

CARLOS MATTOS TEIXEIRA SOARES

**AVALIAÇÃO GINECOLÓGICA DE ÉGUAS RECEPTORAS DE EMBRIÃO VIA
DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como requisito parcial do programa de Pós-graduação em Zootecnia, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S676a
2017
Soares, Carlos Mattos Teixeira, 1991-
Avaliação ginecológica de éguas receptoras de embrião via
diferentes métodos de diagnóstico / Carlos Mattos Teixeira
Soares. – Viçosa, MG, 2017.
xv, 89f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.72-83.

1. Equinos - Reprodução. 2. Exame ginecológico.
3. Obstetrícia veterinária. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em
Zootecnia. II. Título.

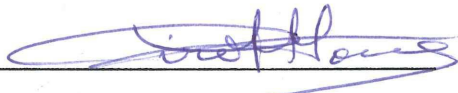
CDD 22 ed. 636.1

CARLOS MATTOS TEIXEIRA SOARES

**AVALIAÇÃO GINECOLÓGICA DE ÉGUAS RECEPTORAS DE EMBRIÃO VIA
DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como requisito parcial do programa de Pós-graduação em Zootecnia, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2017.



Ciro Alexandre Alves Torres
(Coorientador)



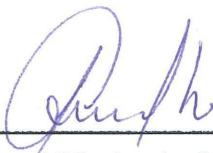
Mariana Machado Neves
(Coorientador)



Giancarlo Magalhães dos Santos



Maria Aparecida Scatamburlo Moreira



Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Orientador)

DEDICATÓRIA

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui, familiares, amigos e mestres. E aos equinos, razão pela qual escolhi desempenhar tal profissão e estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus familiares por terem sido a base para a construção do meu caráter e de quem sou hoje, Antônio Carlos, Dayse, Lidia e Gustavo.

A minha noiva Jussara, por ter me amparado e passado por bons e maus momentos sempre ao meu lado, me motivando e encorajando para seguir em frente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Zootecnia e seus professores e funcionários.

Ao professor Giovanni pela orientação e por ter sido exemplo acadêmico.

Aos profissionais os quais acompanhei durante minha vida acadêmica e não mediram esforços para compartilharem conhecimentos e experiências, Gilberto Guimarães, Maria Gazzinelli e Rafael Goretti.

Ao Setor de Equideocultura da UFV e todos que por lá passaram, estagiários, estudantes de pós-graduação e funcionários, dedicando-se a construir mais do que profissionais competentes e dedicados, mas pessoas de bom coração e que amam cavalos. Fernando, Pedro Gama, Cristian, Renan, Dinah, Iana, Pablo, Viviane, Thiago Vieira, Thiago Augusto, Bia, Raquel, Dani, Lorena, Claudiana, Tácio, Ilana Henrique, Pedro, Leandro, Gabriela, Amanda, Lucas, Domingos, Zé, Arcino, Bernardo, Dimas, Sílvio, Roberto, entre outros.

Aos meus amigos de graduação que me acompanharam e cresceram ao meu lado, principalmente Daniel Átila, Mariana Abreu, Bruna Torres e Rafael Domingues que tanto me auxiliaram durante o experimento.

Aos amigos de pós-graduação Maria Eduarda, Manuela Matta e Flávia Vieira, pelo auxílio do experimento até a escrita da dissertação.

Aos professores da banca de avaliação pelos importantes conselhos e correções.

Aos Haras San Genaro, Haras Laglória, Haras River Side, Agropecuária CPT, Fazenda Pedra Branca, Sítio Floresta e seus proprietários, funcionários e animais que contribuíram diretamente para o sucesso do experimento.

Ao Departamento de Veterinária e seus professores e funcionários, principalmente a professora Maria Aparecida e aos funcionários Luís e Adão.

A professora Mariana Neves, por estar sempre disposta a ajudar e ensinar.

A Viçosa e a UFV por ter sido minha segunda casa nestes 7 anos, me trazendo amigos e aprendizados que levarei para o resto da minha vida, muito obrigado!

BIOGRAFIA

CARLOS MATTOS TEIXEIRA SOARES, filho de Antônio Carlos Ribeiro Teixeira Soares e Dayse das Graças Mattos Teixeira Soares, nasceu em 23 de Agosto de 1991, no Rio de Janeiro - RJ.

Graduou-se Medicina Veterinária em janeiro de 2015, pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG e ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia no mesmo ano.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Transferência de embriões	3
2. Égua problema	5
3. Endometrite	6
4. Avaliação ginecológica	8
4.1. Coleta de dados	11
4.1.1. Idade	11
4.1.2. Escore de condição corporal	12
4.1.3. Histórico reprodutivo	13
4.2. Exame clínico reprodutivo	14
4.3.1. Conformação do períneo	14
4.3.2. Palpação e ultrassonografia	16
4.3.3. Vaginoscopia	17
4.3.4. Exame da cérvix	18
4.3. Exames laboratoriais	19
4.3.1. Técnicas de coleta de amostras	19
4.3.2. Citologia endometrial	23
4.3.3. Cultura microbiológica uterina	25
4.3.4. Avaliação histopatológica endometrial	27
4.3.5. Comparação entre métodos de coleta de amostras	29
MATERIAL E MÉTODOS	32
1. Período e localização experimental	32
2. Animais	32
3. Coleta de dados	32
3.1. Identificação e idade	32
3.2. Escore de condição corporal	33
3.2. Histórico reprodutivo	33
4. Exame clínico reprodutivo	33
4.1. Conformação do períneo	33

4.2. <i>Palpação e ultrassonografia</i>	35
4.3. <i>Vaginoscopia</i>	36
4.4. <i>Exame da cérvix</i>	37
5. Coleta de amostras para exames laboratoriais	37
5.1. <i>Coletores comerciais</i>	38
5.2. <i>Lavado intrauterino de baixo volume</i>	39
5.3. <i>Biópsia e lavado do fragmento</i>	40
6. Exames laboratoriais.....	41
6.1. <i>Cultura microbiológica uterina</i>	41
6.2. <i>Citologia endometrial</i>	42
6.3. <i>Avaliação histopatológica endometrial</i>	43
7. Análises estatísticas.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
1. Coleta de dados	45
1.1. <i>Idade</i>	45
1.2. <i>Escore de condição corporal</i>	46
1.3. <i>Histórico reprodutivo</i>	47
2. Exame clínico reprodutivo	50
2.1. <i>Conformação do períneo</i>	50
2.2. <i>Palpação e ultrassonografia</i>	53
2.3. <i>Vaginoscopia</i>	55
2.4. <i>Exame da cérvix</i>	55
3. Exames laboratoriais.....	56
3.1. <i>Avaliação do efluxo do LBV</i>	56
3.2. <i>Citologia endometrial</i>	56
3.3. <i>Cultura microbiológica uterina</i>	57
3.4. <i>Avaliação histopatológica endometrial</i>	59
4. Comparação entre exames de diagnóstico da endometrite	61
5. Comparação entre as técnicas de coleta de amostras	64
5.1. <i>Coletores comerciais (CC)</i>	66
5.2. <i>Lavado intrauterino de baixo volume (LBV)</i>	67
5.3. <i>Lavado do fragmento da biópsia endometrial (LFBE)</i>	69
CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	84

LISTA DE TABELAS

01	Sensibilidade e especificidade do exame citológico endometrial obtido por diferentes métodos de coleta de amostras utilizando como padrão ouro o exame histológico a partir de biópsia endometrial.....	30
02	Sensibilidade e especificidade do exame de cultura microbiológica uterina obtido por diferentes métodos de coleta de amostras utilizando como padrão ouro o exame histológico a partir de biópsia endometrial.	31
03	Coeficientes de correlação de Spearman entre as variáveis idade, escore de condição corporal e Índice de Caslick das éguas receptoras durante a avaliação ginecológica.....	46
04	Tratamentos realizados nas éguas receptoras durante a estação reprodutiva.....	48
05	Distribuição das éguas receptoras que possuíam líquido intrauterino de acordo com o volume apresentado.....	54
06	Distribuição das éguas receptoras que possuíam líquido intrauterino de acordo com a ecogenicidade apresentada.....	54
07	Número, porcentagem e classificação das éguas receptoras de acordo com os resultados do exame citológico endometrial.....	56
08	Número e porcentagem de éguas receptoras de acordo com o resultado do exame de cultura microbiológica uterina.....	57
09	Número e porcentagem de éguas receptoras de acordo com o crescimento de microrganismos isolados ou misto.....	58
10	Distribuição dos gêneros de microrganismos isolados na cultura microbiológica uterina de éguas receptoras.....	58
11	Susceptibilidade <i>in vitro</i> dos microrganismos isolados de éguas receptoras aos antimicrobianos.....	59
12	Associação das alterações encontradas durante o exame histológico e seu resultado utilizando o Teste exato de Fisher.....	62
13	Comparação entre os diferentes métodos de diagnóstico da endometrite utilizados no exame ginecológico em comparação ao exame histopatológico do endométrio.....	63
14	Número de animais e porcentagem de acordo com o resultado do exame citológico uterino a partir de diferentes formas de coleta de amostra e sua classificação.....	65
15	Crescimento de microrganismos de acordo com a forma de coleta de amostra utilizada na cultura uterina.....	66
16	Distribuição dos microrganismos isolados no exame microbiológico uterino de éguas receptoras de acordo com os diferentes tipos de coleta de amostras.....	68

LISTA DE FIGURAS

01	Vulvômetro utilizado para mensurações durante o exame de conformação do períneo. Adaptação do vulvômetro desenvolvido por PASCOE, 1979. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.....	34
02	Coletores comerciais do tipo <i>swab</i> e escova citológica utilizados na coleta de amostras para os exames de citologia endometrial e cultura microbiológica uterina durante a avaliação ginecológica. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.....	38
03	Material utilizado para o lavado de baixo volume com a finalidade de coletar amostras para os exames de citologia endometrial e cultura microbiológica uterina durante a avaliação ginecológica. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.....	39
04	Material utilizado para a biópsia endometrial com a finalidade de coletar amostras para os exames de citologia endometrial, cultura microbiológica uterina e avaliação histopatológica endometrial durante a avaliação ginecológica. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.....	40
05	Distribuição das éguas receptoras de acordo com a idade apresentada durante a avaliação ginecológica.....	45
06	Distribuição das éguas receptoras de acordo com escore de condição corporal apresentado durante a avaliação ginecológica (ECC).....	47
07	Égua receptora com escore de condição corporal 4 durante a avaliação ginecológica. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.....	47
08	Distribuição das éguas receptoras de acordo com o número de estações reprodutivas em que permaneceram na propriedade.....	49
09	Distribuição das éguas receptoras de acordo com o número de gestações e partos que estiveram na propriedade.....	49
10	Distribuição das éguas receptoras de acordo com o número de embriões transferidos na estação reprodutiva anterior. SC: sem condições de receber embrião.....	50
11	Períneo de égua receptora com resultado positivo no exame de conformação do períneo durante avaliação ginecológica. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.....	51
12	Distribuição das éguas receptoras de acordo com a classificação da conformação vulvar.....	51
13	Distribuição das éguas receptoras de acordo com a classificação do fechamento vulvar.....	52
14	Distribuição das éguas receptoras de acordo com a fase do ciclo estral.....	53
15	Probabilidade do diagnóstico positivo para endometrite em éguas receptoras de acordo com a classificação do volume do líquido intrauterino.....	55
16	Égua receptora apresentando secreção durante o exame de vaginoscopia na avaliação ginecológica. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.....	55

17	Imagem microscópica de lâmina histológica do endométrio de égua receptora sem alterações histopatológicas, grau 1. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.....	60
18	Imagem microscópica de lâmina histológica do endométrio de égua receptora com alterações histopatológicas, grau 3. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.....	60
19	Probabilidade de se obter o diagnóstico positivo para endometrite pelo exame histológico em relação ao número de exames corretos.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
BE	Biópsia endometrial
BHI	Brain Heart Infusion
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
CC	Coletor comercial
CCE	Coletor comercial do tipo escova citológica
CCS	Coletor comercial do tipo <i>swab</i>
CEUAP	Comitê Institucional de Uso de Animais de Produção
pH	Concentração de íons hidrogênio
DZO	Departamento de Zootecnia
ECC	Escore de condição corporal
G	Força G - Unidade de aceleração
°C	Graus Celsius
IC	Índice de Caslick
LFBE	Lavado do fragmento da biópsia endometrial
LBV	Lavado intrauterino de baixo volume
LIU	Líquido intrauterino
MHz	Mega hertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NRC	National Research Council
p	Nível de significância
n	Número
%	Percentual
PMNs	Polimorfonucleados
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
TE	Transferência de embriões
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFV	Universidade Federal de Viçosa
spp	Várias espécies do gênero

RESUMO

SOARES, Carlos Mattos Teixeira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Avaliação ginecológica de éguas receptoras de embrião através de diferentes métodos de diagnóstico.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho
Coorientadores: Mariana Machado Neves e Ciro Alexandre Alves Torres.

Objetivou-se verificar se a endometrite é a principal causa da retirada de éguas receptoras do programa de transferência de embriões, além de comparar métodos e técnicas de diagnóstico. Quarenta éguas receptoras mestiças oriundas de sete propriedades e que não ficaram gestantes ao final da estação reprodutiva, adicionado ao histórico de subfertilidade, foram selecionadas para exame ginecológico. O exame foi realizado através de (i) coleta de dados do animal, idade, escore de condição corporal (ECC) e histórico reprodutivo; (ii) exame clínico reprodutivo, conformação do períneo, palpação e ultrassonografia transretal dos órgãos reprodutivos, vaginoscopia e exame digital da cérvix; e (iii) exames laboratoriais, cultura e citologia, a partir de um coletor comercial (CC) duplamente protegidos, lavado intrauterino de baixo volume (LBV) e do lavado do fragmento resultante da biópsia endometrial (LFBE), e a avaliação histológica. A presença de polimorfonucleados (PMNs) no estrato compacto durante a avaliação histológica serviu de referência para o diagnóstico da endometrite e base para comparação entre os métodos de diagnóstico. A endometrite foi diagnosticada em 65% dos animais avaliados, sendo caracterizada pela presença de PMNs, distribuição das glândulas endometriais em aglomerações e a presença de fibrose no tecido endometrial e periglandular durante a avaliação histológica. No exame clínico reprodutivo, foram positivos 32,5% dos animais para a avaliação da conformação do períneo; 52,5% para exame de palpação e ultrassonografia; 25% para o exame de vaginoscopia; e 37,5% para o exame da cérvix. Nos exames laboratoriais, foram positivos 17,5% para avaliação do efluxo do LBV; 52,5% para o exame citológico uterino; e 62,5% para exame de cultura uterina, sendo a bactéria mais isolada a *Staphylococcus* spp., seguida de *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp., todas susceptíveis a sulfa/trimetoprim, enrofloxacin e florfenicol. Comparando os exames para o diagnóstico da endometrite, a palpação e ultrassonografia apresentaram os melhores resultados entre os exames clínicos, entretanto, foi inferior aos exames laboratoriais de citologia e cultura uterina, sendo este último com maior sensibilidade e especificidade para endometrite. A utilização

de múltiplos resultados de diferentes exames também se mostrou uma alternativa eficaz para o diagnóstico da endometrite. Nas condições em que o estudo foi realizado, a técnica de coleta de amostras mais prática e ao mesmo tempo eficaz para os exames de cultura e citologia uterina foi a do CC. A técnica de LFBE não demonstrou ser tão eficiente quanto às demais. Concluiu-se que a endometrite é a principal causa de éguas receptoras com problemas reprodutivos, e que o exame ginecológico é essencial para o diagnóstico destes animais, utilizando-se o maior número de exames possíveis ou o exame de palpação e ultrassonografia como triagem para a realização de exames laboratoriais, além disto, que o coletor comercial foi o método mais prático e eficaz para a coleta de amostras para os exames de cultura e citologia endometriais.

