

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM
ÉGUAS DOADORAS DE EMBRIÃO DA RAÇA QUARTO
DE MILHA

Victor Hugo Mendonça
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM
ÉGUAS DOADORAS DE EMBRIÃO DA RAÇA QUARTO
DE MILHA

Victor Hugo Mendonça
Orientadora: Prof. Adj. Juliana R. Peiró

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP
2012

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Mendonça, Victor Hugo

M5234qh

Quantificação de proteínas de fase aguda em éguas doadoras
de embrião da raça quarto de milha. / Victor Hugo Mendonça.

Araçatuba: [s.n], 2012

65 f. il.; CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária, 2012

Orientador: Profa. Adj. Juliana Regina Peiró

1. Eletroforese 2. Histopatologia 3. Citologia 4. Transferrina
- 5.Útero 6. Biopsia 7. Albumina

CDD 636.1330898

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VICTOR HUGO MENDONÇA – Campinas – SP, 09 de Julho de 1984. Graduado em Medicina Veterinária, 2008, Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus Araçatuba, São Paulo. Foi bolsista de Iniciação Científica pela FAPESP em 2007. Atua na área de Clínica e Reprodução Equina, na empresa Central da Mil, desde 2009, Araçatuba, São Paulo. Aluno do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal – UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba, São Paulo.

“As pessoas que vencem neste mundo são as que procuram as circunstâncias de que precisam e, quando não as encontram, as criam.”

(Bernard Shaw)

DEDICATÓRIA

“A meu pai Sebastião Marcos Mendonça (in memorian), pelo pai exemplar que foi e por todo o amor, amizade, carinho e alegria que nos trouxe durante o pouco tempo que passou conosco aqui na Terra, mas que foram momentos muito especiais e que jamais serão apagados de nossas memórias e de nossos corações. Sempre será o meu ídolo.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre estar ao meu lado e por ter me ajudado a cumprir mais esta etapa.

Agradeço a minha mãe Lúcia e minha avó Maria de Lourdes por sempre estarem comigo em todos os momentos de minha vida, e pela importância que representam para mim.

Agradeço meu irmão Heitor, meus tios Luiz e Eliza, primos Giovanni e Leonardo, que me apoiaram ao longo desses anos, me dando todo o apoio necessário para que eu cumprisse mais esta etapa de minha vida.

Agradeço à Professora Adjunto Juliana R. Peiró pela confiança em mim depositada, orientação ao longo destes anos, desde a época da graduação. Agradeço pela paciência e conhecimentos compartilhados, e por estar ao meu lado durante momentos difíceis pelos quais passei.

Agradeço Médica Veterinária Tatianna Frate Schwardt por todos estes anos de companheirismo, amor e dedicação, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos bons e difíceis que passei.

Agradeço às professoras Márcia Marinho, Gisele Machado e respectivas equipes pelos ensinamentos e por todo apoio técnico e científico ao longo do projeto.

Agradeço ao professor Luiz Eduardo Corrêa Fonseca pela grande amizade, confiança em mim depositada e auxílio durante todo o período de graduação e ao longo de minha vida profissional.

Agradeço à Médica Veterinária Tatiana Poló por ajudar durante todo o procedimento de eletroforese, no qual sem ela isto não seria possível.

Agradeço ao Sr. Jamil Buchalla Filho, por ter permitido a realização deste experimento em sua propriedade e com seus animais, além de toda confiança em mim depositada durante esta fase.

Agradeço a Bianca Gerardi, Guilherme Dias de Melo, Cilene Vidovix Táparo por todo auxílio técnico prestado ao transcorrer do projeto.

Agradeço ao Médico Veterinário Eduardo Hara por todo o auxílio e companheirismo ao longo desta jornada.

Agradeço a todos os funcionários e amigos da Central da Mil (Tiago, Fábio, Mauro, Micheli, Gino, Juliano, Carol, Elis, Fernanda) pelo apoio e ajuda durante o experimento.

Agradeço meus amigos Daniel Tomazella, Alexandre Laurini, João Paulo Goes, Bruno Matsukuma, meu irmão Heitor Mendonça e Aline Lobato pela ajuda em todos os momentos do experimento, apoio incondicional e pela amizade nesta jornada.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba pela estrutura física concedida, assim como o apoio da Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e da Seção de Pós-graduação pela solicitude.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma cooperaram para o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
I. Lista de figuras	ix
I. Lista de tabelas	x
I. RESUMO	xi
I. SUMMARY	xiii
I. INTRODUÇÃO	16
II. MATERIAL E MÉTODO	23
2.1 Caracterização dos animais	23
2.2 Hemograma completo	24
2.3 Cultivo e isolamento bacteriano	24
2.4 Citologia endometrial	25
2.5 Biópsia uterina e exame histopatológico	26
2.6 Lavagens uterinas	27
2.7 Eletroforese	27
2.7.1 Gel de separação	27
2.7.2 Gel de empilhamento	28
2.7.3 Solução tampão	28
2.7.4 Amostras	28
2.7.4.1 Soro	28
2.7.5 Corrida eletroforética	29
2.7.6 Coloração dos géis	29
2.7.7 Descoloração dos géis	30
2.7.8 Leitura dos géis	30
2.7.9 Análise estatística - Eletroforese	30
III. RESULTADO E DISCUSSÃO	31
IV. CONCLUSÃO	51
V. REFERÊNCIAS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quantidade de PMNs na citologia endometrial em relação à quantidade de células inflamatórias totais no grupo controle nos dias 0 e 4 após o início do cio	35
Figura 2 - Quantidade de PMNs na citologia endometrial em relação à quantidade de células inflamatórias totais no grupo experimental nos dias 0 e 4 após o início do cio	36
Figura 3 - Figura 3. Relação (%) de PMNs e células inflamatórias totais na citologia endometrial de cada indivíduo	37
Figura 4 - Aspectos citotológicos do endométrio de éguas com características de inflamação, obtidos de animais dos Grupos Controle (a, b) e Experimental (c, d). Coloração H.E. Araçatuba, 2012	38
Figura 5 - Aspectos histopatológicos do endométrio de éguas com características de inflamação, obtidos de animais dos Grupos Controle (c, d) e Experimental (a,b,e, f). Coloração H.E. Araçatuba, 2012	42
Figura 6 - Sonograma demonstrando acúmulo de fluido uterino em égua do grupo Experimental (E1) no dia 0	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Determinação do grau de inflamação uterino em Éguas da raça Quarto de Milha	26
Tabela 2 - Cultura Microbiana com Swab intrauterino em Éguas da raça Quarto de Milha	32
Tabela 3 - Citologia endometrial do Grupo Controle	33
Tabela 4 - Citologia endometrial do Grupo Experimental	34
Tabela 5 - Classificação das biópsias endometriais nos dias 0 e 4 após início do cio, segundo Kenney e Doig (1986)	40
Tabela 6 - Resultado da classificação das biópsias endometriais nos dias 0 e 4, segundo Kenney e Doig (1986)	41
Tabela 7 - Achados microbiológicos, citológicos, histopatológicos e dos lavados das éguas doadoras de embrião do grupo Experimental	44
Tabela 8 - Achados microbiológicos, citológicos e histopatológicos das éguas doadoras de embrião do grupo Controle	45
Tabela 9 - Concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL) de éguas doadoras de embrião com (grupo Controle, C) e sem sinais clínicos de endometrite (grupo Experimental, E) ao longo do tempo	48
Tabela 10 - Concentração sérica de transferrina (mg/dL) de éguas doadoras de embrião com (grupo Controle, C) e sem sinais clínicos de endometrite (grupo Experimental, E) ao longo do tempo	49
Tabela 11 - Concentração sérica de albumina (g/dL) de éguas doadoras de embrião com (grupo Controle, C) e sem sinais clínicos de endometrite (grupo Experimental, E) ao longo do tempo	49
Tabela 12 - Concentração sérica de haptoglobina (g/dL) de éguas doadoras de embrião com (grupo Controle, C) e sem sinais clínicos de endometrite (grupo Experimental, E) ao longo do tempo	50
Tabela 13 - Concentração sérica de glicoproteína ácida (mg/dL) de éguas doadoras de embrião com (grupo Controle, C) e sem sinais clínicos de endometrite (grupo Experimental, E) ao longo do tempo	50

QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM ÉGUAS DOADORAS DE EMBRIÃO DA RAÇA QUARTO DE MILHA

RESUMO – A eficiência reprodutiva em éguas é geralmente baixa, sendo que 43% de éguas puro-sangue falham em conceber um potro vivo. Infecção bacteriana no lúmen uterino é uma das principais causas de infertilidade em éguas. O exame citológico do endométrio é o mais importante método auxiliar no controle da saúde genital da égua devido ao seu baixo custo, fácil emprego e a possibilidade de rápido diagnóstico de processos inflamatórios, mesmo que subclínicos. A indução experimental de endometrite por inóculos de *E. coli* em éguas promoveu um aumento significativo nas proteínas de fase aguda (APPs) sistemicamente demonstrado pelo aumento nas concentrações da proteína amiloide sérica A (SAA) e fibrinogênio, leucopenia transitória e aumento da expressão de mRNA de citocinas e SAA no endométrio (METTE et al., 2010). Os objetivos do presente estudo foram correlacionar os achados de exames ultrassonográficos e hematológicos com culturas microbiológicas, citologia e histopatologia endometrial de éguas que apresentam endometrite ou histórico reprodutivo insatisfatório, avaliar a influência das lavagens uterinas no ambiente uterino e determinar qual(is) proteína(s) de fase aguda poderia(m) ser utilizada(s) como marcador(es) da resposta inflamatória sistêmica. Doze éguas da raça Quarto de Milha, divididas em dois grupos: controle e com endometrite (n=6), foram avaliadas quanto aos parâmetros hematológicos, swab uterino para cultivo microbiológico, citologia endometrial, biópsia uterina, e eletroforese do soro para determinação das concentrações de proteínas de fase aguda, antes e após o processo de lavagem uterina. Os resultados do presente estudo mostraram que a cultura microbiológica associada ao exame citológico do endométrio possibilitaram a fácil identificação e classificação da endometrite já instalada, sendo a histopatologia necessária para identificar endometrites subclínicas e/ou crônicas além de demonstrar a viabilidade do útero. O lavado uterino mostrou-se um bom método para realizar a limpeza física do útero.

Entretanto, demonstrou ter a propriedade de promover a inflamação local em alguns animais, sendo mais acentuada no grupo controle. Através deste modelo experimental, não foi possível determinar qual(is) proteína(s) de fase aguda pode(m) ser utilizada(s) como marcador da resposta inflamatória sistêmica. Para tanto, sugere-se a análise das concentrações das APPs no fluido endometrial, pois não houve alteração das mesmas no soro destes animais.

Palavras-chave: eletroforese, éguas, útero, histopatologia, biópsia, transferrina, citologia, albumina

QUANTIFICATION OF ACUTE PHASE PROTEIN IN QUARTER HORSE EMBRYO DONOR MARES

SUMMARY – The reproductive efficiency of mares is generally low, and 43% of Thoroughbred mares fail to conceive a live foal. Bacterial infection of the uterine lumen is a major cause of infertility in mares. The cytological examination of the endometrium is the most important method to assist in controlling the genital health of the mare due to its low cost, is easy to use and provides a rapid diagnosis of inflammatory processes. Experimental induction of endometritis by an inoculum of *E. coli* in mares caused a significant increase in acute phase proteins (APPs) systemically demonstrated by increased concentrations of serum amyloid A protein (SAA) and fibrinogen, transient leucopenia and increased mRNA expression of cytokines and SAA in the endometrium. The aim of this study was to correlate the ultrasonographic and hematological findings with results of the microbiological cultures, endometrial cytology and histopathology in mares with endometritis or poor reproductive history, assess the influence of uterine flushings in the uterine environment and determine which acute phase protein(s) might be used as a marker of systemic inflammatory response and evaluate the influence of uterine lavages on the uterine environment. Twelve Quarter Horse mares were divided into 2 groups: control and with endometritis (n=6) and were evaluated for hematological variables, uterine swab for microbiological culture, endometrial cytology, uterine biopsy and serum electrophoresis for determination of acute phase proteins concentrations before and after uterine lavage. The results of this study showed that the microbial culture associated with endometrial cytology allowed easy identification and classification of endometritis, and the histopathology was necessary to identify subclinical and/or chronic endometritis and demonstrate the integrity of the uterus. The uterine lavage proved to be a good method to perform uterine clearance. However, the uterine lavage seems to promote a local inflammatory response in some animals, which was higher in the control

group. Through this experimental model, we could not determine which protein might be used as an acute phase marker of systemic inflammatory response. We suggest the analysis of the APPs concentrations in the endometrial fluid might be helpful to evaluate the local inflammatory response.

Keywords: electrophoresis, mares, uterus, histopathology, biopsy, transferring, cytology, albumin

I. INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva em éguas é geralmente baixa, sendo que dados do ano de 2005 revelaram que 43% de éguas puro-sangue falharam em conceber um potro vivo (THE BRITISH HORSE RACING BOARD, 2007). Análises de resultados obtidos em fazendas de criação de cavalos durante os últimos 20 anos indicaram taxas de prenhez e nascimento por ciclo estral de 55-65% e 43-45%, respectivamente (ALLEN et al., 2007; MORRIS; ALLEN, 2002).

A subfertilidade na égua constitui um dos maiores problemas na criação industrial equina, causando grande perda econômica por impossibilitar a produção de um potro por ano (CONCHA-BERMEJILLO; KENNEDY, 1982). Um dos aspectos mais importantes para que se mantenha a gestação é a existência de um útero sem alterações anatômicas e histológicas e particularmente um endométrio sadio (KENNEY, 1978). Desta forma, o diagnóstico de subfertilidade em éguas reprodutoras torna-se de extrema importância na tentativa de prevenir ou minimizar tais perdas econômicas.

