ESQUEMA

	Página
Esquema 1 - Seqüência dos eventos realizados para determinação da concentração de IgA, pelo método de ELISA.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Escore (0-3) de presença de conteúdo uterino: valores individuais, Média (x), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).	57
Tabela 2 -	Total de leucócitos no sangue: valores individuais, Média (x), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).	58
Tabela 3 -	Total de neutrófilos no sangue: valores individuais, Média (x), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).	59

- Tabela 4 - Porcentagem de neutrófilos reativos ao teste do NBT não estimulado: valores individuais, Média (\bar{x}), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. 60 Estatísticas calculadas (H e p).
- Tabela 5 - Porcentagem de neutrófilos reativos ao teste do NBT estimulado : valores individuais, Média (\bar{x}), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. 61 Estatísticas calculadas (H e p).
- Tabela 6 - Total de leucócitos $\times 10^6$ por ml de lavado uterino: valores individuais, Média (\bar{x}), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p). 62
- Tabela 7 - Total de IgA por ml de lavado uterino em $\mu\text{g/ml}$: valores individuais, Média (\bar{x}), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p). 63

- Tabela 8 - Total de IgA no soro em $\mu\text{g/ml}$: valores individuais, Média (\bar{x}), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p). 64
- Tabela 9 - Porcentagem de neutrófilos na citologia cérvico-uterina: valores individuais, Média (\bar{x}), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p). 65
- Tabela 10 - Escore (0-4) da resposta inflamatória aguda através de histologia uterina: valores individuais, Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p). 66

LISTA DE GRÁFICOS

Página

- Gráfico 1 - Taxa de prenhez em porcentagem nos grupos controle inseminado com 800×10^6 de espermatozóides pré-congelação e tratamento inseminado com 800×10^6 de espermatozóides pré-congelação + 20 mL de plasma seminal e submetido a corticóide-terapia ambos pós-ovulação, com deposição do sêmen no corpo do útero ($p>0,10$). 67
- Gráfico 2 - Taxa de prenhez em porcentagem nos grupos controle inseminado com 400×10^6 de espermatozóides pré-congelação e tratamento inseminado com 400×10^6 de espermatozóides pré-congelação e submetido a corticóide-terapia ambos pré e pós-ovulação, com deposição do sêmen no corpo do útero ($p>0,10$). 68

Gráfico 3 - Taxa de prenhez em porcentagem nos grupos controle inseminado com 200 a 500 x 10⁶ de espermatozóides viáveis pós-congelação e tratamento inseminado com 200 a 500 x 10⁶ de espermatozóides viáveis pós-congelação e submetido a corticóide-terapia com inseminação pré e pós-ovulação, e deposição do sêmen próximo a junção útero-tubárica (p<0,05). 69

RESUMO

Com o intuito de verificar a ação do acetato de prednisolona e do plasma seminal sobre a resposta inflamatória uterina de éguas inseminadas com sêmen congelado, desenvolveu-se os seguintes procedimentos: inicialmente 36 éguas foram aleatoriamente divididas em 6 grupos experimentais: G1 grupo controle, éguas não inseminadas; G2 éguas inseminadas com 800×10^6 de espermatozóides "in natura"; G3 éguas inseminadas com sêmen congelado 800×10^6 de espermatozóides viáveis pré-congelação; G4 éguas inseminadas com sêmen congelado 800×10^6 de espermatozóides viáveis pré-congelação + adição de 20 mL de plasma seminal; G5 éguas inseminadas com sêmen congelado 800×10^6 de espermatozóides viáveis pré-congelação + corticóide-terapia; G6 éguas inseminadas com sêmen congelado 800×10^6 de espermatozóides viáveis pré-congelação + adição de 20 mL de plasma seminal + corticóide-terapia. A corticóide-terapia foi iniciada quando os animais apresentavam folículos de 35 mm e edema uterino, neste momento, se efetuava a administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) e concomitantemente 0,1 mg/kg de acetato de prednisolona por via intramuscular (Predef[®]), e repetia-se o corticóide a cada 12 horas até a ovulação. Os animais dos grupos tratados com corticóide G5 e G6, demonstraram um decréscimo significativo na função neutrofílica, frente ao teste

da redução do tetrazólio nitroazul (NBT). O plasma seminal não alterou a intensidade da resposta inflamatória em nenhum dos testes realizados. No teste de fertilidade foram realizados dois grupos de inseminação, no primeiro, foram utilizadas éguas sem histórico de resposta inflamatória intensa pós-inseminação e não foi vista diferença estatística nos resultados de prenhes. Entretanto, no segundo teste de fertilidade, onde foram usadas éguas problemáticas, com históricos de endometrite pós-inseminação, o grupo tratado com a corticóide-terapia apresentou taxa de gestação significativamente maior em relação ao grupo controle, 67% contra 0% respectivamente. A corticóide-terapia se mostrou segura, sem quaisquer alterações físicas – reprodutivas dos animais tratados, mostrando-se uma opção adequada a animais com histórico de endometrite pós-cobertura. Futuras pesquisas são necessárias para sedimentar estes resultados e contribuir para o desenvolvimento da terapia preventiva nos casos de endometrites pós-inseminações.

Palavras chaves: Corticóide; Equino; Plasma seminal; Resposta inflamatória uterina; Sêmen congelado.

ABSTRACT

Aiming to verify the action of prednisolone acetate and of seminal plasma on the uterine inflammatory response of mares inseminated with frozen semen, the following procedures were developed. Thirty six mares were randomly allocated in 6 experimental groups: G1 control groups, with non-inseminated mares; G2 mares inseminated with 800×10^6 "in natura" sperm cells; G3 mares inseminated with 800×10^6 frozen-thawed sperm cells; G4 mares inseminated with 800×10^6 frozen-thawed sperm cells + 20 mL seminal plasma; G5 mares inseminated with 800×10^6 frozen-thawed sperm cells + cortico-therapy; G6 mares inseminated with 800×10^6 frozen-thawed sperm cells + 20 mL seminal plasma + cortico-therapy. The therapy with 0,1 mg/kg of prednisolone acetate (IM) (Predef[®]), was performed when the mares presented follicles with 35 mm and uterine edema. At this moment the ovulation was induced with human corionic gonadotrophin (hCG), and the corticoid administrations repeated every 12 hours until ovulation. In G5 and G6 when the animals were treated with corticoid, it was observed a significant decrease on the neutrophil function, analyzed by the tetrazolio nitroazul test (NBT). The infusion of seminal plasma did not modify the uterine inflammatory response in any of the performed tests. For the fertility test, two groups of inseminated mares were used. On the first one, mares with no history of intense uterine inflammatory response after insemination were used. No statistic differences were observed on

pregnancy results. However, on the second group of fertility test when problem mares, with history of post-insemination endometritis, were used, the corticoid-treated group presented a significant high pregnancy rate when compared with the control group (67% and 0% respectively). The cortico-therapy showed to be a safe method with no side effects on treated animals, representing an adequate choice for animals with history of post-insemination endometritis. Future research is needed to confirm those results and establish a preventive therapy for the post-insemination uterine infection.

Key words: uterine inflammatory response; frozen semen; seminal plasma; equine; corticoid.

1. INTRODUÇÃO

A modulação da resposta inflamatória uterina de éguas, vem sendo estudada por vários grupos de pesquisadores em todo mundo. Distúrbios neste fenômeno fisiológico, parecer ser alguns animais, um fator que contribui para o insucesso reprodutivo. A presença de células espermáticas no útero, faz com que este órgão promova uma resposta de defesa, na tentativa de eliminar o agente estranho.

O espermatozóide ao ser depositado no útero percorre um longo trajeto, até alcançar seu destino junto ao oviduto. Durante este percurso ele se movimenta, evitando ser fagocitado pelos polimorfonucleares (PMNs), atinge o oviduto e ainda permanece viável, até que ovócito seja liberado, para então fecundá-lo e dar início a uma nova vida.

Muitas são as possibilidades para que a fecundação não se realize, entretanto, a natureza destinou uma imensa população de células para desempenhar esta função. Com os avanços biotecnológicos hoje presentes e a severa seleção genética realizada, animais que naturalmente seriam eliminados da reprodução continuam sendo utilizados por vários anos, ocasionando o aparecimento de situações adversas que necessitam soluções para revertê-las.

Vários protocolos foram desenvolvidos visando tratar as desordens uterinas ocasionadas por um processo inflamatório indesejado, pós-inseminação. Todos estes procedimentos são baseados na terapia curativa. Lavagens para remoção

do conteúdo uterino excedente, uterotônicos, infusão de neutrófilos funcionalmente competentes, antibióticos, entre outros, alguns com implicações algumas vezes não desejadas.

A utilização da corticóide-terapia na prevenção da resposta inflamatória uterina pode contribuir com os protocolos atualmente existente, proporcionando a possibilidade de obtenção de melhores taxas de prenhes em éguas susceptíveis as endometrites pós-inseminação.

Com base numa ação preventiva para tratar a agressão imposta pela inseminação, levantou-se a hipótese da utilização de uma substância moduladora da resposta imune uterina que pudesse minimizar os efeitos indesejados da resposta inflamatória em alguns animais.

O presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito da resposta inflamatória uterina pós-inseminação, bem como avaliar a ação de duas substâncias tidas como moduladoras da resposta inflamatória uterina, por meio da inseminação com sêmen congelado sobre os índices de fertilidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Inflamação

A inflamação é a resposta do organismo a uma agressão. É um mecanismo essencial de proteção do organismo, de modo que fatores de defesa, como as imunoglobulinas, o sistema complemento e as células fagocitárias atinjam o local da agressão. As imunoglobulinas e os componentes do complemento são normalmente encontrados em baixas concentrações em fluidos teciduais, em comparação a sua porcentagem na corrente sanguínea. Moléculas maiores como as imunoglobulinas M (IgM), não tem a capacidade de transpor normalmente a barreira endotelial, desta forma os mecanismos da reação inflamatória, facilitam marginação destes fatores até a região afetada. A reação inflamatória é classificada de acordo com sua duração e severidade, em aguda e crônica (COLLINS et al, 1999).

A inflamação aguda se caracteriza por ocorrer poucas horas após a agressão, apresentando cinco características básicas: calor, tumor, rubor, dor e perda da função do local afetado. Imediatamente após a instalação da injúria, ocorre uma constricção das arteríolas e dilatação de todas as vênulas da região afetada, resultando num aumento do fluxo de sangue para o local. Poucas horas depois, ocorre uma diminuição gradual deste afluxo sanguíneo, retornando aos valores normais. Com a dilatação das vênulas há um aumento da permeabilidade

vascular, fazendo com que um exudato extravase para o tecido agredido, ocasionando edema local. Com o início das alterações vasculares, células de defesa como os neutrófilos, eosinófilos e os monócitos se aderem ao endotélio dos vasos e se existirem danos vasculares as plaquetas irão se aglutinar nessa região lesada para conter a hemorragia. Após a aderência das células de defesa na parede dos vasos, os leucócitos começam a migrar para o tecido agredido, os neutrófilos e os eosinófilos são os primeiros a transpor a parede vascular, devido a sua maior mobilidade no sangue, os monócitos por se moverem mais lentamente chegam depois (COLLINS et al, 1999).

Metchnikoff em 1883, formulou a teoria da fagocitose e propôs que os neutrófilos e os monócitos são a primeira linha de defesa do organismo contra a invasão de microorganismos (PARK, 1971). A principal função dos neutrófilos é fagocitar e destruir bactérias, entretanto podem danificar ou destruir fungos, leveduras, algas, parasitas e vírus. Podem ainda, induzir citotoxicidade celular dependente de anticorpos para destruir células infectadas ou transformadas (ROTH et al. 1982a; FELDMAN et al., 2000). Para exercer efetivamente sua função, os neutrófilos devem ser atraídos para o local da agressão através de fatores quimiotáticos, aderirem à parede endotelial, atravessarem o endotélio vascular, fagocitar e destruir os microorganismos invasores (ROTH & KAEBERLE, 1982). Qualquer fator que interfira com a produção ou a supressão das funções de

neutrófilos, rapidamente torna o animal mais susceptível a doenças infecciosas (ROTH & KAEBERLE, 1982; FELDMAN et al., 2000).

Os fagócitos possuem alguma habilidade intrínseca de ligação direta a bactéria e a outros microorganismos, mas esta estará aumentada se a bactéria estiver ativada o sistema complemento. As bactérias terão então o fator do complemento C3b ligado e desta forma as células podem se ligar às bactérias através de receptores para C3b. A opsonização de organismos que não estimulam o sistema complemento de forma adequada é realizada por meio de anticorpos que atuam como ponte entre o antígeno e o receptor Fc do fagócito. Anticorpos também são capazes de ativar o sistema complemento e se ambos, anticorpo e C3b realizarem a opsonização, a ligação torna-se muito mais intensa (ROITT, 1994).

Num sítio de inflamação, a lesão tecidual e a ativação do sistema complemento causada pelo antígeno provocam a liberação de peptídios quimiotáticos. Estes se difundem para os capilares adjacentes, causando a aderência dos fagócitos que transitam por este vaso ao endotélio (adesão). Os fagócitos então emitem pseudópodos entre as células endoteliais e dissolvem a membrana basal (diapedese), passando para o exterior do vaso e movendo-se pelo gradiente de concentração dos peptídios quimiotáticos em direção ao local da inflamação (ROITT, 1994).

Os fagócitos chegam ao sítio inflamatório por quimiotaxia. Podem ligar-se aos microorganismos através de receptores inespecíficos de superfície ou, se o antígeno é opsonizado com a fração C3b do sistema complemento, esta ligação ocorrerá por meio desses receptores. Neste momento se a membrana celular é ativada pelo agente infeccioso, este será englobado pelo fagossoma com auxílio de pseudópodos que o envolverão. Dentro da célula os lisossomos se fundirão ao fagossoma para formar um fagolisossoma destruindo o agente com um arsenal de mecanismos bactericidas. Os produtos microbianos não digeridos podem ser liberados para o exterior (ROITT, 1994).

A inflamação crônica ocorre muitas horas após os neutrófilos terem atingido o foco da inflamação os monócitos chegam ao local; eles são atraídos por muitos fatores, tais como: os próprios neutrófilos, o colágeno, a elastina, o fibrinogênio e as linfocinas. Com a chegada dos monócitos ocorre ativação da inflamação macrofágica, (realizada pelos macrófagos) que fagocitam os tecidos mortos e danificados, os neutrófilos e o fibrinogênio, eles liberam também as colagenases e elastases que prontamente atuam sobre o tecido conjuntivo, liberam também o plasminogênio ativador, ocorrendo a liberação de “plasmina”. As interleucinas I atraídas pelos macrófagos, ativam a síntese dos fibroblastos que produzem o colágeno que reparará o tecido danificado, resultando em tecido cicatricial (COLLINS et al, 1999).

Os linfócitos são responsáveis pelo reconhecimento imune específico dos patógenos e pelo desencadeamento da resposta imune adaptativas. As células B produzem anticorpos, enquanto as células T auxiliares (T_a) são estimuladas pelas células apresentadoras de antígeno (CAA), a produzirem citocinas as quais controlam as respostas imunes. As células T citotóxicas (T_c) e os linfócitos grandes granulares (LGG), podem reconhecer e destruir células-alvo do hospedeiro (ROITT, 1994).

2.2. Ação dos Corticosteróides no Sistema Imune

Por serem hormônios esteróides apresentam a condição de transporem prontamente a membrana plasmática celular, ligando-se a receptores no citoplasma, este complexo receptor/esteróide é transportado até o núcleo da célula, onde se liga a cromatina de proteínas e ao DNA, resultando na depressão da transcrição do RNA, gerando um novo RNAm que inativa a síntese de proteínas, promovendo uma nova síntese protéica que media os efeitos da droga. Há um bloqueio da atividade da fosfolipase A₂ da membrana celular, promovendo uma inibição da produção de ácido aracdônio, síntese de leucotrienos e prostaglandinas (TIZARD, 1992).

Os corticóides atuam basicamente sobre quatro áreas: sobre o efeito da circulação de leucócitos; interferindo no mecanismo da imunidade linfocitária;

modulando os mediadores da inflamação e modificando as proteínas, carboidratos e o metabolismo de gorduras.

Os efeitos dos corticóides sobre os componentes do sistema imune são: em relação aos **neutrófilos** = neutrofilia, depressão da quimiotaxia, depressão da marginação, depressão da fagocitose, depressão da reação de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo, depressão da atividade bactericida; **macrófagos** = depressão da quimiotaxia, depressão da fagocitose, depressão da atividade bactericida, depressão da produção de IL-1, depressão do processo antigênico; **linfócitos** = depressão da proliferação, depressão da resposta das células T, prejuízos aos mediadores citotóxicos de células T, depressão da produção de IL-2, depressão da produção de linfocinas; **imunoglobulinas** = causam pequena diminuição; **sistema complemento** = sem efeito.

2.3. Mecanismos de Defesa Uterina

O ambiente uterino sadio oferece as condições ideais para que ocorra primeiramente o transporte espermático ao sítio de fecundação e posteriormente o desenvolvimento embrionário. O fluido uterino é composto de hormônios, prostaglandinas, enzimas, substratos energéticos, íons, vitaminas, aminoácidos, peptídeos, proteínas séricas e proteínas uterinas (FISHER & BEIER, 1986). Os vasos uterinos são a barreira de comunicação entre o sangue e os fluidos uterinos

determinando a taxa de troca de substâncias entre eles. O fluido uterino é formado deslocando no seguinte percurso: sangue intravascular, substrato endometrial e substâncias intrauterinas (MCRAE, 1988).