ABSTRACT

SOARES, Carlos Mattos Teixeira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Gynecological evaluation of embryo recipient mares through different diagnostic methods.** Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho Co-advisers: Mariana Machado Neves and Ciro Alexandre Alves Torres.

The objective was to verify if endometritis is the main cause of the withdrawal of recipient mares from the embryo transfer program, in addition to comparing methods and diagnostic techniques. Forty crossbred recipient mares from seven farms that did not become pregnant at the end of the reproductive season, added to the history of subfertility, were selected for gynecological examination. The examination was performed through (i) collection of animal data, age, body condition score (ECC) and reproductive history; (ii) reproductive clinical examination, conformation of the perineum, palpation and transrectal ultrasonography of the reproductive organs, vaginoscopy and digital examination of the cervix; and (iii) laboratory tests, culture and cytology, from a double-shielded commercial collector (CC), low-volume intrauterine flush (LBV) and wash of the fragment resulting from endometrial biopsy (LFBE), and histological evaluation. The presence of polymorphonucleate (PMNs) in the compact stratum during the histological evaluation served as a reference for the diagnosis of endometritis and basis for comparison between diagnostic methods. Endometritis was diagnosed in 65% of the evaluated animals, being characterized by the presence of PMNs, distribution of the endometrial glands in agglomerations and the presence of fibrosis in endometrial and periglandular tissue during the histological evaluation. In the reproductive clinical examination, 32.5% of the animals were positive for evaluation of the perineum conformation; 52.5% for examination of palpation and ultrasonography; 25% for vaginoscopy examination; and 37.5% for the examination of the cervix. In the laboratory tests, 17.5% were positive for evaluation of the efflux of the LGV; 52.5% for uterine cytology examination; and 62.5% for uterine culture, with *Staphylococcus* spp. being the most isolated bacteria, followed by *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp., all susceptible to sulfa / trimethoprim, enrofloxacin and florfenicol. Comparing the exams for the diagnosis of endometritis, palpation and ultrasonography showed the best results among the clinical exams, however, it was inferior to the laboratory exams of cytology and uterine culture, the latter being with greater sensitivity and specificity for endometritis. The use of

multiple results from different exams has also proved to be an effective alternative for the diagnosis of endometritis. Under the conditions under which the study was carried out, the most practical and efficient sampling technique for culture and uterine cytology examinations was CC. The LFBE technique did not prove to be as efficient as the others. It was concluded that endometritis is the main cause of recipient mares with reproductive problems, and that gynecological examination is essential for the diagnosis of these animals, using as many tests as possible or palpation and ultrasonography as screening for besides the fact that the commercial collector was the most practical and efficient method for the collection of samples for endometrial culture and cytology exams.

INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2016), o Brasil possui um efetivo de cerca de cinco milhões de equinos destinados ao trabalho, criação, esporte e lazer. O agronegócio do cavalo gera uma renda anual de mais de dezesseis bilhões de reais, empregando de forma direta e indireta mais de três milhões de pessoas.

Dentro deste contexto, a reprodução equina e suas biotecnologias se destacam, pois atuam no melhoramento genético buscando suprir metas de um mercado cada vez mais exigente por animais zootecnicamente superiores. A Transferência de Embriões (TE) é uma biotecnologia aplicada à fêmea equina que tem se destacado nas últimas décadas pelo seu avanço científico e, principalmente, comercial. Ela torna a relação custo e benefício atraente para o criador, pois permite que éguas geneticamente superiores, com grande valor afetivo e/ou consagradas campeãs em suas modalidades esportivas, possam ter mais de um potro por ano. Seguindo esse preceito, a TE tem se tornado comum na criação de equinos, sendo uma biotecnologia promissora para os profissionais que trabalham nesta área.

Apesar deste cenário positivo, éguas com a fertilidade reduzida podem influenciar diretamente o sucesso da técnica, sendo responsáveis por menores taxas de eficiência reprodutiva. Assim, éguas receptoras de embrião que não se tornam gestantes após o programa de TE têm sido objeto de pesquisas, devido ao desafio delas em reconhecerem o embrião da doadora e proporcionarem um ambiente propício para a gestação.

Éguas receptoras inaptas para receber o embrião, com sucessivas perdas embrionárias precoces e/ou que não levam a gestação a termo são consideradas “éguas problema”. Esta nomenclatura tem sido muito utilizada para éguas com histórico conhecido de afecções reprodutivas, como a endometrite, sendo muitas vezes retiradas do programa de TE ao final da estação reprodutiva por não se tornarem gestantes. Entretanto, o alto custo de aquisição e manutenção de éguas receptoras no programa de TE, além da diminuição na relação oferta/procura por estes animais, tem tornado imprescindível o diagnóstico e o tratamento eficientes das éguas com problemas reprodutivos, com intuito de manter estes animais no programa.

A endometrite é considerada a principal causa de subfertilidade em éguas. O diagnóstico preciso e a identificação da causa da inflamação persistente do endométrio são necessários para iniciar o tratamento e ter uma resposta terapêutica eficaz. No entanto, diferentes métodos de diagnóstico da endometrite são utilizados para a avaliação ginecológica, e a melhor forma de diagnosticar com segurança e de forma rápida e prática tal patologia pode ser muitas vezes confusa para o médico veterinário.

Diante disso, objetivou-se com o presente estudo, verificar se a endometrite é a principal causa de problemas reprodutivos em éguas receptoras e conseqüente retirada destes animais do programa de TE, e comparar diferentes métodos de diagnóstico e técnicas de coleta de amostras, a fim de verificar qual método e técnica é mais prática e eficiente para os profissionais que atuam na área.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Transferência de embriões

A transferência de embriões (TE) é uma biotecnologia aplicada comercialmente na reprodução equina, que consiste na colheita de um ou mais embriões de uma égua doadora, por lavado intrauterino transcervical, para transferência não cirúrgica a uma égua receptora previamente sincronizada, que é responsável por gestar (FLEURY *et al.*, 1987; SQUIRES *et al.*, 1999).

A TE é realizada no âmbito comercial no Brasil desde a década de 80, onde teve grande aceitação por parte tanto dos médicos veterinários, quanto dos criadores. A técnica apresenta como vantagens a baixa complexidade em relação às outras técnicas reprodutivas avançadas, permite a obtenção de múltiplos potros de éguas doadoras geneticamente superiores, com grande valor afetivo, impossibilitadas de gestar e/ou consagradas campeãs em suas modalidades esportivas. Éguas receptoras, de menor valor zootécnico e comercial, serão responsáveis por gestar e cuidar dos potros até o desmame (FLEURY *et al.*, 1987; EVANGELISTA, 2012)

Devido às vantagens e a grande aceitação proporcionadas pela TE no Brasil, o país se tornou, junto com os Estados Unidos e Argentina, o maior produtor de embriões equinos do mundo. Há cerca de 40 centros de TE espalhados por todo país, sendo a raça Mangalarga Marchador e Quarto de Milha com o maior número de potros nascidos por TE registrados (FLEURY *et al.*, 1987; SQUIRES *et al.*, 1999; ALVARENGA, 2010; EVANGELISTA, 2012).

Mesmo com a ampla utilização da técnica na espécie equina, esta é considerada incipiente em relação a outras espécies (RIERA, 2009), principalmente pela dificuldade de induzir a superovulação. Além disso, outros fatores também podem influenciar de forma direta ou indireta o sucesso da TE, tais como a fertilidade e a qualidade seminal do garanhão, a técnica utilizada pelo profissional e sua habilidade, e fatores inerentes à fertilidade e manejo das éguas doadoras e receptoras (SQUIRES *et al.*, 1999; CARVALHO, 2000; SQUIRES, 2003; HINRICHS & CHOI, 2005; LIRA *et al.*, 2009).

As éguas receptoras são de extrema importância em um programa de TE, visto que, são as responsáveis por reconhecer o embrião transferido e fornecer as condições necessárias ao seu desenvolvimento (FLEURY *et al.*, 2007). Portanto, a seleção destes animais para aquisição e inclusão no programa de TE pode se

tornar fator importante e determinante para o sucesso da técnica (VANDERWALL & WOODS, 2007; MCKINNON & SQUIRES, 2007).

Critérios de seleção de receptoras devem ser seguidos de forma metódica e minuciosa, abrangendo a idade do animal, sendo preconizados animais na faixa etária de três a dez anos (VANDERWALL & WOODS, 2007; MCKINNON & SQUIRES, 2007), com escore de condição corporal adequado, sendo o ideal o 5 na escala de 1 a 9 (HENNEKE *et al.*, 1983; NRC, 2007), sem histórico reprodutivo de patologias, com ciclos estrais regulares e sem anormalidades em todo o trato reprodutivo, mediante avaliação ginecológica (SQUIRES, 1999; VANDERWALL & WOODS, 2007). Além disto, o estado clínico geral, problemas anatômicos, tamanho do animal e seu comportamento também podem ser considerados fatores excludentes do programa (ALONSO, 2008; RIERA, 2009).

Porém, geralmente o exame ginecológico não é realizado de forma completa, havendo uma grande proporção de éguas aceitas que não estão aptas reprodutivamente (LOSINNO & ALVARENGA, 2006). Isto explica o alto índice de animais retirados do programa por não estarem aptos a receber o embrião no momento da TE ou apresentarem perdas embrionárias precoces sucessivas.

O reconhecimento da gestação e a implantação do embrião na receptora são cruciais para não haver a perda embrionária precoce, porém, mesmo depois de serem aceitas e inseridas nos programas de TE, algumas éguas não estão aptas para receber o embrião durante o processo de seleção para a transferência. Tal processo é considerado fundamental para um programa de TE eficiente, pois pode influenciar diretamente na taxa de prenhez (ALONSO, 2008).

A seleção é baseada em diversos fatores, geralmente averiguados por palpação e ultrassonografia transretal, tais como a sincronia em relação à doadora, ausência de edema endometrial, ausência de fluido intrauterino, e presença de tônus uterino e cervical (ALONSO *et al.*, 2010). Normalmente, a janela de sincronia utilizada é entre o quarto e nono dia após ovulação sem a suplementação exógena de progesterona, alcançando-se taxas satisfatórias de prenhez neste período (ALONSO *et al.*, 2010).

Em torno de 15 a 20% das éguas receptoras são rejeitadas no processo de seleção realizado no momento da TE (SQUIRES, 2003), por isso é recomendado a seleção de no mínimo duas receptoras para cada embrião a ser colhido, uma vez que, podem ocorrer falhas na sincronização e/ou as éguas não estarem com as características ginecológicas adequadas, não sendo possível garantir um melhor

ambiente uterino para o embrião se houver apenas uma égua para seleção (MCKINNON & SQUIRES, 2007).

Segundo LOSINNO & ALVARENGA (2006), deve-se estimar um número de éguas receptoras 50% maior do que o total de gestações desejadas desde o início da estação reprodutiva. Além disto, segundo os autores, devem-se descontar deste número a retirada de receptoras consideradas inaptas após a avaliação de seleção para inclusão (10 a 20%) e a taxa de mortalidade (1 a 2,5%).

Devido ao baixo custo das éguas receptoras em relação as demais categorias de animais, estas quando consideradas inaptas para o programa de TE não passam por um exame ginecológico completo para o diagnóstico e tratamento adequado, visto que, estes podem gerar gastos. Assim, éguas receptoras são muitas vezes consideradas subférteis, sem elucidação da causa, sendo retiradas do programa de TE. No entanto, a aquisição de animais de qualidade é cada vez mais difícil, devido à diminuição da relação oferta e procura, além dos altos custos com manutenção e reposição destes animais no plantel. Portanto, os gastos com o diagnóstico a partir do exame ginecológico e tratamento destes animais podem ser financeiramente viáveis (ALVARENGA, 2010).

Para que o sucesso da técnica seja alcançado, maximizando a taxa de prenhez e reduzindo a perda embrionária, é indispensável o uso de receptoras sadias e aptas ao reconhecimento embrionário e manutenção da gestação. O custo de aquisição e manutenção destas éguas no plantel tem aumentado, e perdas embrionárias precoces e descarte de animais podem representar grandes prejuízos para a propriedade produtora de equídeos.

2. Égua problema

A égua problema, denominação comumente encontrada na prática reprodutiva equina, tem se tornado um desafio para os profissionais que atuam na área. As éguas receptoras que possuem histórico de subfertilidade e sinais clínicos ou laboratoriais de patologias reprodutivas, que apresentam perdas embrionárias sucessivas e não se tornam gestantes, também estão incluídas nesta nomenclatura.

Segundo LEBLANC & MCKINNON (2011), as éguas são reconhecidas com um problema reprodutivo a partir do momento em que não conceberem de um garanhão fértil, em uma fazenda de reprodução bem gerida, em três ou mais ciclos de uma estação reprodutiva, perdem sua gestação antes de 60 dias gestacionais,

e/ou não possuem ciclos normais de estro. Da mesma forma, MCCUE (2008) define as éguas problemáticas, porém insere animais que não possuem sucesso em levar uma gestação a termo, que têm patologias reprodutivas conhecidas ou com problemas relacionados a distúrbios comportamentais reprodutivos.

A fertilidade dos animais pode ser afetada por diversos fatores, tais como a idade, número de partos, anomalias nos órgãos reprodutivos, escore de condição corporal, problemas sistêmicos e até mesmo condições ambientais (LEBLANC & MCKINNON, 2011). Segundo LEBLANC (2008), infecção, inflamação, trauma prévio aos órgãos reprodutivos ou estresse podem interferir na concepção ou manutenção da gravidez. Assim, éguas subférteis apresentam três problemas comuns: (1) acúmulo de líquido intrauterino (LIU) durante ou imediatamente após o estro; (2) infecção de longa duração e/ou inflamação crônica; e (3) ciclos irregulares ou ausência destes. Segundo MCCUE (2008), uma das anomalias reprodutivas mais frequentemente diagnosticadas é a endometrite bacteriana, além da endometrite persistente pós-cobertura e de folículos anovulatórios ou hemorrágicos.

Muitas vezes, uma égua pode ser considerada problema por anos, pois a irritação do endométrio é repetitiva, gerando danos endometriais e acúmulo de líquido (LEBLANC & MCKINNON, 2011). É difícil para o profissional determinar o problema primário responsável pela subfertilidade, sendo indispensável o exame ginecológico completo e minucioso, porém este pode ser realizado utilizando-se de vários exames e metodologias, o que pode complicar ainda mais o diagnóstico correto e o tratamento adequado.

Resolver o problema destas éguas requer persistência e adesão a princípios científicos, necessitando de uma abordagem detalhada durante o exame ginecológico, a fim de proporcionar um diagnóstico, uma terapia e um manejo reprodutivo eficiente (MCCUE, 2008; LEBLANC & MCKINNON, 2011).