Dos últimos 50 anos até hoje, a endometrite, condição que envolve inflamação e muitas vezes, por consequência, infecção do endométrio das éguas, é uma das causas mais importantes e frequentes de infertilidade e de baixa eficiência reprodutiva (CARD, 1997; NIKOLAKOPOULOS; WATSON, 1999; THOMASSIAN, 1996; TROEDSSON, 1999), além de ser um dos maiores problemas na clínica dos equinos (DOIG et al., 1981). Considerando-se o processo de endometrite, as éguas classificadas como susceptíveis são aquelas que apresentam falha no processo de limpeza uterina associada a uma migração exacerbada de polimorfonucleares (PMNs) para o útero. Essas alterações resultam em uma resposta inflamatória exacerbada, com contínua migração de neutrófilos atraídos pela quimiotaxia originada pela presença de um corpo estranho, desta forma, tornando o ambiente uterino incompatível com o desenvolvimento embrionário (TROEDSSON, 1999).

O útero das éguas é mantido livre de contaminantes através de mecanismos físicos, imunológicos e de um sistema linfático funcional (MALCHITZZKY et al., 2007). As barreiras físicas que impedem o acesso de micro-organismos ao útero são a vulva (CASLICK, 1937; PASCOE, 1979), a prega vestibulo-vaginal (HINRICHS et al., 1988) e a cérvix (LEBLANC et al., 1995). Na espécie equina, independentemente do método de cobertura utilizado, o sêmen é depositado na luz uterina, estando portanto, as barreiras físicas ultrapassadas. Neste caso, os espermatozoides, proteínas do plasma seminal e bactérias do sêmen e do pênis do garanhão, são responsáveis pela indução de uma resposta inflamatória aguda (TROEDSSON, 1997). O útero reage rapidamente à presença do sêmen através de um aporte de neutrófilos, que são identificados no útero 30 minutos após a cobertura (KOTILAINEN et al., 1994), atingindo um pico inflamatório em 12 horas (KATILA, 1995; TROEDSSON, 1997).

Algumas éguas são mais susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura e caracterizam-se pela sua incapacidade de eliminar o processo inflamatório em até 48 horas após a mesma. De um modo geral, éguas susceptíveis apresentam características em comum, como idade avançada, histórico de falha reprodutiva em várias temporadas, episódios anteriores de endometrite e de perdas gestacionais (TROEDSSON, 1997).

O emprego da transferência de embriões (TE) gerou um mercado crescente na equideocultura. Tal biotécnica possibilita um maior aproveitamento do potencial genético e reprodutivo de animais de alto desempenho (EIGENHEER-MOREIRA et al., 2007). Entretanto, no programa de TE, o trato reprodutivo da égua é manipulado também no diestro, momento em que se realiza a lavagem uterina para obtenção dos embriões nas doadoras e transferência do embrião nas receptoras. Sendo assim, assume-se que éguas utilizadas em programas de TE estão mais predispostas a desenvolver endometrites.

A infecção bacteriana no lúmen uterino é uma das principais causas de infertilidade em éguas (METTE et al., 2010). Anormalidades do ambiente

uterino e de oviduto podem ser responsáveis por uma parte significativa de perda embrionária (BALL et al., 1986; 1989), e inflamação secundária a infecções uterinas parece ser uma das causas primárias de ambiente subótimo (DIMOCK; EDWARDS, 1928 citados por ADAMS et al., 1987; SALTIEL et al., 1986). *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* e *Escherichia coli* são as bactérias mais comumente isoladas de éguas com endometrite (ALBIHN et al., 2003), ambas as bactérias são comensais sobre as membranas mucosas e são consideradas patógenos oportunistas (RIDDLE et al., 2007).

As proteínas de fase aguda (APPs) pertencem à uma família de aproximadamente 30 proteínas plasmáticas (BANKS et al., 1995) de derivação hepática (HULTÉN et al., 1999). Durante quadro de inflamação, ocorre aumento da síntese hepática dessas proteínas, caracterizando resposta aguda protéica (PETERSEN et al., 2004). Como resposta às infecções, essas proteínas são liberadas rapidamente na corrente sanguínea (CRISMAN et al., 2008). As APPs podem ser classificadas em positivas e negativas, sendo APPs positivas as que têm suas concentrações aumentadas nos casos de inflamação, e APPs negativas aquelas que têm sua síntese hepática diminuída (GRUYS et al., 2006).

A haptoglobina (Hp) é uma APP positiva (HEEGAARD et al., 1998; PALLARÉS et al., 2008; PETERSEN et al., 2004) e o aumento de sua concentração é indicativo de inflamação grave (FÜERLL et al., 2005). A Hp, durante o processo inflamatório, tem as funções de remoção de hemoglobina, limitação na disponibilidade de ferro, inibição da quimiotaxia e fagocitose, além de possuir ações bacteriostática e imunomoduladora (DELANGE et al., 1998; MURATA; MIYAMOTO, 1993; SUFFREDINI et al., 1999).

A albumina (Alb) é a proteína extracelular mais abundante no sangue (SHAMAY et al., 2005), considerada uma APP negativa (CERÓN; PARRA, 2005), porém, a diminuição de sua concentração pode ocorrer por deficiência nutricional (WOLF, 2011). Em éguas sadias, observou-se 56% mais albumina no líquido uterino do que no soro das mesmas (TUNÓN et al., 2008).

Diferentemente, éguas com metrite crônica apresentaram aumento na secreção de albumina no líquido uterino (WIDDERS et al., 1984).

As transferrinas (TF) são as principais proteínas reguladoras de ferro nos vertebrados, embora sejam também encontradas em invertebrados e bactérias (AISEN, 1988). Embora haja contradições quanto a sua classificação (MURATA et al., 2004), esta é uma APP negativa, e suas funções principais são transportar e armazenar ferro (AISEN; LISTOWSKY, 1980; BRIGGS et al., 1999; FORESTA et al., 1986), além de possuir efeitos bactericida e bacteriostático (ARNOLD et al., 1980; DE JONG et al., 1990).

A α_1 -glicoproteína ácida (AGP) é produzida pelo fígado e classificada como APP positiva (SMITH, 2005). Esta possui atividades biológicas imunomoduladora e anti-inflamatória, e atua como proteína de transporte plasmático (CECILIANI et al., 2005; STAKAUSKAS et al., 2005).

A ceruloplasmina (Cp) é uma glicoproteína, cuja função é transportar o cobre utilizado na reparação tecidual e formação de colágeno, além de proteger as células e tecidos contra agentes oxidantes produzidos pelas células fagocitárias e eliminar debris celulares, caracterizando assim o seu papel na cicatrização (CERÓN et al., 2005).

A indução experimental de endometrite por inóculos de *E. coli* (Gram negativa) em éguas promoveu um aumento significativo nas proteínas de fase aguda (APPs) sistemicamente demonstrado pelo aumento nas concentrações da proteína amiloide sérica A (SAA) e fibrinogênio, leucopenia transitória e aumento da expressão de mRNA de citocinas e SAA no endométrio (METTE et al., 2010). Este desafio por *E. coli* também ocasionou mudanças clínicas, sendo similar aos sinais clínicos observados após a infusão intravenosa de lipopolissacarídeo (LPS) purificado (CLARK; MOORE, 1989; KIKU et al., 2003).

Em ovelhas (REGASSA; NOAKES, 1999) e vacas (SHELDON et al., 2001), têm-se sugerido que as APPs são produzidas sistemicamente em animais com endometrite clínica (WOLF, 2011). A concentração de Hp aumentou em ovelhas com endometrite, já em vacas com a mesma afecção,

houve aumento nas concentrações de Hp, AGP e Cp na presença de *Escherichia coli* e *Arcanobacterium pyogenes* (WOLF, 2011).

Estudo recente realizado após inseminação artificial com sêmen congelado em éguas mostrou não haver aumento na concentração periférica de APPs (NASH et al., 2010; WOLF, 2011). Foram relatados aumentos nas concentrações do endométrio (128 vezes) e sistêmicas (590 vezes) de SAA, após 24 horas de infecção bacteriana por *E. coli* (KOLM et al., 2006 e METTE et al., 2010 citados por WOLF, 2011), sendo o mesmo observado com o fibrinogênio plasmático, o qual aumentou 1,5 vezes em 24 horas. Em lavados uterinos de éguas ao estro, observou-se maior quantidade de α 1-antitripsina (AAT) em relação ao diestro (SCUDAMORE et al., 1994; WOLF, 2011), entretanto, não foi observada diferença na concentração destas proteínas, antes e depois da indução de endometrite com *Streptococcus zooepidemicus* por estes mesmos autores. Atualmente, existem poucos relatos na literatura sobre as APPs envolvendo endometrite (WOLF, 2011).

O exame citológico do endométrio é o método auxiliar mais importante no controle da saúde genital da égua devido ao seu baixo custo, fácil emprego e a possibilidade de rápido diagnóstico de processos inflamatórios (MATTOS et al., 1984) mesmo em quadros subclínicos. O exame do esfregaço corado a partir do swab introduzido na cavidade uterina permite a identificação de leucócitos polimorfonucleares (PMN), sempre que houver inflamação do endométrio (COUTO; HUGHES, 1984). Trata-se de uma técnica de exame rápido que permite o diagnóstico objetivo da endometrite, a avaliação terapêutica, e consequentemente a decisão sobre cobertura ou não de uma determinada égua durante o cio. Rotineiramente a técnica do swab é mais utilizada, porém, há outras técnicas de citologia endometrial, tal como a substituição do swab por uma escova ginecológica (ALVARENGA; PASTORELLO, 1994).

Existem vários modos de interpretação das amostras citológicas coletadas do útero e métodos para sua coleta. O primeiro a descrever a técnica para o exame de citologia endometrial foi Knudsen (1964). A presença de

neutrófilos no lúmen uterino, detectada pela citologia, é um indicador absoluto de inflamação (ASBURY et al., 1984; CAUSEY et al., 2006), porém não determina a etiologia do processo (NIELSEN, 2005). Se somente poucos neutrófilos são encontrados, vários autores têm aplicado o critério semi-quantitativo para distinguir se a égua apresenta ou não endometrite. Esses métodos incluem a contagem de neutrófilos por campo, neutrófilos por lâmina, número de neutrófilos em relação às células epiteliais, ou da porcentagem de neutrófilos: > 1 neutrófilo por campo em 240x; > 5 neutrófilos por 10 campos em 400x; proporção de neutrófilos: células epiteliais: > 1%; > 2%; > 10% (AGUILAR, et al., 2006).

Alguns autores usam o sistema positivo-negativo, enquanto outros quantificam o grau de inflamação (CARD, 2005). Outros graduaram a severidade da endometrite levando em consideração o percentual de neutrófilos em relação às células epiteliais, onde 0 a 3% de leucócitos não são considerados inflamação, 4 a 15% de leucócitos indica inflamação leve, 16 a 50% inflamação moderada e, > 50% inflamação severa (CRICKMAN; PUGH, 1986). Na rotina, esta última metodologia é citada como uma das mais utilizadas (CARD, 2005).

A biópsia endometrial associada ao exame histopatológico posteriormente, proporciona informações importantes sobre as condições do endométrio, permitindo uma correlação entre os achados histopatológicos e a futura perspectiva da performance reprodutiva das fêmeas (QUEIROZ, 1991). A investigação histopatológica do endométrio tem demonstrado importância diagnóstica e prognóstica, tornando a biópsia o método mais preciso para a avaliação da situação morfofuncional do endométrio (DOIG et al., 1981). A biópsia endometrial oferece como vantagens ser uma técnica relativamente fácil, segura (DOIG et al., 1981; KENNEY; DOIG, 1986; RICKETTS, 1975; VAN CAMP, 1988), a qual pode ser realizada com um mínimo de instrumental e não estando associada com dor ou desconforto do animal (RICKETTS, 1975).

Foi observado no exame ultrassonográfico que éguas susceptíveis acumulam praticamente o dobro da quantidade de líquido no interior do útero quando comparadas às éguas resistentes pós-inseminação artificial, diferentemente daquelas que passaram por um desafio bacteriano as quais apresentaram acúmulo de líquido no útero 6 vezes maior do que as éguas resistentes (TROEDSSON; LIU, 1992), talvez porque esse tipo de desafio seja capaz de provocar uma exsudação mais intensa do que aquela vista em resposta a presença do sêmen (FIORATTI, 2010).

A quantidade e a ecogenicidade do líquido uterino observadas e consideradas significantes não estão bem estabelecidas. Pode ser que a quantidade seja mais importante que a natureza ecogênica. Isso é particularmente verdadeiro no líquido presente durante o estro. Em geral, se notado ao exame ultrassonográfico uma coluna com altura maior que 1 cm de líquido dentro do lúmen uterino no estro, deve-se tentar removê-lo antes da cobertura (por exemplo, ministrando ocitocina). Se o volume for > 2cm, deverá ser coletada uma amostra para avaliar a presença de células inflamatórias e bactérias. A égua poderá, então, necessitar de tratamento com lavagens uterinas (LEY, 2006).

Atualmente, admite-se que nenhum modelo exista para atuar como padrão ou controle no estudo da endometrite (LIU; TROEDSSON, 2008). Além disso, diferentes parâmetros têm sido utilizados como marcadores da inflamação em estudos realizados *in vivo* (FUMUSO et al., 2007; KOTILAINEN et al., 1994) e *in vitro* (WATSON et al., 1987; WATSON, 1989).

Os objetivos do presente estudo foram verificar a concordância entre os achados de exames ultrassonográficos e hematológicos com culturas microbiológicas e citologia endometrial de éguas que apresentam endometrite clínica ou histórico reprodutivo insatisfatório, avaliar a influência das lavagens no ambiente uterino e determinar qual(is) proteína(s) de fase aguda poderia(m) ser utilizada(s) como marcador da resposta inflamatória sistêmica.