A cobertura ou monta natural é comumente associada às causas de endometrites. Todos os garanhões são hospedeiros para diversas espécies de bactérias em sua genitália externa e no seu sêmen (DIMOCK & SNYDER, 1924; HUGHES et al., 1967; MILLAR & FRANCIS, 1974 e SIMPSON et al., 1975). Uma pressão negativa uterina é a responsável pela deposição do sêmen dentro do útero da égua durante o coito (MILLAR, 1952). Como muitas bactérias são habitantes da flora normal da vagina (HINRICHS et al., 1988), estas são deslocadas para o interior uterino durante a cópula. Mais de 80% das éguas são bacteriologicamente positivas em culturas cervicais 24 horas após a cobertura (BRYANS, 1962). Atualmente com a utilização da inseminação artificial (IA) e, particularmente com o uso da colheita de sêmen através de vagina artificial e diluição em extensores com antibióticos o número de éguas contaminadas pós-inseminação diminuiu bastante (TISCHNER et al., 1974).

Os polimorfonucleares (PMNs) estão presentes no ambiente uterino após a deposição do sêmen (BROOK, 1985). Um grande número de leucócitos foi detectado em lavagens uterinas de éguas após a inseminação, e espermatozóides freqüentemente sendo fagocitados por PMNs (BADER & KRAUSE, 1980). Estas inflamações eram associadas à presença de bactérias decorrentes da cobertura,

baseadas nos estudos de Bryans (1962). Entretanto, em coelhos (TYLER, 1977) e humanos (COHEN, 1984), a presença de leucócitos ocorria por uma resposta fisiológica contra os espermatozóides, e era semelhante à vista nos eqüinos.

A endometrite induzida pós-inseminação é uma inflamação fisiológica e transitória que serve para limpeza do excesso de espermatozóides mortos e outros contaminantes uterinos formados pela deposição do sêmen (TROEDSSON, 1999).

A inflamação é causada pela presença espermática no útero, e caracteriza-se por uma rápida infusão de PMNs uma hora após a inseminação e se debela em aproximadamente 36 horas nas éguas normais (KOTILAINEN et al, 1994; KATILA, 1995; TROEDSSON, 1999 e TROEDSSON et al, 2000, 2001).

A habilidade das éguas em eliminar as infecções uterinas tem sido muito estudada ultimamente. Inoculações intrauterinas experimentais de *Streptococcus zooepidemicus* é geralmente o método mais utilizado para pesquisar os mecanismos de defesa do endométrio desde sua primeira utilização em 1969 por Huglhes & Loy e Peterson et al. Estes estudos mostraram que em menos de seis horas após o desafio com as bactérias grande quantidades de PMNs já se encontravam na luz uterina e 12 horas após iniciava-se a diminuição desses valores. Éguas jovens e saudáveis apresentavam retorno as suas condições aparentemente normais 96 horas após a inoculação, entretanto alguns animais

requeriam mais tempo para a eliminação das bactérias e foram denominadas de persistentes a endometrite (HUGHES & LOY 1969; PETERSON et al. 1969).

Embora Hughes & Loy (1969) e Peterson et al. (1969) tenham demonstrado que éguas diferem quanto à sensibilidade a infecções uterinas, estes não conseguiram esclarecer como este fenômeno ocorria. Subseqüentemente vários estudos foram desenvolvidos na busca de desvendar os mecanismos da limpeza uterina das éguas. A maior dificuldade no desenvolvimento destes trabalhos era a seleção de éguas susceptíveis e resistentes a endometrites. O critério mais comumente se baseia no histórico reprodutivo do animal e/ou análises histológicas do endométrio através de biópsia.

Troedsson et al. (1993), determinaram que um endométrio era considerado normal e resistente a infecções comparando seus achados em éguas susceptíveis que apresentavam grandes alterações histopatológicas em seus tecidos uterinos. Alterações histopatológicas médias ou leves não apresentavam correlações entre éguas susceptíveis e resistentes.

Em outro estudo realizado por Williamson et al. (1989) os autores apresentaram uma conclusão diferente. Esses pesquisadores concluíram que o histórico do animal apresentava uma correlação bem maior em sensibilidade (0,9) e especificidade (0,95) a animais susceptíveis a endometrite em comparação aos graus severos de degeneração uterina obtidos pela biópsia (sensibilidade 0,5 e especificidade 0,75). Um bom método proposto para identificação de animais

susceptíveis e resistentes a endometrite foi à infusão uterina com bactérias e verificação do tempo de “clearance” pós-inoculação maior ou menor que 96 horas (TROEDSSON, 1991). Outro método proposto LeBlanc, (1994) foi à infusão de carvão vegetal em éguas no estro, as que retinham o carvão vegetal no útero por de 48 horas eram tidas como susceptíveis.

2.3.1. Resposta Celular

Os principais elementos que participam deste mecanismo são os neutrófilos. Quando ocorre uma agressão, essas células aumentam muito seu número na luz uterina conferindo uma boa segurança na interpretação do exame citológico, que é um método diagnóstico de endometrites nas éguas (WINGFIELD-DIGBY, 1978).

Com a invasão do útero por um agente estranho, através da liberação de produtos de seu metabolismo, ocorre uma atração de neutrófilos (quimiotaxia). Entre as substâncias quimiotáticas mais importantes destacam-se componente C5a do sistema complemento e os metabólicos do ácido aracdônio (prostaglandinas F e G, leucotrienos e troboxanas). Para que os neutrófilos reconheçam a célula alvo de seu ataque é necessário que ocorra a opsonização (ligação das opsoninas ao antígeno) desta forma os polimorfonucleares começam a desenvolver sua função. As principais opsoninas conhecidas são o componente

C3b do sistema complemento, as imunoglobulinas G e M e a fibronectina (TROEDSSON, 1991).

Em 1984, Blue et al, estudaram a concentração de fatores quimiotáticos no fluido uterino e verificaram que seu valor é maior em éguas com endometrites, destacando a importância de se diferenciar uma disfunção primária de polimorfonucleares, de uma secundária, resultante das propriedades imunoreguladoras do útero, desta forma esclarecendo o papel da quimiotaxia na formação das endometrites.

Verificando a habilidade migratória de neutrófilos em filtros de milipore, concluiu-se que polimorfonucleares provenientes de animais susceptíveis a endometrites apresentavam um menor deslocamento quando comparados a células de éguas resistentes, entretanto, em relação a neutrófilos circulantes não se obteve diferença significativa entre os dois grupos testados (LIU et al., 1985).

Já em outro experimento, Watson et al. (1987), observaram uma menor habilidade de deslocamento de neutrófilos circulantes de éguas susceptíveis em gel de agarose, em relação a animais resistentes.

Brown et al., (1985), destacaram que a atividade opsonizante do fluido uterino é um evento independente do sistema complemento, já que o componente C3b encontra-se biologicamente inativo e predominantemente degradado nesta secreção, concluindo que as imunoglobulinas são os fatores de maior importância neste processo.

Concordando com esses achados, Hansen & Asbury (1987) verificaram concentrações maiores de opsoninas em lavados uterinos de éguas susceptíveis, quando desafiadas com cepas de *Streptococcus zooepidemicus* em relação as resistentes, neste experimento os autores utilizaram temperatura de 56°C, onde os mesmos relatam que o sistema complemento é inativado, restando apenas as opsonizações realizadas pelas imunoglobulinas.

Em um trabalho onde se estudou os neutrófilos e a secreção uterina de animais susceptíveis e resistentes a endometrites após desafio com *Streptococcus zooepidemicus*, verificando-se a quimiotaxia para a atividade opsonizante e a capacidade fagocitária, observou-se que a fagocitose foi equivalente entre os grupos testados, entretanto, a opsonização foi menor em éguas susceptíveis mesmo estes animais apresentando uma maior concentração de fatores quimiotáticos, concluindo que a ação fagocitária em animais susceptíveis é decorrente de uma má opsonização e não de uma deficiência primária da função dos neutrófilos (TROEDSSON et al 1993).

Pycock & Allen (1990), investigando a ação da lisozima e da lactata desidrogenase, ambas substâncias bactericidas presentes no útero sadio, verificaram a presença da prostaglandina E2 (PGE2) no útero (fator de quimiotaxia), após a inflamação e concluíram que a PGE2 é um potente vasodilatador, potencializando a permeabilidade vascular produzida pela histamina e bradicinina.

2.3.2. Resposta Humoral

O mecanismo humoral contribui na defesa fisiológica uterina através da ação das imunoglobulinas, Kenney & Khaleel (1975) foram os primeiros a estudarem este processo utilizando técnicas de imunodifusão e imunofluorescência, demonstrando a existência de IgA, IgG e IgM na luz do útero.

O efeito da fase do ciclo estral sobre os níveis de imunoglobulinas e albumina sérica no fluído folicular, oviduto, útero e secreção vaginal foram avaliados por Widders et al. (1985). A taxa de imunoglobulinas séricas não variou durante o estro, embora os níveis de imunoglobulina M (IgM) foram mais elevados em éguas ciclando comparado a animais não ciclando (anestro ou pré-púberes). Também não houve variação na concentração de proteínas nos líquidos do oviduto e folicular. No útero imunoglobulina A (IgA) e G (IgG), tiveram uma concentração maior no estro que no diestro, e a IgM se mostrou de maneira inversa. Os níveis de albumina não se alteraram, entretanto, em dados absolutos IgG, IgA, albumina e proteínas totais tiveram uma maior duração no diestro e menos no estro. Na vagina houve maior concentração de proteínas que em relação ao útero, embora a IgA relativa às proteínas totais estiveram em maior concentração no útero que na vagina.

Mitchell et al (1982), verificaram que as concentrações de IgA tanto séricas como na luz uterina, foram significativamente maiores que as demais

imunoglobulinas, desta forma ressaltaram que esta é a principal imunoglobulina produzida localmente.

Células produtoras de IgA constituem o tipo mais numeroso no trato genital, entretanto, verifica-se que as imunoglobulinas G estão predominantemente no endométrio (WIDDERS et al, 1984).

Estudando a influência do estrógeno e da progesterona na atividade antibacteriana e atividade secretora de imunoglobulinas no fluido uterino de éguas submetidas a ovariectomia, determinou-se que as concentrações de IgG na secreção uterina é maior nos animais tratados com progesterona. E em relação aos submetidos a administrações de estrógeno, verificou-se que os níveis de IgG nos animais em “cio” e em fase luteal, e observaram que as concentrações foram maiores na presença do corpo lúteo, sugerindo que outros fatores uterinos são os responsáveis pela ativação das defesas antibacterianas no útero (JOHNSON et al, 1994).

Asbury et al 1980, comparando éguas resistentes e susceptíveis a endometrites crônicas observaram que o útero dos animais susceptíveis produz uma quantidade significativamente maior de imunoglobulinas após o desafio bacteriano. Mitchell et al 1982, encontraram altas concentrações de IgA e IgG no fluido uterino de animais susceptíveis.

2.3.3. Defesa Física

Após a inseminação, o sêmen é transportado e eliminado em um processo rápido dentro do genital da égua. A frequência das contrações uterinas move o sêmen para frente e para trás entre o corpo e os cornos uterinos durante a primeira meia hora. Passadas quatro horas da inseminação a maioria dos espermatozóides já haviam sido eliminados. (KATILA et al.1998)

LeBlanc et al. (1989), na mesma linha de pesquisa que BROWN et al. (1985), determinaram o mecanismo de limpeza uterina no período seguinte a ovulação. Às éguas susceptíveis a endometrites acumularam mais líquido no interior do útero que as resistentes a essa patologia após a ovulação, demonstrando que o conteúdo celular e bacteriano nessa fase se dá em decorrência de uma disfunção do mecanismo de defesa do animal. Entretanto, ressaltaram que aparentemente o mecanismo de contração miometrial (limpeza mecânica), parece não ser o responsável por essa inflamação pós-ovulação.

Utilizando a ultra-sonografia Ginther & Pierson, 1984, observaram que éguas susceptíveis as endometrites recorrentes retêm uma quantidade significativa de líquido na luz uterina, sugerindo que nestes animais possa estar havendo uma deficiência de contratilidade uterina, sendo este um dos fatores importantes a cronicidade da patologia.

Num estudo utilizando esferas não antigênicas, em animais susceptíveis e resistentes as endometrites verificou-se que a eliminação destas esferas foi

diminuída nas éguas susceptíveis, concluindo que a atividade contrátil do útero para eliminação de agentes infecciosos e produtos da inflamação é extremamente importante para a plena atividade reprodutiva do animal (TROEDSSON & LIU, 1991).

Allen & Pycock (1989) verificaram também, a diminuição de contratilidade uterina em animais susceptíveis as endometrites e sugeriram que este acúmulo de secreção pode atuar como meio de cultura para agentes oportunistas agravando o quadro patológico.

Em 1994, LeBlanc et al, realizaram trabalhos relacionados à limpeza uterino, o primeiro utilizando-se da técnica da cintilografia e verificaram que em éguas susceptíveis a administração de ocitocina foi eficaz na promoção da limpeza do endométrio, posteriormente infundiram corante “nanquim” e observaram que a drenagem linfática do útero de animais resistentes as endometrites é um mecanismo bem mais efetivo, do que o visto nas susceptíveis.

2.4. Ação do Plasma Seminal

Muitos estudos têm sido direcionados para verificação da importância do plasma seminal na modulação da resposta inflamatória uterina de éguas.

A importância da endometrite pós-cobertura ainda não está bem esclarecida, se por um lado auxiliam na limpeza uterina, por outro, podem interferir na fertilidade do animal.

Muitos autores relatam o efeito imunossupressor do plasma seminal em várias espécies inclusive nos eqüinos (ANDERSON & TARTER, 1982; SCHOPE et al. 1984; BOUVET et al. 1987; TROEDSSON et al. 1995, 2000; IMADE et al. 1997 e ROZEBOOM et al. 1999, 2000, 2001).

Segundo Troedsson et al. (1999), o plasma seminal tem um efeito supressivo sobre a atividade do complemento, em outro experimento, Troedsson et al. (1998), verificaram que o plasma seminal suprime a migração dos PMNs “in vitro”.

Estudando a ocorrência da endometrite, contratilidade uterina e taxa de prenhes de éguas inseminadas com baixa dose de espermatozóides, na presença ou não de plasma seminal, Katila et al. (2004), verificaram que houve um aumento do número de neutrófilos nas éguas inseminadas com plasma seminal e que a contratilidade uterina foi significativamente mais freqüente ($p < 0,05$) nos animais que não receberam o plasma seminal, embora a taxa de prenhes não diferenciou entre os grupos estudados.

Fiala et al. (2004), utilizando várias doses (100, 500 e 1000 x 10⁶ de espermatozóides) de sêmen refrigerado entre 18 a 22 horas na presença ou não de plasma seminal e extensor a base de leite desnatado, verificaram que as éguas inseminadas e infundidas com plasma seminal e leite desnatado apresentaram maiores valores de leucócitos no lavado uterino em relação às éguas não inseminadas. E que a intensidade da reação era maior quando se aumentava a

dose inseminante e quanto maior a reação, mais rápida foi à resolução do processo inflamatório, entretanto o número de espermatozóides que chegaram ao oviduto foi independente da dose utilizada.

Alghamdi et al. (2004), verificaram que as inseminações artificiais realizadas, doze horas após a indução de uma resposta inflamatória uterina com espermatozóides mortos, obtiveram 77% de prenhes quando usaram espermatozóides ressuspendidos em plasma seminal contra 5% de gestação ao ressuspenderem os espermatozóides em diluente a base de leite desnatado.

2.5. Métodos de Avaliação da Condição Uterina

2.5.1. Palpação Retal e Ultra-Sonografia

A palpação retal é a mais antiga e ainda mais comumente forma de avaliação da condição uterina de éguas. A verificação do tamanho, simetria e tônus uterino são maneiras úteis de avaliação da condição reprodutiva de éguas. Entretanto, esta intervenção é subjetiva e requer grande habilidade e experiência do profissional que a realiza. Como muitos diagnósticos de alterações uterinas necessitam de uma acurácia maior, a ultra-sonografia veio a corroborar na identificação, direcionando a um tratamento mais específico.

A ultra-sonografia retal facilita a visualização de pequenos acúmulos de líquidos no interior do útero (GINTHER & PIERSON, 1984). De acordo com

McKinnon et al. (1988), acúmulos de líquidos menores que 3 mm de diâmetro são normais durante o estro. Os graus de ecogenicidade dos fluidos vistos no útero são correlacionados com a quantidade de debris e leucócitos presentes (MCKINNON et al. 1988).

2.5.2. Citologia Cérvico-Uterina

O exame citológico do útero tem o objetivo de verificar principalmente a presença ou ausência de neutrófilos. PMNs não estão presentes no útero de éguas normais em nenhuma fase do ciclo estral, exceção do estro com no máximo 5% em alguns animais e após a cobertura, parto ou inseminação, em outros casos é um indicativo de endometrite. A lavagem uterina para obtenção de material para análise da citológica se mostrou menos eficiente que o método do “swab” (BALL et al. 1988). E a utilização da escova citológica ao “swab” demonstrou ser mais eficiente segundo Alvarenga & Mattos, 1990 em relação à quantidade de material obtido por intervenção.

2.5.3. Histologia Uterina

A histologia do endométrio é um exame realizado através da obtenção de um fragmento uterino. Inflamações agudas e crônicas podem ser distinguidas em suas severidade por esse método. Degenerações glandulares, fibroses

periglandulares, cistos glandulares ou linfáticos e alterações vasculares podem ser visualizadas por esta metodologia (KENNEY, 1978).

Kenney, (1978) dividiu as éguas em três categorias segundo os achados histopatológicos: categoria I endométrio normal com boa expectativa de concepção. Categoria III grandes alterações morfológicas, animais com taxa de prenhes menor que 10%. A categoria II foi subdividida em mais duas categorias IIA e IIB éguas com algumas alterações uterinas e variando a taxa de gestação entre 50-80% e 10-50%, respectivamente (KENNEY & DOIG, 1986).

Segundo Katila et al. (1988), a biópsia uterina promove um melhor entendimento do quadro endometrial comparado ao “swab” citológico.