3. Endometrite

A endometrite é considerada uma das principais causas da redução de fertilidade, e é a primeira preocupação reprodutiva em éguas, ocorrendo em 25 a 60% de éguas consideradas subférteis (TROEDSSON, 1999; CAUSEY, 2006; LEBLANC *et al.*, 2007; OVERBECK *et al.*, 2011; WOODWARD *et al.*, 2012; KOZDROWSKI *et al.*, 2015). Esta patologia, caracterizada pelo processo inflamatório persistente do endométrio, leva a um ambiente uterino hostil para a

sobrevivência e implantação do embrião, fase lútea encurtada e, conseqüentemente, a incapacidade de gestar (MOREL, 2003; LEBLANC & CAUSEY, 2009).

A endometrite gera um impacto econômico significativo, pois geralmente as éguas com esta patologia exigem uma gestão reprodutiva intensiva e necessitam de mais ciclos para se tornarem gestantes (LEBLANC, 2010), o que gera custos adicionais para o proprietário (AMORIM *et al.*, 2016).

Segundo KATILA (2016), a endometrite, por definição, é inflamação do endométrio, e abrange diferentes tipos de condição, cujas etiologias são diferentes, tais como: (1) endometrite persistente pós-cobertura, que ocorre quando a inflamação persiste após 48 horas do acasalamento; (2) endometrite crônica, causada por inflamação decorrente da infecção por microrganismos; (3) endometrite subclínica, quando os sinais de endometrite são muito sutis e somente os Polimorfonucleados (PMNs) são encontrados; (4) piometra, um tipo extremo de endometrite onde grandes quantidades de material purulento se acumulam no útero; (5) metrite aguda pós-parto, que ocorre durante a primeira semana após o parto; e (6) a endometrite venérea causada pela infecção por microrganismos transmissíveis.

Os microrganismos são os agentes infecciosos causadores da inflamação em todos os tipos de endometrite, exceto da endometrite persistente pós-cobertura, sendo mais comum a infecção por bactérias do que por fungos. As bactérias mais frequentemente isoladas do útero da égua são *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Outras bactérias aeróbias isoladas do útero de éguas incluem *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Actinobacter* spp., *Proteus* spp., e *Citrobacter* spp. (TROEDSSON, 2011).

Apesar da menor incidência, a endometrite fúngica também tem sido reconhecida como uma causa importante de queda na fertilidade, visto que, são mais difíceis de tratar e de pior prognóstico. *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. são os microorganismos mais comumente isolados de éguas com endometrite fúngica (SILVA & ALVARENGA, 2011).

Normalmente, a égua dispõe de mecanismos de defesa físicos, mecânicos e celulares do trato reprodutivo, capazes de eliminar os microrganismos e produtos inflamatórios causadores de endometrite. No entanto, qualquer transposição destas barreiras naturais irá predispor a égua a uma infecção uterina (FERRIS, 2016).

A vulva, o esfíncter vestibulo-vaginal e a cérvix representam três barreiras físicas dos órgãos reprodutivos da égua para prevenir infecções uterinas. Se uma dessas barreiras não é funcional, a égua estará propensa a pneumovagina, podendo levar a aspiração de bactérias e irritação do útero (CANISSO *et al.*, 2016). A depuração uterina a partir das contrações miométriais, o relaxamento da cérvix e a drenagem linfática, são considerados formas de defesa mecânicas (LEBLANC, 2010). Ainda existem as respostas celulares via sistema imunológico, com a mobilização de células de defesa (TROEDSSON, 1999; FERRIS, 2016), também atuando como mecanismo de defesa da égua contra a endometrite.

Existem vários fatores de risco individuais que podem predispor a falha destas defesas, infecção persistente e a endometrite (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2015), tais como: o aumento da idade, que tem sido associado a alterações na resposta imunológica sistêmica, e é um fator que predispõe as éguas a desenvolver infecções uterinas persistentes (ZENT *et al.*, 1998; BARBACINI *et al.*, 2003; WOODWARD *et al.*, 2012); má conformação vulvar (HEMBERG *et al.*, 2005); defeito na contratilidade miométrial (TROEDSSON & LIU, 1993) retardando a depuração uterina; cultura uterina positiva (RIDDLE *et al.*, 2007); retenção de fluido uterino durante o estro (BRINSKO *et al.*, 2003); e o posicionamento ventral do útero (LEBLANC *et al.*, 1998). Tais fatores estão associados a éguas consideradas susceptíveis a endometrite, isto é, animais que não conseguem debelar a inflamação de forma eficiente, o que pode tornar a endometrite infecciosa persistente ou com resolução tardia (CASTRO CHAVES, 2011).

O diagnóstico desta patologia pode ser difícil devido a sua natureza multifatorial, métodos inadequados usados para o diagnóstico e interpretação incorreta dos achados (NIELSEN, 2005; RIDDLE *et al.*, 2007; KOZDROWSKI *et al.*, 2015; CANISSO *et al.*, 2016). Ele deve ser baseado na avaliação ginecológica, que consiste na história reprodutiva da égua, avaliação da conformação perineal, vaginoscopia, exame da cérvix e palpação e ultrassonografia dos órgãos reprodutivos, bem como diagnósticos laboratoriais, incluindo cultura, citologia e histologia endometriais (OVERBECK *et al.*, 2011; FERRIS, 2016).

4. Avaliação ginecológica

A avaliação ginecológica é aplicado à medicina equina com o objetivo de diagnosticar éguas problema e a endometrite, instituir tratamentos e avaliar as respostas terapêuticas. Tal exame também é utilizado para a seleção de receptoras

em programas de TE, pois anormalidades podem até mesmo indicar se este animal permanecerá ou não no programa.

Esta avaliação deve ser realizado antes do início da estação reprodutiva, para compra de animais ou para o diagnóstico de casos de subfertilidade (LINTON & SERTICH, 2016). As éguas receptoras deveriam passar por exames ginecológicos rotineiramente, porém, na maioria das vezes, os exames não são realizados. Sem o diagnóstico preciso do problema e da sua causa muitos animais são tratados de forma empírica, utilizando-se de tratamentos ou protocolos generalistas, possuindo pouca resposta terapêutica, fazendo com que estes animais sejam retirados dos programas de TE e ditos como subférteis.

A avaliação deve ser rigoroso e metódico, compreendendo diferentes métodos de avaliação, incluindo: (1) coleta de dados do animal, tais como idade, escore de condição corporal, histórico reprodutivo e tratamentos já realizados; (2) exame clínico reprodutivo a partir da avaliação da conformação perineal, palpação e ultrassonografia transretal dos órgãos reprodutivos, vaginoscopia e exame da cérvix; e (3) exames laboratoriais, como cultura endometrial com exame de susceptibilidade a antimicrobianos, avaliação citológica endometrial e avaliação histológica de uma amostra de biópsia endometrial (MCCUE, 2008; LEBLANC & CAUSEY, 2009; KOZDROWSKI *et al.*, 2015; KATILA, 2016).

Estes métodos de diagnóstico são realizados durante a avaliação ginecológica para identificar e descartar endometrite, além de detectar a possível causa da subfertilidade (FERRIS, 2016). Outros exames adicionais, menos comuns na prática, também podem ser requeridos em determinados casos, tais como endoscopia do lúmen uterino, testes endócrinos e do cariótipo, porém não são geralmente utilizados em éguas receptoras devido aos elevados custos e complexidade de realização. Como a endometrite é considerada uma patologia local, leucogramas e marcadores inflamatórios não são alterados, exceto na metrite puerperal aguda, não sendo suficientemente sensíveis ou específicos para o diagnóstico (KATILA, 2016).

A utilização de métodos de diagnóstico inadequados durante a avaliação ginecológica, bem como a interpretação incorreta dos resultados, dificultam o diagnóstico preciso da endometrite (NIELSEN, 2005; RIDDLE *et al.*, 2007). Além disso, possíveis resultados falsos positivos ou falsos negativos devem ser tomados em consideração durante a interpretação dos resultados (KOZDROWSKI *et al.*, 2015).

Os métodos de diagnóstico possuem vantagens e desvantagens em relação à praticidade de realização, rapidez em oferecer os resultados, custos e diagnóstico correto. Neste contexto, diferentes trabalhos vêm buscando conciliar e comparar diferentes métodos de diagnóstico, a fim de desenvolver uma forma prática, sensível e específica de diagnosticar a endometrite e outros problemas reprodutivos que levem a éguas problema em um programa de TE. Porém, segundo FERRIS (2016), ainda não há um método que compreenda facilidade de execução, baixo custo e retorne resultados rápidos aos profissionais.

Até o momento, o exame histológico tem sido considerado o mais completo em seus resultados, entretanto muitas vezes pode ser demorado e de difícil execução, sofrendo resistência de alguns profissionais. AMORIM *et al* (2016) sugerem que o uso de múltiplos achados durante o exame ginecológico seja a forma mais eficiente de diagnosticar a endometrite.

A maioria dos casos de éguas problema pode ser resolvido via exame ginecológico completo, que facilita a tomada de decisão do profissional quanto à escolha do tratamento mais eficaz, a fim de maximizar a fertilidade da égua e esta se tornar gestante.

A preparação prévia a avaliação ginecológica é de extrema importância, uma vez que, deve promover segurança a todos os envolvidos com a contenção adequada da égua, e facilitar a execução dos exames. Deve ser iniciada com a organização do material a ser utilizado, sendo que estes devem estar facilmente acessíveis e devidamente armazenados. Fichas para anotações dos resultados podem proporcionar um exame mais metódico, facilitando também o posterior acesso aos dados obtidos, além da padronização dos dados.

A contenção do animal deve ser realizada em tronco individual, de forma a ser possível o isolamento da cauda e higienização do períneo, a fim de minimizar o potencial de contaminação dos órgãos reprodutivos da égua e das amostras coletadas (FERRIS, 2016).

A higienização deve ser realizada com auxílio de lavagens com sabão neutro e água de boa procedência, repetidas de forma suficiente para remover os detritos. A região deve ser seca com toalhas de papel descartáveis. Além disso, um pedaço de algodão umedecido com solução estéril pode ser utilizado para limpar o interior do vestíbulo e remover material fecal e detritos, evitando que sejam indevidamente transferidos para o útero durante o exame (FERRIS, 2016).

4.1. Coleta de dados

4.1.1. Idade

A idade pode desempenhar um papel muito importante na fertilidade e na avaliação de uma égua problema. Éguas idosas ou muito jovens são cada vez mais encontradas em programas de TE, e isto pode comprometer a eficiência desta biotecnologia. Atualmente, grande parte dos animais possui a data de nascimento registrada, entretanto se não for possível o acesso aos dados do animal a avaliação pela cronometria dentária pode ser realizada.

Éguas idosas, utilizadas como doadoras de embriões, são comuns, já que uma das principais formas de seleção destas é pelo seu desempenho atlético. Da mesma forma, é comum ver animais muito jovens, uma vez que, podem possuir grande valor financeiro e/ou afetivo, entrando cada vez mais cedo e permanecendo cada vez mais tempo na reprodução. Assim como as doadoras, éguas receptoras de embriões, devido a sua difícil aquisição e a tentativa de máximo desfrute, também têm entrado cada vez mais cedo e permanecido cada vez mais nos programas de TE, o que pode influenciar na fertilidade destes animais e nos resultados da técnica.

Em sua revisão, MORLEY & MURRAY (2014), relataram que a idade em que a fertilidade de uma égua começa a diminuir varia entre dez a quinze anos, com o risco de perda gestacional aumentando de forma comparável à idade. Éguas idosas podem possuir má conformação do períneo devido à diminuição do tônus muscular, possuindo predisposição a repetidas infecções ascendente. PYCOCK (2006) relata que éguas idosas possuem maior incidência de endometrite devido à prevalência de infecções dos órgãos reprodutivos, podendo assim, causar redução da fertilidade relacionada a menores taxas de sobrevivência embrionária. BALL *et al.* (1987) demonstraram que éguas idosas possuíram resultados de exame histopatológico endometrial com uma maior incidência de doenças inflamatórias, e CARNEVALE *et al.* (2000) demonstraram que éguas receptoras idosas tiveram o impacto destas anormalidades uterinas no período de 12 a 50 dias gestacionais.

Éguas idosas também podem ter complicações relacionadas à grande manipulação reprodutiva, além de poder sofrer uma variedade de disfunções reprodutivas, como alterações uterinas (LEBLANC & MCKINNON, 2011), disfunções endócrinas (CARNEVALE *et al.*, 1994) e de má conformação perineal (PASCOE, 1979). Estes fatores estão interligados e podem ocorrer de forma

associada em um mesmo animal, com consequente redução da eficiência reprodutiva (ROSSI, 2014).

Éguas muito jovens também podem diminuir a eficiência do programa, uma vez que a imaturidade uterina destas está relacionada a altas taxas de perdas gestacionais (ROSSI, 2014). A puberdade não deve ser confundida com a maturidade sexual em éguas jovens, pois éguas que ainda não atingiram a maturidade podem ser subférteis, além de haver influência da raça na idade de maturação sexual, com algumas raças amadurecendo numa idade mais avançada do que outras (HENINGER, 2011).

4.1.2. Escore de condição corporal

O escore de condição corporal (ECC) é um método subjetivo de avaliação do nível de gordura corporal do animal, utilizado como fator de resposta em estudos sobre nutrição animal, fisiologia e reprodução (VECCHI *et al.*, 2010). É um parâmetro de fácil julgamento, não invasivo e sem custo, e é determinado pela visualização e palpação de determinadas áreas corporais específicas, avaliando-se a deposição de gordura corporal e atribuindo-se de notas em uma escala.

Tal método avalia a gordura subcutânea do corpo e, portanto, o balanço energético do animal, representando sua condição corporal (CHRISTIE *et al.*, 2006). Outras técnicas, como a medição da espessura de gordura por ultrassom, possuem a vantagem de proporcionar uma medida objetiva, mas requerem o uso de instrumentos apropriados e tempos de execução mais longos (VECCHI *et al.*, 2010). BURROWS *et al.* (2013), comparando o ECC com a quantidade interna de gordura de carcaças, demonstraram que há forte relação entre estes dois parâmetros em vários tipos de raças equinas, com o ECC sendo uma forma de avaliação segura e eficaz.

Diversos fatores podem afetar de forma direta e indireta o ECC, tais como: a intensidade e frequência de exercícios; patologias clínicas, principalmente doenças metabólicas, problemas parasitários e dentários; além da disponibilidade de alimentos e manejo nutricional (RODRIGUES, 2009). BUFF & MORRISON (2005) sugerem que a leptina é um sinalizador cerebral do estado nutricional do animal, e responde ativamente às alterações do organismo animal. As concentrações de leptina variam de acordo com o ECC (FRANK, 2009).

HENNEKE *et al.* criaram em 1983, uma das escalas de pontuação mais utilizadas na espécie equina para determinar a influência da condição corporal

sobre o desempenho reprodutivo de éguas. A escala pontua os animais de acordo com a visualização e palpação da cernelha, costelas, processos espinhosos lombares, inserção da cauda, do bordo dorsal do pescoço, da parte posterior das escápulas, atribuindo assim pontuações de 1 a 9 (Anexo 1).