II. MATERIAL E MÉTODO

2.1 Caracterização dos animais

Foram utilizadas 12 éguas da raça Quarto de Milha em programa de transferência de embriões por no mínimo 2 estações de monta consecutivas, com idade variando entre 10 e 25 anos ($15,9 \pm 4,4$ anos), divididas em dois grupos com seis animais cada. Os animais foram escolhidos aleatoriamente de acordo com a casuística do haras e divididos em dois grupos.

O Grupo Controle (GC) foi composto por seis animais ($14,3 \pm 3,6$ anos) considerados reprodutivamente normais (C1 a C6), sem histórico de endometrite, apresentando taxas de recuperação embrionária superior a 70% por no mínimo duas estações de monta anteriores, com resultados de exames ginecológicos, citológicos, e hematológicos normais antes de serem incluídos previamente ao estudo.

O Grupo Experimental (GE) foi composto por seis animais ($15,5 \pm 5,4$ anos) com histórico reprodutivo insatisfatório (E1 a E6), apresentando taxas de recuperação embrionária inferior a 50%, achados ultrassonográficos compatíveis de endometrite e com acúmulo de líquido intrauterino ao estro, ou histórico de endometrites bacterianas confirmadas anteriormente por citologia associado à cultura e antibiograma, ou ainda animais com histórico de exames histológicos sem a presença de isolamento bacteriano.

As amostras foram colhidas em uma central de transferência de embriões na cidade de Araçatuba. Todas as éguas receberam alimentação à base de ração comercial¹, aproximadamente 1% do peso vivo e pastagem de Tifton de boa qualidade, além de água e sal mineral² *ad libitum*. Todos os animais foram vermifugados³ a cada sessenta dias.

¹Fertilié, Socil®, Descalvado, SP.

²Mineral ADE, Socil®, Descalvado, SP.

³Ivermectina Gel Composto, Ourofino Saúde Animal®, Cravinhos, SP.

As éguas foram avaliadas diariamente por exame ultrassonográfico utilizando-se probe linear retal de 5,0 MHz⁴ e palpação transretal para detecção do estro e mensuração dos folículos dominantes (> 28mm e < 33 mm de diâmetro). Para o Grupo Experimental, ao se detectar volume > 2cm (altura da coluna de fluido) no útero ao exame ultrassonográfico, realizou-se a colheita de material para citologia e cultura microbiológica do líquido uterino (LEY, 2006) e biópsia endometrial para avaliação histopatológica.

Enrofloxacina⁵ (5 mg/kg, IM, SID) foi administrada a todos os animais do 1º até o 7º dia após o início da colheita das amostras.

2.2 Hemograma completo

Sangue venoso jugular (5 mL) foi colhido das éguas, utilizando-se tubos à vácuo⁶ com anticoagulante (K3EDTA) para realização de hemograma completo no início do cio (dia 0) e nos dias 2, 4 e 6 após o início do cio.

2.3 Cultivo e isolamento bacteriano

Após a higienização da região perineal, procedeu-se com a colheita de material biológico utilizando-se um *swab* uterino para o cultivo microbiológico, imediatamente anterior à citologia uterina. A técnica de colheita de material ocorreu conforme descrito por Alvarenga e Iwana de Matos (1990). Os *swabs* foram acondicionados em meio de transporte de Stuart e encaminhados ao laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária Júlio de Mesquita Filho – UNESP, campus de Araçatuba para realização do cultivo e isolamento microbiológico. As colheitas ocorreram no início do cio (dia 0), e no 4º dia após o início do cio. O material foi semeado em meio de ágar sangue e

⁴ Ultrassom Mindray® DP 3300 VET, Shenzhen, China.

⁵ Zelotril 10%, Agener União Saúde Animal, Pouso Alegre, MG, Brasil

⁶ Vacutainer, Becton-Dickinson, Plymouth, UK.

MacConkey, por um período de 24, 48 e 72 horas em atmosfera de aerobiose e em estufa bacteriológica a temperatura de 37°C. Para isolamento e identificação dos micro-organismos após o período de incubação, as amostras foram coradas ao Gram e submetidas à bateria de provas bioquímicas (QUINN, 1994) para identificação de gênero e quando possível espécie. Para membros da família *Enterobacteriaceae* utilizou-se Kit para Enterobactérias⁷, e para cocos Gram positivos utilizou-se a técnica descrita por Quinn (1994).

2.4 Citologia endometrial

Após a higienização da região perineal, procedeu-se com a colheita de material para a realização da citologia uterina exfoliativa. As colheitas ocorreram no início do cio (dia 0), e no 4º dia após o início do cio, logo após a colheita de material para cultivo microbiológico, conforme técnica descrita por Alvarenga e Iwana de Matos (1990). Após a introdução da ponta do instrumento de citologia dentro do lúmen uterino, através da passagem pela cérvix, a haste de metal era posicionada no corpo do útero e uma vez em contato com a superfície uterina, a escova exposta e girada consecutivamente 5 vezes para a obtenção do material. As lâminas confeccionadas a partir da colheita foram secas à temperatura ambiente e coradas pelo método Panótico rápido⁸. A leitura das amostras foi feita realizada em microscopia óptica em aumento de 1000x de forma aleatória, e classificou-se o processo inflamatório considerando a porcentagem de células inflamatórias/200 células (Tabela 1).

Realizou-se também a contagem relativa de neutrófilos em 200 células contadas, considerando-se, no mínimo, a presença de 10 células por campo e a classificação do processo inflamatório foi obtida pela relação entre o número de células endometriais e neutrófilos, conforme relatado por Alvarenga e Iwana de Matos (1990). A porcentagem de neutrófilos presentes em uma amostra de

⁷ Newprov, Pinhais, Paraná, Brasil.

⁸ Laborclin, Paraná, Brasil.

citologia endometrial é usada para determinar o grau da inflamação presente no útero, conforme descrito por Brook (1993).

Tabela 1 – Determinação do grau de inflamação uterino em éguas da raça Quarto de Milha

Porcentagem de células inflamatórias	Classificação
0 – 3%	Normal ao estro
3 – 10%	Endometrite leve (+)
10 – 30%	Endometrite moderada (++)
30 – 50%	Endometrite moderada à severa (+++)
50 – 70%	Endometrite severa (++++)
>70%	Endometrite muito severa (+++++)

2.5 Biópsia uterina e exame histopatológico

As biópsias uterinas foram obtidas de todos os animais nos dias 0 (início do cio) e 4º dia após o cio com o auxílio de uma pinça de biópsia equina. A pinça foi posicionada na base de um dos cornos uterinos, local clinicamente chamado de região de implantação do embrião (CARVALHO, 2008), e a amostra foi retirada cuidadosamente do instrumento com uma agulha para evitar danos como artefato de técnica na lâmina (SAMPER et al., 2007). Todas as amostras foram fixadas em formalina a 10% (McKINNON, 2010), sendo posteriormente transferidas para álcool 70% após 24 horas, para posterior inclusão em parafina. Cortes com três micrômetros de espessura foram obtidos e corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE) (PORTO et al., 2011). As amostras foram identificadas por números, não sendo conhecidos o nome da égua e o grupo a que pertenciam no momento da avaliação pelo patologista. Foram avaliados o epitélio luminal quanto ao número de camadas, morfologia celular e presença de células inflamatórias; os estratos compacto e esponjoso quanto à presença de células inflamatórias; e os vasos quanto à

presença de perivasculite (KELLER, 2004). A classificação do grau de endometrite foi feita segundo Kenney e Doig (1986).

2.6 Lavagens uterinas

Após a higienização da região perineal, foram realizadas lavagens uterinas durante cinco dias consecutivos; dia 0 ao 4º dia após o início do cio (logo após colheita de material microbiológico, citologia endometrial e histopatológico). A lavagem uterina foi realizada após a transposição da cérvix com o dedo indicador e o posicionamento da sonda uterina modelo bivona⁹ estéril, cujo balonete foi inflado com 50 mL de ar e tracionado caudalmente até obstruir o óstio cervical interno. Foram infundidos primeiramente 120 mL de solução aquecida a 38°C de Ringer com Lactato¹⁰ no lúmen uterino, seguido de sifonagem do líquido em copo coletor estéril, e posteriormente 1 litro de solução isotônica Ringer com Lactato⁹ aquecida a 38°C, para a lavagem uterina e a remoção do material acumulado. O procedimento foi repetido três vezes.

2.7 Eletroforese

Para a confecção dos diferentes géis, foram utilizados produtos Sigma.

2.7.1 Gel de separação

A preparação do gel de separação a 10% consistiu de 14,28 mL de água deionizada, de 7,08 mL de solução Tris-HCL 2 M (pH 8,8), 12,6 mL de Acrilamida/Bis (30%T/1,866%C), 2,04 mL de Glicerol (PM 92,09), 760 uL de

⁹ Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario, Canada.

¹⁰ JP Indústria Farmacêutica, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

solução de EDTA 0,5 M (pH 8,3), 760 uL de solução de SDS 10% (Lauril Sulfato de Sódio), 290,4 uL de Persulfato de Amônia a 10% e 32,4 uL de Tetrametil-etilenodiamina (TEMED).

2.7.2 Gel de empilhamento

Para a preparação do gel de empilhamento a 4% foi utilizado 4,74 mL de água deionizada, 720 uL de solução Tris-HCL 0,617M (pH 6,8), 1,2 mL de Acrilamida/Bis (30%T/1,866%C), 360 uL de Glicerol (PM 92,09), 147,6 uL de solução de EDTA 0,5 M (pH 8,3), 147,6 uL de solução de SDS 10% (Lauril Sulfato de Sódio), 72 uL de Persulfato de Amônia a 10% e 15,6 uL de Tetrametil-etilenodiamina (TEMED).

2.7.3 Solução tampão de corrida

A solução de tampão concentrada 10 vezes consistiu de 63,2 g de trizma-base, 39,9 g de glicina, e 10 g de SDS e completado o volume com 1000 mL de água destilada. Para cada corrida a solução foi diluída formando uma concentração de 1%, ou seja, 90 mL de água deionizada com 10 mL de solução concentrada 10%.

2.7.4 Amostras

2.7.4.1 Soro

Em um tubo de polipropileno¹¹ de 1,5 mL foram colocados 10 uL de amostra pura de soro sanguíneo, acrescidos de 20 uL de tampão de amostra para proteínas desnaturadas (consiste em 10 mL de lauril sulfato de sódio a 10%, 4 mL de EDTA 0,5 M , 5 mL de triz-fosfato 0,617 M (pH 6,8), 3 mL de 2-mercaptoetanol, 10 mL de glicerol, 18 mL de água deionizada e 5 mg de azul de bromofenol) e 30 uL de solução tampão de fosfato salina livre de cálcio (PBS, pH 7,2). A solução foi homogeneizada varias vezes para uma mistura adequada e posteriormente aquecida durante 10 minutos a 100°C utilizando banho seco para desnaturação das proteínas. Por fim, as amostras foram homogeneizadas novamente e colocadas cada uma em um poço diferente do gel de eletroforese, sendo realizada a confecção de um mapa de cada gel para identificação das amostras.

2.7.5 Corrida eletroforética

Após a colocação das placas de gel, solução tampão de corrida e as amostras, a cuba¹² foi conectada à fonte de energia regulando para 20 miliamperes por gel mantido até que todas as amostras ultrapassassem o gel de empilhamento, alterando para 24 miliamperes por gel até o final da corrida. Durante a corrida foi observado para que a voltagem não ultrapassasse 220V.

2.7.6 Coloração dos géis

Após o término da corrida, os géis foram retirados da cuba¹² e colocados cada um em uma vasilha de vidro acrescido de corante Coomassie Blue 0,2% (Brilliant Blue R-250) à base de metanol (50%), ácido acético glacial (10%),

¹¹ Microtubo de centrifugação, Axygen Brasil Brasil.

¹² Cuba SE 600 Ruby®, Amersham Biosciences-GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, SP.

água (40%) e coomassie blue (0,2%), durante 2 horas, mantidos em um agitador horizontal¹³.

2.7.7 Descoloração dos géis

O corante foi retirado e acrescentado uma solução descorante (usada uma vez) *overnight* (25% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 65% de água destilada). No dia seguinte, a solução de descorante foi retirada e colocada uma solução de descorante nova mantida até que o gel estivesse descorado o suficiente para realização da leitura.

2.7.8 Leitura dos géis

As concentrações das frações protéicas foram determinadas por um fotodocumentador computadorizado¹⁴. As frações de proteínas de fase aguda foram identificadas utilizando-se como referência um marcador de peso molecular de 6.500 a 200.000 dáltons e pela comparação com a mobilidade eletroforética da ceruloplasmina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida purificadas. Os valores das concentrações das proteínas constituintes de cada fração foram determinados pela proporção destas em relação aos valores da proteína total de cada momento (FAGLIARI et al., 1998; SAQUETTI et al., 2008).

2.7.9 Análise estatística - Eletroforese

¹³ Agitador horizontal EL 445, Grupo Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP.

¹⁴ LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, SP.

Os dados obtidos para cada parâmetro estudado, nos diferentes grupos experimentais, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com parcelas subdivididas, seguida da comparação entre as médias pelo teste de Tukey. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram considerados significativos com valor de $P \leq 0,05$ para os diferentes tempos.

III. RESULTADO E DISCUSSÃO

Não foram observadas diferenças significativas em relação aos parâmetros dos hemogramas ao longo do tempo ou entre os grupos.