2.6. Técnicas de Avaliação da Função Neutrófila

2.6.1. Metabolismo Oxidativo de Neutrófilos

Os mecanismos antibacterianos dos neutrófilos são classificados em dependentes e independentes de oxigênio. O mecanismo dependente de oxigênio é iniciado pela fagocitose ou por distúrbios na membrana da célula e envolve uma série de reações que produz espécies reativas de oxigênio que interagem com outras substâncias ou atuam diretamente contra as bactérias. A ativação do metabolismo oxidativo de neutrófilos é modulada por vários mediadores inflamatórios como o peptídeo N-formilado, os leucotrienos, o fator ativador de

plaquetas, o fator estimulador de colônias de granulócito (G-CSF), fator estimulador de colônias granulócito-monócito (GM-CSF), o interferon- γ e o fator de necrose tumoral (TNF). Nas reações inflamatórias os monócitos e/ou linfócitos ativados secretam várias citocinas, como interleucina-1 (IL-1), o TNF e o interferon- γ que estimulam as células endoteliais e/ou os fibroblastos a secretarem os fatores estimuladores de colônias (G-CFS e GM-CFS), que ativam os neutrófilos. Outros estímulos envolvidos no disparo da explosão respiratória são as partículas opsonizadas, alguns componentes do complemento, a imunoglobulina G (IgG), a concavalina A e a fosfolipase C (STYRT, 1989).

A ativação da adenina nicotinamina dinucleotídeo fosfato ligada à membrana (NADPH oxidase) depende da interação do citocromo b associado à membrana e de outras proteínas localizadas no interior da célula. Sob estímulo, as proteínas do citosol são transportadas para a membrana e completa o sistema NADPH oxidase. O sistema NADPH oxidase catalisa a reação de redução do oxigênio molecular (O_2) para ânion superóxido (O_2^-), determinando um rápido aumento na atividade da oxidase causando uma explosão respiratória no consumo de oxigênio ("respiratory burst"). As reações da explosão respiratória produzem derivados tóxicos do oxigênio no vacúolo fagocítico. Porém, esta reação é dependente de uma contínua redução do NADP para suprir o elétron receptor NADPH na redução do oxigênio (O_2) para ânion superóxido (O_2^-). O NADPH é suprido por um aumento no metabolismo da glicose através da via da hexose

monofosfato. Após o ânion superóxido (O_2^-) ser produzido, ele é rapidamente transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) geram a hidroxila (OH^-) e o oxigênio (O_2) (KANEKO et al., 1997).

2.6.2. Avaliação do Metabolismo Oxidativo de Neutrófilos por meio do Teste de Redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT)

Existem muitos métodos para a avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos. Estes testes incluem a redução do tetrazólio nitroazul (NBT), a determinação do consumo de oxigênio, a redução do citocromo c, a quimiluminescência (KANEKO et al., 1997) e a citometria de fluxo pela 2-7-diclorofluoresceína e o 123-dihidrorodamine (VAN EEDEN et al., 1999). Dentre estes métodos, o teste de redução do NBT é um dos mais utilizados.

O teste do NBT foi primeiramente utilizado por Baehner & Nathan (1967) para o diagnóstico de doença granulomatosa crônica (CGD) em crianças. A CGD é uma doença genética que produz alteração na função de neutrófilos, determinando deficiência na produção da enzima NADPH-oxidase. Nestes neutrófilos, apesar da fagocitose normal das bactérias, a destruição e a morte do microorganismo está inibida pela ausência na produção da enzima NADPH-oxidase (BAHENER & NATHAN, 1968) de grande importância na geração de

ânions superóxido (O_2^-). Desta maneira, a CGD é caracterizada pela presença de infecções bacterianas crônicas recorrentes (BABIOR, 1978).

O NBT é um corante amarelo claro que quando adicionado a uma suspensão de neutrófilos entra no vacúolo fagocítico junto com a partícula ingerida. No vacúolo fagocítico, o corante é reduzido pelo ânion superóxido a um precipitado insolúvel de coloração azul enegrecida conhecido como formazam (NATHAN, 1974). A redução do NBT tem uma estreita correlação com o metabolismo oxidativo e avalia um importante componente da atividade bactericida do neutrófilo (ROTH et al., 1983).

O teste do NBT pode ser considerado como uma mensuração indireta da atividade microbica dependente de oxigênio dos neutrófilos (GORDON et al. 1975; JAIN, 1986) e pode ser avaliado por meio da microscopia óptica ou por espectrofotometria (METCALF et al., 1986). Na avaliação pela microscopia óptica a localização do formazam é muito heterogênea, podendo apresentar-se ligado à membrana da célula ou no interior dos fagócitos (NATHAN, 1974). Os depósitos de formazam podem ser reconhecidos de duas formas: um único e grande depósito de coloração negra localizada no citoplasma das células ativadas, representando o vacúolo fagocítico, ou como múltiplas manchas negras distribuídas aleatoriamente no citoplasma da célula. Alguns fatores podem dificultar a identificação do formazam, como aglomerados de plaquetas e

neutrófilos ou quando as plaquetas estão localizadas sobre o neutrófilo (NATHAN, 1974).

Park & Good (1970) com o objetivo de evitar resultados falsos negativos, desenvolveram uma técnica que avalia a capacidade dos neutrófilos em reduzir o NBT na presença de um estimulante à base de extrato bacteriano inativado, conhecido como teste estimulado de redução do NBT (NBT-E). O teste do NBT-E distingue os resultados falsos negativos devido a defeitos metabólicos dos resultados verdadeiramente negativos associados com a ausência de infecção bacteriana ativa. A extensão da produção do formazan pelo fagócito em repouso é muito menor do que aquela observada durante a fagocitose.

Algumas suposições devem ser feitas quanto ao uso do teste do NBT: os sistemas de fagocitose celular e humoral do hospedeiro devem estar funcionando normalmente no período do teste e a infecção deve envolver a circulação sistêmica (PARK, 1971).

Park et al. (1968) desenvolveram o teste do NBT como um teste não específico *in vitro* para um rápido auxílio no diagnóstico diferencial entre infecções bacterianas e doenças inflamatórias de origem não bacteriana em crianças. A presença de intensos depósitos de formazan foram característicos em infecções bacterianas, na malária, micoplasmose e meningite viral. O teste do NBT foi considerado como de triagem em hospitais (SARA & DWARAKNATH, 1977), porém estudos têm demonstrado que é inútil para a diferenciação entre

leucocitose de origem infecciosa e não infecciosa. O teste seria útil na triagem para defeitos na explosão respiratória em pacientes com infecções crônicas recorrentes (BABIOR, 1978).

Na medicina veterinária, Poli et al. (1973) foram os primeiros a utilizarem o teste do NBT em doenças bacterianas de cães.

Poli & Manteli (1974) estudaram o metabolismo oxidativo de neutrófilos por meio do teste do NBT em animais sadios de várias espécies. Para cabras sadias da raça Tibetana obtiveram valores normais de 0 a 3% de células NBT positivas.

Ultimamente, vários autores têm estudado o metabolismo oxidativo de neutrófilos por meio do teste do NBT em diversas situações e espécies de animais, como Ciarlini (1998) em ovinos, Costa (2000), Costa et al. (2000) e Borges et al. (1999) em bovinos, Lopes (2000) em caprinos, Ciarlini et al. (1997) e Laposy et al. (2000) em eqüinos.

2.6.3. Metabolismo Oxidativo de Neutrófilos associado ao Cortisol e outros Corticosteróides

Os corticosteróides são conhecidos por alterarem vários aspectos das funções dos neutrófilos. Entretanto, as investigações relativas a este fenômeno têm variado em seu resultado devido a alguns fatores como: os métodos usados nas pesquisas, as espécies investigadas, os sistemas de ensaios *in vivo* ou *in*

vitro, a composição dos corticosteróides e a concentração da droga utilizada (MADDUX & KEETON, 1987).

Sabe-se que em testes *in vivo* os glicocorticóides na forma de succinato devem ser ativados por uma esterase hepática, sendo que, *in vitro*, sua clivagem ocorre lentamente. Assim, é necessária maior quantidade de corticóides na forma de succinato para alterar as funções de neutrófilos em testes *in vitro*. Além disso, *in vivo*, a administração de corticosteróides pode ter efeito indireto sobre a função de neutrófilos pela alteração dos mediadores da inflamação (ROTH & KAEBERLE, 1981).

Maddux & Keeton (1987) observaram diminuição do metabolismo oxidativo de neutrófilos (redução do citocromo c) em cabras tratadas com dexametasona. Segundo Roth & Kaeberle (1981) a mesma droga também suprimiu a redução do NBT em bovinos. A supressão na redução do NBT indica que um importante mecanismo bactericida está diminuído.

Em humanos, a hidrocortisona foi caracterizada por diminuir a oxidase, que é a enzima que inicia a explosão respiratória (MANDEL et al., 1970; CHRETIEN & GARAGUSI, 1972). O teste do NBT também foi suprimido por altas dosagens de corticosteróides em humanos (MATULA & PATERSON, 1971), sendo que a redução na dosagem diária dos corticosteróides elevou os resultados do NBT para valores normais com um desaparecimento do efeito supressivo.

Porém, a administração de ACTH (200 U.I.) em bovinos provocou aumento da concentração de cortisol, mas não teve efeito sobre a redução do NBT nos neutrófilos (ROTH et al., 1982b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

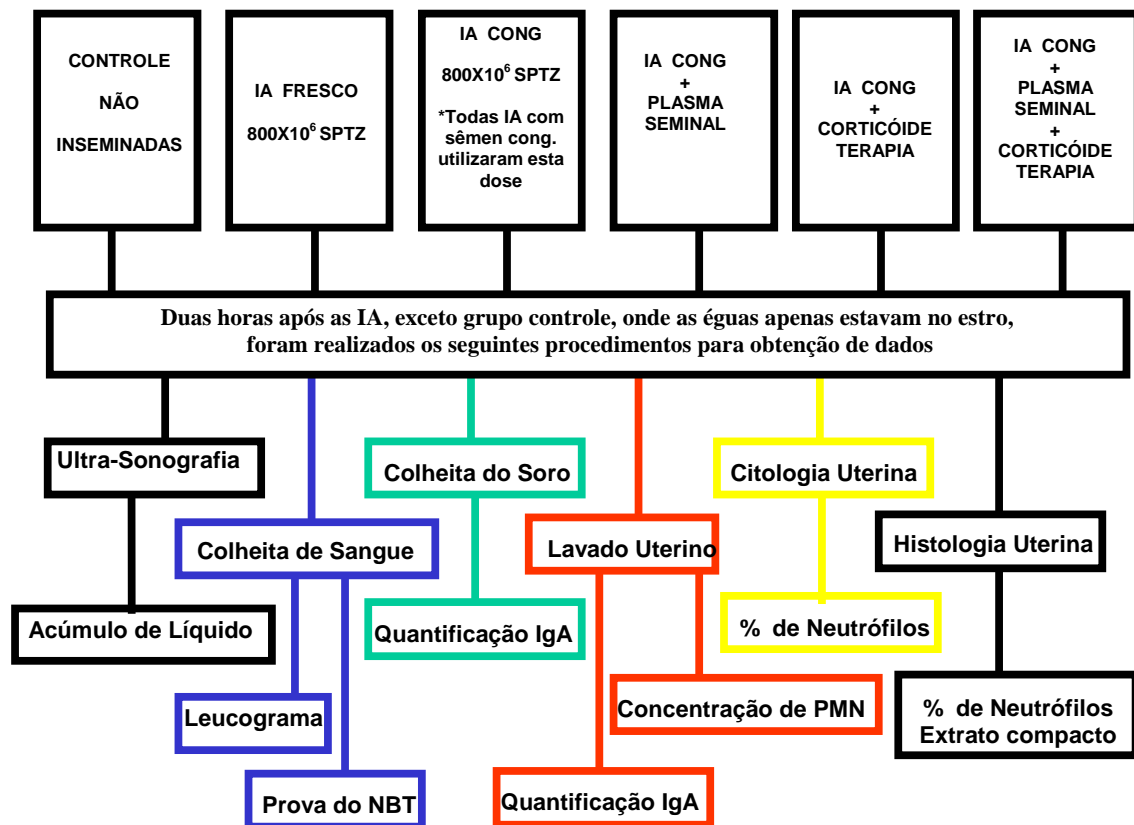
3.1. Local da Pesquisa

O experimento foi realizado em duas etapas: 1) Colheita e análise das amostras: realizado junto ao CERBEQ – Centro de Reprodução e Biotecnologia Eqüina (Posto de Monta), localizado na Fazenda Lageado, pertencente ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP, Campus de Botucatu, Departamentos pertencentes FMVZ: Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e Departamento de Clínica Veterinária junto ao Laboratório Clínico, também no Instituto de Biociências (IB), no Departamento de Microbiologia e Imunologia. 2) Teste de fertilidade: foi efetuado nas instalações do CERBEQ e do Haras Santa Maria, localizado no município de Itapetininga, SP.

3.2. Animais

Foram utilizadas 33 éguas mestiças com idade variando entre quatro e 15 anos, de fertilidade conhecida. O sêmen utilizado nesta fase do experimento tanto para as inseminações “in natura” (Fresco) como em doses congeladas foram de um garanhão da raça Westernfalin de 12 anos de idade com fertilidade comprovada.

3.3. Organograma da Divisão dos Grupos, Colheitas de Dados e Materiais



3.4. Divisão dos Grupos

Inicialmente 36 éguas foram aleatoriamente divididas em três grupos para verificação da resposta inflamatória uterina promovida após a inseminação. Duas horas após as inseminações com exceção do grupo controle (éguas não inseminadas), foi colhido material ou dados para realização dos seguintes testes: ultra-sonografia uterina, lavado uterino para quantificação de leucócitos e dosagem de Imunoglobulina A (IgA), colheita de sangue para leucograma, teste de

função neutrofílica, pelo do teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) e dosagem de IgA, citologia cérvico-uterina e biópsia uterina.

Os três primeiros grupos foram: 1) Controle, éguas que atingiam folículos de no mínimo 35mm e demonstravam sinais de estro; 2) Inseminadas com 800×10^6 de espermatozóides viáveis com sêmen a fresco e 3) Inseminadas com sêmen congelado 800×10^6 de espermatozóides viáveis pré-congelação. Das 36 éguas selecionadas inicialmente três não entraram em estro e foram descartadas do experimento e posteriormente na formação dos três grupos experimentais restantes mais três éguas não retornaram em cio em também foram descartadas, assim sendo os grupos foram compostos de 10, 11 e 12 animais.

As éguas que continuaram a apresentar ciclo estral normal foram novamente divididas, e tiveram a mesma colheita de material anteriormente citada duas horas pós-inseminação e foram divididas em mais três grupos experimentais: 4) Inseminadas com sêmen congelado 800×10^6 de espermatozóides viáveis pré-congelação mais adição de 20 mL de plasma seminal; 5) Inseminadas com sêmen congelado 800×10^6 de espermatozóides viáveis pré-congelação e submetidas a corticóide-terapia pré-inseminação e 6) Inseminadas com sêmen congelado 800×10^6 de espermatozóides viáveis pré-congelação mais adição de 20 mL de plasma seminal e submetidas a corticóide-terapia pré-inseminação.

Resumindo os seis grupos estudados foram os seguintes:

- 1) Controle - éguas não inseminadas.

- 2) Inseminadas com 800×10^6 de espermatozóides viáveis com sêmen a fresco
- 3) Inseminadas com sêmen congelado 800×10^6 de espermatozóides viáveis pré-congelação.
- 4) Inseminadas com sêmen congelado 800×10^6 de espermatozóides viáveis pré-congelação mais adição de 20 mL de plasma seminal.
- 5) Inseminadas com sêmen congelado 800×10^6 de espermatozóides viáveis pré-congelação e submetidas a corticóide-terapia pré-inseminação.
- 6) Inseminadas com sêmen congelado 800×10^6 de espermatozóides viáveis pré-congelação mais adição de 20 mL de plasma seminal e submetidas a corticóide-terapia pré-inseminação.

3.5. Obtenção do Plasma Seminal

O plasma seminal utilizado junto às inseminações foi obtido do mesmo garanhão usado para congelação do sêmen e foi processado da seguinte forma: após a colheita do sêmen em vagina artificial, o ejaculado foi filtrado e centrifugado a $600 \times g$ por 10 minutos para remoção de aproximadamente 90% dos espermatozóides (Dell'Aqua Jr., 2000), o sobrenadante então era novamente centrifugado a $5000 \times g$ por 60 minutos a 5°C para total retirada dos

espermatozoides, o sobrenadante restante foi aliqotado em frações de 20 mL e finalmente congelado em freezer a -20°C para posterior utilização. No momento das inseminações o plasma seminal era descongelado a 37°C por 10 minutos e infundido com auxílio de uma pipeta de inseminação e uma seringa de 20 mL imediatamente antes da inseminação com o sêmen congelado.

3.6. Protocolo da Corticóide-Terapia

A corticóide-terapia instituída para modulação da resposta inflamatória uterina foi a seguinte: a partir do momento que um folículo atingisse um diâmetro médio de 35 mm e presença de edema uterino concomitante a administração da gonadotrofina coriônica humana (hCG) era efetuada uma aplicação intramuscular (IM) de 0,1 mg/kg de acetato de 9-alfa-prednisolona (Predef[®]). O procedimento de aplicação do Predef[®] era repetido a cada 12 horas até a constatação da ovulação, inclusive no momento da inseminação.