O ECC de uma égua destinada à reprodução pode ser um indicador importante da sua saúde geral e fertilidade (MORLEY & MURRAY, 2014). RODRIGUES (2009), em sua revisão relatou que ECC das éguas pode afetar a eficiência reprodutiva, incluindo a taxa de concepção, duração do ciclo estral e perdas embrionárias (HENNEKE *et al.*, 1983; HINES *et al.*, 1987; GASTAL *et al.*, 2004).

São indesejáveis pontuações extremas de ECC, pois podem afetar tanto a saúde quanto a eficiência reprodutiva (VICK *et al.*, 2007), sendo a pontuação ideal, de acordo com o NRC (2007) a 5. Éguas com ECC baixo, isto é, menor que 5 segundo a escala de HENNEKE *et al.* (1983), podem ter sua fertilidade afetada devido a maturação incompleta de folículos, atraso no início dos ciclos na estação reprodutiva, ciclos irregulares e/ou menores taxas de concepção (MORLEY & MURRAY, 2014).

Da mesma forma, autores sugerem que a obesidade causa desempenho reprodutivo anormal na égua (MORLEY & MURRAY, 2014). O número de éguas com sobrepeso tem acompanhado uma tendência de aumento semelhante à de humanos segundo JOHNSON *et al.* (2009), em que a incidência de obesidade e seus distúrbios metabólicos associados aumentaram em ambas as espécies.

De acordo com RICH & BREUER (2002), para se alcançar uma máxima fertilidade, é essencial uma dieta e ECC adequado, que podem ser alcançados através de um manejo nutricional eficiente.

4.1.3. Histórico reprodutivo

O histórico reprodutivo completo de uma égua é importante na identificação de causas atuais da subfertilidade e na prevenção de problemas futuros (MCCUE, 2008). A primeira avaliação de uma égua não pode ser adequadamente realizada sem um histórico completo e preciso de todo seu desempenho reprodutivo (ZENT, 2011). Discutir diagnósticos e tratamentos anteriores com os profissionais responsáveis pelo animal pode fornecer uma visão mais ampla sobre a causa do problema reprodutivo, e fornecer informações valiosas a serem consideradas para a tomada de decisão (LEBLANC, 2008).

Anotações diárias e detalhadas da vida reprodutiva de uma égua podem fornecer informações úteis durante um exame ginecológico, é de extrema importância um acesso prático e rápido dos dados dos animais.

Os dados devem ser anotados em fichas, para que sirvam de referência para um exame metódico e completo, e para exames futuros. Resultados de exames citológicos, histológicos e culturas uterinas podem auxiliar na compreensão da evolução da endometrite, além de demonstrar as respostas de diferentes terapias as quais as éguas já foram submetidas.

O número de estações reprodutivas e a categoria em que as éguas pertenciam (matriz, doadora ou receptora) podem sugerir o grau de manipulação destas éguas, sendo um fator a ser considerado como possível causa de problemas reprodutivos. Além disso, distocias anteriores podem ser as causas de problemas cervicais e lesões vaginais, que podem levar ao comprometimento das funções de proteção realizadas por estes órgãos.

Os procedimentos cirúrgicos reprodutivos, tais como correções no períneo e presença de vulvoplastia, remoção de um ovário ou uma cesariana, são partes importantes de informações que podem afetar o desempenho durante a época de reprodução (ZENT, 2011). Animais que foram submetidos a longos tratamentos clínicos, elevadas cargas de treinamento, levando ao estresse, ou até mesmo o uso de drogas anabolizante e esteroides devem ser averiguados, pois podem comprometer direta ou indiretamente o desempenho reprodutivo.

Em 1989, WILLIAMSON *et al.*, relataram que o histórico reprodutivo de uma égua pode ser mais sensível e específico que achados histológicos na predição da sensibilidade ou resistência desta fêmea à endometrite, demonstrando, assim, a importância do histórico reprodutivo durante o exame ginecológico.

4.2. Exame clínico reprodutivo

4.2.1. Conformação do períneo

A área que envolve a vulva e o ânus, denominada de períneo, pode apresentar alterações de conformação anatômicas significantes, predispondo o animal à pneumovagina ou à urovagina, o que poderá levar a alterações da fertilidade devido a infecções uterinas ascendentes (BRADECAMP, 2011). O exame da conformação do períneo é realizado por meio de palpação, visualização e mensurações, sendo prático e simples de realizar.

A vulva deve ser avaliada durante o exame, pois esta é considerada a primeira barreira física para a prevenção da contaminação dos órgãos reprodutivos por organismos patogênicos (MCCUE, 2008, CANISSO *et al.*, 2016). Os lábios vulvares devem promover o fechamento adequado para evitar a entrada de contaminantes, e a vulva deve ser orientada verticalmente com pelo menos dois terços do comprimento vulvar localizado abaixo da borda pélvica (PASCOE, 1979, CANISSO *et al.*, 2016). A inclinação vulvar secundária à regressão do ânus e/ou baixo tônus muscular da região perineal pode predispor a égua a uma infecção ascendente do útero (BRADECAMP, 2011).

Outro método de avaliação consiste na separação física dos lábios vulvares e identificação de qualquer ruído de ar sendo aspirado para dentro da vagina. Conhecido como teste de sucção de ar ou *windsuck*, este teste avalia se os lábios vulvares estão promovendo fechamento adequado e, além disso, se o esfíncter vestibulo-vaginal é incompetente, pois se o profissional for capaz de visualizar diretamente a vagina e a cérvix, é sinal que este não está promovendo fechamento adequado (CANISSO *et al.*, 2016). Traumas na vulva e diminuição do tônus muscular com a idade podem levar a um comprometimento do fechamento vulvar e predisposição para pneumovagina e *windsuck* positivo (MCCUE, 2008).

Mensurações do comprimento efetivo (distância entre a comissura vulvar dorsal até o nível do assoalho da pelve, em centímetros) e do ângulo de inclinação da vulva em relação a vertical, são realizadas durante o exame com vulvômetro adaptado de PASCOE (1979). A partir destes resultados, o Índice de Caslick (IC) pode ser calculado, multiplicando-se o comprimento efetivo pelo ângulo de inclinação da vulva. Um valor maior que 150 indica a necessidade de uma vulvoplastia (BRADECAMP, 2011). Também deve ser realizada a mensuração do comprimento total da comissura vulvar, que compreende a distância em centímetros entre a comissura vulvar dorsal e ventral.

Tem sido relatado que a conformação do períneo sofre influência hereditária, da idade, do ECC e/ou do número de partos (CASLICK, 1937; PASCOE, 1979; MCCUE, 2008; INOUE & SEKIGUCHI, 2017). Quando diagnosticada uma má conformação perineal, seja por qualquer um destes fatores, o profissional pode prever problemas reprodutivos associados à contaminação ascendente do útero e a predisposição da égua à endometrite infecciosa e, conseqüentemente, subfertilidade (CASLICK, 1937; HEMBERG *et al.*, 2005; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2015).

4.2.2. Palpação e ultrassonografia

A palpação e a ultrassonografia transretal são os exames comumente realizados na prática reprodutiva equina, sendo muitas vezes o primeiro indicador de uma égua problema. O objetivo do exame é identificar características do trato reprodutivo, determinar o estágio do ciclo estral e identificar possíveis anormalidades.

A palpação transretal dos órgãos reprodutivos da égua fornece informações importantes quanto à forma e função destes. O objetivo deste exame não é apenas localizar e identificar os órgãos reprodutores, mas avaliar e realizar uma interpretação dos dados (BOWMAN, 2011). Tamanho, forma e turgidez de folículos no ovário são usadas, por exemplo, para identificar estruturas anormais, como os folículos anovulatórios ou tumores (LEBLANC, 2008).

A palpação é frequentemente realizada em conjunto com a ultrassonografia transretal. Embora o ultrassom seja a principal ferramenta de diagnóstico utilizada na prática reprodutiva, a palpação manual pode identificar características que não podem ser detectadas por ultrassonografia, incluindo o tônus uterino e cervical (MCCUE, 2008).

Com o auxílio da ultrassonografia, é possível detectar e classificar o edema endometrial; a presença de LIU; cistos endometriais e gestação (GINTHER & PIERSON, 1984; KATILA, 2016).

O edema endometrial anormal, e o LIU são os principais achados clínicos sugestivos de endometrite na ultrassonografia. O LIU resulta da falha na depuração do conteúdo uterino e o edema endometrial anormal da inflamação persistente. Ambos estão associados à redução da fertilidade e nos fornecem informações importantes sobre presença e a gravidade da endometrite (LIU & TROEDSSON, 2008; CANISSO *et al.*, 2016). RASMUSSEN *et al.* (2015) demonstraram que éguas com edema anormal foram 5,48 vezes mais propensas a uma cultura positiva do que as éguas com edema endometrial normal.

Além de achados clínicos, inconsistências no crescimento folicular, na ovulação, no padrão de edema uterino e relaxamento cervical, podem ser indicativos da causa de subfertilidade. Porém, LEBLANC & CAUSEY (2009) relataram uma endometrite que não demonstrava sinais nestes exames, denominada de endometrite subclínica. Assim, o diagnóstico da endometrite não pode se basear apenas nestes parâmetros.

4.2.3. Vaginoscopia

O exame visual da vagina com auxílio de um espéculo é chamado de vaginoscopia, e é elemento essencial em um exame de rotina reprodutiva, além disso, deve ser sempre realizado em éguas consideradas subférteis ou problema. Quando realizado corretamente, pode fornecer informações sobre a presença de anormalidades como traumas, o estado fisiológico do ciclo estral, avaliar a integridade do esfíncter vestibulo-vaginal, detectar a presença de líquidos como pus ou urina na vagina, ou discrepâncias entre o relaxamento cervical e estágio do ciclo, além da cor e umidade da mucosa vaginal identificadas visualmente (LEBLANC, 2008; MCCUE, 2008; ZENT & STEINER, 2011).

Para o exame a contenção adequada da égua é de primordial importância, pois algumas éguas sentem-se incomodadas. Além do espéculo de metal, como os desenvolvidos por Caslick e Polansky, outros equipamentos podem ser utilizados com a mesma finalidade, como o vaginoscópio e espéculos de papelão descartável ou vidro. Porém, o espéculo de metal possui a vantagem de fornecer excelente visibilidade da vagina anterior, da cérvix e de toda a mucosa. No entanto, é mais difícil sua esterilização, devido ao seu tamanho, além de ser mais caro do que outros tipos. Todos estes tipos de espéculos requerem alguma forma fonte de luz para melhor visualização da vagina, (ZENT & STEINER, 2011).

O espéculo deve ser lubrificado com gel estéril e introduzido fechado, lateralmente e acompanhando a angulação da vagina, sem força excessiva. Depois de introduzido, este deve ser aberto cuidadosamente, observando a presença de descargas ou fluídos. A parte caudal da cérvix e seu óstio externo servem de ponto de referência, porém a sua posição varia com a estação, o estágio do ciclo estral, o estado de gestação e a presença de infecção (MCCUE, 2008).

A avaliação da posição e do tônus da cérvix podem predizer a fase do ciclo estral da égua em condições normais. No diestro apresenta tônus e fica longe do assoalho vaginal, enquanto no estro fica flácida e disposta sobre o assoalho vaginal. Discrepâncias entre as características da cérvix e a fase do ciclo estral, comprovada mediante palpação e ultrassonografia transretal, podem demonstrar sinais de inflamação, por exemplo, quando está com tônus e localizada fora do assoalho vaginal durante o estro, podendo ser um sinal de endometrite (LEBLANC, 2008, ZENT & STEINER, 2011).

Líquidos de diferentes naturezas podem ser observados dentro da vagina durante o exame. Material purulento pode ser indicativo de vaginite e, quando originário da cérvix durante o estro é geralmente sinal de endometrite. Ocasionalmente, a retenção de urina na vagina (urovagina) é visto em éguas mais velhas, multíparas e/ou com baixa condição corporal, pois estas muitas vezes possuem uma angulação do assoalho vaginal que não permite total eliminação da urina. Em casos graves, a urina pode fluir para o útero através da cérvix aberta, e ocasionar endometrite e cervicite (MCCUE, 2008, ZENT & STEINER, 2011).

Adesões, lacerações e sinais de traumas devem ser observados em toda vagina, esfíncter vestibulo-vaginal e cérvix, além da coloração da mucosa, pois éguas com endometrite podem ter um a cérvix hiperêmica (MCCUE, 2008). O esfíncter vestibulo-vaginal é a única barreira que permanece funcional enquanto a égua está no estro e ajuda a prevenir a aspiração de ar e detritos para a vagina anterior. No entanto, é também um local comum para lacerações durante o parto, e sua integridade e competência deve ser avaliada no exame. Esta integridade pode ser observada desde a introdução do espécuro, que deve sofrer resistência durante sua introdução e saída da vagina (ZENT & STEINER, 2011; CANISSO *et al.*, 2016).

O hímen persistente também pode ser encontrado durante o exame. Este está localizado na junção do vestibulo com a vagina, aproximadamente 6 a 8 cm distante da vulva. O hímen pode ser completo, ocluindo toda a abertura vestibular-vaginal, resultando em um acúmulo de muco e detritos celulares, ou pode ser uma membrana parcial (MCCUE, 2008).

4.2.4. Exame da cérvix

O exame manual da cérvix consiste na palpação do orifício externo e canal cervical, podendo trazer informações úteis durante o exame ginecológico. Tal exame é de fácil execução e baixo custo, porém muitas vezes é negligenciado ou esquecido, embora anormalidades cervicais sejam causa comum de infertilidade crônica.

A palpação é realizada com auxílio de luva adequadamente lubrificada com produto estéril e, após a abertura da vulva e introdução da mão na vagina, deve-se palpar a parte externa da cérvix. Após este procedimento, o dedo indicador deve ser introduzido no orifício cervical e pesquisar a presença de anormalidades e defeitos anatômicos nesta estrutura (LEBLANC, 2008).

Defeitos anatômicos como fibroses, aderências, divertículos e tortuosidades podem comprometer sua função de proteção física e auxílio na limpeza uterina, podendo levar a subfertilidade e a éguas com problemas reprodutivos. Fibroses cervicais, por exemplo, são causas importantes de subfertilidade e podem ser difíceis de diagnosticar. Assim, um veterinário pode tratar repetidamente infecções, sem perceber que a causa primária da subfertilidade é uma cérvix fibrótica (LEBLANC, 2008).

Manipulações reprodutivas repetidas por anos ou com técnica inadequada podem ser causas de problemas cervicais. Problemas obstétricos durante parto também podem resultar em traumas, fibrose ou adesões entre o óstio externo e a vaginal, ou dentro do próprio canal cervical. Éguas afetadas podem ter infecção ou acúmulo de fluido intrauterino, apesar do tratamento repetido com antimicrobianos, ou histórico de morte embrionária ou aborto, se tornando éguas problema (MCCUE, 2008).

4.3. Exames laboratoriais

4.3.1. Técnicas de coleta de amostras

A coleta de amostras uterinas é realizada de maneira transcervical a partir de diferentes técnicas, tais como coletores comerciais do tipo *swab* (CCS) ou escova citológica (CCE), lavado intrauterino de baixo volume (LBV) e biópsia endometrial (BE), sendo que todas permitem a coleta de material uterino com segurança (BALL *et al.*, 1998; CARD, 2005; COCCHIA *et al.*, 2012; FERRIS, 2016).