Nos dias 0, 2 e 4 após o início do cio, a égua C3 do grupo controle apresentou leve leucocitose ($14,6 \times 10^9/L$, $14,8 \times 10^9/L$ e $14,3 \times 10^9/L$, respectivamente) por neutrofilia ($11,4 \times 10^9/L$, $11,6 \times 10^9/L$ e $11,1 \times 10^9/L$, respectivamente) (RADOSTITS et al., 2002). Entretanto, esta égua não apresentava sintomatologia clínica de qualquer enfermidade infecciosa, apresentando citologia endometrial normal e a cultura microbiológica negativa. Durante o período de realização das colheitas de material, houve em determinada época do ano um surto de influenza equina no haras, sendo que nenhum dos animais do estudo apresentou sintomatologia clínica. Entretanto, acredita-se pelo resultado dos hemogramas, que este referido animal podia estar se recuperando de uma infecção subclínica devido a um possível contato com o vírus.

Os resultados das culturas microbiológicas uterinas estão apresentados na Tabela 2. Quatro animais (4/6) do Grupo Controle (C1, C2, C3 e C6) apresentaram resultado negativo nos dias 0 e 4. O crescimento bacteriano em um ou ambos os momentos estudados em outros 2 animais do grupo controle sem a presença de PMNs na citologia uterina é indicativo de uma contaminação durante a coleta (LANGONI et al., 1999). Foi observado o isolamento de *Streptococcus spp.* em 50% dos animais do grupo experimental

(3/6), semelhantemente aos dados descritos por Langoni et al. (1994), sendo o *Streptococcus* β -hemolítico considerado o principal agente envolvido na casuística de infecções do trato genital de éguas (CARVALHO, 2008).

Tabela 2 - Cultura Microbiana com swab intrauterino em Éguas da raça Quarto de Milha

Grupo Experimental			Grupo Controle		
Animal	Dia 0	Dia 4	Animal	Dia 0	Dia 4
E1	<i>Candida albicans</i>	Negativo	C1	Negativo	Negativo
E2	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Streptococcus spp</i>	C2	Negativo	Negativo
E3	<i>Streptococcus spp</i>	<i>Streptococcus spp</i>	C3	Negativo	Negativo
E4	<i>Providencia rettigeri</i>	<i>Pseudomonas spp</i>	C4	<i>Pseudomonas spp</i>	<i>Pseudomonas spp</i>
E5	<i>Streptococcus spp</i>	Negativo	C5	<i>Pseudomonas spp</i>	Negativo
E6	<i>Candida albicans</i>	Negativo	C6	Negativo	Negativo

O animal E2 no dia 0, apresentou na cultura microbiológica *Pasteurella multocida*, sendo isolado apenas *Streptococcus sp.* no dia 4. Devido ao fato de ter sido realizado antibioticoterapia em todos os animais, o medicamento utilizado pode ter inibido o crescimento da *Pasteurella multocida* no dia 4, e o *Streptococcus spp.*, que provavelmente já estava presente na amostra do dia 0 e não havia sido isolado, apresentou crescimento positivo, indicando a ineficácia da enrofloxacina para esta bactéria.

O lavado uterino com baixo volume tem sido proposto como alternativa para análises microbiológica e citológica no diagnóstico de endometrite para éguas inférteis ou subférteis (LEBLANC et al., 2007; LIU; TROEDSSON, 2008). O primeiro relato do uso de lavado uterino com baixo volume foi realizado por Ball et al. (1988), onde demonstraram ser uma técnica em inclusão potencial, como um método mais efetivo para identificação de patógenos bacterianos e resposta inflamatória, com ênfase em éguas inférteis e subférteis, entretanto optamos pela técnica convencional de citologia exfoliativa por ser uma técnica mais simples, com mais citações na literatura e muito mais empregada a campo.

No presente estudo, foi realizada a citologia exfoliativa com utilização de escova ginecológica e a classificação do processo inflamatório foi obtida pela relação entre o número de células endometriais e neutrófilos, conforme descrito na literatura (ALVARENGA; IWANA DE MATOS, 1990; BROOK, 1993; CRICKMAN; PUGH, 1986). Segundo estes autores, a porcentagem de neutrófilos presentes em uma amostra de citologia endometrial pode ser usada para determinar o grau da inflamação presente no útero (ALVARENGA; IWANA DE MATOS, 1990; CRICKMAN; PUGH, 1986).

As Tabelas 3 e 4 demonstram, respectivamente, a quantidade de células inflamatórias no citológico dos grupos controle e experimental, e as Figuras 1 e 2 demonstram, respectivamente, a quantidade de células inflamatórias e PMNs no citológico dos grupos controle e experimental. Como esperado, as éguas do grupo controle apresentaram valores de células inflamatórias PMNs menores que 3% no dia 0 (Figura 1), o que as caracteriza como fisiologicamente normais, ou seja, sem endometrite. Embora tenham apresentado um aumento na porcentagem de células inflamatórias na análise citológica realizada no dia 4, isso provavelmente ocorreu devido à maior manipulação do ambiente uterino e às lavagens uterinas nos dias subsequentes ao dia 0.

Tabela 3 - Citologia endometrial do Grupo Controle

Grupo Controle				
Animal	Dia 0		Dia 4	
	% células inflamatórias	Classificação da endometrite	% células inflamatórias	Classificação da endometrite
C1	4	endometrite leve (+)	21,5	endometrite moderada (++)
C2	1,5	normal	4,5	endometrite leve (+)
C3	2	normal	5	endometrite leve (+)
C4	3,5	endometrite leve (+)	9,5	endometrite leve (+)
C5	2	normal	21,5	endometrite moderada (++)
C6	0,5	normal	22	endometrite moderada (++)

Em relação aos exames citológicos referentes ao grupo experimental, os resultados apresentados para o dia 0 foram semelhantes aos obtidos por Fioratti (2010), nos quais as éguas susceptíveis à endometrite apresentavam celularidade inflamatória superior a 3%, caracterizando um quadro de endometrite leve (ALVARENGA; PASTORELLO, 1994).

No presente estudo, após análise da citologia endometrial exfoliativa, constatou-se a presença de neutrófilos anteriormente à lavagem uterina nas éguas do grupo experimental, consideradas susceptíveis à endometrite, diferindo do grupo controle que apresentava quantidade de neutrófilos dentro dos valores considerados normais. Todas as éguas controle apresentaram citologia compatível com o aceitável para o estro, enquanto as éguas susceptíveis apresentavam, nesse mesmo período, mais do que 5% de neutrófilos, indicando inflamação ativa (CARD, 2005). Observou-se também que apenas três éguas susceptíveis (experimentais) apresentaram inflamação (< 15% de PMNs) anteriormente à lavagem uterina, mas com acúmulo de líquido no lúmen uterino.

Tabela 4 - Citologia endometrial do Grupo Experimental

Grupo Experimental				
Animal	Dia 0		Dia 4	
	% células inflamatórias	Classificação da endometrite	% células inflamatórias	Classificação da endometrite
E1	4	endometrite leve (+)	10	endometrite leve (+)
E2	10	endometrite leve (+)	12	endometrite moderada (++)
E3	56	endometrite severa (++++)	26,5	endometrite moderada (++)
E4	6	endometrite leve (+)	16	endometrite moderada (++)
E5	17,5	endometrite moderada (++)	36,5	endometrite moderada à severa (+++)
E6	16	endometrite moderada (++)	18,5	endometrite moderada (++)

Observa-se a influência das lavagens uterinas no resultado da citologia endometrial, quando comparados os dias 0 e 4, onde houve aumento significativo na porcentagem de células inflamatórias no dia 4 de todas as

éguas (Figura 1), e de ambos os grupos, exceto para a égua E3 do grupo experimental (Figura 2), que apresentou 56% de células inflamatórias no dia 0 e 26,5% no dia 4. Todos os animais de ambos os grupos, com exceção da égua E3 do grupo experimental, apresentaram aumento da celularidade inflamatória no dia 4 em relação ao momento inicial, comprovando que a manipulação e a lavagem do útero contribuíram para aumentar a inflamação intrauterina (Figuras 1 e 2). O fato do número de células inflamatórias ter diminuído no dia 4 na égua E3 em relação ao dia 0 poderia ser explicado pela lavagem uterina ter removido algumas células, principalmente polimorfonucleares, aderidas superficialmente ao endométrio.

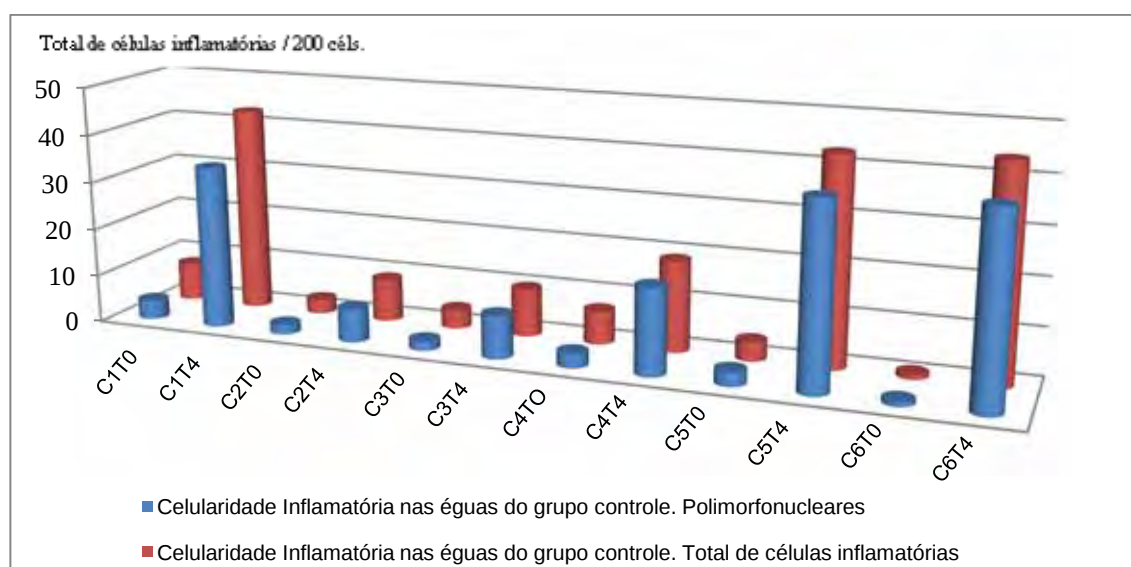


FIGURA 1 - Quantidade de PMNs na citologia endometrial em relação à quantidade de células inflamatórias totais no grupo controle nos dias 0 e 4 após o início do cio.

A endometrite também pode ser classificada de acordo com a porcentagem de células inflamatórias totais presentes no exame citológico (ALVARENGA; IWANA DE MATOS, 1990; CARD, 2005; CRICKMAN; PUGH, 1986). Neste estudo, observou-se que todas as éguas do grupo experimental apresentavam celularidade inflamatória acima de 3% no dia 0, o que as classifica com o quadro de endometrite leve. Já no grupo de éguas

controle, apenas as éguas C1 e C4 apresentaram porcentagem de células inflamatórias no dia 0 superior a 3% (4 e 3,5%, respectivamente), enquanto o restante dos animais apresentou quantidades inferiores a 3%, sendo consideradas como éguas normais ao estro. Ainda, ambos os animais (C1 e C4) apresentaram valores de PMNs $\leq 3\%$, analisando a relação PMNs / células inflamatórias totais, como apresentado na Figura 3. Comparando-se estes resultados com a classificação apresentada por Brook (1993), onde a presença de valores $< 5\%$ de PMNs indica um endométrio não inflamado, de 5 a 15% uma inflamação média, de 15 a 30% uma inflamação moderada e acima de 30% uma inflamação severa, é possível classificar estes dois animais como normais para a fase de estro do ciclo estral em que se encontram.

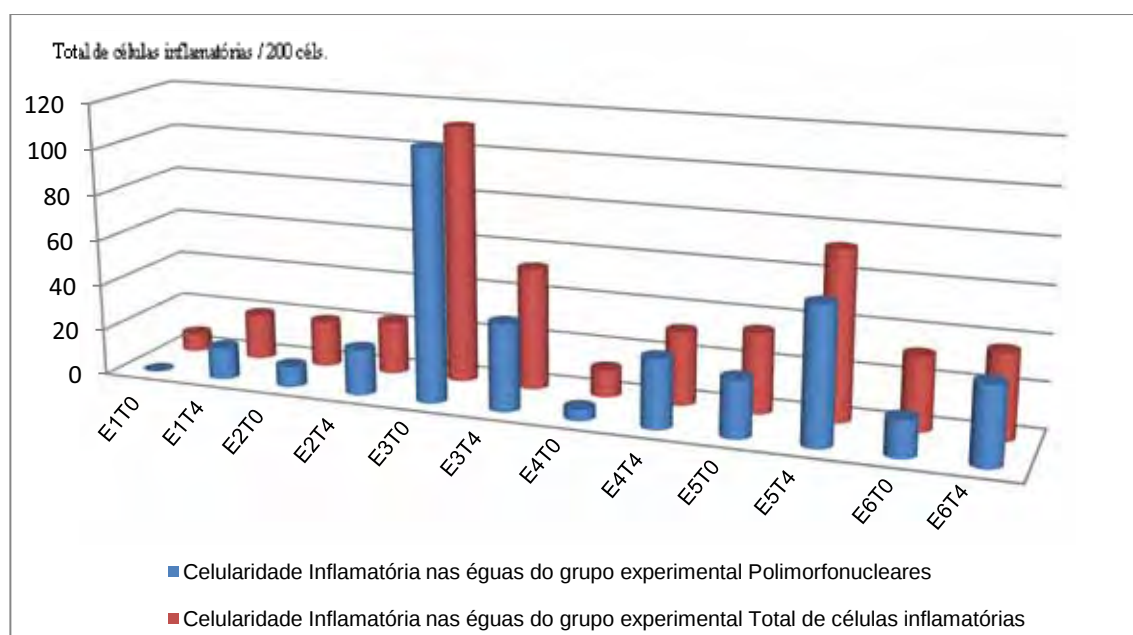


FIGURA 2 - Quantidade de PMNs na citologia endometrial em relação à quantidade de células inflamatórias totais no grupo experimental nos dias 0 e 4 após o início do cio.