3.7. Procedimento de Congelação do Sêmen

Após a colheita em vagina artificial o ejaculado foi destinado a congelação e processado da seguinte forma: filtração em filtro específico para remoção do gel, diluição em diluente a base de leite desnatado e glicose na proporção de 1:1, centrifugado a 600 xg por 10 minutos, remoção do sobrenadante, ressuspensão em diluente de congelação MP50 (Papa et al., 2002) na concentração de 200×10^6

espermatozóides viáveis por mL, envase em palhetas francesas de 0,5 mL, estabilização a 5°C por 1 hora, congelação em caixa de isopor, seis centímetros acima do nível do nitrogênio líquido (N₂) por 20 minutos, imersão no N₂ e armazenamento em botijão criobiológico.

3.8. Análises do Sêmen Pós-Descongelação

O controle de qualidade das partidas de sêmen utilizadas tanto para primeira fase do experimento quanto para o teste de fertilidade realizado no CERBEQ foram os seguintes: descongelação em banho Maria 46°C por 20 segundos (Dell'Aqua Jr., 2000), análise computadorizada da motilidade espermática através do Hamilton Torne Research – IVOS 10, adicionando-se uma gota de sêmen na câmara de Makler aquecida a 38°C, verificação da integridade da membrana plasmática pelo teste com sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídeo descrita por Harrison e Vickers, (1990) e modificado por Zúccari, (1998) conforme protocolo abaixo descrito. As partidas utilizadas apresentavam no mínimo 60% de motilidade total e 40% de integridade de membrana.

Protocolo de preparo e utilização das sondas fluorescentes.

SOLUÇÕES DE ESTOQUE

SOLUÇÃO 1

9,2 mg Diacetato de
Carboxifluoresceína
20 mL DMSO (Dimetilsulfóxido)

SOLUÇÃO 2

10 mg Iodeto de Propídeo
20 mL DMSO (Dimetilsulfóxido)

SOLUÇÃO 3

1 parte Formalina a 40%
79 partes Solução Fisiológica

SOLUÇÃO 4

3 g Citrato de sódio
100 mL Solução Fisiológica

SOLUÇÃO DE TRABALHO

20 μ L da Solução 1
10 μ L da Solução 2
10 μ L da Solução 3
960 μ L da Solução 4

AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS

10 μ L de Sêmen
40 μ L da Solução de Trabalho

As soluções de estoque 1 e 2 foram preparadas ao abrigo da luz, acondicionadas em tubos de ensaio recobertos com papel alumínio em alíquotas de 1 mL e congeladas a -20°C .

Soluções de estoque 3 e 4 eram armazenadas em geladeira a 5°C .

Confeccionada a solução de trabalho, esta era fracionada em alíquotas de 40 μL para cada amostra e acondicionadas em uma caixa de isopor com tampa, acrescentando-se a essas 10 μL das amostras de sêmen.

A avaliação foi realizada em microscópio de epifluorescência em aumento de 400x. Foram contadas 200 células espermáticas em uma mesma lâmina e classificando-as em íntegras e lesadas, conforme sua coloração.

Íntegros = Espermatozóides corados em verde, em toda sua extensão

Lesados = Espermatozóides corados com cor vermelha

3.9. Procedimento das Colheitas e Análises de Dados e Materiais

3.9.1. Ultra-Sonografia Uterina

O exame ultra-sonográfico, foi realizado com auxílio de um ultra-som PIE MEDICAL 450, utilizando-se transdutor linear de frequência de 5 Mhz. Todo útero foi examinado para visualização de possíveis áreas de acúmulo de conteúdo. As mensurações foram realizadas na região da bifurcação entre corpo e cornos

uterinos. As alterações foram anotadas em fichas específicas para posterior análise.

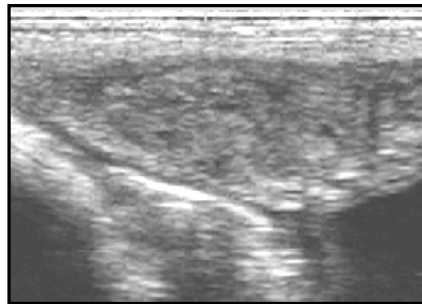
Os achados ultra-sonográficos encontrados foram classificados em escore de 0 a 4 conforme descrição a seguir:

0 – Sem presença de fluido uterino

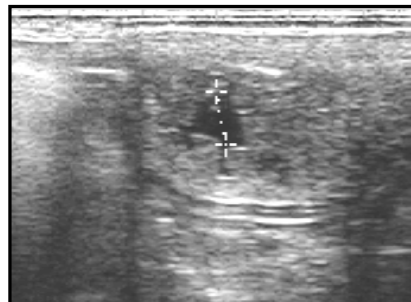
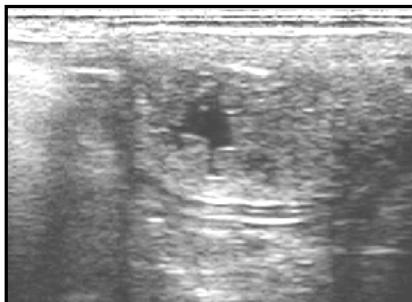
1 – Pequeno acúmulo de fluido uterino menor que, 1 cm de Altura na Região da Bifurcação (ARB)

2 – Acúmulo médio de fluido uterino variando de 1,1 a 2 cm (ARB)

3 – Acúmulo de fluido uterino com áreas maiores que 2 cm (ARB)



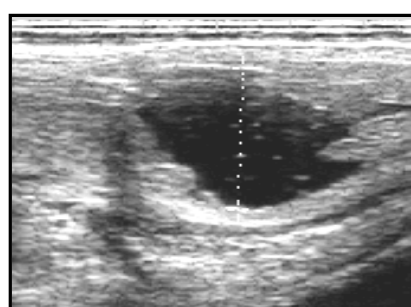
Escore 0 – Sem presença de fluido uterino



Escore 1 – Pequeno acúmulo de fluido uterino menor que 1 cm (ARB)



Escore 2 – Acúmulo médio de fluido uterino variando de 1,1 a 2 cm (ARB)



Escore 3 – Acúmulo de fluido uterino com áreas maiores que 2 cm (ARB)

3.9.2. Leucograma

As amostras de sangue destinadas ao leucograma foram colhidas através de punção da jugular utilizando-se agulhas descartáveis 25 x 8 mm próprias para tubos com vácuo contendo EDTA-sódico. O sangue era homogeneizado dentro do tubo de colheita 10 vezes e encaminhado para o Laboratório Clínico para análise.

As análises hematológicas foram realizadas no Laboratório Clínico em contador eletrônico de células – (CELL- DYN 3500- Abbott).

3.9.3. Redução do NBT

A colheita do sangue para realização do teste da redução do NBT, também foi por punção da jugular com auxílio de agulhas 25 x 8 mm acopladas a tubos de vácuo sem anticoagulante. Imediatamente após o procedimento utilizando-se uma pipeta automática com ponteira plástica, transferiu-se rapidamente uma alíquota de 500 µl para um frasco de plástico tipo “ependorf” contendo 10 UI de heparina sódica.

A avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos foi determinada por meio do teste não estimulado (NBT-NE) e estimulado (NBT-E) de redução do tetrazólio nitroazul (NBT), método microscópico citado por Park et al. (1970), utilizando-se “kit” comercial¹, com algumas modificações, conforme o seguinte procedimento:

- 1) Anteriormente ao dia da colheita, os frascos contendo o corante NBT tamponado foram reconstituídos em 1,0 mL de água destilada. Utilizando-se uma pipeta automática de 25 µL foram feitas várias alíquotas em tubos do tipo “ependorf” da solução de NBT que foram congeladas em freezer à temperatura de menos 20°C, até o momento da realização dos testes. Não foram utilizadas alíquotas com período superior a 30 dias de congelamento.

¹ NBT Vial, Sigma Diagnostic. St. Louis, USA.

- 2) A solução estimulante liofilizada foi reconstituída em 1,5 mL de água destilada e mantida sob refrigeração (4 a 8°C) até o momento da utilização. Esta solução foi utilizada durante todo o experimento.
- 3) No momento da realização dos testes, as alíquotas de NBT foram descongeladas, sendo que, foi utilizado uma alíquota para cada teste não estimulado (NBT-NE) e estimulado (NBT-E), identificando-se o tubo do tipo “eppendorf” com o número do animal e as letras E para a prova estimulada e NE para a prova não estimulada.
- 4) No tubo do tipo “eppendorf” identificado como E (estimulado), foi adicionada com uma micropipeta a dose de 1,25 µL do estimulante constituindo-se de extrato bacteriano inativado.
- 5) Foram adicionados 25 µL de sangue heparinizado nos tubos do tipo “eppendorf” não estimulado (NE), e 12,5 µL no tubo estimulado (E), e homogeneizado por repetidas aspirações da pipeta.
- 6) Após a homogeneização, os tubos tipo “eppendorfs” foram incubados por 10 minutos em banho-maria à temperatura de 37°C. Após a retirada do banho-maria os tubos permaneceram à temperatura ambiente pelo período de 10 minutos.
- 7) Os tubos tipo “eppendorfs” foram homogeneizados levemente e em seguida confeccionados três esfregaços sangüíneos em lâminas de vidro para cada

teste não estimulado e estimulado, perfazendo um total de seis lâminas para cada animal em cada momento.

- 8) Os esfregaços foram secos imediatamente após a confecção, utilizando-se um secador de cabelos elétrico e em seguida corados com May Grünwald-Giemsa.

Foi realizada a contagem de 300 neutrófilos para cada prova não estimulada e estimulada em microscópio óptico, em aumento de 1.000 vezes, discriminando-se o percentual de células NBT positivas e negativas. Foram consideradas células positivas (reativas) aquelas que apresentavam no interior do citoplasma, precipitado de coloração azul enegrecido (formazan), independente do número ou tamanho das granulações. Foram contados apenas neutrófilos não aglomerados a outras células, conforme figuras 1 e 2.

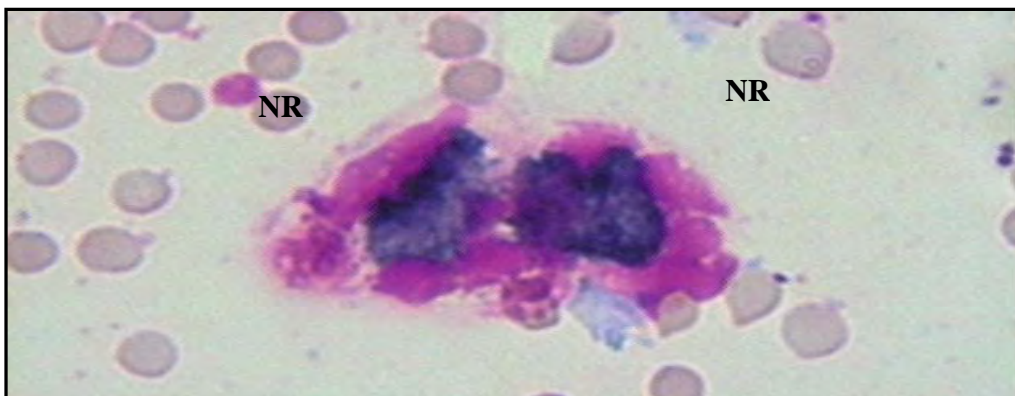


Figura 1 - Prova Não Estimulada de Redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT-NE). Neutrófilos segmentados reativos (NR) com a presença de formazan no interior do citoplasma.

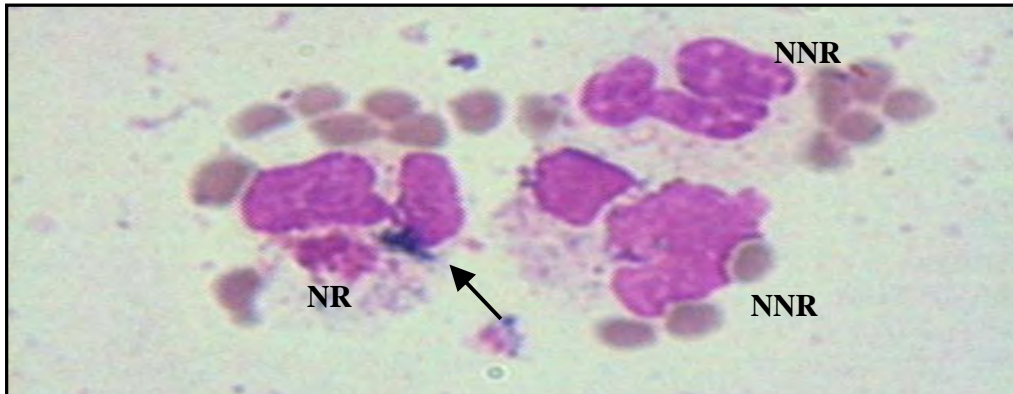


Figura 2 – Prova Estimulada de Redução do Tetrazólio Nitroazul (NBT-E). Neutrófilos segmentados reativos (NR) com a presença de formazan no interior do citoplasma (seta) e neutrófilos segmentados não reativos (NNR).

3.7.4. Obtenção do Lavado Uterino

Para obtenção do lavado uterino, utilizou-se infusão uterina de 50 mL de DPBS, através da introdução de cateter tipo Bivona pela cervix do animal até atingir o corpo do útero, onde se utilizando uma seringa de 20 mL foi inflado o balão com aproximadamente 30 cc de pressão. O DPBS era depositado sob pressão contínua utilizando-se uma seringa de 50 mL e retirado do útero por gravidade, após leve massagem uterina via retal. O conteúdo proveniente do lavado foi depositado em provetas volumétricas para aferição da quantidade retirada e destinado para quantificação de leucócitos e dosagem de IgA.

A quantificação do número de leucócitos encontrados no lavado uterino foi realizada da seguinte forma:

- 1) Homogeneização do conteúdo obtido no lavado uterino.
- 2) Preenchimento dos dois retículos da câmara de Neubauer com a solução do lavado
- 3) Contagem de todos os PMNs presentes em cinco quadrados de cada lado da câmara.
- 4) Média dos valores obtidos de cada retículo.
- 5) Ajuste para a diluição efetuada (50 mL – volume infundido para obtenção do lavado).
- 6) Nos animais onde o volume obtido era maior ou menor que 50 ml, ajuste para o valor encontrado.
- 7) O resultado final era a concentração de leucócitos obtidos por mL de lavado recuperado.

3.9.5. Quantificação da Imunoglobulina A

A quantidade de IgA das éguas foi aferida tanto no soro quanto do fluído uterino proveniente do lavado. Para obtenção do soro o mesmo procedimento anteriormente descrito por meio de punção da jugular com uma modificação, ou seja, o tubo a vácuo de colheita continha um coagulante para apressar a dessora. Este tubo, então foi centrifugado a 2000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos

e o soro produzido aspirado com auxílio de uma pipeta automática aliqotado em “eppendorfs” de 1 mL e congelado a -20°C para posterior análise.

Já a amostra proveniente do lavado uterino era centrifugada por 2000 rpm por 10 minutos e do sobrenadante retirado alíquotas de 1 mL, acondicionadas em “eppendorfs” e congeladas em freezer para futuras avaliações.

Tanto para a determinação da concentração de IgA sérica como a obtida no lavado uterino realizou-se a técnica de ELISA indireto com anticorpo de captura conforme descrição a seguir:

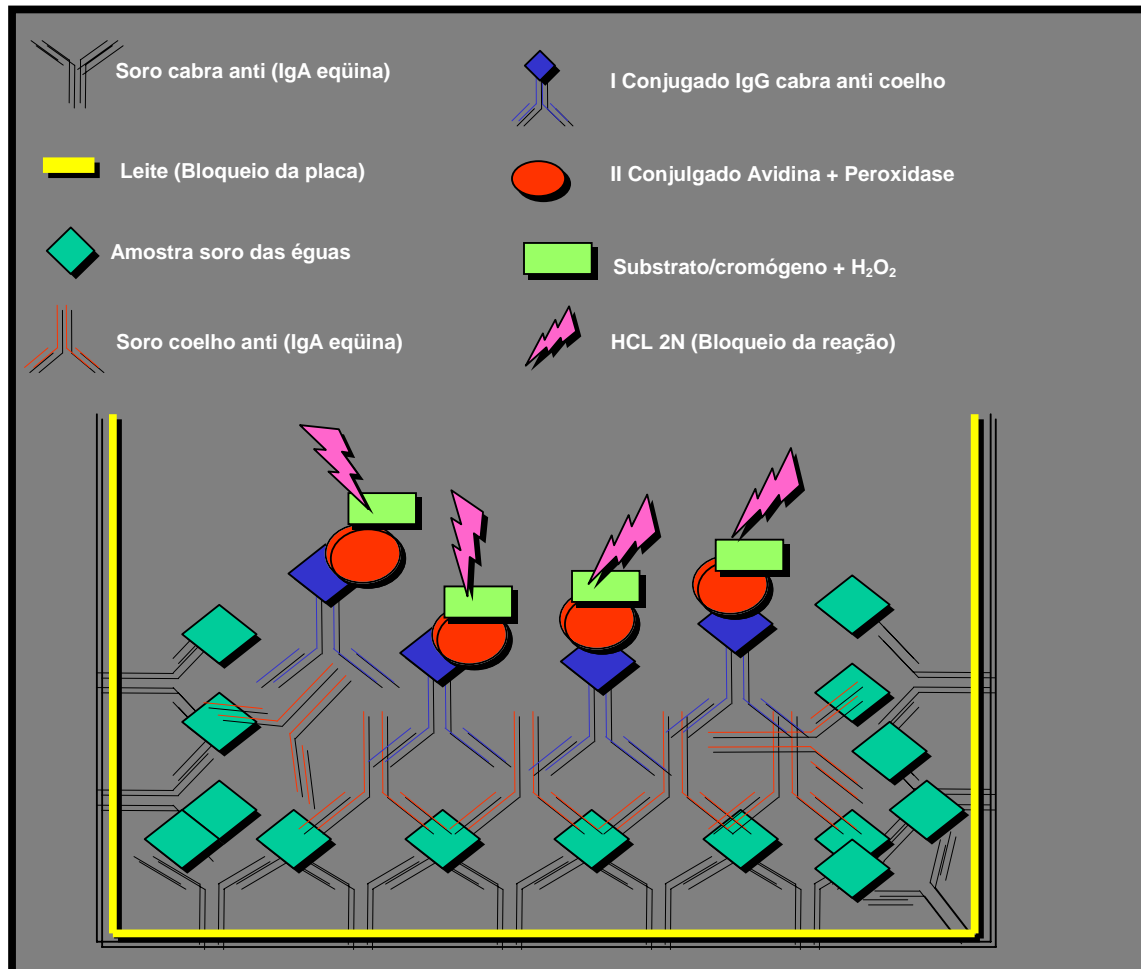
- 1) O anticorpo de captura utilizado foi IgG produzido em cabra contra IgA eqüina obtido comercialmente. Este foi diluído em Tampão Carbonato Bicarbonato 0,05 M pH 9,6 na proporção de 1:160 (v:v), e colocado em todas as cavidades da microplaca de ELISA (Nunc Maxisorp®), na quantidade de 100 μL . A placa foi então incubada a 4°C por 18 horas em câmara úmida.
- 2) Entre todas as fases da reação, as microplacas foram lavadas 5 vezes com PBS 0,01 M PO_4^{--} 0,14 M NaCl pH 7,4, 0,05 % de tween-20 (PBST) a fim de se eliminar o excesso de reagentes da fase imediatamente anterior
- 3) Com o objetivo de se eliminar possíveis "ruídos" na reação, cada cavidade da microplaca, após ter sido sensibilizada com o anticorpo de captura, recebeu 200 μl de PBS 0,01 M PO_4^{--} 0,14 M NaCl pH 7,4, contendo 10 % de leite em

pó desnatado e 0,05 % de tween-20 (PBSTM). A microplaca foi mantida em câmara úmida por 45 min. a 37°C.