Antes da coleta de material para os exames laboratoriais, seja qual for o método utilizado, é fundamental que seja determinado por ultrassonografia se o animal não está gestante, visto que, os procedimentos são considerados invasivos (MCCUE, 2008).

- Coletores comerciais duplamente guardados

Os coletores comerciais (CC) estéreis considerados duplamente guardados, isto é, que são protegidos de contaminação vaginal e ambiental por uma proteção plástica externa e um tubo plástico onde se encontra a haste coletora, são fabricados por diferentes empresas. Antes dos CC, eram usados *swabs* e escovas citológicas não guardadas ou não protegidas, o que levava a grande porcentagem de contaminação, principalmente cervical.

A haste coletora pode ser do tipo *swab*, que é baseada em um algodão esterilizado na sua extremidade, ou do tipo escova citológica, baseada em uma escova com cerdas de *nylon* estéreis em vários sentidos.

Os CC, seja CCS ou CCE, são considerados o método de coleta de amostras mais rápido (KOZDROWSKI *et al.*, 2015). Uma vez introduzido na vagina, este é inserido na cérvix, com auxílio do dedo indicador do manipulador, onde é rompida a proteção plástica externa. O coletor é conduzido no sentido cranial e adentra o lúmen uterino, onde é exposta a haste interna de dentro do tubo plástico, entrando em contato com endométrio. Movimentos rotatórios podem ser realizados para uma melhor amostragem. Posteriormente, a haste interna retorna para o tubo, onde são removidos.

Ambos os coletores, CCS e CCE, podem ser usados tanto para o exame citológico, quanto para cultura uterina, possuindo vantagens e desvantagens dependendo do exame. Existe uma concordância entre autores que a técnica de CCE é preferível à técnica de CCS para o exame citológico, uma vez que, o limiar para a determinação da inflamação é diferente, já que CCE produz maior celularidade e, conseqüentemente, maior predominância de PMNs são coletados (WALTER *et al.*, 2012; KOZDROWSKI *et al.*, 2013; CANISSO *et al.*, 2016).

O CCE possui fibras relativamente rígidas que permitem a raspagem da superfície do endométrio e coleta de células inflamatórias infiltradas, coletando amostras celulares mais profundas em comparação as demais técnicas, além de que, o CCS quando utilizado para exame citológico, é mais propenso a alterar a conformação das células (MARTIN-HIRSCH *et al.*, 2000; COCCHIA *et al.*, 2012; KOZDROWSKI *et al.*, 2015).

Para obtenção de amostra para cultura endometrial, a técnica de amostragem mais comumente usada é a com auxílio do CCS, que tem as vantagens de ser barato, prático e seguro de usar, sendo utilizado rotineiramente em grandes centros reprodutivos e à campo (LEBLANC, 2008; CANISSO *et al.*, 2016).

A principal desvantagem de CC é o contato com uma área relativamente pequena do endométrio, de aproximadamente 1 a 2 cm² cranial a cérvix, produzindo amostras possivelmente não representativas do endométrio como um todo (LEBLANC, 2010; LINTON & SERTICH, 2016).

- Lavado intrauterino de baixo volume (LBV)

A técnica de LBV foi descrita primeiramente em 1988, por BALL *et al.*, com intuito de ser utilizada para os exames de cultura e citologia uterina. Esta técnica de coleta de amostra consiste na infusão de um pequeno volume de solução estéril (60 a 150 mL) no útero via uma sonda estéril (LEBLANC *et al.*, 2007).

Após a infusão, o fluido é distribuído por todo o útero através de manipulação transretal uterina e o efluente é então coletado por fluxo gravitacional ou sucção, podendo ser auxiliado por administração intravenosa de ocitocina. O efluente é então centrifugado e o sedimento resultante é submetido aos exames (LINTON & SERTICH, 2016).

Geralmente o LBV é realizado antes da BE, pois segundo LINTON & SERTICH (2016), o uso da técnica não afeta a classificação da biópsia endometrial se o intervalo das coletas não ultrapassar 15 minutos, uma vez que, a ativação da cascata do complemento, uma das causas incitantes da infiltração neutrofílica na resposta do endométrio à manipulação, ocorre em 1 hora após o insulto inicial (GUYTON & HALL, 1996).

A técnica também permite a avaliação do efluxo resultante do lavado, diminuindo a taxa de falsos positivos se houver a incorporação de testes adicionais que possam indicar a inflamação, tais como, a aparência de efluxo, o pH e/ou a presença de detritos, o que aumenta ainda mais a sensibilidade deste método de diagnóstico (LEBLANC *et al.*, 2007; COCCHIA *et al.*, 2012). Quanto à celularidade e a presença de secreção ou muco, o efluxo pode ser classificado em normal, quando limpo e translucido, ou anormal, quando turvo/nublado, purulento ou com muco (LEBLANC *et al.*, 2007).

A presença de células vaginais em amostras de coletas realizadas por esta técnica confirma que esta deve ser considerada uma técnica semiprotégida. Assim, a contaminação da sonda ou cateter uterino com flora vaginal, ou até mesmo contaminações ambientais, pode ser uma fonte de resultados de cultura falsos positivos (COCCHIA *et al.*, 2012). A opção seria a técnica de LBV duplamente protegida descrita por BRANDIS *et al.* (2010), que envolve um tubo estéril, uma proteção plástica estéril e um espéculo de aço estéril. Segundo CHRISTOFFERSEN *et al.* (2015), o uso de tal sistema é considerado vantajoso para o trabalho de campo, podendo ser conduzido por uma única pessoa.

A grande vantagem da técnica de LBV, seja protegida ou não, é permitir a amostragem de uma área maior do endométrio, mais representativa do que os

coletores comerciais ou BE, uma vez que as infecções podem ser focais e não difusas em todo o endométrio (LEBLANC, 2008). Em casos de éguas que foram consideradas negativas para o crescimento bacteriano a partir de CCS, mas que possuem sinais de endometrite, tais como LIU, PMNs no exame histológico e/ou edema uterino exagerado, LBV pode ser utilizado para aumentar as chances de isolamento de microorganismos uterinos e proporcionar o exame de susceptibilidade a antimicrobianos (LINTON & SERTICH, 2016).

Em contraste à vantagem de permitir o aumento da área de amostragem do endométrio, a coleta celular é diluída no conteúdo luminal, muco e/ou exsudados de uma grande superfície uterina (COCCHIA *et al.*, 2012). Mas a principal desvantagem do LBV é em relação à praticidade, uma vez que, é necessária uma etapa extra, envolvendo a centrifugação e subsequente suspensão celular, além da utilização de mais instrumentos em comparação com as demais técnicas. (COCCHIA *et al.*, 2012).

- Biópsia endometrial (BE)

A técnica de BE envolve a coleta de um pequeno fragmento de endométrio para avaliação histológica, sendo considerado um procedimento confiável e seguro para o diagnóstico e prognóstico da endometrite (SCHOON *et al.*, 1997; KELLER *et al.*, 2004).

O fragmento é coletado utilizando-se de uma pinça adequada, como a de Yeoman, que ultrapassa a cérvix, de forma protegida ou não, adentrando o lúmen uterino. Então, esta é aberta, e com auxílio da manipulação retal, é apreendido um fragmento da parede uterina, que é exteriorizado após tração no sentido caudal da pinça.

A partir do fragmento coletado pode ser realizado, além do exame histológico, o exame de cultura, com a aplicação deste em um meio de cultura, e citologia uterina, realizando o *imprint* do fragmento na lâmina.

Algumas observações indicam que uma amostra de biópsia não é totalmente representativa de todo o útero (DYBDAL *et al.*, 1991; FIALA *et al.*, 2010), podendo ser vantajosa a coleta de múltiplas amostras em algumas éguas (MCCUE, 2008). Em contraste com estas observações, OVERBECK *et al.* (2013) não encontraram diferenças significativas nos números de PMNs em material de biópsia coletado *post-mortem* de diferentes localizações do útero equino. Desta forma, ainda não

existe um consenso nesta área de pesquisa que precisa ser investigada (OVERBECK *et al*, 2011).

4.3.2. Citologia endometrial

A avaliação citológica uterina de éguas envolve a coleta e interpretação das células que revestem o útero e seu lúmen (MCCUE, 2008). O exame é frequentemente realizado na rotina de éguas destinadas a reprodução, sendo junto com a cultura uterina, o mais utilizado para o diagnóstico da endometrite (LEBLANC, 2008). Isto se dá devido a sua maneira rápida de diagnosticar inflamação endometrial, uma vez que demonstra resultados pouco tempo após a coleta da amostra, além de ser relativamente barato e fácil de executar (KOZDROWSKI *et al.*, 2015; CANISSO *et al.*, 2016).

O diagnóstico da endometrite pode ser realizado em muitos casos com base em resultados da citologia, e a terapia adequada pode começar antes mesmo da obtenção do resultado completo do exame ginecológico (FERRIS, 2016). Porém o exame tem como desvantagem não fornecer informações suficientes sobre a causa de inflamação (KOZDROWSKI *et al.*, 2015).

Após a coleta da amostra, seja qual for o método utilizado, é recomendado fazer imediatamente o esfregaço (LEBLANC, 2011). As lâminas com os esfregaços devem ser deixadas secar ao ar ou, se a coloração for após 12h da coleta das amostras, utiliza-se um fixador para manter a arquitetura celular (FERRIS, 2016).

Lâminas secas ao ar têm menor perda de células em comparação as demais, contudo, o detalhe celular pode ser comprometido. As amostras fortemente contaminadas por muco quando secas ao ar, podem ter a identificação das células difícil de ser realizada e, nestes casos, é aconselhado utilizar o fixador, que preserva o detalhe celular (LEBLANC, 2011). Em seguida, procede-se com a coloração da lâmina, podendo ser utilizada, por exemplo, a coloração de Romanowsky.

De acordo com FERRIS (2016), a avaliação das lâminas deve ser sistemática e minuciosa, sendo realizada primeiramente com baixa ampliação para determinar se há celularidade suficiente para fornecer interpretação precisa. Se a amostra for determinada como sendo de qualidade, a lâmina é então avaliada a uma ampliação de 400 vezes e 1000 vezes em imersão de óleo, em múltiplos campos, examinando a presença de células epiteliais uterinas, glóbulos brancos,

detritos, glóbulos vermelhos, bactérias, leveduras, organismos fúngicos e espermatozoides.

As amostras com poucas células, não podendo fornecer um resultado preciso, não devem ser avaliadas. Sangue nas amostras devido ao uso agressivo de CCE, por exemplo, podem resultar em eritrócitos e PMNs no esfregaço, dificultando a interpretação dos resultados (WALTER *et al.*, 2012).

A avaliação da inflamação em esfregaços citológicos baseia-se principalmente em dois métodos: (1) na determinação do número de PMNs por campos de alta potência e (2) porcentagens de PMNs, presentes em relação às células endometriais. O PMN mais comumente encontrado e utilizado para tal avaliação é o neutrófilo, porém em alguns casos podem ser encontrados também eosinófilos. Assim, o método escolhido para a avaliação pode ter um grande impacto nos resultados, independentemente da forma de coleta da amostra (KOZDROWSKI *et al.*, 2015), porém ainda não há um consenso acerca dos critérios de leitura para interpretação dos resultados, sem haver um padrão de método a ser seguido (CARD, 2005; COCCHIA *et al.*, 2012; KOZDROWSKI *et al.*, 2015).

- PMNs por campo de alta potência

RIDDLE *et al.* (2007) determinaram que dez campos de alta potência (em aumento de 400 vezes) de cada esfregaço fossem escolhidos aleatoriamente e avaliados, sendo o número médio de PMNs encontrado entre eles o resultado, que serviria como avaliação da gravidade da inflamação no endométrio da seguinte forma: 0 a 2 sem inflamação; 2 a 5 inflamação moderada; maior que 5 inflamação grave.

LEBLANC (2011) e COCCHIA *et al.* (2012), estipulam a mesma classificação de RIDDLE *et al.*, porém outros autores utilizam de diferentes formas de mensuração da gravidade da inflamação. CARVALHO *et al.* (2011), classificaram como leve os graus de 1 a 2, moderada para os graus de 3 a 5 e intensa para os graus maiores que 5, enquanto REILAS & KATILA (2002) classificaram de 1 a 10 a inflamação leve, maior que 10 como inflamação moderada e aquelas com grandes aglomerados como uma inflamação intensa.

- Porcentagem de PMNs em relação às células epiteliais

A porcentagem de PMNs em relação às células epiteliais é determinada pela contagem de 200 a 400 células totais à microscopia, sem levar em conta o número de campos. Esta técnica tem sido considerada mais adequada, uma vez que,

diferentes celularidades, de diferentes métodos de coleta de material, são avaliados com mesmo critério.

Porém, a porcentagem mínima de PMNs para a égua ser considerada com inflamação e estipular a gravidade do processo quando este presente, ainda difere entre estudos. Isto ocorre devido à falta de consenso sobre o valor fisiológico de PMNs durante a fase de estro, uma vez que, nesta fase a migração de neutrófilos para o lúmen uterino é maior devido à predominância do estrogênio.

As porcentagens mínimas para a determinação da inflamação variam de acordo com diferentes autores, de 0,5 a 5% (LEBLANC, 2011). A porcentagem mínima de 0,5% foi descrita (DIGBY & RICKETTS, 1982; NIELSEN, 2005; RIDDLE *et al.*, 2007; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2015), classificando a endometrite em: negativa menor que 0,5%; leve 0,5 a 5%; moderada 5 a 30%; e grave maior que 30% (RICKETTS & MACKINTOSH, 1987; FALOMO *et al.*, 2006). Outros autores estipulam a porcentagem mínima em 1% (LEBLANC *et al.*, 2007; AMORIM *et al.*, 2016) ou 2% (BALL *et al.*, 1988; AGUILAR *et al.*, 2006; OVERBECK *et al.*, 2011, 2013; CARD *et al.*, 2004; KOZDROWSKI *et al.*, 2015).

KOZDROWSKI *et al.* (2015), comparando os dois critérios de avaliação, porcentagem de PMNs e o número de PMNs em campos de alta potência, encontraram um diagnóstico mais sensível de endometrite nos esfregaços avaliados de acordo com a porcentagem de PMNs.

Ainda não há um consenso quanto às diretrizes da interpretação dos resultados (OVERBECK *et al.*, 2011; CARD, 2005; COCCHIA *et al.*, 2012). A consequência disto podem ser resultados falsos positivos e falsos negativos e a terapia inadequada, que tem um impacto negativo nos resultados do tratamento e na taxa de fertilidade dos animais (KOZDROWSKI *et al.*, 2015).

4.3.3. Cultura microbiológica uterina

A cultura de microrganismos após coleta de amostras intrauterinas é comumente utilizada na medicina reprodutiva equina, pois é prática e simples de realizar, além de ser barata. O isolamento de microrganismos durante este exame foi sempre associado com a diminuição das taxas de prenhez, independentemente dos achados citológicos, fazendo com que este tipo de diagnóstico seja muito importante durante o exame ginecológico para descartar ou não a endometrite infecciosa (LEBLANC, 2008).