A análise citológica uterina em todos os animais nos dias 0 e 4 (contagem de células PMNs e mononucleares) mostrou uma prevalência de células polimorfonucleares, com exceção ao dia 0 da égua E1 que apresentou 100% de células inflamatórias mononucleares (8 células mononucleares),

caracterizando um processo inflamatório crônico, classificado como endometrite leve (Figura 3).

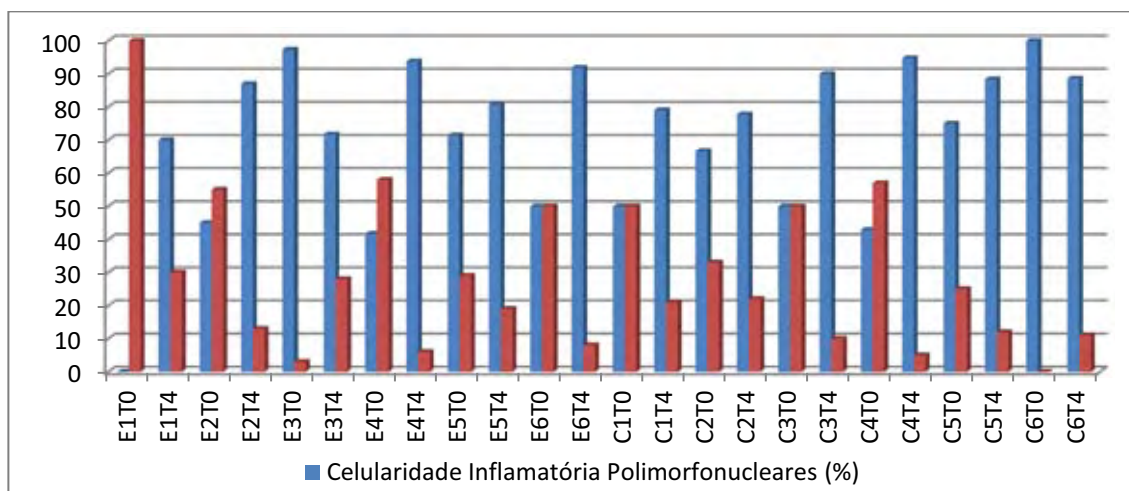


FIGURA 3 - Relação (%) de PMNs e células inflamatórias totais na citologia endometrial de cada indivíduo.

Éguas com evidência de inflamação na avaliação citológica e contaminação bacteriana apresentam menores taxas de prenhez, apesar da pequena correlação entre esses testes (FIORATTI, 2010). Tanto a citologia endometrial quanto a cultura bacteriana são métodos diagnósticos utilizados para identificar as éguas com endometrite, pois as taxas de prenhez diminuem quanto maior a inflamação e a infecção (RIDDLE et al., 2007). Entretanto, neste estudo, a cultura microbiológica identificou em 33,3% das éguas do Grupo Controle (2/6) a presença de bactérias em pelo menos um dos momentos analisados, o que sugere possivelmente contaminação das amostras do swab em meio Stuart, pois não houve correlação com os achados hematológicos, não houve presença de fluido uterino na ultrassonografia diária e a citologia endometrial não apresentou celularidade compatível com endometrite, diferindo dos achados de Digby e Ricketts (1982) que relataram que 91% das éguas com evidência clínica de endometrite persistente apresentaram citologia compatível, mas somente 45% das amostras foram

positivas na cultura. Ainda, foi possível identificar a presença de pseudohifas de *Candida albicans* (Figura 4) na citologia no momento inicial de avaliação de um dos animais do grupo experimental (E6), porém, 4 dias após o início do cio, tanto a citologia como a cultura microbiológica foram negativas. Atribui-se esse resultado à realização de lavagens uterinas consecutivas, que promovem a limpeza física do útero e diminuem a carga microbiológica (McKINNON, 2010). A lavagem uterina também promove uma leve reação inflamatória que auxilia na limpeza do útero (McKINNON, 2010), possivelmente pelo aumento da fagocitose de PMNs.

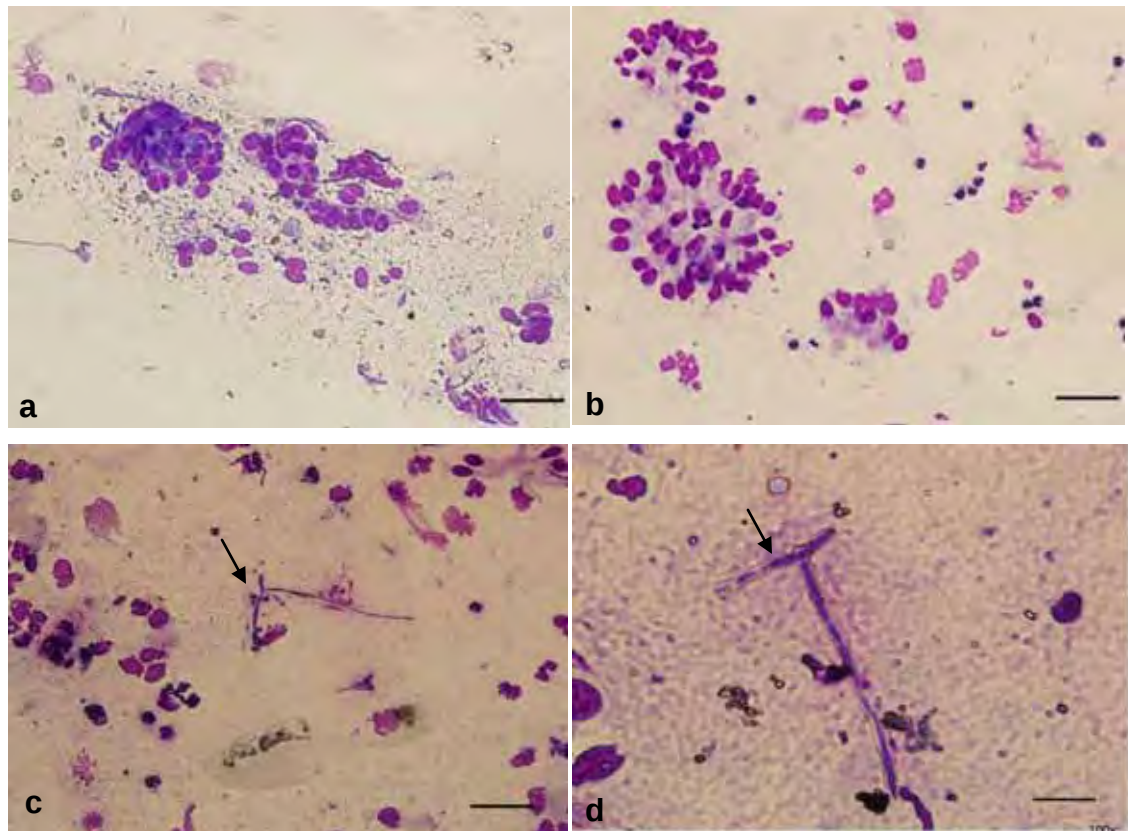


FIGURA 4 - Aspectos citológicos do endométrio de éguas com características de inflamação, obtidos de animais dos Grupos Controle (a, b) e Experimental (c, d). Coloração H.E. Araçatuba, 2012.
a) C5T0 – Citologia endometrial normal ao estro do animal Grupo Controle no dia 0 (40x).
b) C5T4 – Citologia endometrial do animal Grupo Controle no 4º dia após início do estro – endometrite moderada com presença de PMNs (40x).
c) E6T0 – Citologia endometrial do animal Grupo Experimental no 4º dia após início do estro – endometrite moderada e presença de pseudohifas (seta) de *Candida albicans* (40x).
d) E6T0 – Citologia endometrial do animal Grupo Experimental no 4º dia após início do estro – endometrite moderada e presença de pseudohifas (seta) de *Candida albicans* (100x).

Dois animais (2/6) do grupo controle apresentaram cultura microbiológica positiva para *Pseudomonas sp.* Esses resultados associados à citologia endometrial indicam que o processo de colheita de material apresentou crescimento bacteriano devido à contaminação ambiental, sendo a *Pseudomonas sp.* uma bactéria ambiental.

Os resultados das avaliações das biópsias uterinas estão demonstrados na Tabela 5. Neste estudo, ao se comparar os achados histopatológicos nos grupos controle (C) e experimental (E), observou-se muita semelhança entre as biópsias realizadas nos dias 0 e 4 (Tabela 6). De acordo com o diagnóstico histopatológico, neste estudo houve presença acentuada de fibrose periglandular em praticamente todas as amostras (Figura 5), o que é justificado pela idade da maioria dos animais, considerados muito idosos e pelo fato de estarem sendo submetidos a programas de TE há muitos anos. Estes achados são semelhantes aos encontrados anteriormente (McKINNON et al., 2010), onde se relata que a idade das éguas e o número médio de anos vazia aumenta gradualmente de acordo com a severidade da fibrose endometrial. Estes mesmos autores realizaram 700 biópsias endometriais em éguas inférteis ou subférteis e observaram fibrose endometrial em 88% das amostras. Ainda, os resultados do presente estudo são semelhantes àqueles descritos por Ricketts e Alonso (1991), que associaram a fibrose degenerativa com a idade, verificando que éguas até 9 anos não devem apresentar sinais degenerativos, éguas até os 13 anos devem apresentar apenas sinais discretos, éguas até os 15 anos sinais moderados e éguas com mais de 17 anos podem apresentar sinais avançados de alterações degenerativas crônicas. A observação de fibrose difusa é normalmente indicativa de mau prognóstico, ou seja, a manutenção de gestações torna-se praticamente impossível (McCUE, 2008). Entretanto, a presença de fibrose difusa no endométrio não inviabiliza a utilização destes animais como doadoras de embrião.

Tabela 5 - Classificação das biópsias endometriais nos dias 0 e 4 após início do cio, segundo Kenney e Doig (1986)

Grupo Controle			Grupo Experimental		
Animal	Dia 0	Dia 4	Animal	Dia 0	Dia 4
C1	IIB	IIB	E1	IIB	IIB
C2	IIB	IIB	E2	IIA	IIA
C3	III	IIB	E3	III	III
C4	IIB	IIA	E4	III	III
C5	IIB	IIB	E5	IIB	IIB
C6	III	III	E6	IIB	IIB

I - Endométrio normal ou alterações inflamatórias insignificantes

IIA - Discreto Infiltrado inflamatório, fibrose envolvendo glândulas individuais

IIB - Moderado infiltrado inflamatório - fibrose glândulas endometriais no estrato esponjoso

III - Severo infiltrado inflamatório - severa fibrose periglandular, com as glândulas em formação de ninhos isolados por fibrose, com ou sem lacunas linfáticas

No presente estudo, 83,33% (5/6) das éguas do grupo experimental apresentaram infiltrado mononuclear difuso nos estratos esponjoso e/ou compacto (Figura 5), e apenas uma égua (16,66%) apresentou aumento de células mononucleares no dia 4 em relação ao dia zero. Ainda, 33,33% (2/6) das éguas do grupo experimental apresentaram metrite difusa crônica nos dias 0 e 4. Estes dados revelam que os animais do grupo experimental, com histórico de acúmulo de fluido uterino à ultrassonografia, resultado insatisfatório nos programas de TE, apresentaram resultado microbiológico positivo e diagnóstico de endometrite através do exame de citologia endometrial. Nos resultados da avaliação histopatológica observou-se também uma alta incidência de endometrite crônica, demonstrando assim a severidade e cronicidade do processo inflamatório. Estes achados evidenciaram que os animais do presente estudo apresentaram relativamente um número maior de éguas com endometrite crônica do que a literatura encontrada, diferentemente do citado por McKinnon et al. (2010). Estas variações podem ter ocorrido devido à diferença do número de animais utilizados nos experimentos, faixa

etária, e ainda, pelo fato das éguas estudadas serem utilizadas como doadoras de embrião há muito tempo, diferentemente daquelas do estudo citado anteriormente (McKINNON et al., 2010) que foram consideradas subférteis ou inférteis devido à redução significativa da porcentagem de parição anual, bem como a alta incidência de perda fetal (morte embrionária precoce ou aborto).

Tabela 6 – Resultado da classificação das biópsias endometriais nos dias 0 e 4, segundo Kenney e Doig (1986)

Classificação	CONTROLE		EXPERIMENTAL	
	Dia 0	Dia 4	Dia 0	Dia 4
I	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	0% (0/6)
IIA	0% (0/6)	16,66% (1/6)	16,66% (1/6)	16,66% (1/6)
IIB	66,66% (4/6)	66,66% (4/6)	50% (3/6)	50% (3/6)
III	33,33% (2/6)	16,66% (1/6)	33,33% (2/6)	33,33% (2/6)

As éguas do presente estudo são utilizadas exclusivamente como doadoras de embrião, portanto, não sendo avaliadas quanto às suas taxas de parição de potros viáveis anualmente. Semelhante aos resultados deste estudo, a presença de endometrite crônica foi mais frequentemente encontrada em éguas idosas (> 12 anos), multíparas, com má conformação perineal, ocorrendo também em éguas susceptíveis à endometrite induzida pela cobertura, em doadoras de embriões manipuladas frequentemente para colheita de embriões e em éguas com incompetência cervical (LEBLANC, 2008). Ao contrário da endometrite aguda, a endometrite crônica é caracterizada por uma afluência de linfócitos para áreas localizadas do estroma endometrial (VANDERWALL, 2008).