- 4) Neste momento era adicionado o soro diluído nas proporções de 1/80000; 1/40000; 1/20000; 1/10000 (v:v) e o líquido do lavado diluído 1/400; 1/200; 1/100; 1/50 (v:v), previamente estocados dos animais do experimento. Estes eram diluídos em PBSTM 10% e colocados na quantidade de 100 µL a cada cavidade, em quadruplicata, e levados à estufa 37°C por 1 hora em câmara úmida. Também era colocada diferentes concentrações da IgA eqüina (2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 e 0,01562 ng/ml) obtida comercialmente para realização da curva padrão de concentrações.
- 5) A próxima etapa foi à adição do anticorpo detector que era IgG de coelho anti IgA de eqüinos (idem etapa 1). A diluição do detector foi de 1/160 (v:v) em PBSTM e colocado na quantidade de 100 µL por cavidade. A placa era levada à estufa 37°C por 1 hora, em câmara úmida.
- 6) Então se adicionou o conjugado Biotinilado que era composto de IgG de cabra contra IgG de coelho mais Biotina. Este conjugado era diluído em PBST na proporção de 1/1000 (v:v) e colocado na microplaca na quantidade de 100 µL. A placa era levada à estufa 37°C por mais 1 hora.
- 7) Para se ligar à Biotina presente no primeiro conjugado, adicionava-se um segundo conjugado composto de Avidina + Peroxidase obtido comercialmente

(Sigma), na diluição de 1/1000 (v:v) em PBST. Desta solução se acrescentava 100 μ L por cavidade da placa e leva-se a estufa 37°C por mais 1 hora.

- 8) Finalmente a cada cavidade da microplaca foram adicionados 100 μ l da solução de substrato/cromógeno contendo 5 μ l de peróxido de hidrogênio a 30%, 100 μ l de tetra metil benzadina (TMB) a 10 mg/ml (diluído em DMSO) e 10 ml de tampão acetato-citrato 0,1 mol/l e pH 6,0.
- 9) Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação enzimática foi então bloqueada pela adição de 50 μ l de HCl 2 N. As microplacas foram então lidas em um leitor de placas de ELISA (Titertek UNISKAN-II) a um comprimento de onda de 450 nm contra um branco onde era apenas colocado o substrato/cromógeno e o bloqueador enzimático. A concentração de IgA em cada amostra foi determinada pela comparação da DO observada com aquela obtida com a curva padrão dentro da mesma microplaca. A seguir segue esquema dos passos efetuados.



Esquema 1: Seqüência dos eventos realizados para determinação da concentração de IgA, pelo método de ELISA.

3.9.6. Citologia Cérvico-Uterina

O material celular uterino foi colhido utilizando-se escovas ginecológicas (Citobrush-Laborex), acopladas a um coletor mecânico (ALVARENGA & MATTOS,

1990) previamente esterilizado, que era introduzido via cervical até atingir o corpo do útero, posteriormente à escova de colheita era exteriorizada e através de movimentos circulares sobre o endométrio as amostras eram obtidas. A escova era removida do útero e o material nela contido depositado sobre lâmina histológica na forma de esfregaço, em seguida as lâminas eram acondicionadas em caixas específicas para posterior análises.

Os esfregaços obtidos foram corados pela técnica de Leishman, utilizando-se o seguinte procedimento: 20 gotas de corante Leishman sobre a lâmina por 3 minutos, 20 gotas de água destilada por 20 minutos, água corrente e secagem ao ar. As lâminas coradas foram examinadas em microscópio óptico, em objetiva de imersão em aumento de 400x, foi contado um total de 200 células, entre células uterinas e neutrófilos e o resultado foi expresso em porcentagem sobre o número de neutrófilos encontrados. Segue exemplos de citologia cérvico-uterina em três graus distintos de intensidade de resposta neutrofílica, Figuras, 3, 4, e 5.

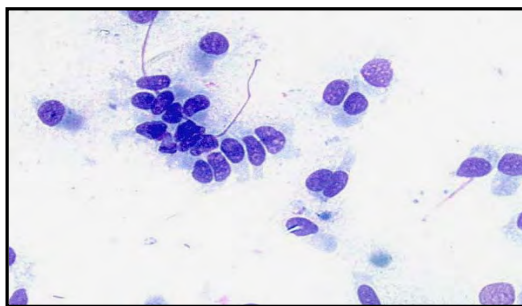


Fig. 3 - Células endometriais

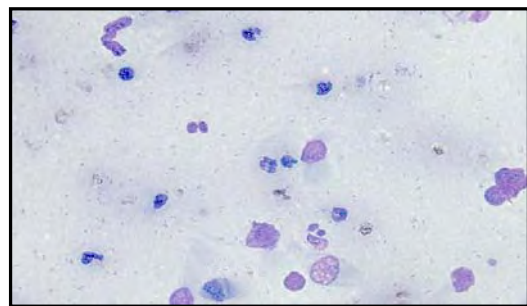


Fig. 4 - Inflamação moderada

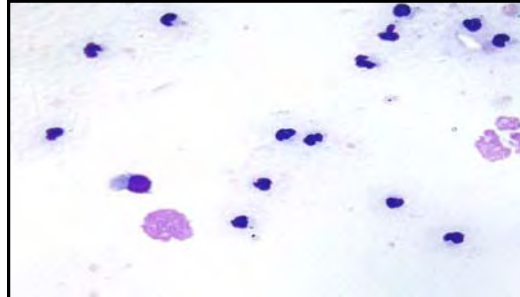


Fig. 5 - Inflamação severa

3.9.7. Histologia Uterina

O exame histológico foi realizado através da coleta de um fragmento endometrial obtido pela introdução no útero de um aparelho de biópsia (pinça "boca de jacaré", modelo Krause), devidamente esterilizado. O aparelho era introduzido via cervical e por palpação via retal o útero era aproximado da extremidade da pinça para remoção de um fragmento uterino de aproximadamente 1 cm². O fragmento colhido era fixado em Bovin por 18 horas posteriormente transferido para álcool 70°, o álcool era renovado a cada 24 horas até que a solução ficasse translúcida, e então encaminhado para confecção dos cortes histológicos.

Os fragmentos uterinos obtidos foram processados conforme técnica de rotina e montados em blocos de resina, que foram fatiados em cortes histológicos, para confecção das lâminas. Estas foram coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina. A análise foi realizada em microscopia óptica em aumento de 400x, onde

foram verificados cinco campos visuais no extrato compacto, quantificando o número de PMNs por campo, classificando a intensidade da reação segundo um escore de 0 – 4 conforme descrição a seguir:

0 – Ausente (nenhum PMNs)

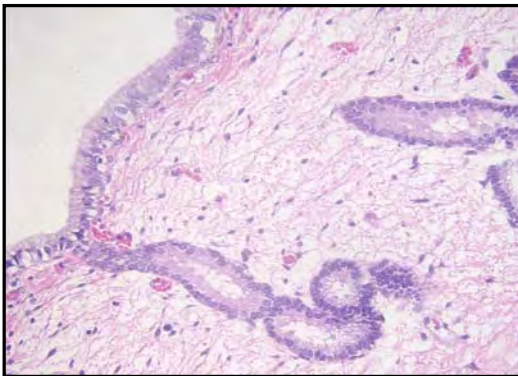
1 – Leve (1 a 5 PMNs em média por campo)

2 – Leve a Moderada (6 a 10 PMNs em média por campo)

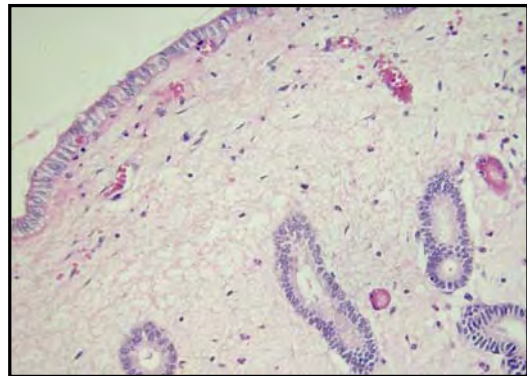
3 – Moderada (11 a 20 PMNs em média por campo)

4 – Severa (mais que 20 PMNs em média por campo)

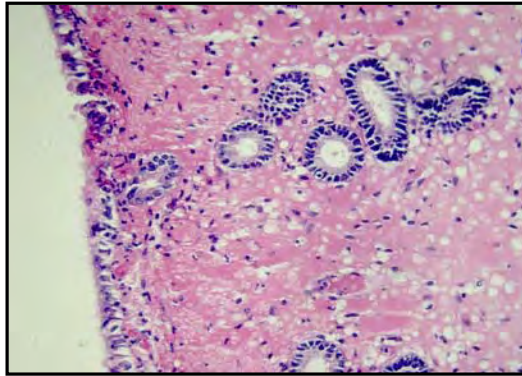
A seguir exemplos de cortes histológicos avaliados segundo a classificação adotada.



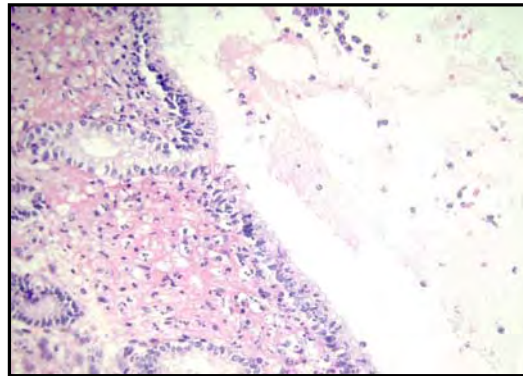
Escore 0 – Ausente



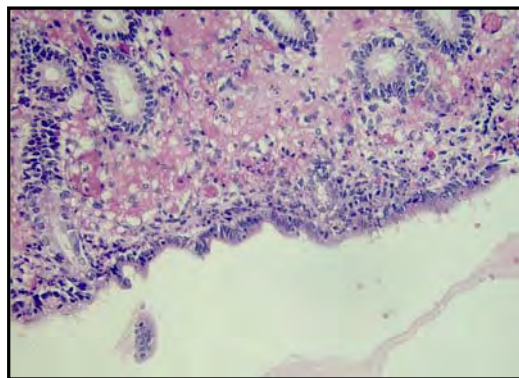
Escore 1 – Leve



Score 2 – Leve a Moderada



Score 3 – Moderada



Score 4 - Severa

3.10. Teste de Fertilidade

O teste de fertilidade foi realizado em duas etapas uma no CERBEQ e um segundo teste no Haras Santa Maria. No primeiro teste foram utilizadas 30 éguas sem histórico de acúmulo de fluido uterino, que foram inseminadas em dois protocolos distintos. O primeiro foi instituído com a associação do plasma seminal

e corticóide-terapia e o segundo apenas com corticóide-terapia conforme os seguintes procedimentos:

1. Controle (n=30) X corticóide-terapia + Plasma Seminal (n=30)
(Inseminação pós-ovulação)
2. Controle (n=30) X corticóide-terapia (n=30) (Inseminação pré e pós-ovulação)

Obs: as éguas utilizadas foram controle de si próprias.

A dose utilizada por inseminação artificial com sêmen congelado foi de 800×10^6 espermatozóides viáveis pré-congelação, no grupo onde as éguas foram inseminadas pós-ovulação. Quando as inseminações foram pré e pós-ovulação a dose foi de 400×10^6 pré e 400×10^6 pós. Todas as inseminações foram efetuadas no corpo do útero.

A corticóide-terapia seguiu os padrões estabelecidos anteriormente (2 frascos de Predel[®] de 12 em 12 hs a partir de folículos de 35 mm até a ovulação) e o plasma seminal foi utilizado na quantidade de 20 mL imediatamente antes das inseminações.

As éguas eram rufiadas a cada dois dias e quando se detectava o animal em estro este passava controle diário pelo ultra-som para acompanhamento do crescimento folicular. Quando o folículo atingia tamanho de 35 mm e presença de edema uterino a ovulação era induzida com 2500 UI de hCG via intramuscular e as fêmeas pertencentes ao grupo tratamento, começavam a receber a corticóide-

terapia, o acompanhamento ultra-sonográfico era reduzido para intervalos de 12 horas. Trinta e seis horas após a administração do hCG as éguas passavam a serem palpadadas a cada seis horas e ao se detectar a ovulação era efetuada a inseminação com deposição do sêmen no corpo do útero.

Quando a inseminação era efetuada pré e pós-ovulação, a primeira inseminação era realizada 36 horas após a aplicação do hCG e a segunda às 48 horas (pós hCG), onde 95% dos animais já tinham ovulado. Nas éguas que não ovulavam no período esperado eram inseminadas a cada 12 horas até detecção da ovulação.

O segundo teste de fertilidade realizado no Haras Santa Maria seguiu o procedimento adotado pelos veterinários responsáveis, que utilizaram apenas animais com histórico de acúmulo de fluido uterino pós-inseminação.

Quinze éguas foram inseminadas com sêmen congelado comercial de diferentes garanhões e submetidas à terapia com corticóide.

Todos os animais foram inseminados pós-ovulação com doses inseminantes variando entre 200 e 500x10⁶ de espermatozoides pós-descongelação na extremidade do corno uterino próximo a junção útero-tubárica através de pipeta flexível Minitub, conforme procedimento adotado pelo Haras. Os animais foram controles deles mesmos, pois no primeiro ciclo eram inseminados sem a utilização da corticóide-terapia.

O diagnóstico de gestação foi efetuado através de ultra-sonografia 15 dias após a confirmação da ovulação.

3.11. Análise Estatística

Devido ao tipo das variáveis mensuradas (porcentagens, contagens e escores) a comparação entre os grupos foi efetuada utilizando-se a prova não-paramétrica de Kruskal-Wallis (CURI, 1998) com cálculo das estatísticas H e p e contrastes entre postos médios dos grupos.

O cálculo das porcentagens de prenhes obtidas no teste de fertilidade foram analisadas pelo teste de Fisher.

A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$ (p é a probabilidade de erroneamente concluir pela significância).

4. RESULTADOS

Em relação aos dados encontrados através da visualização ultrasonográfica do útero duas horas após as inseminações e intervenções terapêuticas instituídas, pode-se observar que, ocorrem variações individuais entre animais e que no grupo 4 onde se adicionou o plasma seminal junto à inseminação com sêmen congelado houve um aumento significativo ($p < 0,01$) da presença de fluido uterino no momento do exame, conforme dados demonstrados na tabela 1.

Tabela 1: Escore (0-3) de presença de conteúdo uterino através ultrasonografia: valores individuais, Média (x), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
	0	0	0	2	0	0
	0	0	0	2	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	2
	0	0	0	2	0	0
	0	0	0	2	0	0
	0	3	0	3	0	0
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	2	0	0
		0	2			
		1				
Média	0 ^a	0,3 ^{ab}	0,2 ^{ab}	1,4 ^b	0 ^a	0,2 ^{ab}
Md	0	0	0	2	0	0
P25-P75	0-0	0-0	0-0	0-2	0-0	0-0
\bar{R}	27,00	32,16	29,81	46,10	27,00	30,01

Estatística: H= 19,015; p < 0,01

G1: controle - éguas não inseminadas, **G2:** éguas inseminadas com sêmen a fresco, **G3:** inseminadas com sêmen congelado, **G4:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal, **G5:** inseminadas com sêmen congelado após terapia com corticosteróide, **G6:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal após terapia com corticosteróide.