No laboratório, as amostras obtidas dos diferentes métodos de coleta são aplicadas em placas de meios de cultura de forma a evitar a contaminação ambiental usando técnicas laboratoriais padrão. As amostras devem ser incubadas em ambiente aeróbico em 37 °C por até 48 horas, visto que, microrganismos anaeróbios não são importantes na endometrite equina (RICKETTS & MACKINTOSH, 2016). As culturas são examinadas após 24 e 48 horas (RICKETTS, 2011).

O crescimento bacteriano geralmente é detectado dentro de 48 horas, enquanto fungos requerem vários dias para crescer (MCCUE, 2008). O diagnóstico é baseado no tamanho da colônia, morfologia, pigmentação e hemólise, e um técnico experiente deve ser capaz de identificar a maioria dos patógenos aeróbicos equinos por sua aparência. Para facilitar a identificação, boa técnica de inoculação é necessária para permitir uma separação adequada da colônia (RICKETTS, 2011; KATILA, 2016).

Meios de cultura especiais e testes podem ser usados para uma melhor identificação, como por exemplo, ágar de seleção cromogênica, em que os substratos cromogênicos são incorporados e liberam corantes coloridos específicos quando hidrolizados por enzimas de determinados microrganismos patogênicos (BEEHAN E MCKINNON, 2009; KATILA, 2016).

As colônias também podem ser contabilizadas e classificadas em Unidades Formadoras de Colônia (UFC), segundo REILAS & KATILA (2002), em: 0 UFC, nenhum crescimento; 1 a 10 UFC, baixo crescimento; 11 a 100 UFC, moderado crescimento; e maior que 100 UFC ou impossível contar, grande crescimento.

Os microrganismos mais frequentemente isolados de éguas com infecção uterina incluem bactérias e fungos. As bactérias são mais comumente isoladas do que os fungos, sendo a *Streptococcus zooepidemicus* a mais isolada, seguida da *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (MCCUE *et al.*, 1991; RICKETTS *et al.*, 1993; MCCUE, 2008; RICKETTS, 2011; RIDDLE *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2010). No entanto, outros estudos relataram a *Escherichia coli* como a principal bactéria isolada (LEBLANC *et al.*, 2007; CHRISTOFFERSEN *et al.* 2015).

Várias espécies de fungos também já foram isoladas, porém *Candida* spp. E *Aspergillus* spp. são as mais comuns (LEBLANC, 2008; SILVA & ALVARENGA, 2011). Outras bactérias aeróbias isoladas de órgãos reprodutivos de éguas, porém

menos comuns, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Actinobacter* spp., *Proteus* spp. e *Citrobacter* spp. (TROEDSSON, 2011).

Testes de susceptibilidade a antimicrobianos podem ser realizados nos microorganismos cultivados. A terapia deve ser ajustada de acordo com os resultados da cultura e testes de susceptibilidade para determinar o melhor tratamento (MCCUE, 2008).

4.3.4. Avaliação histopatológica endometrial

O exame histológico tem sido considerado o procedimento padrão para avaliação da saúde uterina da égua há anos, e é um método seguro e muito útil (KENNEY, 1978; RICKETTS & BARRELET, 1997; BUCZKOWSKA *et al.*, 2014), fornecendo informações sobre a resposta terapêutica de um tratamento, a depuração uterina, o fluxo sanguíneo, e se a terapia adicional é necessária. É usada principalmente como indicador do prognóstico da endometrite e, conseqüentemente, das condições de uma égua de levar uma gestação a termo (LEBLANC, 2008; MCCUE, 2008).

Porém, o exame histológico a partir de BE não tem sido utilizado rotineiramente, sendo restrito a casos especiais, uma vez que pode não ser prático de realizar e o resultado ser demorado (OVERBECK *et al.*, 2011; CANISSO *et al.*, 2016).

A detecção de PMNs no estrato compacto do endométrio durante o exame histológico é geralmente utilizado como referência ou “padrão ouro” para diagnosticar qualquer forma de endometrite na égua (KENNEY E DOIG, 1986; SCHOON *et al.*, 1997; LUDWIG *et al.*, 2001; NIELSEN, 2005; LEBLANC *et al.*, 2007; SCHLAFER, 2007; OVERBECK *et al.*, 2011, NIELSEN *et al.*, 2012; KOZDROWSKI *et al.*, 2015).

Após a coleta do fragmento de endométrio, este deve ser imediatamente acondicionado em solução fixadora até o seu processamento, com objetivo de manter de modo definitivo as estruturas histológicas, sendo o formol neutro 10% e o *Bouin* os mais utilizados com esta finalidade. O período mínimo e máximo que o fragmento pode ficar na solução fixadora vai variar com o tipo de fixador utilizado.

As etapas posteriores que envolvem a inclusão, microtomia, coloração (com Hematoxilina e Eosina) e montagem da lâmina podem ser realizadas em laboratórios comerciais, porém o tempo para a confecção da lâmina e

consequentemente a leitura e o resultado do exame podem ser prolongados, se tornando um entrave para técnica.

A avaliação da lâmina deve ser realizada por patologistas ou por outro profissional treinado (SCHLAFER, 2007; LEBLANC, 2008), que deve distinguir na parede uterina sete componentes: (1) lúmen uterino; (2) interface epitelial endometrial; (3) estroma superficial (estrato compacto); (4) glândulas e epitélio glandular; (5) estroma - endométrio médio e profundo (estrato esponjoso); (6) vasos (artérias, veias e vasos linfáticos); e (7) miométrio. As avaliações destes componentes ajudam a determinar a fisiopatologia da parede uterina (BUCZKOWSKA *et al.*, 2014).

O achado de alterações no tamanho e forma epitelial, no grau de edema endometrial relacionado ao estágio do ciclo, lacunas linfáticas, fibrose periglandular, figuras mitóticas no epitélio glandular ou degeneração glandular cística, estão associados a processos patológicos específicos. Além disto, dependendo da alteração encontrada, estratégias de tratamento podem ser determinadas (KENNEY, 1978; LEBLANC, 2008).

Infiltrado no epitélio luminal endometrial e no estrato por um ou mais PMNs, por cinco campos de alta potência, é considerada evidência de endometrite (NIELSEN, 2005; KOZDROWSKI *et al.*, 2015). No entanto, de acordo com SCHOON *et al.* (1992), a presença de neutrófilos em proestro ou estro não indica inflamação, enquanto que em diestro indica. LEBLANC *et al.* (2007) e BUCZKOWSKA *et al.* (2014) definiram o limiar de inflamação em biópsias endometriais para 3 ou mais PMNs em 5 campos de visualização.

A degeneração glandular endometrial também pode ser uma forma de diagnóstico. É frequentemente reconhecida como uma deposição de colágeno na forma de fibrose ou tecido cicatricial em torno das glândulas endometriais, chamada de fibrose periglandular, e representa uma condição permanente e intratável. O desenvolvimento de alterações degenerativas no endométrio também faz parte do processo de envelhecimento normal (MCCUE, 2008).

Um sistema de classificação dos achados histológicos em escores a partir de biópsias endometriais foi proposto por KENNEY & DOIG em 1986, que depois de adaptado por SCHOON *et al.* em 1992, se tornou um dos mais utilizados até os dias de hoje. Consiste em classificar as éguas em quatro categorias de acordo com as alterações agudas e crônicas observadas na histopatologia do endométrio, tais como alterações em glândulas, vasos sanguíneos e linfáticos, além de

alterações inflamatórias e fibrose. As alterações podem coexistir, e quanto mais mudanças ocorrem e mais avançadas estão, maior a categoria. (BUCZKOWSKA *et al.*, 2014; CANISSO *et al.*, 2016).

A categoria 1 refere ao tecido saudável, sem alterações, já a categoria 2 foi subdividida em “A”, inflamação e fibrose leves, e “B”, inflamação e fibrose moderadas, além da categoria 3, que corresponde a inflamação e fibrose graves. Éguas incluídas nas categorias 2 e 3 são consideradas potencialmente susceptíveis à endometrite, enquanto éguas na categoria 1 são geralmente resistentes. Este sistema também auxilia no prognóstico dos animais, uma vez que quanto mais alterações ocorrem no endométrio, isto é maior o grau de classificação, menores as chances das éguas se tornarem gestantes ou manterem uma gestação (KENNEY & DOIG 1986).

É possível uma melhora na condição endometrial se a inflamação presente for reduzida ou eliminada com o tratamento adequado. No entanto, deve-se enfatizar que muitos fatores adicionais, como o manejo do garanhão, também desempenham papéis críticos no sucesso reprodutivo (MCCUE, 2008).

4.4.5. Comparação entre os métodos de coleta de amostras

De acordo a literatura, ainda existe uma discrepância relativamente alta entre os resultados obtidos usando diferentes métodos de coleta de amostras. Isto pode acontecer devido a diferentes critérios adotados para avaliação das amostras e a abordagem utilizada pelos autores. Assim, a interpretação correta dos achados durante os exames requer a consideração de possíveis resultados falsos positivos e falsos negativos (LEBLANC *et al.*, 2007; KOZDROWSKI *et al.*, 2015).

Para comparar o risco de falsos positivos e negativos entre os métodos de diagnóstico da endometrite são usados os conceitos de sensibilidade e especificidade. A sensibilidade, neste caso, é a capacidade que o método de diagnóstico para endometrite apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente a endometrite, estipulando o risco de falso negativo. Já a especificidade é a capacidade que o método tem de detectar os verdadeiros negativos, isto é, de diagnosticar corretamente os indivíduos sem endometrite, estipulando o risco de falso positivo.

NIELSEN (2005) foi o primeiro a avaliar a sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico, a partir de então outros estudos foram conduzidos com o mesmo objetivo. A sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico

influenciam a percepção da prevalência de endometrite e a necessidade de tratar o animal (KATILA, 2016). Ambos os conceitos são empregados pelos diversos autores utilizando como “padrão ouro” para o diagnóstico da endometrite a avaliação histológica a partir da biópsia endometrial, facilitando a comparação entre os estudos.

Outro fator que influencia a comparação entre os métodos são as técnicas de coleta de amostras. Nas Tabelas 01 e 02 são apresentados valores encontrados para os parâmetros de sensibilidade e especificidade nos exames citológicos e culturas endometriais respectivamente, a partir de diferentes métodos de coleta de amostras intrauterinas. Os resultados variam de acordo com os diferentes autores, não havendo um consenso de qual método de coleta seria mais sensível e específico, e sem definição de qual método de amostragem é o mais eficaz no diagnóstico da endometrite.

Tabela 01: Sensibilidade e especificidade do exame citológico uterino obtido por diferentes métodos de coleta de amostras utilizando como padrão ouro o exame histológico a partir de biópsia endometrial.

Método de coleta	Sensibilidade	Especificidade	Referência
CCE	0,17	0,83	OVERBECK <i>et al.</i> , 2011
CCE	0,71	0,85	BUCZKOWSKA <i>et al.</i> , 2014
CCE	0,70	0,88	KOZDROWSKI <i>et al.</i> , 2015
LBV	0,80	0,67	LEBLANC <i>et al.</i> , 2007
LBV*	0,08	0,95	CHRISTOFFERSEN <i>et al.</i> 2015
BE	0,77	1,00	NIELSEN, 2005
BE	0,25	0,85	OVERBECK <i>et al.</i> , 2011
BE	0,73	0,96	BUCZKOWSKA <i>et al.</i> , 2014
BE	0,33	1,00	CHRISTOFFERSEN <i>et al.</i> 2015
BE	0,77	0,81	KOZDRORSKI <i>et al.</i> , 2015
BE	0,78	0,84	RASMUSSEN <i>et al.</i> , 2015

*Lavado de baixo volume duplo guardado. CCE = Coletor Comercial do tipo Escova citológica; LBV = Lavado intrauterino de Baixo Volume; BE = Biópsia Endometrial.

Tabela 02: Sensibilidade e especificidade do exame de cultura microbiológica uterina obtido por diferentes métodos de coleta de amostras utilizando como padrão ouro o exame histológico a partir de biópsia endometrial.

Método de coleta	Sensibilidade	Especificidade	Referência
CCS	0,34	1,00	NIELSEN, 2005
CCS	0,33	0,83	OVERBECK <i>et al.</i> , 2011
CCS	0,33	0,90	CHRISTOFFERSEN <i>et al.</i> 2015
LBV	0,71	0,86	LEBLANC <i>et al.</i> , 2007
LBV*	0,75	0,72	CHRISTOFFERSEN <i>et al.</i> 2015
BE	0,82	0,92	NIELSEN, 2005
BE	0,25	0,95	OVERBECK <i>et al.</i> , 2011
BE	0,63	0,54	BUCZKOWSKA <i>et al.</i> , 2014
BE	0,50	0,90	CHRISTOFFERSEN <i>et al.</i> 2015
BE	0,81	0,69	RASMUSSEN <i>et al.</i> , 2015

*Lavado de baixo volume duplo guardado. CCS = Coletor Comercial do tipo *Swab*; LBV = Lavado intrauterino de Baixo Volume; BE = Biópsia Endometrial.

Independente do método de coleta de amostra para o exame citológico é necessário um número suficiente de células uterinas coletadas sem contaminar a amostra com secreções vaginais. O ideal para um diagnóstico é que a técnica produza um número elevado de células bem preservadas, representativas de uma área superficial uterina grande (AGUILAR *et al.*, 2006; WALTER *et al.*, 2012, KOZDROWSKI *et al.*, 2015; CANISSO *et al.*, 2016). No entanto, a quantidade e a qualidade do material coletado é particularmente diferente entre métodos, e conseqüentemente os resultados também podem diferir (KOZDROWSKI *et al.*, 2015).

A cultura microbiológica uterina possibilita a identificação do microrganismo causador da inflamação e a realização do teste de susceptibilidade ao antimicrobiano, sendo este um ponto positivo da sua utilização. Porém, como em qualquer teste de diagnóstico, falsos positivos e falsos negativos podem resultar de técnicas de amostragem deficientes (CANISSO *et al.*, 2016), dificultando o diagnóstico e o tratamento adequado. Culturas falsas positivas estão associadas à contaminação do ambiente, da genitália externa e/ou vagina, enquanto que culturas falsas negativas estão associadas com insuficiente amostragem do endométrio (LEBLANC *et al.*, 2007; OVERBECK *et al.*, 2011; KOZDROWSKI *et al.*, 2015).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Período e localização experimental

O estudo foi conduzido no período de Julho a Dezembro de 2016, quando foram coletados amostras e dados de animais provenientes de sete propriedades de criação de cavalos da raça Mangalarga Marchador, nos municípios de Além Paraíba - MG, Muriaé - MG, São Geraldo - MG, Itaperuna - RJ e Sapucaia - RJ, com latitudes variando de -20° 55' 22" a -21° 59' 42" e longitude variando de -41° 53' 16" a -42° 54' 52". No Laboratório de Reprodução Animal do DZO/UFV, em Viçosa - MG, as amostras foram processadas e analisadas.

2. Animais

Foram utilizadas 40 fêmeas equinas mestiças, receptoras de embrião, e que foram retiradas do programa de transferência de embriões das propriedades devido ao histórico de subfertilidade, portanto, não ficaram gestantes na estação reprodutiva anterior. Os animais possuíam idade entre cinco e 20 anos e estavam em regime extensivo, em lotes com cinco a 20 animais, em pastagens de boa qualidade com água e sal mineral *ad libitum*.