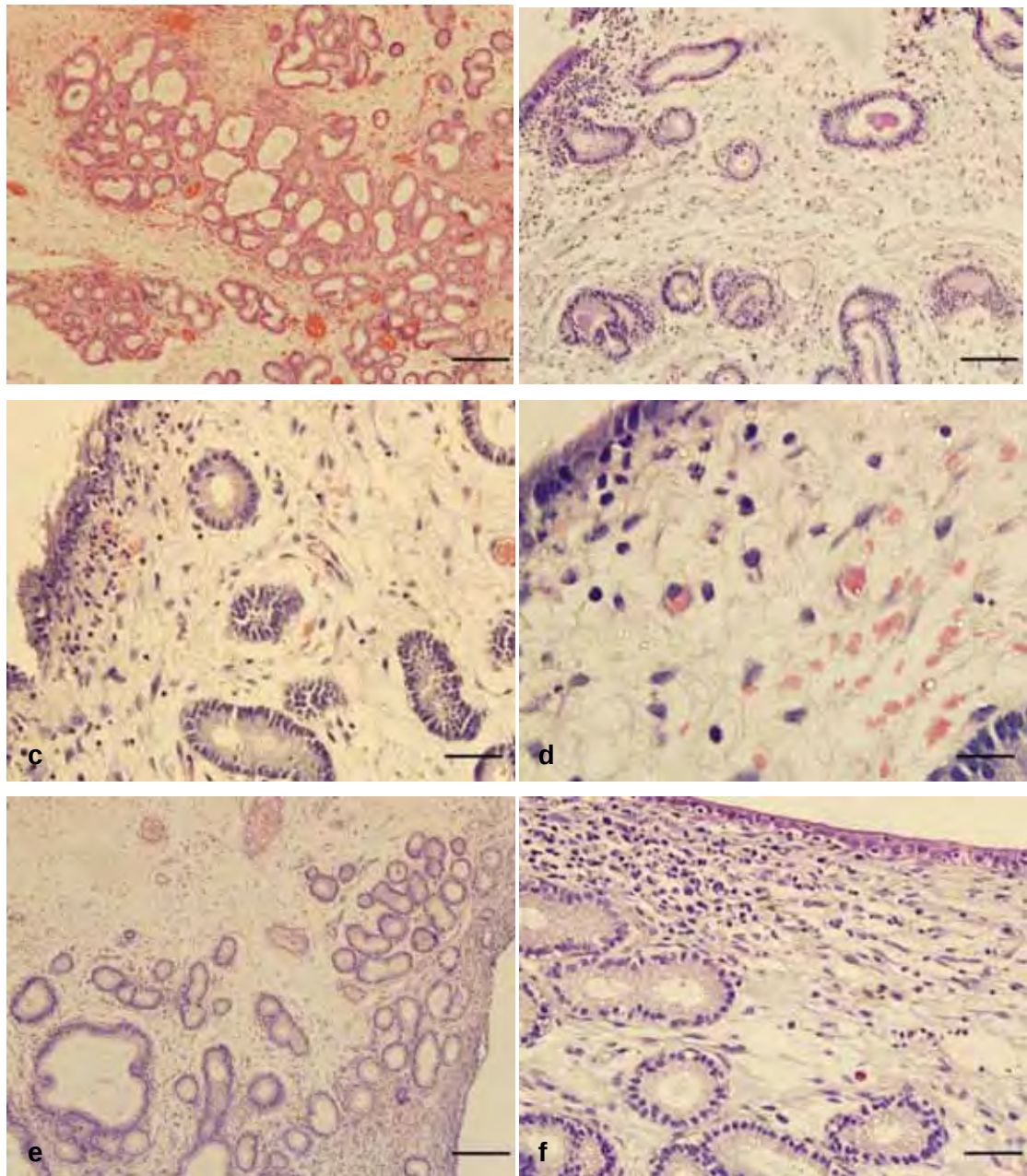


FIGURA 5– Aspectos histopatológicos do endométrio de éguas com características de inflamação, obtidos de animais dos Grupos Controle (c, d) e Experimental (a,b,e, f). Coloração H.E. Araçatuba, 2012

- a) E3T4 - Fibrose acentuada periglandular e dilatação de algumas glândulas isoladas (10x 200 μ m)
- b) E6T0 - Fibrose difusa periglandular e formação de ninhos focais, e infiltrado composto por mononucleares e neutrófilos (raros) em número moderado (metrite crônica) (20x 100 μ m)
- c) C1TA - Metrite difusa com neutrófilos entre as células epiteliais, e distribuição sub-epitelial de mononucleares e neutrófilos em número moderado. Fibrose difusa periglandular (40x 50 μ m)
- d) C1TA - Metrite difusa com neutrófilos entre as células epiteliais, e distribuição sub-epitelial de mononucleares e neutrófilos em número moderado. Fibrose difusa periglandular (100x 20 μ m)
- e) E5T4 - Metrite difusa crônica com severa fibrose difusa e periglandular e dilatação de algumas glândulas isoladas (10x 200 μ m)
- f) E5T4 - Metrite difusa crônica e eosinofilia (40x 50 μ m)

No Grupo Controle, 83,33% (5/6) das éguas apresentaram infiltrado mononuclear, sendo em 33,33% (2/6) dos animais identificado apenas um infiltrado mononuclear focal no dia 0. Houve aumento do infiltrado mononuclear que passou de focal para difuso ao dia 4 em apenas uma égua (16,66%). Em um animal, foi identificado infiltrado mononuclear periglandular no dia 0 e 4 (16,66%); metrite difusa crônica foi identificada em 33,33% (2/6) dos animais nos dias 0 e 4 (similar ao Grupo Experimental), com discreto infiltrado neutrofílico entre as células epiteliais de apenas um dos animais (16,66%).

Apenas uma égua (16,66%) não apresentou extenso infiltrado de células mononucleares ou neutrófilos. Diferentemente do encontrado na citologia exfoliativa do endométrio, que foi considerada normal ao estro em 66,66% das éguas do grupo controle no dia 0 (4/6 éguas apresentaram até 3% de células inflamatórias), e endometrite leve em 33,33% no dia 0 (2/6 éguas apresentaram 3,5% e 4%, respectivamente), os achados histopatológicos revelaram que 83,33% dos animais considerados controle para o experimento apresentaram endometrite crônica, sendo que em 33,33% destas éguas havia metrite. Isto pode ser atribuído ao local escolhido para a colheita das amostras para citologia. Na técnica da citologia exfoliativa, o material foi colhido do corpo uterino; enquanto que para a realização da biópsia para histopatologia, o material foi colhido dos cornos uterinos.

A partir dos achados microbiológicos, ultrassonográficos, citológicos e histopatológicos descritos para todas as éguas doadoras de embrião do grupo Experimental (Tabela 7) sugere-se que estas não são aptas a levarem uma gestação a termo, devido às alterações observadas nos respectivos endométrios. Entretanto, estes animais não foram avaliados quanto a esta possibilidade, pelo fato de serem animais utilizados restritamente em programas de TE.

Ainda, as éguas doadoras de embrião do grupo Controle apresentaram achados importantes e significativos quanto à capacidade de adaptação uterina e resposta aos desafios oferecidos nos programas de TE, onde os resultados microbiológicos, ultrassonográficos e citológicos obtidos (Tabela 8) foram

compatíveis com uma resposta satisfatória quanto à taxa de recuperação de embriões e seus respectivos históricos reprodutivos. Porém, a maioria destes animais não apresentou uma classificação de útero compatível a levar uma gestação a termo, concordando com os achados de Vanderwall (2000). Isto representa um problema importante, uma vez que a eficiência reprodutiva é mais baixa em éguas submetidas a programas de TE por longo tempo, pois o avanço da idade relaciona-se com menores taxas de gestação e aumento da taxa de mortalidade embrionária (McKINNON; SQUIRES, 2009).

Tabela 7 - Achados microbiológicos, citológicos, histopatológicos e dos lavados das éguas doadoras de embrião do grupo Experimental

GRUPO EXPERIMENTAL								
ANIMAL	CITOLOGIA		CULTURA		BIÓPSIAS		LAVADO	
	Dia 0	Dia 4	Dia 0	Dia 4	Dia 0	Dia 4	Dia 0	Dia 4
E1	4% (+)	10% (+)	<i>Candida albicans</i>	Negativa	IIB	IIB	Limpo, muitos debris	Limpo
E2	10% (+)	12% (++)	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Streptococcus spp</i>	IIA	IIA	Turvo e viscoso	Limpo
E3	56% (++++)	26,5% (++)	<i>Streptococcus spp</i>	<i>Streptococcus spp</i>	III	III	Pús; muito viscoso	Limpo
E4	6% (+)	16% (++)	<i>Providencia rettigeri</i>	<i>Pseudomonas</i>	III	III	Turvo e viscoso	Limpo
E5	17,5% (++)	36,5% (+++)	<i>Streptococcus spp</i>	Negativa	IIB	IIB	Pús; muito viscoso	Limpo
E6	16% (++)	18,5% (++)	<i>Candida albicans</i>	Negativa	IIB	IIB	Pouco turvo	Limpo

A ultrassonografia é utilizada para a detecção e caracterização da presença de fluido intrauterino e grau de edema no útero, embora apenas contribua para o diagnóstico sugestivo da endometrite (CAMOZATTO et al., 2009; McKINNON et al., 1987). Algumas éguas do grupo experimental

apresentaram maior ecogenicidade do fluido uterino acumulado no início do cio, havendo total concordância com as características do fluido uterino recuperado nas lavagens. Nossos achados concordam com achados anteriores (McKINNON et al., 1987), onde a quantidade e a qualidade do fluido uterino têm relação com o grau de inflamação. Atualmente, a presença de mais de 2 centímetros de fluido uterino, durante a fase de estro, tem sido considerada como o fator principal para a detecção precoce de animais considerados susceptíveis à endometrite persistente pós-cobertura (BUCCA et al., 2008). O fluido uterino pode estar livre no lúmen uterino ou encapsulado por tecido cicatricial fibrótico, esse ponto de acúmulo de líquido torna o útero mais susceptível às infecções e impossibilita a implantação embrionária (LEFRANC; ALLEN, 2008). A Figura 6 demonstra um acúmulo de fluido uterino encontrado em uma égua do grupo experimental com cultura microbiológica positiva para *Candida albicans* no dia 0.

Tabela 8 - Achados microbiológicos, citológicos e histopatológicos das éguas doadoras de embrião do grupo Controle

GRUPO CONTROLE						
ANIMAL	CITOLOGIA		CULTURA		BIÓPSIAS	
	Dia 0	Dia 4	Dia 0	Dia 4	Dia 0	Dia 4
C1	4% (+)	21,5%(++)	Negativa	Negativa	IIB	IIB
C2	1,5% (N)	4,5% (+)	Negativa	Negativa	IIB	IIB
C3	2% (N)	5% (+)	Negativa	Negativa	III	IIB
C4	3,5% (+)	9,5% (+)	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	IIB	IIA
C5	2% (N)	21,5% (++)	<i>Pseudomonas</i>	Negativa	IIB	IIB
C6	0,5% (N)	22% (++)	Negativa	Negativa	III	III

Quatro animais (E2, E3, E4 e E5) apresentaram grande quantidade de fluido uterino (altura da coluna de líquido no endométrio maior que 40 mm), além de aspecto muito turvo, similar a pus e com alta viscosidade. A presença de grande quantidade de fluido uterino de aspecto turvo e com alta viscosidade

confirma a presença de endometrite instalada e cronicidade do processo inflamatório (McKINNON; VOSS, 1993; McKINNON et al., 1987).



FIGURA 6 - Sonograma demonstrando acúmulo de fluido uterino em égua do grupo Experimental (E1) no dia 0.

Éguas que acumulam fluido durante o estro são consideradas susceptíveis à endometrite (ALLEN; PYCOCK, 1988). Houve melhora significativa na qualidade e aspecto do lavado nos dias subsequentes ao dia 0, sendo que no dia 4 o lavado estava mais límpido e claro, demonstrando a eficiência na limpeza física do útero.

Os resultados obtidos das eletroforeses para proteínas de fase aguda realizadas a partir do soro dos animais dos grupos Controle e Experimental estão demonstrados nas Tabelas 9, 10, 11, 12 e 13, respectivamente.

No presente estudo não houve diferenças significativas para as concentrações séricas de ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida entre todos os momentos no grupo Controle ($p=0,6929$, $p=0,9474$, $p=0,8258$, $p=0,8568$, $p=0,3857$, respectivamente) e no grupo Experimental ($p=0,7148$, $p=0,7316$, $p=0,8627$, $p=0,6509$, $p=0,8652$, respectivamente).

As concentrações séricas de ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida não sofreram alterações entre os grupos no dia 0 ($p=0,6588$, $p=0,2129$, $p=0,1774$, $p=0,1827$, $p=0,4561$, respectivamente), dia 1 ($p=0,2375$, $p=0,9349$, $p=0,7271$, $p=0,2726$, $p=0,9839$, respectivamente), dia 2 ($p=0,1844$, $p=0,1293$, $p=0,2696$, $p=0,9142$, $p=0,7372$, respectivamente), e dia 4 ($p=0,8550$, $p=0,1066$, $p=0,5765$, $p=0,9097$, $p=0,3827$, respectivamente). No dia 3, não foram observadas diferenças significativas para as concentrações séricas de ceruloplasmina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida entre os grupos ($p=0,4847$, $p=0,2480$, $p=0,4689$, $p=0,2602$, respectivamente). Estes resultados indicam que houve uma diminuição ($p=0,0136$) nas concentrações séricas da transferrina (TF) no dia 3 após o início do cio no grupo experimental em relação ao grupo Controle (Tabela 10), concordando com os achados de Toussaint et al. (2005), que descreveram uma diminuição desta proteína na espécie equina durante um quadro inflamatório, e durante o processo infeccioso intrauterino (WOLF, 2011).