O leucograma realizado confirmou o quadro e estresse característico do uso de corticóide, demonstrando um aumento estatisticamente significativo do número total de leucócitos sérico (leucocitose), devido principalmente ao aumento de neutrófilos sanguíneos (neutrofilia) que tiveram sua diapedese alterada pela ação da prednisolona, visto nos animais dos grupos G5 e G6. (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2: Total de leucócitos no sangue: valores individuais, Média (x), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
	12800	14550	9300	9300	8500	14300
	9200	13250	4450	10100	9300	15900
	14450	8250	10500	9600	20700	19500
	10700	15450	7450	8000	15200	10200
	11100	7450	6700	11800	11700	12300
	14200	10600	11100	8000	12800	13200
	11000	12900	10000	13800	9100	11400
	9700	10700	7600	7900	16100	10900
	10100	10600	14950	11300	16500	14700
	11700	11050	16300	14300	18400	15700
		8700	7950			
		8500				
Média	11495^{ab}	11000^{ab}	9660^a	10410^{ab}	13830^b	13810^b
Md	11050	10650	9300	9850	14000	13750
P25-P75	10100-12800	8500-12900	7450-10500	8000-11800	9300-16500	11400-15700
\bar{R}	32,65	28,79	20,64	25,00	41,75	44,95

Estatística: H= 13,891; p < 0,02

G1: controle - éguas não inseminadas, **G2:** éguas inseminadas com sêmen a fresco, **G3:** inseminadas com sêmen congelado, **G4:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal, **G5:** inseminadas com sêmen congelado após terapia com corticosteróide, **G6:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal após terapia com corticosteróide.

Tabela 3: Total de neutrófilos no sangue: valores individuais, Média (x), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
	8300	7150	6850	4950	7150	11400
	5500	8350	2500	6850	7800	12100
	10400	4050	5150	5750	18000	16200
	5450	10200	4000	4000	14400	8050
	8650	4050	5000	5300	9350	9600
	6400	6400	7200	4000	10000	10450
	6200	7600	5600	8600	7300	8450
	6200	6550	4350	3700	13200	7750
	5350	5100	7950	5650	14350	12950
	7200	3900	11350	9600	14750	11150
		5600	5500			
		5200				
Média	6960^a	6180^a	5950^a	5840^a	11630^b	10810^b
Md	6300	6000	5500	5475	11600	10800
P25-P75	5500-8300	4050-7150	4350-6850	4000-6850	7800-14400	8450-12100
\bar{R}	29,75	23,21	21,27	20,30	50,05	50,25

Estatística: H= 30,371; p < 0,001

G1: controle - éguas não inseminadas, **G2:** éguas inseminadas com sêmen a fresco, **G3:** inseminadas com sêmen congelado, **G4:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal, **G5:** inseminadas com sêmen congelado após terapia com corticosteróide, **G6:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal após terapia com corticosteróide.

Ao se verificar a função neutrofílica através do teste de redução do NBT estimulado e não estimulado, foi visto que sem uma estimulação os neutrófilos se comportaram de maneira semelhante não havendo diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,10$) tabela 4, entretanto ao serem estimulados os neutrófilos provenientes dos animais pertencentes aos grupos G5 e G6 submetidos à terapia com corticosteróide demonstraram significativo decréscimo ($p < 0,001$) de

reatividade ao teste do NBT em comparação as éguas dos demais grupos G1 a G4 que não foram submetidas ao tratamento com prednisolona, como visto na tabela 5.

Tabela 4: Porcentagem de neutrófilos reativos ao teste do NBT não estimulado: valores individuais, Média (\bar{x}), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
	2	2	3	78	1	2
	2	2	5	3	1	4
	1	20	7	5	2	1
	1	11	4	4	1	1
	9	5	1	3	1	2
	2	5	4	1	2	3
	3	1	1	3	1	2
	0	1	2	1	1	1
	3	1	0	3	11	1
	0	2	2	3	2	2
		0	2			
		0				
Média	2,30	4,17	2,81	10,40	2,30	1,90
Md	2	2	2	3	1	2
P25-P75	1-3	1-5	1-4	3-4	1-2	1-2
\bar{R}	28,25	31,83	35,64	42,50	24,80	28,65

Estatística: H= 6,311; p > 0,20

G1: controle - éguas não inseminadas, **G2:** éguas inseminadas com sêmen a fresco, **G3:** inseminadas com sêmen congelado, **G4:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal, **G5:** inseminadas com sêmen congelado após terapia com corticosteróide, **G6:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal após terapia com corticosteróide.

Tabela 5: Porcentagem de neutrófilos reativos ao teste do NBT estimulado : valores individuais, Média (x), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
	55	53	53	79	2	8
	51	42	62	66	2	52
	54	74	55	69	1	1
	17	82	56	63	3	23
	65	75	60	57	2	22
	25	67	61	25	6	28
	71	8	80	51	10	25
	58	64	62	46	2	17
	44	57	55	84	10	1
	63	59	43	45	8	10
		32	72			
		57				
Média	50,30^a	55,83^a	59,91^a	58,50^a	4,60^b	18,70^b
Md	54,5	58,0	60,0	60,0	2,50	19,50
P25-P75	44-63	42-67	55-62	46-69	2-8	8-25
\bar{R}	36,75	41,96	43,32	43,00	8,00	15,85

Estatística: H= 36,948; p < 0,001

G1: controle - éguas não inseminadas, **G2:** éguas inseminadas com sêmen a fresco, **G3:** inseminadas com sêmen congelado, **G4:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal, **G5:** inseminadas com sêmen congelado após terapia com corticosteróide, **G6:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal após terapia com corticosteróide.

O total de leucócitos encontrado por ml de lavado uterino, mostrou uma grande variação individual entre os animais inseminados (G2 a G6). Isto impossibilitou uma boa avaliação dos dados obtidos, visto que alguns animais que apresentaram contagem muito superior aos demais elevaram a média do grupo, prejudicando uma possível conclusão. O grupo (G6) que foi inseminado e recebeu a corticóide-terapia mais o plasma seminal obteve valores que não diferiram

estatisticamente do grupo não inseminado (controle) mas também seus valores não foram significativamente diferente dos demais grupos estudados (G2 a G4 e G6), conforme dados vistos na tabela 6.

Tabela 6: Total de leucócitos x 10⁶ por ml de lavado uterino: valores individuais, Média (x), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
	0,15	19,60	0,50	0,21	0,91	0,51
	0,12	0,70	1,79	0,41	0,65	0,33
	0,08	12,00	0,45	2,88	0,51	0,44
	0,08	1,12	1,08	4,15	5,92	1,01
	0,14	4,13	4,80	15,30	4,60	2,75
	0,15	0,24	6,60	0,44	2,38	3,87
	0,24	0,59	0,12	4,10	14,42	0,47
	0,04	0,24	1,00	12,50	2,64	4,40
	0,82	0,21	0,50	5,70	0,30	2,94
	0,35	2,80	0,37	4,25	14,00	0,10
		0,65	3,05			
		0,78				
Média	0,21^a	3,58^b	1,84^b	4,99^b	4,63^b	1,68^{ab}
Md	0,14	0,74	1,00	4,12	1,64	0,76
P25-P75	0,07-0,24	0,24-2,80	0,45-1,79	0,44-5,70	0,65-5,92	0,44-2,94
\bar{R}	9,95	34,21	33,27	42,30	39,95	31,75

Estatística: H= 19,740; p < 0,01

G1: controle - éguas não inseminadas, **G2:** éguas inseminadas com sêmen a fresco, **G3:** inseminadas com sêmen congelado, **G4:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal, **G5:** inseminadas com sêmen congelado após terapia com corticosteróide, **G6:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal após terapia com corticosteróide.

Em relação às concentrações de imunoglobulina A, não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,10$) entre os grupos testados (G1 a G6), tanto para as concentrações obtidas do lavado uterino quanto à da corrente sangüínea,

comprovando a não ação da corticóide-terapia sobre a resposta humoral. (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7: Total de IgA por ml de lavado uterino em $\mu\text{g/ml}$: valores individuais, Média (\bar{x}), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
	25	25	25	8	100	70
	6,25	6,25	6,25	15	125	20
	100	100	3,15	50	70	10
	6,25	50	6,25	3,15	12,5	20
	12,5	6,25	100	25	100	70
	100	3,15	12	5	12,5	12,5
	100	12	3	12,5	15	10
	25	30	12	120	12,5	8
	100	6,25	6,25	125	6,25	8
	100	50	6	100	90	15
		3	100			
		12,5				
Média	57,50	27,32	25,49	46,36	54,37	24,35
Md	62,50	12,25	6,25	20,00	42,50	13,75
P25-P75	12,5-100	6,25-30	6,0-12,0	8,0-100	12,5-100	10,0-20,0
\bar{R}	40,50	26,37	22,14	35,05	39,75	30,30

Estatística: H= 8,709; p > 0,10

G1: controle - éguas não inseminadas, **G2:** éguas inseminadas com sêmen a fresco, **G3:** inseminadas com sêmen congelado, **G4:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal, **G5:** inseminadas com sêmen congelado após terapia com corticosteróide, **G6:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal após terapia com corticosteróide.

Tabela 8: Total de IgA no soro em $\mu\text{g/ml}$: valores individuais, Média (\bar{x}), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
	1250	2500	625	2500	4000	5000
	2500	2500	625	6000	4000	2500
	5000	8000	1250	2500	1250	5500
	1250	3000	1250	500	1250	1250
	1250	5000	5000	2500	2500	2500
	5000	2500	3000	2500	2000	5000
	2500	5000	3000	600	1250	1250
	2500	4500	3500	2500	6000	2500
	5000	4500	625	3000	1300	1250
	3000	5500	2500	1000	2500	2000
		4500	3000			
		4500				
Média	2925	4700	2375	2360	2605	2875
Md	2500	4500	2500	2500	2250	2500
P25-P75	1250-5000	2500-5000	625-3000	1000-2500	1250-4000	1250-5000
\bar{R}	32,70	46,08	25,90	25,60	28,40	31,05

Estatística: H= 10,230; p > 0,10

G1: controle - éguas não inseminadas, **G2:** éguas inseminadas com sêmen a fresco, **G3:** inseminadas com sêmen congelado, **G4:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal, **G5:** inseminadas com sêmen congelado após terapia com corticosteróide, **G6:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal após terapia com corticosteróide.

Os dados obtidos através da citologia cérvico-uterina mostraram que os animais não inseminados apresentavam valores condizentes a éguas em estro, entretanto nos grupos onde a inseminação foi realizada seja com sêmen a fresco ou congelado e independentemente dos protocolos instituídos, estas não

apresentaram diferença significativamente estatística ($p > 0,10$) em seus valores, como se pode observar na tabela 9.

Tabela 9: Porcentagem de neutrófilos na citologia cérvico-uterina: valores individuais, Média (\bar{x}), Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
	0	97	95	28	74	80
	0	42	74	75	77	66
	3	91	82	96	81	80
	1	88	92	90	88	86
	5	95	70	92	86	24
	1	57	65	84	76	90
	0	84	64	84	87	25
	1	24	88	81	59	81
	0	88	66	93	56	52
	0	88	66	66	80	60
		84	89			
		90				
Média	1,1 ^a	77,4 ^b	77,4 ^b	78,9 ^b	76,4 ^b	64,4 ^b
Md	0,5	88	74	84	78,5	64,4
P25-P75	0-1	57-90	66-88	75-92	74-86	52-81
\bar{R}	5,5	42,3	36,9	42,1	33,8	28,8

Estatística: H= 28,972; p < 0,001

G1: controle - éguas não inseminadas, **G2:** éguas inseminadas com sêmen a fresco, **G3:** inseminadas com sêmen congelado, **G4:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal, **G5:** inseminadas com sêmen congelado após terapia com corticosteróide, **G6:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal após terapia com corticosteróide.

Já nos resultados encontrados pela histologia uterina analisando apenas a resposta uterina aguda os valores não diferiram estatisticamente ($p > 0,10$), entre os grupos inseminados (G2 a G6). Entretanto foi visto através deste teste que os

animais pertencentes ao grupo 4 apresentaram valores médios não diferentes aos obtidos no grupo controle, dados estes observados na tabela 10.

Tabela 10: Escore (0-4) da resposta inflamatória aguda através de histologia uterina: valores individuais, Mediana (Md), Percentis (P25-P75) e Posto Médio em cada grupo. Estatísticas calculadas (H e p).

	G1	G2	G3	G4	G5	G6
	2	3	4	2	0	1
	0	2	2	2	0	1
	1	3	0	1	4	3
	0	4	2	2	3	3
	0	3	3	2	2	2
	1	2	1	1	3	3
	0	2	4	2	3	1
	0	2	3	4	3	3
	1	0	4	2	4	3
	1	2	2	2	3	2
		3	3			
		3				
Md	0,5 ^a	2,5 ^b	3,0 ^b	2,0 ^{ab}	3,0 ^b	2,5 ^b
P25-P75	0-1	2-3	2-3	2-2	3-3	1-3
\bar{R}	11,1	37,1	39,0	28,9	40,3	33,8

Estatística: H= 19,115; p < 0,01

G1: controle - éguas não inseminadas, **G2:** éguas inseminadas com sêmen a fresco, **G3:** inseminadas com sêmen congelado, **G4:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal, **G5:** inseminadas com sêmen congelado após terapia com corticosteróide, **G6:** inseminadas com sêmen congelado e plasma seminal após terapia com corticosteróide.

Os resultados obtidos após a realização dos testes de fertilidade, demonstraram que a corticóide-terapia se mostrou eficiente quando realizada em éguas com histórico reprodutivo de endometrite pós-inseminação.

No primeiro teste de fertilidade (n = 30) os resultados de fertilidade encontrados não apresentaram diferença estatística ($p > 0,10$), tanto no grupo tratamento utilizando-se a associação plasma seminal + corticóide-terapia, quanto no que usou apenas o corticóide, conforme se pode observar nos gráficos 1 e 2.

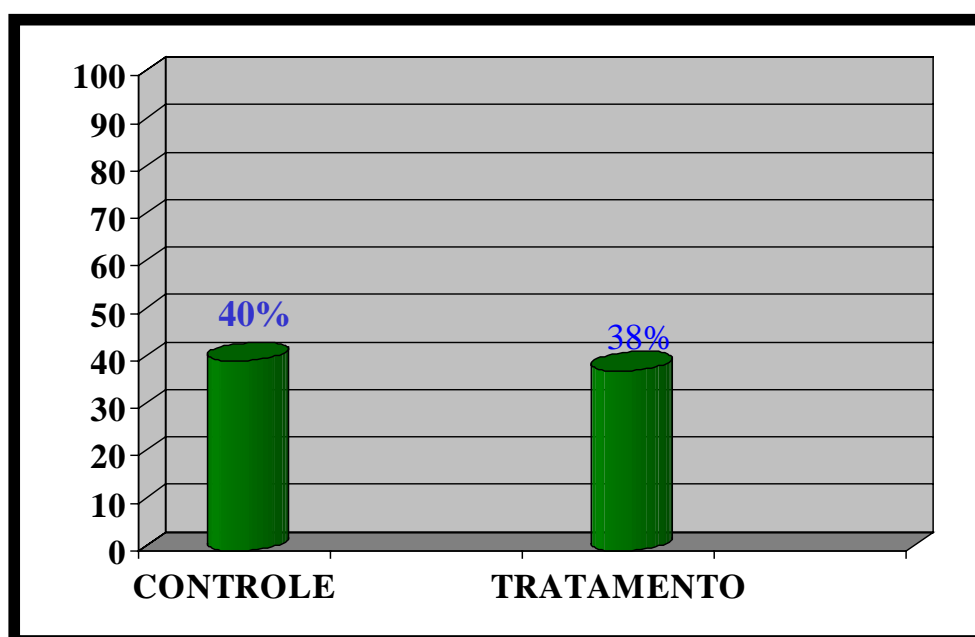


Gráfico 1: Taxa de prenhez em porcentagem nos grupos controle inseminado com 800×10^6 de espermatozóides pré-congelação e tratamento inseminado com 800×10^6 de espermatozóides pré-congelação + 20 mL de

plasma seminal e submetido a corticóide-terapia ambos pós-ovulação, com deposição do sêmen no corpo do útero ($p>0,10$).

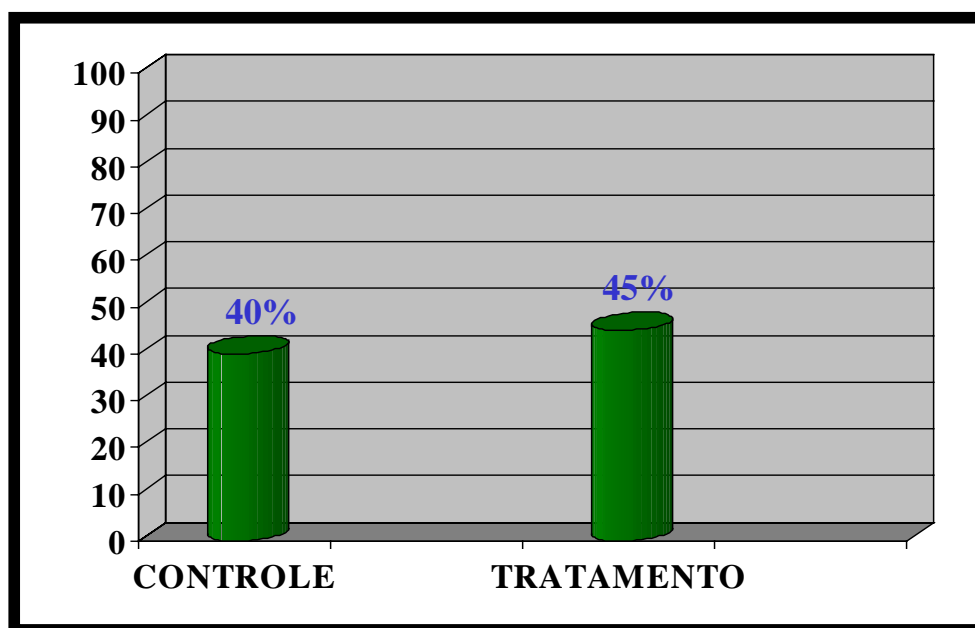


Gráfico 2: Taxa de prenhez em porcentagem nos grupos controle inseminado com 400×10^6 de espermatozóides pré-congelação e tratamento inseminado com 400×10^6 de espermatozóides pré-congelação e submetido a corticóide-terapia ambos pré e pós-ovulação, com deposição do sêmen no corpo do útero ($p>0,10$).