Todos os procedimentos envolvendo os animais foram realizados de forma a garantir que as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DZO/UFV fossem rigorosamente seguidas, e protocoladas no Comitê Institucional de Uso de Animais de Produção (CEUAP - UFV), sob o número 016/2016.

3. Coleta de dados

Os dados dos animais foram obtidos através da visualização, consultas em fichas reprodutivas e questionamentos ao médico veterinário responsável, e foram anotados em fichas para posteriores análises (Anexo 2).

3.1. Identificação e idade

As éguas foram identificadas pelo nome, pelagem e características fenotípicas. A idade dos animais foi determinada por consulta em registros e fichas, ou estimada pela avaliação da cronometria dentária. As éguas foram divididas em

três grupos de acordo com a faixa etária: (G1) menores que 10 anos, (G2) 10 a 14 anos e (G3) 15 a 20 anos, consideradas idosas.

3.2. Escore de condição corporal

Os animais tiveram o escore de condição corporal avaliado segundo HENNEKE *et al.* (1983), baseando na visualização e na palpação de áreas do corpo do animal, atribuindo notas em uma escala de 1 a 9 (Anexo 1).

3.3. Histórico reprodutivo

O histórico reprodutivo dos animais foi questionado ao médico veterinário responsável e coletado de fichas reprodutivas e sanitárias, sendo levado em consideração o número de estações de monta em que a égua avaliada foi submetida na propriedade, número de gestações e partos, número de distocias, retenções placentárias ou outras patologias, e tratamentos realizados (Anexo 2).

4. Exame clínico reprodutivo

Todas as éguas foram examinadas previamente por palpação transretal e ultrassonografia (SONOSCAPE A5Vet[®] com transdutor de 5 MHz) para excluir a possibilidade de gestação.

Para realização do exame clínico reprodutivo, os animais foram contidos em troncos de contenção individuais, onde foi possível a suspensão da cauda e proteção dos pelos, de forma a promover segurança aos animais e profissionais.

O períneo foi higienizado com água e sabão até a remoção total dos detritos, procedeu-se com a secagem do períneo com toalhas de papel descartáveis e limpeza do interior do vestibulo com um algodão umedecido com solução estéril para remover material fecal e detritos se presentes. O exame foi conduzido pela avaliação da conformação do períneo, palpação e ultrassonografia transretal, vaginoscopia e exame da cérvix. Os dados foram anotados em fichas para posteriores análises (Anexo 2).

4.1. Conformação do períneo

A conformação do períneo das éguas foi avaliada de forma visual, por palpação e mensurada com um auxílio de um paquímetro, um transferidor e um nível formando um vulvômetro adaptado de PASCOE (1979) (Figura 01).



Figura 01: Vulvômetro utilizado para mensurações durante o exame de conformação do períneo. Adaptação do vulvômetro desenvolvido por PASCOE, 1979. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.

Os animais foram avaliados conforme os seguintes parâmetros:

Conformação e fechamento vulvar: avaliação subjetiva feita por meio de visualização, palpação e classificação dos animais em 1 - Ruim, 2 - Bom e 3 - Ótimo.

Presença de pneumovagina e/ou urovagina: foi realizado o teste de sucção de ar ou *windsuck*, em que o examinador com os dedos abriu e fechou os lábios vulvares, verificando se estes promoviam um fechamento vulvar adequado, evitando o acúmulo de ar (pneumovagina) e/ou urina (urovagina), além da visualização interna do vestibulo vaginal. Tais parâmetros, presença de pneumovagina e/ou urovagina, foram posteriormente confirmados ou não por meio do exame da vaginoscopia.

Vulvoplastia: foi avaliado se já havia sido realizada anteriormente a cirurgia de vulvoplastia no animal.

Comprimento total da comissura vulvar: com auxílio do vulvômetro foi realizada a mensuração em centímetros da comissura vulvar dos animais.

Comprimento efetivo: foi realizada a mensuração, com auxílio do vulvômetro, da distância em centímetros entre a comissura vulvar dorsal até o nível do assoalho da pelve.

Ângulo da vulva em relação à vertical: o vulvômetro colocado na vertical foi utilizado para medir o ângulo até a vulva, mensurando assim, o ângulo em graus de inclinação da vulva em relação à vertical.

Índice de Caslick (IC): foi calculado a partir da multiplicação do valor em centímetros do comprimento efetivo pelo valor em graus do ângulo de inclinação em relação à vertical.

Animais classificados como 1 - Ruim em pelo menos um dos parâmetros (conformação, inserção e fechamento vulvar), os que apresentavam pneumovagina e/ou urovagina, que possuíram comprimento total da comissura vulvar acima de 15 centímetros ou que possuíram IC acima de 150 foram considerados positivos para o exame de conformação do períneo.

4.2. Palpação e ultrassonografia

Com uma luva de palpação devidamente lubrificada, o examinador retirou as fezes da ampola retal e procedeu com a palpação transretal e posteriormente com a ultrassonografia transretal (SONOSCAPE A5Vet® com transdutor linear de 5 MHz), avaliou os seguintes parâmetros:

- Tônus cervical: através da compressão digital mediante palpação foi classificado o tônus cervical em:

- 1: Cérvix sem tônus ou aberta, correspondente a fase de estro;
- 1 a 2: Cérvix com tônus intermediário;
- 2: Cérvix com tônus ou fechada, correspondente a fase de diestro.

- Tônus uterino: o tônus uterino foi classificado através da compressão digital em:

- 1: útero sem tônus, correspondente a fase de estro;
- 2: útero com tônus intermediário;
- 3: útero com tônus, correspondente a fase de diestro.

- Edema endometrial: as dobras endometriais ou edema endometrial foram avaliados por ultrassonografia do útero, e foram classificadas de 0 a 5, em que:

- 0: Ausência de edema;
- 1: Pouco edema;
- 2: Edema intermediário;
- 3: Muito edema;
- 4: Excesso de edema;
- 5: Hiperedema.

- Presença de líquido intrauterino (LIU): a presença de líquido no lúmen uterino foi determinada através da ultrassonografia. Quando havia presença de líquido este foi mensurado em seu maior diâmetro possível e classificado da seguinte forma:

- 0: Ausência de líquido;
- 1: Traço de líquido, menor que 1 cm;
- 2: Pouca quantidade de líquido, 1 a 2 cm;
- 3: Média quantidade de líquido, 2 a 4 cm;
- 4: Grande quantidade de líquido, 5 a 10 cm;
- 5: Muito grande quantidade de líquido, maior que 10 cm.

Foi avaliada a ecogenicidade do LIU, e classificada em:

- 1: Não ecogênico;
- 2: Pouco ecogênico;
- 3: Moderada ecogenicidade;
- 4: Muito ecogênico.

- Presença de cistos uterinos: foram mensurados e contabilizados os cistos uterinos através da ultrassonografia.

- Fase do ciclo estral: Foram considerados em diestro aqueles animais que tinham corpo lúteo; não apresentavam edema endometrial; tinham tônus uterino e cervical. Em estro, os animais que tinham folículos maiores que 25 mm de diâmetro, edema endometrial com útero e cérvix flácidos. Se em qualquer uma das fases, um dos critérios não correspondesse aos demais, tal critério seria considerado não condizente a fase do ciclo.

Foram considerados positivos os animais que obtiveram tônus uterino, tônus cervical ou edema não condizente com a fase do ciclo estral; que tiveram excesso de edema endometrial ou hiperedema (classificações 4 e 5 de edema); ou que tiveram presença de LIU detectada, seja qual for o volume ou a ecogenicidade.

4.3. Vaginoscopia

Após o exame transretal, o períneo foi novamente higienizado com água e sabão neutro por três vezes, e seco com toalha de papel. Para a realização da vaginoscopia foi utilizado um espéculo vaginal de Polansky estéril e umedecido com gel estéril, e uma lanterna para facilitar a visualização interna da vagina. Ao exame, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Abertura da cérvix: a porção caudal da cérvix foi primeiramente visualizada, servindo de ponto de referência para os demais parâmetros avaliados. Possíveis anormalidades na cérvix tais como tortuosidades, lacerações, aderências e indícios de traumas foram avaliados.

- Fase do ciclo: de acordo com a visualização do posicionamento da porção caudal da cérvix os animais foram classificados como: na fase de (1) estro, quando a cérvix estava sem tônus e sobre o assoalho da vagina; e em (2) diestro, quando a cérvix estava com tônus e distante do assoalho da vagina.

- Coloração da mucosa: a coloração da mucosa vaginal foi avaliada visualmente e classificada em hipocorada, normal (rósea) e hipercorada.

- Presença de anormalidades: secreção, traumas, aderências, entre outras anormalidades foram detectadas e avaliadas visualmente.

Os animais foram considerados positivos para o exame de vaginoscopia quando tinham anormalidades na cérvix, quando a cérvix não condizia com a fase do ciclo estral apresentada na palpação e ultrassonografia transretal, quando a coloração não estava normal e/ou havia a presença de anormalidades na vagina do animal.

4.4. Exame da cérvix

Com auxílio de luva de palpação, o examinador introduziu sua mão no canal vaginal protegendo seu dedo indicador, e com este realizou o exame digital da cérvix, avaliando sua integridade, o que possibilitou a detecção de alterações no interior do canal cervical, tais como: lacerações, fibroses, aderências, divertículos e tortuosidades. Animais com a presença de qualquer uma destas alterações foram considerados positivos para o exame digital da cérvix.

5. Coleta de amostras para exames laboratoriais

As coletas foram realizadas de forma consecutiva na seguinte ordem: coletores comerciais (CC) - primeiramente o tipo *swab* e depois o tipo escova citológica – lavado intrauterino de baixo volume (LBV) e a biópsia endometrial (BE), com objetivo de coletar material para os exames de citologia endometrial e cultura microbiológica uterina.

5.1. Coletor comercial

Com auxílio de luva de palpação transretal, o examinador introduziu na vagina da égua o coletor comercial *swab* uterino duplamente guardado (PROVAR® - São Paulo, Brasil) protegendo-o com a mão (Figura 02). Com o dedo indicador auxiliou o coletor a penetrar na cérvix, onde rompeu a primeira proteção plástica, expôs o conjunto coletor e o introduziu no útero de forma transcervical.



Figura 02: Coletores comerciais do tipo *swab* e escova citológica utilizados na coleta de amostras para os exames de citologia endometrial e cultura microbiológica uterina durante a avaliação ginecológica. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.

Com o conjunto coletor dentro do útero, rompeu-se o lacre externo, permitindo que o *swab* entrasse em contato com a parede interna do útero, ficando ali por pelo menos 1 minuto, alternando suaves movimentos rotatórios para direita e esquerda. Depois de colhida a amostra, puxou-se a haste interna de volta para dentro do tubo externo e retirou-se todo o conjunto de dentro do útero. As amostras de *swabs* foram armazenadas em tubos de ensaio de vidro com tampa rosqueável, estéreis contendo meio BHI (Brain Heart Infusion - Becton Dickinson - BD®, Heidelberg, Alemanha), que foram condicionados dentro de uma caixa de transporte de isopor.

Após a coleta do material para o exame de cultura microbiológica uterina, executando os mesmos procedimentos que o coletor de *swab*, foi coletado material para o esfregaço da citologia endometrial com o conjunto coletor escova citológica duplamente guardada (PROVAR® - São Paulo, Brasil), o qual, após ser retirado do útero, foi levemente deslizado em movimento rotatório pela lâmina de microscopia, realizando o esfregaço. Tal lâmina foi seca ao ar e armazenada em caixa apropriada para transporte, onde junto com a caixa de transporte de isopor com a amostra de *swab*, foram transportadas até o Laboratório de Reprodução Animal do DZO - UFV.

5.2. Lavado intrauterino de baixo volume

Com auxílio de luva de palpação retal, infundiu-se no útero da égua 60 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% (Fisiológico - LINHAMAX[®] - Eurofarma Laboratórios SA, São Paulo, Brasil). Para tanto, uma sonda estéril (Sonda Nasogástrica Humana número 20 Siliconada - EMBRAMED[®], São Paulo, Brasil), acoplada a uma seringa de 20 mL foi introduzida no útero de maneira transcervical (Figura 03). Em seguida, a mão foi retirada da vagina e introduzida no reto, onde manipulou-se o útero para distribuição da solução.



Figura 03: Material utilizado para o lavado de baixo volume com a finalidade de coletar amostras para os exames de citologia endometrial e cultura microbiológica uterina durante a avaliação ginecológica. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.

Após 1 minuto de permanência no útero, a solução foi succionada com auxílio da seringa, recolhida para tubos plásticos de 15 mL estéreis (Tubo Cônico - Tipo Falcon - LABOR IMPORT[®], São Paulo, Brasil).

A característica do efluente recolhido durante o lavado de baixo volume também foi classificado de acordo com: (1) aspecto, sendo classificado em translúcido, nublado e purulento; (2) celularidade, sendo classificado em baixa, moderada e alta; e se havia ou não a (3) presença de secreção. Os animais com características do efluente do lavado de baixo volume com aspecto turvo ou purulento, celularidade moderada ou alta e presença de secreção foram considerados positivos para este parâmetro examinado.

As amostras foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos, e posteriormente, a maior parte do sobrenadante foi descartada, restando apenas 2 mL e o sedimento, que foi então ressuspenso.

Um *swab* estéril (Swab Estéril para Transporte de Amostras - LABOR IMPORT[®], São Paulo, Brasil) e posteriormente uma escova citológica estéril (Escova Cervical Descartável - LABOR IMPORT[®], São Paulo, Brasil), foram

mergulhados no ressuspensão resultante. Os *swabs* foram armazenados em tubos de ensaio de vidro com tampa rosqueável, estéreis contendo meio BHI (Brain Heart Infusion - Becton Dickinson - BD®, Heidelberg, Alemanha), que foram condicionados dentro de uma caixa de isopor para transporte. A escova citológica foi levemente deslizada em movimento rotatório pela lâmina de microscopia, realizando o esfregaço. Tal lâmina foi seca ao ar e armazenada em caixa apropriada para transporte, onde junto com a caixa de isopor com a amostra de *swab*, foram transportadas até o Laboratório de Reprodução Animal do DZO - UFV.

5.3. Biópsia e lavado do fragmento

Uma pinça de Yeoman estéril foi introduzida em uma proteção plástica do tipo camisa higiênica (MINITUBE®, Alemanha) e adentrou na vagina protegida pela mão enluvada do examinador (Figura 04). Ao penetrar o canal cervical, a proteção plástica foi rompida e a pinça introduzida no útero. A mão foi retirada da vagina e, após lubrificação, foi introduzida no reto, de forma a conduzir a ponta da pinça até a parede do útero e, após a abertura da pinça e apreensão, esta fosse retirada do útero trazendo consigo o fragmento coletado.



Figura 04: Material utilizado para a biópsia endometrial com a finalidade de coletar amostras para os exames de citologia endometrial, cultura microbiológica uterina e avaliação histopatológica endometrial durante a avaliação ginecológica. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.

Foi realizada uma nova forma de amostragem a partir do fragmento da biópsia, que foi lavado em solução estéril, com intuito de evitar contaminações e perda da qualidade da amostra, sendo denominado lavado do fragmento da biópsia endometrial (LFBE).