Por se tratar de uma proteína de fase aguda (APP) negativa (CAMPBELL et al., 2005; GRUYS et al., 2005; MURATA et al., 2004), a TF é secretada em casos de invasão microbiana (WEINBER, 1977), na tentativa de remover ferro do plasma sanguíneo e armazená-lo nos hepatócitos. A TF quando não está ligada ao ferro também possui atividade bactericida contra infecção microbiana (ARNOLD et al., 1980), devido à produção de radicais hidroxil OH^- (LASSITER et al., 1987). A TF, bem como outras APPs negativas, diminuem na inflamação devido à utilização de seus aminoácidos pelo fígado para produção de APPs positivas, as quais aumentam durante o processo inflamatório (CRISMAN et al., 2008). Com base nestes achados, sugere-se que

a análise da produção de proteínas de fase aguda no sangue não seja um bom parâmetro para identificar éguas com endometrite clínica e/ou susceptíveis, e diferenciá-las dos animais sadios, não apresentando alterações significantes entre os grupos, à exceção da transferrina que apresentou variação significativa para o dia 3. Entretanto, são necessários novos estudos para determinar o perfil da transferrina sérica em animais com endometrite e estabelecer uma curva padrão para este processo inflamatório localizado. Para tanto, sugere-se a realização da análise das APPs no líquido endometrial de éguas que apresentem endometrite clínica para melhor elucidação do processo inflamatório no útero de éguas doadoras de embrião.

Tabela 9 - Concentração sérica de ceruloplasmina (mg/dL) de éguas doadoras de embrião com (grupo Controle, C) e sem sinais clínicos de endometrite (grupo Experimental, E) ao longo do tempo

Grupo	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
C	103,95 ±	103,14 ±	89,60 ±	87,92	114,82 ±
(n=5)	45,84 ^{aA}	53,25 ^{aA}	20,23 ^{aA}	±19,58 ^{aA}	15,07 ^{aA}
E	115,93 ±	139,52 ±	151,22 ±	105,14 ±	120,87 ±
(n=6)	41,22 ^{aA}	37,63 ^{aA}	92,67 ^{aA}	49,33 ^{aA}	70,02 ^{aA}

n = número de animais

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (Teste de Tukey, $p > 0,05$).

(Letras minúsculas para as comparações na horizontal e maiúsculas na vertical)

Tabela 10 - Concentração sérica de transferrina (mg/dL) de éguas doadoras de embrião com (grupo Controle, C) e sem sinais clínicos de endometrite (grupo Experimental, E) ao longo do tempo

Grupo	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
C	526,59 ±	501,08 ±	512,12 ±	540,23	521,88 ±
(n=5)	66,25 ^{aA}	37,99 ^{aA}	76,63 ^{aA}	±82,86 ^{aA}	92,30 ^{aA}
E	451,48 ±	494,75 ±	448,36 ±	425,05 ±	448,13 ±
(n=6)	109,07 ^{aA}	144,11 ^{aA}	49,62 ^{aA}	38,40 ^{aB}	38,64 ^{aA}

n = número de animais

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (Teste de Tukey, $p > 0,05$).

(Letras minúsculas para as comparações na horizontal e maiúsculas na vertical)

Tabela 11 - Concentração sérica de albumina (g/dL) de éguas doadoras de embrião com (grupo Controle, C) e sem sinais clínicos de endometrite (grupo Experimental, E) ao longo do tempo

Grupo	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
C	2,68 ±	2,72 ±	2,52 ±	2,62 ±	2,56 ±
(n=5)	0,32 ^{aA}	0,24 ^{aA}	0,26 ^{aA}	0,28 ^{aA}	0,29 ^{aA}
E	2,22 ±	2,57 ±	2,23 ±	2,29 ±	2,39 ±
(n=6)	0,68 ^{aA}	0,80 ^{aA}	0,50 ^{aA}	0,53 ^{aA}	0,62 ^{aA}

n = número de animais

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (Teste de Tukey, $p > 0,05$).

(Letras minúsculas para as comparações na horizontal e maiúsculas na vertical)

Tabela 12 - Concentração sérica de haptoglobina (g/dL) de éguas doadoras de embrião com (grupo Controle, C) e sem sinais clínicos de endometrite (grupo Experimental, E) ao longo do tempo

Grupo	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
C	150,28 ±	172,73 ±	156,70 ±	161,03	164,56 ±
(n=5)	51,40 ^{aA}	29,96 ^{aA}	12,58 ^{aA}	±30,78 ^{aA}	14,88 ^{aA}
E	193,98 ±	235,60 ±	158,90 ±	221,48 ±	167,78 ±
(n=6)	42,94 ^{aA}	100,85 ^{aA}	42,56 ^{aA}	174,99 ^{aA}	59,71 ^{aA}

n = número de animais

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (Teste de Tukey, $p > 0,05$).

(Letras minúsculas para as comparações na horizontal e maiúsculas na vertical)

Tabela 13 - Concentração sérica de glicoproteína ácida (mg/dL) de éguas doadoras de embrião com (grupo Controle, C) e sem sinais clínicos de endometrite (grupo Experimental, E) ao longo do tempo

Grupo	Dia 0	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
C	85,27 ±	114,63 ±	115,79 ±	86,66	117,98 ±
(n=5)	23,17 ^{aA}	21,82 ^{aA}	54,45 ^{aA}	±33,35 ^{aA}	28,99 ^{aA}
E	95,85 ±	115,23 ±	106,66 ±	114,98 ±	92,33 ±
(n=6)	14,69 ^{aA}	53,41 ^{aA}	22,04 ^{aA}	40,23 ^{aA}	54,92 ^{aA}

n = número de animais

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (Teste de Tukey, $p > 0,05$).

(Letras minúsculas para as comparações na horizontal e maiúsculas na vertical)

IV. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que a cultura microbiológica associada à citologia endometrial foram bons parâmetros quando analisados em conjunto para se classificar uma égua como portadora de endometrite. Ainda, vale ressaltar que os achados ultrassonográficos quanto ao acúmulo de fluido uterino, aliado, principalmente ao histórico reprodutivo da égua, foram muito importantes para triar os animais quanto à necessidade de exames complementares, tais como biópsia uterina, citologia endometrial e a cultura microbiológica, as duas últimas de fácil realização e baixo custo. Tais recursos possibilitaram fácil identificação e classificação da endometrite já instalada, sendo a avaliação da biópsia uterina necessária para identificar endometrites subclínicas e/ou crônicas e demonstrar a integridade do útero e prognosticar o futuro reprodutivo destes animais.

Estes achados permitiram demonstrar a variação que existe entre o ponto de realização de colheita das amostras para citologia, em que na técnica da citologia exfoliativa o material é colhido do corpo uterino, podendo apresentar variações de resultados de celularidade bem acentuados e diferentes do material de biópsia para histopatologia, na qual o material é colhido normalmente dos cornos uterinos. Os resultados do presente apresentaram concordância entre os achados de exames ultrassonográficos, microbiológicos associados à citologia endometrial de éguas que apresentam endometrite clínica ou histórico reprodutivo insatisfatório, entretanto não houve concordância com os exames hematológicos. Observou-se que éguas doadoras de embrião com bom histórico reprodutivo em programas comerciais de TE podem apresentar quadros de metrite difusa crônica e fibrose acentuada periglandular, sem interferir na taxa de recuperação embrionária, apresentando, portanto, boa adaptação aos desafios no ambiente intrauterino. As alterações histopatológicas foram associadas principalmente com a idade das éguas.

A lavagem uterina mostrou-se um bom método para realizar a limpeza uterina, principalmente no que diz respeito à remoção do excesso de debris celulares, secreção uterina e exsudato inflamatório, entre outros; porém, em alguns animais, demonstrou ter a propriedade de promover uma inflamação local moderada, sendo este método uma espécie de estímulo inflamatório, o que pode ser deletério em algumas ocasiões. Através deste modelo experimental, não foi possível determinar qual(is) proteína(s) de fase aguda pode(m) ser utilizada(s) como marcador(es) da resposta inflamatória sistêmica. Para tanto, sugere-se a análise das concentrações das APPs no fluido endometrial, pois não houve alteração das mesmas no soro destes animais.

V. REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. et al. Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare. *J. Reprod. Fertil.*, v.35, suppl., p.445–454, 1987.
- AGUILAR, J. et al. Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares. *Theriogenology*, v.66, n.2, p.423-430, 2006.
- ALBIHN, A.; BAVERUD, V.; MAGNUSSON, U. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Vet. Scand.*, v.44, n.3/4, p.121–129, 2003.
- ALGHAMDI, A.S. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v.53, n.4, p.230–237, 2005.
- ALLEN, B.; KOLD, S. Fibrinogen response to surgical trauma in the horse. *Equine Vet. J.*, v.20, n.6, p.441–443, 1988.
- ALLEN, W. E.; PYCOCK, J.F. Cyclical accumulation of uterine fluid in mares with lowered resistance to endometritis. *Vet. Rec.*, v.122, p. 489-490, 1988.
- ALLEN, W.R., et al. Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mares and stallions in England. *Equine Vet. J.*, v.39, n.5, p.438–445, 2007.
- ALVARENGA, M.A.; IWANA DE MATOS, M.C. Utilização da escova ginecológica cytobrush na coleta de material endometrial de éguas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.42, p.67-68, 1990.
- ALVARENGA, M. A.; PASTORELLO, M. Comparação entre a eficiência da escova ginecológica e swab de algodão na coleta de material endometrial de éguas. *Ars Veterinária*, v.10, n.2, p.244, 1994.
- ARNOLD, R.R., et al. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun*, v.28, n.3, p.893-898, 1980.
- ASBURY, A.C.; GORMAN, N.J.; FOSTER, G.W. Uterine defense mechanisms in the mare: Serum opsonins affecting phagocytosis of *Streptococcus*

- zooepidemicus by equine neutrophils. *Theriogenology*, v. 27, p. 375-385, 1984.
- BADOLATO, R., et al. Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-Candida activity. *J. Leukoc. Biol.*, v.67, p.381–386, 2000.
- BALL, B., et al. Pregnancy rates at days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day 14 in normal and subfertile mares. *Theriogenology*, v.26, p.611-619, 1986.
- BALL, B., et al. Survival of Day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. *J. Reprod. Fertil.*, v.85, p.187–194, 1989.
- BALL, B.A., et al. Use of low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. *Theriogenology*, v.29, p.1269–1283, 1988.
- BANKS, R.E., et al. The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. *Clin Exper Immunol*, v.102, p.217-223, 1995.
- BOOSMAN, R., et al. Serum amyloid A concentrations in cows given endotoxin as an acute-phase stimulant. *Am. J. Vet. Res.*, v.50, p.1690–1694, 1989.
- BROOK, D. Uterine cytology. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (ED). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p. 246–253.
- BROWN, M.P.; TRUMBLE, T.N.; MERRITT, K.A. High-mobility group box chromosomal protein 1 as a potential inflammatory biomarker of joint injury in Thoroughbreds. *Am. J. Vet. Res.*, v.70, n.10, p.1230-1235, 2009.
- BUCCA, S., et al. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. *Theriogenology*, v. 70, p. 1093-1100, 2008.
- BURTON, A.B., et al. Serum interleukin-6 (IL-6) and IL-10 concentrations in normal and septic neonatal foals. *Vet. Immunol. Immunopathol*, v.132, n.2-4, p.122-128, 2009.
- CAMOZZATO, G.C. *Endometrite em éguas*. 36f. Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção da Graduação em Medicina Veterinária. Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,

Brasil, 2011.

CAMPBELL, F.M., et al. Measuring the negative acute phase reactant transthyretin in porcine serum. In: International colloquium on animal acute phase proteins. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, 2005, p.72.

CARD, C. Infectious diseases of the puerperal period. In: YOUNGQUIST, R.S. *Current therapy in large animal theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, p.161-165.

CARD, C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*, v.64, p. 580-588, 2005.

CARVALHO, C.F.P.M. Avaliação de extratos aquosos de plantas no tratamento da endometrite bacteriana em éguas (*Equus caballus*). Tese (Doutorado) UFRRJ Instituto de Veterinária. Curso de Pós-Graduação, 2008.

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

CAUSEY, R.C. Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. *Vet. J.*, v.172, p.405-421, 2006.

CERÓN, J.J.; PARRA, M.D.N. Update on acute phase proteins in dogs: advances in measurement assays and clinical APPLication. In: International colloquium on animal acute phase proteins. Dublin, Ireland. *Abstracts and Proceedings Book*. Dublin, 2005, p.12.

CONCHA-BERMEJILLO, A.; KENNEDY, P.C. Prognostic value of endometrial biopsy in the mare: a retrospective analysis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.181, n.7, p.680-681, 1982.

COUTO, M. S.; HUGHES, J. P. Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. *Equine Vet. Sci.*, v.4, p.265–73, 1984.

CHAPWANYA, A., et al. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology*, v. 71, p.1396–1407, 2009.

CLARK, E.; MOORE, J. The effects of slow infusion of a low dosage of endotoxin in healthy horses. *Equine Vet. J. Suppl.*, v. 7, p.33–37, 1989.

- CRICKMAN, J.A.; PUGH, D.G. Equine endometrial cytology: a review of techniques and interpretations. *Vet. Med.*, v.81, p.650–656, 1986.
- CRISMAN, M.V. Blood Proteins and Inflammation in the Horse. *Vet. Clin. Equine Prac.*, v.24, p.285-297, 2008.
- DABROWSKI, R.; WAWRON, W.; KOSTRO, K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. *Theriogenology*, v. 67, p.321–327, 2007.
- DELANGE, J., et al. Effect of haptoglobin phenotypes on growth of *Streptococcus pyogenes*. *Clin. Chem. Labor. Med.*, v.36, p.691-696, 1998.
- DIGBY, N.J.W.; RICKETTS, S.W. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* v.32, p.181–185, 1982.
- DIMOCK, W.; EDWARDS, P. Pathology and bacteriology of the reproductive organs of mares in relation to sterility. *Kentucky Agric. Exp. Stn. Bull. (Res. Bull.)*, v.286, p.157–237, 1928.
- DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, v.77, p.1627–1652, 1991.
- DINARELLO, C.A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J.*, v. 8, p. 1314–1325, 1994.
- DOIG, P. A.; MCKNIGHT, J. D.; MILLER, R. B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Can. Vet. J., Guelph*, v. 22, n. 3, p. 72-76, 1981.
- FIORATTI, E.G. *Efeito dos anti-inflamatórios esteróides na reação inflamatória e na fertilidade de éguas normais e susceptíveis à endometrite persistente após inseminação artificial*. 124f. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010.
- FOUSSAT, A., et al. A comparative study between T regulatory tYpe 1 and CD4+ CD25+ T cells in the control of inflammation. *J. Immunol.*, v.171, p.5018-5026, 2003.
- FÜERLL, M., et al. Haptoglobin in routine analysis of bovine serum. *International colloquium on animal acute phase proteins*. Dublin, Ireland.