No segundo teste de fertilidade realizado no Haras Santa Maria com éguas de histórico reprodutivo de acúmulo de fluido uterino pós-inseminação ($n = 15$). O resultado de fertilidade foi estatisticamente significativo ($p<0,05$), revelando uma

maior taxa de prenhez nos animais submetidos à terapia com corticosteróide, conforme se observa no gráfico 3.

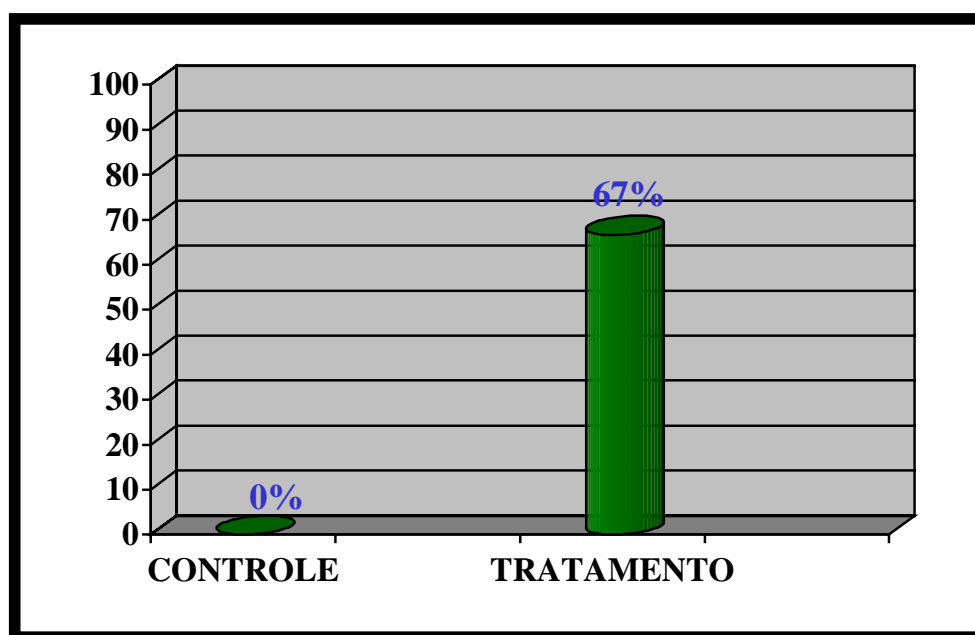


Gráfico 3: Taxa de prenhez em porcentagem nos grupos controle inseminado com 200 a 500×10^6 de espermatozóides viáveis pós-congelação e tratamento inseminado com 200 a 500×10^6 de espermatozóides viáveis pós-congelação e submetido a corticóide-terapia com inseminação pré e pós-ovulação, e deposição do sêmen próximo à junção útero-tubárica ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Vários fatores influenciam a obtenção de taxas elevadas de prenhes, quando as biotecnologias reprodutivas são empregadas. A qualidade do sêmen utilizado, o tipo de preservação espermática proposta, a condição ginecologia da fêmea, além de todos eventos físicos e bioquímicos que os gametas são submetidos até a ocorrência da fecundação.

Nos últimos anos, houve uma evolução no conhecimento da fisiologia reprodutiva nos mais diversos campos estudados, porém as taxas de gestação não acompanharam tal crescimento. A intenção de investigar a possível interferência da resposta inflamatória uterina, pós-inseminação como um fator limitante nas taxas de prenhes em éguas, trouxe a discussão de vários fatores.

Através dos resultados obtidos por meio da citologia cérvico-uterina, contagem de leucócitos no lavado uterino e resultados de histologia uterina, constatou-se que, independente do tipo de sêmen utilizado, congelado ou fresco, a incidência de PMNs no endométrio foi alta, em todos os grupos estudados.

Alguns autores correlacionaram a infiltração neutrofílica severa pós-inseminação com sêmen congelado a presença do glicerol, gema de ovo, leite e os demais constituintes do extensor (BERGMAN & DEKRUIF, 1997; PARLEVLIEET et al, 1997). Entretanto, foi verificado que mesmo quando se utiliza sêmen fresco, sem adição de extensor, a resposta inflamatória uterina é semelhante aquela do

sêmen congelado. Esse fato demonstrou que apenas a presença da célula espermática no ambiente uterino já foi suficiente para o desencadeamento do processo inflamatório.

Katila, (1997) verificou que a resposta inflamatória uterina, cinco (5) horas após a inseminação foi semelhante estatisticamente à quantidade de PMNs em éguas inseminadas com espermatozóides vivos ou mortos, e concluiu que são os próprios espermatozóides os responsáveis pelo aumento dos neutrófilos intra-uterino, reforçando nossos resultados.

A dose inseminante utilizada em nosso trabalho foi fixada em 800×10^6 espermatozóides, independentes do tipo de inseminação, e isso nos impediu de concluir se número de espermatozóides inseminados, tem ou não influencia na severidade do processo inflamatório, como foi proposto por Nikolopoulos & Watson, (1997) que verificaram uma correlação negativa ($p < 0,01$) entre o número de PMNs e a concentração da dose inseminante.

Em 2000, Nikolopoulos & Watson concluíram que quando utilizaram grandes volumes na dose inseminante, a intensidade da resposta inflamatória foi menos severa. Em nosso experimento o grupo inseminado com sêmen a fresco **(G2)** a dose inseminante foi fixada em 800×10^6 espermatozóides como descrito anteriormente, porém, houve uma variação no volume do ejaculado, devido ao ajuste da concentração, já que as inseminações foram realizadas em dias diferentes. Nós não observamos variações da resposta inflamatória uterina entre

os animais do **G2**. Sugerimos, portanto, que estas variações possam estar mais relacionadas à variação individual de cada égua, quando expostas às células espermáticas, do que propriamente as variações no volume de sêmen infundido.

Troedsson (1995) relatou que a resposta inflamatória uterina foi semelhante quando utilizou 700×10^6 espermatozoides, livres de plasma seminal e de contaminações, à provocada por *Streptococcus zooepidemicus* observada em um estudo anterior realizado em 1993. Esse resultado vem ao encontro dos dados observados no presente estudo, em que os espermatozoides independentes de sua concentração no útero, são os responsáveis pelo desencadeamento do processo inflamatório.

Asbury et al 1980 observaram que o útero dos animais susceptíveis produz uma quantidade significativamente maior de imunoglobulinas após o desafio bacteriano, quando compararam as concentrações de imunoglobulinas em éguas resistentes e susceptíveis a endometrites crônicas Mitchell et al 1982, encontraram altas concentrações de IgA e IgG no fluido uterino de animais susceptíveis. Já no presente experimento verificamos que as concentrações séricas ou uterinas de IgA variaram bastante entre os animais, entretanto por não separarmos os animais em susceptíveis e resistentes, não podemos constatar estes relatos. As médias de IgA entre os grupos estudados não demonstraram diferenças estatísticas ($p > 0,10$).

Espermatozóides induzindo “leucocitose uterina” tem sido relatado em várias espécies: em ratos (AUSTIN, 1957); bovinos (MATTNER, 1968); coelhos (TYLER, 1977); mulheres (COHEN, 1984) e suínos (ROZEBOOM et al, 1999). Troedsson et al, (2001) sugeriu que os espermatozóides funcionam como agentes quimiotáticos para os PMNs, ativando o sistema complemento, e resultando na clivagem dos fatores C5a e C3b. Esses fatores são então, responsáveis pela migração dos PMNs dos vasos para luz do endométrio e o componente C3b pela opsonização espermática, facilitando dessa forma a fagocitose.

O plasma seminal se comportou como um agente supressor da resposta inflamatória uterina, apresentando um efeito dose-dependente sobre a quimiotaxia dos PMNs e fagocitose espermática *in vitro* (TROEDSSON et al, 2000). Os resultados por nós obtidos, quando o plasma seminal foi utilizado, não apresentaram redução do número de PMNs *in vivo*, demonstrando um efeito contrário, aos achados de Troedsson et al, 2000, mas condizentes com os dados reportados por Reilas, 2001, que não observou influência da presença do plasma seminal sobre a intensidade da resposta inflamatória uterina.

Reilas, 2001 discutiu sobre a não retirada completa dos espermatozóides do plasma seminal, utilizado como um fator indutor da resposta inflamatória. Destacamos, porém, que o plasma seminal utilizado no presente experimento, foi submetido a duas centrifugações, sendo a segunda de 5000 x g por uma hora e

nenhum espermatozóide foi identificado no plasma seminal, reiterando a sua não participação como agente supressor da inflamação *in vivo*.

Alguns autores ressaltaram a importância da modulação da resposta inflamatória uterina pós-inseminação em relação a sua duração e magnitude, (ROZEBOOM et al, 1999; TROEDSSON et al, 2001), facilitando o transporte espermático até o local da fertilização nas tubas uterinas (EMARSSON & VIRING 1973; OVERSTREET & TOM, 1982).

Reilas, 2001 discutiu em seu trabalho que as taxas baixas de prenhez observadas quando se utilizou sêmen congelado, podem estar relacionadas ao curto espaço de tempo ocorrido entre a inseminação e o fechamento cervical, já que com o sêmen congelado, as inseminações são efetuadas próximas à ovulação, restringindo o tempo de limpeza uterina. Entretanto, ressaltou que a resposta inflamatória uterina é um fenômeno fisiológico e necessário para eliminação do excesso de espermatozóides e contaminações bacterianas.

Já Alghamdi et al, 2001 relataram um decréscimo da motilidade espermática na presença de secreções obtidas de útero de éguas pós-inseminação. Taylor, 1982 discutiu que os espermatozóides capazes de fecundar os ovócitos são aqueles que passam intactos por um grande número de PMNs. Love et al, 1989, relataram que éguas inseminadas diariamente com sêmen congelado, não apresentaram taxas de prenhez diferentes das inseminadas apenas uma vez com resultados de 50% de prenhes por ciclo.

Os resultados demonstrados no estudo de Alghamdi, et al. (2004), sugeriram que o plasma seminal funciona como um importante fator supressor, ao relatarem taxas de prenhez altas, com inseminações utilizando o plasma seminal. Obtiveram índices insatisfatórios de gestação ao remover o plasma seminal.

Entretanto, ressaltamos que mesmo na presença do plasma seminal as quantidades de PMNs se mantiveram constantes em nossos estudos. **G2**, **G3** e **G4** foram inseminados com sêmen fresco, congelado e congelados acrescidos de 20 mL de plasma seminal, respectivamente. Nossos resultados demonstraram que o plasma seminal não exerceu efeito inibitório sobre a resposta inflamatória, provavelmente porque o plasma inibe a ligação dos PMNs aos espermatozoides diminuindo a taxa de fagocitose, porém, o quadro clássico da inflamação caracterizado pela presença de PMNs ao local da agressão, visto pelos testes realizados, se apresenta o mesmo.

Quando o plasma seminal foi utilizado exclusivamente como agente modulador da resposta inflamatória uterina (**G4**) ou em associação a corticóide-terapia (**G6**), foi observado um aumento da presença de líquido uterino ao exame ultra-sonográfico em relação aos demais grupos, provavelmente o plasma seminal induza uma resposta inflamatória uterina *in vivo* corroborando com os achados de Reilas, (2001) e Fiala, (2004).

Nossos resultados sugerem que a resposta inflamatória uterina não é o fator limitante para obtenção de boas taxas de prenhes, pelo contrário, em alguns

animais por se apresentar de forma inadequada é responsável pelas baixas taxas de fertilidade. O emprego da corticóide-terapia como agente modulador da resposta inflamatória uterina mostrou-se uma prática segura, eficiente e se utilizada em animais com histórico reprodutivo de endometrite pós-inseminação é eficaz.

Ressaltamos uma analogia feita entre uma reação inflamatória pós-inseminação e uma lesão muscular sofrida por um atleta, onde hoje, a primeira intervenção clínica é a utilização de gelo no local, para a contenção da resposta inflamatória. Essa reação é importante, porém, em alguns casos, sua severidade é o fator crucial na velocidade de recuperação da lesão.

A corticóide-terapia baseia-se na prevenção de uma reação inflamatória indesejada, modulando a resposta imunológica para que ocorra uma recuperação do endométrio em tempo de receber o embrião em um ambiente saudável. A dose utilizada e a duração do tratamento proposto, não causaram efeito colateral, como laminite, infecções secundárias ou desconforto do animal.

Não se detectaram modificações sobre o momento ovulatório ou alterações no eixo hipotálamo / hipófise / ovário já que todas as éguas ovularam no período esperado e continuaram a apresentar atividade cíclica regular.

Alguns achados importantes foram observados com a utilização do protocolo proposto. Os lavados uterinos realizados após a inseminação de éguas submetidas a corticóide-terapia, apresentaram baixa quantidade de *debris*

celulares, quando comparados com os mesmos animais em ciclos anteriores, provavelmente pela diminuição da capacidade funcional dos neutrófilos, causada pela prednisolona, alterando a taxa de fagocitória dos PMNs.

Os glicocorticóides *in vivo* são ativados por uma esterase hepática, sendo que, *in vitro*, sua clivagem ocorre lentamente. Além disso, *in vivo*, a administração de corticosteróides pode ter efeito indireto sobre a função de neutrófilos pela alteração dos mediadores da inflamação (ROTH & KAEBERLE, 1981), nossos dados refletem que provavelmente a dose utilizada e tempo instituído de tratamento, foram suficientes para que ocorrer alterações importantes na atividade funcional neutrofílica, contribuindo para algumas éguas, antes com dificuldades de empenharem por uma resposta inflamatória indesejada, se tornarem prenhes.

Em um estudo de revisão em humanos foi ressaltada a importância do estresse oxidativo causado pelas espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a produção de óxido nítrico (NO), entre outros nos quadros de infertilidade e endometrites. Provavelmente estes achados podem vir a correlacionar o efeito supressivo da corticóide-terapia instituída sobre a função neutrofílica, diminuindo da produção destas substâncias indesejadas, contribuindo para os resultados encontrados. (SHARMA e AGARWAL, 2004).

Por se tratar de uma proposta inovadora, a utilização do corticóide como agente modulador uterino, necessita de mais estudos que possam embasar os achados encontrados.

6. CONCLUSÕES

- A severidade do processo inflamatório uterino que ocorre após a inseminação independe da forma com que o sêmen se apresenta, “in natura” ou congelado.
- O plasma seminal não interfere na concentração de neutrófilos uterinos, após a inseminação.
- A corticóide terapia promove uma diminuição da função neutrofílica.
- A concentração de Imunoglobulina A sérica e do lavado uterino não se altera com a inseminação nem a corticóide-terapia.
- O índice de fertilidade em éguas com histórico de endometrites persistentes pós-inseminação é maior quando se utiliza a corticóide-terapia antes da inseminação.
- Devido ao pequeno número de publicações e da importância do assunto, novas pesquisas são sugeridas, no intuito de ampliar os conhecimentos neste campo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALGHAMDI, A., TROEDSSON, M.H.T., LASCHKEWITSCH, T., XUE, J.L. Uterine secretion from mares with post-breeding endometrites alters sperm motion characteristics *in vitro*. **Theriogenology**, v.55, p.1019-1028, 2001.

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.E.; PYCOCK, J.F. Inflammatory components in uterine fluids from mares with experimentally induced bacterial endometritis. **Equine Vet. J.**, v.22, p.422-25, 1990.

ALVARENGA, M. A., IWANA DE MATTOS, M.C. Utilização da escova ginecológica cytobrush na coleta de material endometrial de éguas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.42, p.67-8, 1990.

ANDERSON, D.J., TATER, T.H., Immunosuppressive effects of mouse seminal plasma components in vivo and in vitro. **Journal of immunology**, v. 128, p. 535-539, 1982.

ASBURY, A.C.; HALLIWELL, R.E.; FOSTER, G.W.; LONGINO, S.J. Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. **Theriogenology**, v.14, p.299-308, 1980.

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

BABIOR, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **The New England Journal of Medicine.**, v.298, n.13, March, p.721-5, 1978.

BADER, H., KRAUSE, A. Investigations about the transport, distribution and the fate of spermatozoa in the genital tract of the mare. **9th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I.**, vol 5, p. 197-200, 1980.

BAHENER, R.L.; NATHAN, D.G. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. **Science**, Washington, v.155, p.835-6, 1967.

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

BERGMAN, H.J. & DEKRUIF, A. Preliminary evaluation of the inflammatory response of the endometrium on semen, extender and its components in mares. **Pferdeheilkunde**, v.13, p.543, 1997.

BLUE, H.B.; BLUE, M.G.; KENNEY, R.M.; MERRIT, T.L. Chemotatic properties and protein of equine uterine fluid. **Am. J. Vet. Res.**, v.45, p.1205-08, 1984.

BORGES, A.S.; CONCEIÇÃO, M.; MELCHERT, A.; et al. Determinação do metabolismo oxidativo de neutrófilos através do método do Nitroblue Tetrazolium (NBT), em bovinos (*Bos taurus*) da raça Limousin durante o desenvolvimento da premunicação contra Anaplasma e Babesia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.66, supl., p.123, 1999.

BOUVET, J.P. COUDERC, J., PILLOT, J. In vivo and in vitro immunosuppressions in mice by a 100-110kd fraction from boar seminal plasma. **American Journal of reproductive Immunology and Microbiology**, v. 14, p. 135-140, 1987.

BROOK, D. Cytological and bacteriological examination of the mare's endometrium. **Eq. Vet. Sci.** v. 5, p. 16-22, 1985.

BROWN, A.E., HANSEN, P.J., ASBURY, A.C. Opsonization of bacteria by uterine secretion of cyclic mares. **Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol.**, v. 4, p. 119-23, 1985.

BRYANS, J.T. Research on bacterial diseases of horses. **Lectures for Stud Managers' Course**, Lexington, Kentucky, p.153-160m 1962.

CHRETIEN, J.H.; GARAGUSI, V.F. N.B.T. test and steroid therapy. **Lancet**, Boston, v.23, p.653-4, 1972.

CIARLINI, P.C. **Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos em ovelhas (*Ovis aries* Linnaeus, 1758) naturalmente infectadas por nematódeos gastrointestinais ao final da gestação, durante a lactação e após o desmame: Influência de fatores raciais e hormonais.** 1998. 204p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo

CIARLINI, P.C.; BARROS, C.M.Q.; LOPES, M.D.; et al. Leucograma, fibrinogênio plasmático e capacidade bactericida dos neutrófilos de éguas susceptíveis e resistentes a endometrites. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.21, n.3, p.123-5, 1997.

COHEN, J. Immunological aspects of sperm selection and transport. In: Crichton, D.B. (ed.) Immunological aspects of reproduction in mammals. Kent, Butterworths, p. 77-89, 1984.

COLLINS, T.; CONTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Robbins Pathologic Basic of Disease**. 6^a ed, Ed. Saunders, 1999.

COSTA, J.N. **Leucograma, metabolismo oxidativo de neutrófilos, proteinograma e imunoglobulinas de bovinos da raça holandesa (*Bos taurus*). Influência do desenvolvimento etário e da suplementação com vitamina E (acetato de DL- -tocoferol)**. 2000. 209p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

COSTA, J.N.; KOHAYAGAWA, A.; PEIXOTO, A.P.C.; et al. Metabolismo oxidativo de neutrófilos em bovinos da raça nelore (*Bos indicus*). **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, supl., v.7, p.198, 2000.

CURI, P.R. Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas. Editora Tiponic, 2^a.edição, 263p.,1998.

DELL'AQUA Jr., J.A. **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição do sêmen e concentração da dose inseminante de sêmen congelado eqüino**. Botucatu, 2000. 81p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

DIMOCK, W.W., SNYDER, E. Bacteria of the genital tract of mares and the semen of stallions and their relation to breeding efficiency. **J. Am. Vet. Med. Assoc**, v. 64, p. 288-297, 1924.

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

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. 1344p.

FIALA, S.M.; PIMENTEL, C.A.; MATTOS, A.L.G.; AMARAL, M.G.; JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Sperm transport and uterine inflammatory response after insemination in the mare. **In: 15th International Congress on Animal Reproduction**. v.2, p.388, 2004.

FISCHER, B. & BEIER, H.M. Uterine environment in early pregnancy. In: Sreenan, J.M. & Diskin, M.G. (eds). Embryonic mortality in farm animals. Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands: p. 93-108, 1986.

GINTHER, O.J.; PIERSON, R.A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology**, v.21, p.505-15, 1984.

GORDON, P.A.; STUART, J.; LEE, T.R.; et al. The citocentrifuge NBT test. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.28, p.674, 1975

HANSEN, P.J.; ASBURY, A.C. Oponins of *Streptococcus* in uterine flushings of mares susceptibles and resistant endometritis: Control of secretion and partial characterization. **Am. J. Vet. Res.**, v.48, p.646-50, 1987.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J.Reprod.Fertil.**, v.88, p.343-52, 1990.

HINRICHS, K., CUMMINGS, M.R., SERTICH, P.L., KENNEY, R.M. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. **J. Am. Vet. Med. Ass.** V.193, p.72-75, 1988.

HUGHES, J.P., ASBURY, A.C., LOY, R.G., BURD, H.E. The occurrence of *Pseudomonas* in the genital tract of stallions and its effects on fertility. **Cornell Vet.** V.57, p. 53-69, 1967.

HUGHES, J.P., LOY, R.G. Investigations on the effect of intrauterine inoculations of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. Proc. **15th Ann. Conv. Am. Ass. Eq. Prac.**, p.289-92, 1969.

IMADE, G.R., BAKER, H.W. DE KRETZER, D.M., HEDGER, M.P. Immunossuppressive activities in the seminal plasma of infertile men: relationship to

sperm antibodies and autoimmunity. **Human Reproduction**, v. 12, p. 256-262, 1997.

JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger,. 1221p., 1986.

JOHNSON, V.; JACQUELINE, N. Influence of estrogenon antibacterial and immunoglobulin secretory activities of uterine fluids from ovariectomized mares. **Am. J. Vet. Res.**, v.55, nº 5, p.643-49, 1994.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, 932p.,1997.

KATILA, T. Neutrophils in uterine fluid after insemination with fresh live spermatozoa or with killed spermatozoa. **Pferdeheilkunde**, v.13, p. 540, 1997.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. **Biol. Reprod. Mono** v.1, p.515-17, 1995.

KATILA, T., KOSKINEN, E., OIJALA, M. & PARVIAINEN, P. Evaluation of the post-partum mare in relation to foal heat breeding. II. Uterine swabbing and biopsies. **J. Vet. Med. A.**, v. 35, p. 331-339, 1988(b).

KATILA, T., KOSKINEN, E., OIJALA, M. Evaluation of the post partum mare in relation to foal heat breeding. I. Rectal palpation, vaginoscopy and ultrasound scanning. **J. Vet. Med.**, v.35, p.92-100, 1988(a).

KATILA, T.; PORTUS, B.J.; REILAS, T. The effect of seminal plasma on uterine inflammation and contractility in mares. In: **15th International Congress on Animal Reproduction**, v.2, p.392, 2004.

KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v. 172, p. 241-61, 1978.

KENNEY, R.M., DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: Morrow, D.A. (ed.) **Current Therapy in Theriogenology**. WB Saunders Co, Philadelphia, p. 723-729. 1986.

KENNEY, R.N.; KHALEEL, S.A. Bacteriostatic activity of mares uterus: A progress report on immunoglobulins. **J. Reprod. Fert.**, Suppl. 23, p.357-58, 1975.

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

LAPOSY, C.B.; BALARIN, M.R.S.; ATHAIDE, D.F.; et al. Avaliação hematológica e metabolismo oxidativo de neutrófilos de equinos atletas entre 12 e 16 meses de idade. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.6, n.2, p.25-9, 2000.

LEBLANC, M.M., ASBURY, A.C., LYLE, S.K., Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mare. **Am. J. Vet. Res.**, v. 6 p. 864-7, 1989.

LEBLANC, M.M.; JOHNSON, R.D.; CALDERWOOD MAYS, M.B.; VALDERRAMA, C. Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. In: **Sixth International Symposium on Equine Reproduction**, 1994, Caxambu, M.G., Brazil. *Proceedings...* Caxambu, 1994. p.119.

LIU, I.K.M.; CHEUNG, A.T.W.; WALSH, E.M.; MILLER, M.E. Comparison of peripheral blood and uterine-derived polymorphonuclear leukocytes from mares resistant and susceptible to chronic endometritis: Chemotactic and cell elastimetry analysis. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, p.917-20, 1985.

LOPES, S.T.A. **Perfil leucocitário, atividade funcional neutrofílica, medula óssea, fibrinogênio e proteínas plasmáticas totais em cabras com mastite induzida experimentalmente por *Staphylococcus aureus* e suplementadas com vitamina E (acetato de DL- -tocoferol)**. 2000. 159p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

LOVE, C.C., LOCH, W.L., BRISTOL, F., GARCIA, M.C. & KENNEY, R.M. Comparison of pregnancy rates achieved with frozen semen using two packaging methods. **Theriogenology**, v.31, p.613-622, 1989.

MADDUX, J.M.; KEETON, K.S. Effects os dexamethasone, levamisole, and dexamethasone-levamisole combination on neutrophil function in female goats. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.48, p.1114-25, 1987.

MANDEL, G.L.; RUBIN, W.; HOOK, E.W. The effect of NADPH oxidase inhibitor (hydrocortisone) on polymorphonuclear leukocyte bactericidal activity. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v.49, p.1381-8, 1970.

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

MATULA, G., PATERSON, P.Y. N.B.T. test in a patient on steroids. **Lancet**, Boston, v.1, p.803-4, 1971.

MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L. & SHIDELER, R.K. Diagnostic ultrasonography of the mare's reproductive tract. **Eq. Vet. Sci.**, v. 8, p.329-333, 1988(a).

MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., HARRISON, L.A., BLACH, E.L., SHIDELER, R.K. Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: Effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v.192, p.350-353, 1988 (b).

MCRAE, A.C. The blood-uterine lumen barrier and exchange between extracellular fluids. **J. Reprod. Fert.**, v.82, p. 857-873, 1988.

METCALF, J.A.; GALLIN, J.I.; NAUSEEF, W.M.; et al. **Laboratory manual of neutrophil function**. New Yoirk: Raven Press, 1986. 191p.

MILLAR, R. Observations on the bacterial flora of the vulvo-vaginal tract of mares. **Aust. Vet. J.**, v. 28, p. 171-173, 1952.

MILLAR, R., FRANCIS, J. The relation of clinical and bacteriological findings to fertility in thoroughbred mares. **Aust. Vet. J.**, v. 50, p. 351-355, 1974.

MITCHELL, G.; LIU, I.K.M.; PERRYMAN, L.E.; STABENFELDT, G.H.; HUGHES, J.P. Preferential production and secretion of immunoglobulins by the equine endometrium – a mucosal immune system. **J. Reprod. Fert. Suppl.** 32, p.161-68, 1982.

NATHAN, D.G. NBT reduction by human phagocytes. **New England of Journal Medicine**, Schaumburg, v.290, n.5, p.280-1, 1974.

NIKOLAKOPOULOS, E. & WATSON, E.D. Does artificial insemination with chilled, extended semen reduce the antigenic challenge to the mare's uterus compared with natural service? **Theriogenology**, v.47, p.583-590, 1997.

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

OVERSTREET, J.W. & TOM, R.A. Experimental studies of rapid sperm transport in rabbits. **J. Reprod. Fert.**.. v. 66, p.601-606, 1982.

PAPA, F. O.; ZAHN, F. S.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; ALVARENGA, M. A. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen eqüino. In. *Simpósio de Reprodução Animal: Inovações Científicas e Tecnológicas.*, v.26, n.3, p. 184-186, 2002.

PARK, B.H. The use and limitations of the nitroblue tetrazolium test as a diagnostic aid. **Journal of Pediatrics**, St. Louis, v.78, n.2, p.376-8, 1971.

PARK, B.H.; FIRKRIG, S.M; SMITH WICK, E.M. Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils: a diagnostic aid. **Lancet**, London, v.2, p.532-4, 1968. 1968.

PARK, B.H.; GOOD, R.A. N.B.T. test stimulated. **Lancet**, London, v.19, p.616, 1970.

PARLEVLIT, J.M., TREMOLEDA, J.M., CHENG, K.P., PYCOCK, J.F. & COLENBRANDER, B. Influence of semen, extender and seminal plasma on the defence mechanism of the mare's uterus. **Pferdeheilkunde**, v.13, p.540, 1997.

PETERSON, F.B., MCFEELY, R.A. & DAVID, J.S.E. Studies on the pathogenesis of endometritis in the mare. Proc. **15th Ann. Conv. Am. Ass. Eq, Prac.**, p. 279-287, 1969.

POLI, G., MANTELLI, F. Il 'test' N.B.T. negli animali domestici: valori normali. **Clinica Veterinaria (Milan)**, Milan, v.97, p.241-7, 1974.

POLI, G.; NICOLETTI, G.; FARAVELLI, G. Nitroblue tetrazolium (N.B.T.) test nel cane. **Folia Veterinaria Latina**, Milan, v.3, p.215-39, 1973.

PYCOCK, F.J.; ALLEN, E.W. Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. **Equi. Vet. J.** v.22, p.422-25, 1990.

REILAS, T. **Uterine Luminal Environment of the mare**. 2001, Helsinki p.80 - Tese de Doutorado. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki – Finland.

ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**. 3^A ed. Editora Malone, 1994.

ROTH, A. J.; KAEBERLE, M.L. Effects of in vivo dexamethasone administration on in vitro bovine polymorphonuclear leukocyte function. **Infection and Immunity**, Washington, v.33, n.2, p.434-41, 1981.

ROTH, J.A.; KAEBERLE, M.L. Effect of glucocorticoids on the bovine immune system. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.180, n.15, p.894-901, 1982b.

ROTH, J.A.; KAEBERLE, M.L.; APPEL, L.H. et al. Association of increased estradiol and progesterone blood values with altered bovine polymorphonuclear leukocyte function. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.44, n.2, p.247-53, 1983.

ROTH, J.A.; KAEBERLE, M.L.; HSU, W.H. Effect of estradiol and progesterone on lymphocyte and neutrophil functions in steers. **Infection and Immunity**, Washington, v.35, n.3, p.997-1002, 1982a.

ROZEBOOM, K.J., ROCHA-CHAVEZ, G., TROEDSSON, M.H.T. Inhibition of neutrophil chemotaxis by pig seminal plasma in vitro: a potential method for

modulation post breeding inflammation in sows. **Reproduction**, v.121, p.567-572, 2001.

ROZEBOOM, K.J., TROEDSSON, M.H., MOLITOR, T.W. & CRABO, B.G. The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. **J. Anim. Sci.** v. 77, p.2201-2206, 1999.

ROZEBOOM, K.J., TROEDSSON, M.H.T., HODSON, H.H., SHURSON, G.C., GRABO, B.G. the importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 443-448, 2000.

SARA, I.S.; DWARAKNATH, P.K. A note on nitroblue tetrazolium test in normal and diseased animals. **Indian Journal Animal Science**, New Delhi, v.47, n.6, p.362-4, 1977.

SHARMA, R.K., AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. **Reprod Med Biol**, v.3; p.177-199; 2004.

SHOPE, R.E., SCHARAMM, P., BENES, P., MORSCHE, B. Seminal plasma-induced suppression of the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes and monocytes. **Andrologia**, v.16, p.124-128, 1984.

SIMPSON, R.B., BURNS, S.J. & SNELL, J.R. Microflora in stallion semen and their control with a semen extender. Proc. **21st Ann. Conv. Am. Ass. Eq. Practitioners**, p.255-261, 1975.

STYRT, B. Species variation in neutrophil biochemistry and function. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v.46, p.63-74, 1989.

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

TISCHNER, M., KOSINIAK, K. & BIELANSKI, W. Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. **J. Reprod. Fert.**, v. 41, p. 329-335, 1974.

TIZARD, I. **Veterinary Immunology An Introduction**. 4^a ed., Editora Saunders, 1992.

TROEDSSON, M.H., IBRAIN, N.M., KING, N.L., et al., Post-breeding endometritis: the role of seminal components. **Theriogenology**, p. 542., 1998a.

TROEDSSON, M.H., LIU, I.K., CRABO, B.G., Sperm transport and survival in the mare: a review. **Theriogenology**., Oct;1;50(5)p. 807-18., 1998b.

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

TROEDSSON, M.H.T. **Uterine defense mechanisms in the mare**. PhD Thesis, University of California, Davis, USA, 1991.

TROEDSSON, M.H.T. Uterine response to semen deposition in the mare. Proc. **Ann. Meet. Soc. Theriogenology**, San Antonio, TX, p.130-135, 1995.

TROEDSSON, M.H.T., CRABO, B.G., IBRAHIM, N.M., SCOTT, M., ING, M. Matting-induced endometrites: mechanism, clinical importance, and consequences. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 41, p. 11-12, 1995b.

TROEDSSON, M.H.T., LEE, C-S., FRANKLIN, R.D. & CRABO, B.G. The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation. **J. Reprod. Fert.** Supplement 56, p.341-349, 2000.

TROEDSSON, M.H.T., LOSETH, K., ALGHAMDI, A.M. & CRABO, B.G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. Proc. **3rd Int. Symp. Stallion Reproduction**, Fort Collins, Colorado, p. 27, 2001.

TROEDSSON, M.H.T., STEIGER, B.N. IBRAHIM, N.M., KING, V.L., FOSTER, D.N., GRABO, B.G. Mechanism of sperm-induced endometrites in the mare. **Biology of reproduction.**, suplemento, v. 52, p. 133, 1995a.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.L.; THURMOND, M. Function of uterine and blood-derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **J. Reprod. Fert.**, v.44, p.283-88, 1993.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M. Uterine clearance of non-antigenic markers in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. **J. Reprod. Fert.**, v.44, p.283-88, 1991.

TYLER, K.R. Histological changes in the cervix of the rabbit after coitus. **J. Reprod. Fert.**, v.49, p. 341-45, 1977.

VAN EEDEN, S.F.; KLUT, M.E.; WALKER, B.A.M.; et al. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.232, p.23-43, 1999.

WATSON, E.D., STOKES, C.R. & BOURNE, F.J. Cellular and humoral defence mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. **Vet. Imm. Immunopath.**, v.16, p.107-121, 1987a.

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

WATSON, E.D., STOKES, C.R., DAVID, J.S.E., BOURNE, F.J. & RICKETTS, S.W. Concentrations of uterine luminal prostaglandins in mares with acute and persistent endometritis. **Equine vet. J.**, v.19, p.31-37, 1987c.

WIDDERS, P.R., STOKES, C.R., DAVID, J.S.E. & BOURNE, F.J. Immunohistological studies of the local immune system in the reproductive tract of the mare. **Res. Vet. Sci.**, v.38, p.88-95, 1985.

WIDDERS, P.R., STOKES, C.R., DAVID, J.S.E. & BOURNE, F.J. Quantitation of the immunoglobulins in reproductive tract secretions of the mare. **Res. Vet. Sci.**, v.37, p. 324-330, 1984.

WILLIAMSON, P., MUNYUA, S.J.M., PENHALE, J. Endometritis in the mare: a comparison between reproductive history and uterine biopsy as techniques for predicting susceptibility of mares to uterine infection. **Theriogenology**, v.32, p.351-357, 1989.

WINGFIELD-DIGBY, N.J. The technique and clinical application of endometrial cytology in mares. **Equine Vet. J.**, v.10, p.167-170, 1978.

ZUCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Botucatu, 1998. 121p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.