Abstracts and Proceedings Book, Dublin, 2005, p.11.

FUMUSO, E., et al. Endometrial IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha, mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis. Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.96, p.31–41, 2003.

FUMUSO, E.A., et al. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: effects of immunomodulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.118, p.30–39, 2007.

FURLANETO, C.J.; CAMPA, A. A novel function of serum amyloid a: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor-[alpha], interleukin-1[beta], and interleukin-8 by human blood neutrophil. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 268, p.405–408, 2000.

GOGOS, C.A., et al. Pro-versus anti-inflammatory cytokine profile with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J. Infect. Dis.* v.181, p.176-180. 2000.

GRUYS, E., et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science*, v.6B, n.11, p.1045-1056, 2005.

HEEGAARD, P.M.H., et al. Porcine acute phase proteins in experimental models of infectious diseases. In: *International colloquium on animal acute phase proteins*. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book. Dublin, p.5, 2005.

HENDERSON, B.; WILSON, M. Cytokine induction by bacteria: beyond lipopolysaccharide. *Cytokine*, v. 8, p.269–282, 1996.

HERATH, S., et al. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. *J. Reprod. Immunol.* v.69, p.13–22, 2006a.

HERATH, S., et al. Expression and function of toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology*, v.147, p.562–570, 2006b.

HINRICHS, K., et al. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. *J Am. Vet. Med. Assoc.*, v.193, p.72-75, 1988.

HIRVONEN, J., et al. Acute-phase response in dairy cows with acute

postpartum metritis. *Theriogenology*, v.51, p.1071–1083, 1999.

HULTÉN, C., et al. A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) – a clinically useful inflammatory marker in the horse. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 68, 267–281, 2009.

ITO, T., et al. Proteolytic Cleavage of High Mobility Group Box 1 Protein by Thrombin–Thrombomodulin Complexes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v.28, p.1825-1830, 2008.

JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P.H. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Vet. Educ.*, v.19, p.36–46, 2007.

JACOBSEN, S., et al. Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentrations. *Vet. J.* v.172, p.315–319, 2006a.

JACOBSEN, S., et al. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 110, 325–330, 2006b.

JENSEN, L.E.; WHITEHEAD, A.S. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochem. J.* 334, 489–503, 1998.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response in mares after insemination with fresh semen. *Biol Reprod Mono*, n.1, p.515-518, 1995.

KELLER, A. *Avaliação morfológica-funcional da recuperação do endométrio equino através da infusão de neutrófilos imunocompetentes criopreservados, baseado em um modelo experimental definido*. Dissertação (mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 2004.

KENNEY, R. M. Cyclic and pathologic changes in the mare's endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.172, p.3, p. 241-, p.62, 1978.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D.A. *Current therapy in equine medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986,

p.723-729.

KIKU, Y., et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells induced by experimental endotoxemia in horse. *J. Vet. Med. Sci.*, v.65, p.857– 863, 2003.

KNUDSEN, O. Partial dilatation of the uterus as a cause of sterility in the mare. *Cornell Vet.*, v. 54, p.423-438, 1964.

KOKKOLA, R.,etal. High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum.*, v.46, p.2598–2603, .2002.

KOKKOLA R., et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol.* v.61, p.1–9, 2005.

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

LANGONI, H. P. et al. Participação de bactérias aeróbicas, microaerófilas e anaeróbicas na endometrite equina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 23, n. 1, p. 44-51, 1999.

LANGONI, H et al. Estudo microbiológico e citológico do trato genital de éguas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 46, n.6, p.623-636, 1994.

LASSITER, M.O., et al. Characterization of lactoferrininteraction with *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Research.*, v.66, n.2, p.480-485, 1987.

LEBLANC, M.M.; MAGSIG, J.; STROMBERG, A.J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, v. 68, p. 403-412, 2007.

LEBLANC, M. M., et al. Lymphatic clearance of india ink in reproductively normal mares and mares susceptibles to endometritis. *Biol. Reprod. Mono.*, n.1, p.501-506, 1995.

LEBLANC, M. The chronically infertile mare. In: AAEP (Ed.), *Proceedings of the 54th Annual Convention of the AAEP*, San Diego, Califórnia, USA p.391–407, 2008.

LEFRANC, A.C.; ALLEN, W.R. Uterine fluid accumulation and endometrial integrity in the barren mare. *Pferdeheilkunde*, v.24. p.27-30, 2008.

- LEY, W.B. *Reprodução em éguas para veterinários de equinos*. São Paulo: Roca, 2006, Seção 9, p.146-147.
- LIU, I.; TROEDSSON, M. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Theriogenology*, v. 70, p.415–420, 2008.
- MALSCHITZKY, E., et al. Endometrite na éguas, novos conceitos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, n.1, p.17-26, 2007.
- MARHAUG, G.; HACKETT, B.; DOWTON, S.B. Serum amyloid A gene expression in rabbit, mink and mouse. *Clin. Exp. Immunol.* v.107, p.425–434, 1997.
- MATTOS, R.C.; MATTOS, A.L.G.; KLUG, E.A.R. Citologia endometrial na égua auxiliar e complementar. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.8, p.83-90, 1984.
- McCUE, P. The problem mare: management philosophy, diagnostic procedures, and therapeutic options. *J. Equine Vet. Sci.*, v.28, n.11, p.619–626, 2008.
- McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Breeding the problem mare, in AO McKinnon and JL Voss (eds). *Equine Reproduction*: Philadelphia, London, Lea & Febiger, 1993, p.368-378.
- MCKINNON, A.; SQUIRES, E. Embryo transfer and related Technologies. In AAEP(Ed.), In: *ANNUAL RESORT SYMPOSIUM OF THE AAEP*, Gold Coast, 2009, Australia, 25–28 Janeiro, p.27–57, 2009.
- McKINNON, A.O., et al. Diagnostic ultrasonography of uterine pathology in the mare. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, p. 605-622, 1987.
- MEEK, R.L.; ERIKSEN, N.; BENDITT, E.P. Serum amyloid A in the mouse sites of uptake and mRNA expression. *Am. J. Pathol.*, v.135, p.411–419, 1989.
- METTE, C., et al. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.138, p.95–105, 2010.
- MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R.; Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Vet. J.* v.34, p.51–60, 2002.

- MURATA, H., et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, v.168, p.28-40, 2004.
- NASH, D.M., et al. Markers of the uterine innate immune response of the mare. *Anim. Reprod. Sci.* v.119, p.31–39, 2010.
- NGUYEN, T.V. et al. Transfer of maternal cytokines to suckling piglets: in vivo and in vitro models with implications for immunomodulation of neonatal immunity. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.117, p.236-248, 2007.
- NIELSEN, J.M. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*, v. 64, p. 510-518, 2005.
- NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E.D. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. *Theriogenology*, v.52, p.413-423, 1999.
- ORSI, N.; TRIBE, R. Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J. Neuroendocrinol* 20, 462–469, 2008.
- PALLARÉS, F.J., et al. Relationship between serum acute phase protein concentrations and lesions in finishing pigs. *Vet.J.*, v.177, p.369-373, 2008.
- PALMBLAD, K.; et al. Morphological characterization of intra-articular HMGB1 expression during the course of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, v.9, p.R35–R45, 2007.
- PASCOE, D. R. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, n.27, p.299-305, 1979.
- PEPYS, M., et al. Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. *Equine Vet. J.*, v.21, p.106–109, 1989.
- PETERSEN, H.H., et al. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.*, v.35, p.163-187, 2004.
- PORTO, C.D. Expressão de MMP-2 e MMP-9 no endométrio de éguas saudáveis e portadoras de endometrite crônica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.1, p.12-19, 2011.
- QUEIROZ, F. J. R. *Biópsia endometrial como método auxiliar de diagnóstico*

- da subfertilidade e da infertilidade na égua (*Equus caballus*, L. 1728). 75f. Dissertação (Mestrado em Reprodução) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 1991.
- QUINN, P.J. *Clinical Veterinary Microbiology*. 1994.
- RADOSTITS, O.M., et al. *Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 1647.
- REGASSA, F.; NOAKES, D.E. Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria. *Vet. Rec.* v.144, p.502–506, 1999.
- RIDDLE, W.T.; LEBLANC, M.M.; STROMBERG, A.J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*, v.68, p.395–402, 2007.
- RICKETTS, S. W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 23, p.341–345, 1975.
- RICKETTS, S.; ALONSO, S. Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. *Equ. Vet. J.*, v.23, p.189–192, 1991.
- ROMAGNANI, S. Development of Th1 or Th2-dominated immune responses: what about the polarizing signals? *Int. J. Clin. Lab. Res.*, v.26, p.83-98, 1996.
- SALTIEL, A., et al. Pathologic findings in the oviducts of mares. *Am. J. Vet. Res.* v.47, p.594–597, 1986.
- SAMPER, J.C. et al. *Current therapy in equine reproduction*. (Ed.) Chicago: Saunders Elsevier, 2007, p.57-58.
- SHAMAY, A., et al. Albumin a mammary gland secreting cell keeper. In: *International colloquium on animal acute phase proteins*. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book, Dublin, p.77-78, 2005.
- SHELDON, I.M., et al. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet. Rec.* v.148, p.172–175, 2001.
- STONEHAM, S.J., et al. Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidimetric assay: determination of the

normal range, variation with age and response to disease. *Equine Vet. J.*, v.33, p.599–603, 2001.

THE BRITISH HORSE RACING BOARD. British Racing Statistics 2005. Weatherbys Ltd., Wellingborough, UK, 2007.

SUFFREDINI, A.F., et al. New insights into the biology of the acute phase response. *J. Clin. Immunol.*, v.19, p.203-214, 1999.

THOMASSIAN, A. *Enfermidade dos eqüinos*. 3. ed. São Paulo: Varela, 1996, p.318-320.

TOUSSAINT, M.J.M., et al. Measuring negative acute phase proteins to assess acute phase response and starvation. In: International colloquium on animal acute phase proteins. Dublin, Ireland. Abstracts and Proceedings Book, Dublin. 2005, p.14.

TROEDSSON, M.H., et al. Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *J. Reprod. Fertil.* v.99, p.307–313, 1993a.

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

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

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M. Measurement of total volume and protein concentration of intrauterine secretion after intrauterine inoculation of bacteria in mares that were either resistant or susceptible to chronic infection. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, p.1641- 1644, 1992.

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

TROEDSSON, M.H.; LIU, I.K.; THURMOND, M. Function of uterine and blood-derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: phagocytosis and chemotaxis. *Biol. Reprod.* v.49, p.507–514, 1993b.

- TROEDSSON, M.H.; LIU, I.K.; THURMOND, M. Immunoglobulin (IgG and IgA) and complement (C3) concentrations in uterine secretion following an intrauterine challenge of *Streptococcus zooepidemicus* in mares susceptible to versus resistant to chronic uterine infection. *Biol Reprod.* .49, p.502–506, 1993.
- TUNÓN, A.M., et al. Concentrations of total protein, albumin and immunoglobulins in undiluted uterine fluid of gynecologically healthy mares. *Theriogenology*, v.50, p.821-831, 1998.
- URIELI-SHOVAL, S., Widespread expression of serum amyloid A in histologically normal human tissues: predominant localization to the epithelium. *J. Histochem. Cytochem.* v.46, p.1377–1384, 1998.
- VAN CAMP, S. D. Endometrial biopsy of the mare: a review and update. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v.4, n.2, p.229-245, 1988.
- VANDERWALL, D. Current equine embryo transfer techniques. 2000. Acesso em Mar. 7, 2010. Disponível em: <http://www.ivis.org>.
- VANDERWALL, D. Early embryonic loss in the mare. *J. Equine Vet. Sci.*, v.28, n.11, p.691–702, 2008.
- WANG, H.; et al.. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, v.285, p.248–251, 1999.
- WANG, H., et al. HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* , v.164, p.1768 –1773, 2001.
- WATSON, E.D. Release of immunoreactive arachidonate metabolites by equine endometrium in vitro. *Am. J. Vet. Res.*, v.50, p.1207–1209, 1989.
- WATSON, E.D., et al. Concentrations of uterine luminal prostaglandins in mares with acute and persistent endometritis. *Equine Vet. J.*, v.19, p.31–37, 1987b.
- WATSON, E.D., et al. Effect of ovarian hormones on promotion of bactericidal activity by uterine secretions of ovariectomized mares. *J. Reprod. Fertil.*, v.79, p.531–537, 1987a.
- WITTEMANN, B., et al. Autoantibodies to nonhistone chromosomal proteins HMG-1 and HMG-2 in sera of patients with juvenile rheumatoid

arthritis. *Arthritis Rheum.*, v.33, p.1378–1383, 1990.

WOLF, C.A. *Análise do líquido endometrial de éguas suscetíveis à endometrite: efeito da corticoterapia*. 150f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 2011.

YANG, H.; et al. The cytokine activity of HMGB1. *J. Leukoc. Biol.*, v.78, p.1–8, 2005.

YANG, H., et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, p.296–301, 2004.