Com uma pinça anatômica estéril, o fragmento foi apreendido e lavado em um tubo plástico de 15 mL estéril (Tubo Cônico - Tipo Falcon - LABOR IMPORT®, São Paulo, Brasil) contendo solução cloreto de sódio 0,9% (Fisiológico -

LINHAMAX[®] - Eurofarma Laboratórios SA, São Paulo, Brasil) e, após a lavagem, o fragmento transferido para outro tubo plástico contendo formol à 10%, para fixação do fragmento. O frasco com a solução resultante do lavado do fragmento foi então centrifugado a 400 g por 10 minutos, e a maior parte do sobrenadante descartado, restando apenas 2 mL e o sedimento, que foi, então, ressuspendido. Em seguida, os procedimentos para confecção da lâmina citológica e da amostra para a cultura uterina, além do transporte para o laboratório, foram idênticos aos realizados após o lavado de baixo volume.

6. Exames laboratoriais

No Laboratório de Reprodução Animal do DZO - UFV, as amostras, após transporte de no máximo 4 horas, foram analisadas na seguinte ordem: cultura microbiológica uterina, citologia endometrial e confecção das lâminas histológicas.

6.1. Cultura microbiológica uterina

No laboratório, utilizando-se de uma capela de fluxo laminar, as amostras coletadas por CCS, LBV e LFBE, foram semeadas em placas com ágar sangue de carneiro 5% adequadamente identificadas (letra correspondente ao animal, data e hora) de forma duplicada, e depois incubadas em estufa (Modelo 002 CB - FANEM LTDA[®], Brasil) à temperatura de 37 °C. O crescimento de microrganismos foi inspecionado duas vezes a cada 24 horas após a incubação. Nas duas avaliações, foram avaliadas as Unidades Formadoras de Colônia (UFC), segundo REILAS & KATILA, (2002), da seguinte forma:

- 0: Nenhum crescimento;
- 1: Baixo crescimento (1 a 10 UFC);
- 2: Moderado crescimento (11 a 100 UFC);
- 3: Grande crescimento (maior que 100 UFC ou impossível contar).

Posteriormente a contagem de UFC, as placas foram classificadas em: (1) sem crescimento, (2) crescimento isolado (apenas uma espécie de microrganismo) ou de (3) crescimento misto (duas ou mais espécies diferentes de microrganismos). Placas com crescimento misto foram novamente cultivadas (repicadas), isolando cada microrganismo em um cultivo, com intuito do crescimento e isolamento para cultura pura.

Com 48 horas de incubação, as placas sem crescimento foram descartadas e as com crescimento das culturas isoladas foram, com auxílio de uma alça de

platina estéril em capela de fluxo laminar, transportadas para dois tubos de ensaio de vidro com tampa rosqueável, estéreis contendo meio BHI (Brain Heart Infusion - Becton Dickinson - BD®, Heidelberg, Alemanha), e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas.

Após a detecção do crescimento bacteriano no meio BHI a partir da turvação do meio, com auxílio de uma pipeta automática e ponteiras estéreis, alíquotas foram armazenadas de forma duplicada em microtubos plásticos estéreis com glicerol 20% (v/v). Cada microtubo foi identificado, lacrado com filme plástico de parafina, homogeneizado em agitador tipo *vórtex* e congelados em freezer entre -4 °C a -20 °C, para posterior envio para laboratório especializado (Microvet - Microbiologia Veterinária Especial – Viçosa - MG, Brasil). No laboratório os microrganismos foram identificados e o teste de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método Método Kirby Bauer foi realizado utilizando as concentrações padrões de cada antimicrobiano. Os seguintes antimicrobianos foram utilizados: ampicilina, penicilina, gentamicina, tetraciclina, ceftiofur, sulfa/trimetoprim, enrofloxacina, florfenicol e neomicina. A leitura e interpretação dos resultados foram feitas de acordo com as recomendações do CLSI (2009).

6.2. Citologia endometrial

No laboratório, as lâminas obtidas após a coleta de amostras por CCE, LBV e LFBE, foram coradas pelo método panótico rápido (Instantprov – New Prov®, Brasil) e avaliadas por microscopia de luz (BHS, Olympus, Hamburgo, Alemanha) em aumento de 400 x e 1000 x sob imersão em óleo, por um mesmo examinador, de forma a contabilizar a proporção de PMNs em relação a células endometriais, sendo contabilizadas 300 células. O resultado se deu em porcentagem de PMNs em relação às células endometriais, sendo classificado em:

- Menor que 2%: negativa;
- 2 a 5%: leve;
- 5 a 30%: moderada;
- Maior que 30%: intensa.

A celularidade total das lâminas foi avaliada quanto à morfologia e quantidade, sendo classificada em baixa, moderada e alta. A presença de conteúdo de fundo, muco e detritos também foi verificada.

O resultado foi considerado positivo se a lâmina possuíse pelo menos 2% de PMNs, caso contrário foram considerados negativos para citologia uterina.

6.3. Avaliação histopatológica endometrial

No laboratório, entre 2 a 12 horas após a coleta e transporte em fixador formol 10%, os fragmentos foram transportados para tubos plásticos cônicos de 15 mL contendo álcool 70%. Nestes tubos, os fragmentos permaneceram até o processamento das amostras, que consistiu em incluir os fragmentos em parafina, seccionar a 5 mm, desparafinar, reidratar, e corar com hematoxilina e eosina. Depois de confeccionadas, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico.

O exame histológico das biópsias foi classificado baseado no sistema de classificação de KENNEY & DOIG (1983), modificado por SCHOON *et al.* (1992), em que foram avaliadas quanto a fibroses endometriais, hiperplasias glandulares, lacunas linfáticas e infiltrados celulares, classificando os animais em três graus de classificação. O grau 1 é referente ao tecido saudável sem alterações histopatológicas e sem a presença de infiltrados de PMNs, o grau 2 foi subdividido em A, inflamação e fibrose leves com poucas regiões de fibrose não formando aglomeração de glândulas e presença de poucos PMNs, e B, inflamação e fibrose moderadas com formação de aglomerações glandulares, presença moderada de PMNs e hiperplasia ou cistos glandulares, e grau 3, inflamação e fibrose graves, com grande presença de PMNs e aglomerações, cisto e hiperplasias glandulares.

Éguas que foram classificadas como grau 1 foram consideradas negativas no exame histopatológico, enquanto as classificadas como grau 2 (A ou B) ou 3, foram consideradas positivas.

7. Análises estatísticas

Para a análise dos dados, foi utilizado o *Statistical Analysis System* (SAS, 2002). A concordância entre cada metodologia utilizada e a biópsia (padrão ouro) foi avaliada pela estatística *Kappa*. Correlações entre as variáveis foram avaliadas pela análise de correlação de Spearman. O efeito das variáveis sobre as probabilidades de se encontrar diagnóstico positivo de endometrite (pela biópsia) e de haver infecção (pela cultura do coletor comercial) foram avaliadas por regressão logística univariada. Para as variáveis que não puderam ser avaliadas por regressão logística, foi realizado o Teste exato de Fisher para verificação de

associação entre as variáveis e o diagnóstico positivo de endometrite. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Coleta de dados

1.1. Idade

A idade média das éguas receptoras avaliadas no estudo foi de 13,2 ($\pm 3,80$) anos, e a idade de maior repetição foi a de 15 anos (17,5%) – Figura 05.

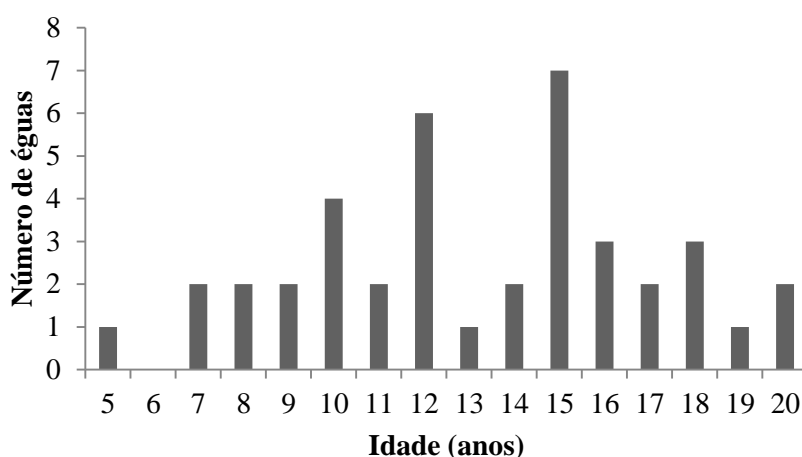


Figura 05: Distribuição das éguas receptoras de acordo com a idade apresentada durante a avaliação ginecológica.

Sete éguas apresentavam idade pertencente ao grupo 1 de faixa etária (G1: menores que 10 anos), 15 éguas ao grupo 2 (G2: 10 a 14 anos) e 18 ao grupo 3 (G3: 15 a 20 anos, consideradas idosas).

De acordo com SQUIRES *et al.* (1999), os animais com idade superior a 3 anos e inferior a 10 anos são consideradas as fêmeas mais adequadas para a transferência de embriões, e no estudo, 17,5% estavam nesta faixa etária (G1). Portanto, a idade não seria um fator considerável para o desenvolvimento de problemas reprodutivos nestes animais, visto que, estariam no seu melhor desempenho reprodutivo (EVANGELISTA, 2012; MORLEY & MURRAY, 2014). Esta faixa etária foi a que apresentou menor proporção de animais positivos para endometrite (3/7).

Os animais pertencentes ao grupo 2 (37,5%) e, principalmente ao 3 (45%), poderiam ter a fertilidade reduzida em consequência da idade avançada, sendo este um fator que pode ter contribuído para se tornarem éguas problema. O fator

idade apresentou forte correlação positiva com o Índice de Caslick (IC) (Tabela 03), esta pode ser um fator determinante para a infecção ascendente e inflamação persistente do endométrio. Estes resultados corroboram com PASCOE (1979), que observou aumento do IC concomitante à idade dos animais.

Tabela 03: Coeficientes de correlação de Spearman entre as variáveis idade, escore de condição corporal e Índice de Caslick das éguas receptoras durante a avaliação ginecológica.

Variáveis	Idade	ECC	IC
Idade	1	-0.58	0.60
ECC		1	-0.47
IC			1

P < 0.05. IC = Índice de Caslick, ECC= Escore de Condição Corporal

Os animais com baixo ECC tinham pouca deposição de gordura na região do períneo, também sendo este um fator determinante para a má conformação perineal. Neste sentido, a idade obteve correlação negativa com o ECC, com animais mais velhos possuindo ECC relativamente mais baixos.

Além do ECC inferior e do IC superior, os animais pertencentes ao grupo 3, apresentaram uma maior proporção de alterações histopatológicas e, conseqüentemente, endometrite (13/18). Estes dados corroboram com as observações de PYCOCK (2006), que relatou que éguas idosas possuem maior incidência de endometrite, e BALL *et al.* (1987), que demonstraram que éguas idosas possuíam resultados de exame histopatológico endometrial sugestivos de doenças inflamatórias. Deste modo, deve-se evitar a seleção de éguas idosas para atuarem como receptoras, com intuito de diminuir o risco de endometrite.

1.2. Escore de Condição Corporal (ECC)

O ECC médio entre as éguas foi de 5,82 variando de 4 a 7, sendo 6 o escore que mais se repetiu em 20 dos animais (50%) (Figura 06). Estes resultados demonstram que apenas 6 éguas (15%) estavam no escore ideal preconizado pelo NRC (2007), enquanto 29 éguas (72,5%) possuíam ECC superior ao ideal, e 5 éguas (12,5%) possuíam ECC inferior ao ideal.

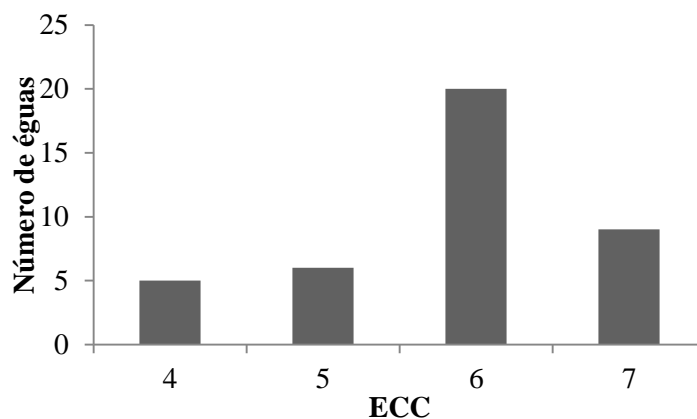


Figura 06: Distribuição das éguas receptoras de acordo com escore de condição corporal apresentado durante a avaliação ginecológica (ECC).

Todas as éguas com ECC 4 foram positivas para endometrite (Figura 07). Este resultado, assim como os encontrados por DAVISON & GREENE (1991), em que éguas com ECC 4 tinham taxas de gestação até 20% menores quando comparadas com éguas com ECC 5, indicam que o ECC abaixo do ideal pode influenciar nas taxas de gestação. Desta forma, animais com ECC 4 devem ser evitados para utilização como receptoras de embrião.



Figura 07: Égua receptora com escore de condição corporal 4 durante a avaliação ginecológica. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.

1.3. Histórico reprodutivo

Dentre as 40 éguas avaliadas no experimento, 13 não possuíam histórico reprodutivo completo conhecido ou documentado, apenas o histórico de não terem se tornado gestante devido a problemas reprodutivos. Portanto, apenas as 27 éguas que possuíam o histórico completo foram consideradas nesta avaliação.

Nenhum dos animais havia sido submetido anteriormente a exame ginecológico completo, incluindo exames laboratoriais. Deste modo, estes animais foram removidos dos programas de TE sem elucidação da causa, com a retirada baseada na falta de aptidão para receber o embrião e/ou por possuírem perdas embrionárias precoces sucessivas.

Dentre as éguas com histórico reprodutivo, 23 (85,1%) já haviam sido submetidas a algum tipo de tratamento durante a estação reprodutiva anterior. A antibioticoterapia associada ou não a outra forma de tratamento foi a mais realizada em 19 dos 27 animais (70,37%) (Tabela 04).

Tabela 04: Tratamentos realizados nas éguas receptoras durante a estação reprodutiva.

Tratamento	Número de éguas	Porcentagem de éguas
Não foram tratadas	4	14,8%
Antimicrobianos	7	25,9%
Antimicrobianos e sanitizante*	6	22,2%
Antimicrobianos e lavado intrauterino	5	18,5%
Sanitizante	4	14,8%
Antimicrobianos, sanitizante e lavado intrauterino	1	3,7%

*Sanitizante (BotuKiller® – Botupharma – Brasil)

A terapia com o uso de antimicrobianos sem prévia realização de cultura uterina e testes de susceptibilidade a antimicrobianos é geralmente instituída por profissionais que trabalham a campo, visto que, estes exames demandam tempo, custos, materiais e equipamentos específicos. Assim, durante a estação reprodutiva, muitos tratamentos são baseados em protocolos pré-estabelecidos, possuindo pouca ou nenhuma resposta terapêutica (CABRERA *et al.*, 2016), culminando na exclusão das éguas problema dos programas de TE.

O número médio de estações que uma égua receptora participou na propriedade, antes de ser retirada do programa de TE, foi de 4,85 estações. Entretanto, grande parte das éguas, 10 das 27 (37%), foi considerada subfértil a ponto de ser retirada do programa de TE depois de passar por duas estações reprodutivas na propriedade (Figura 08).

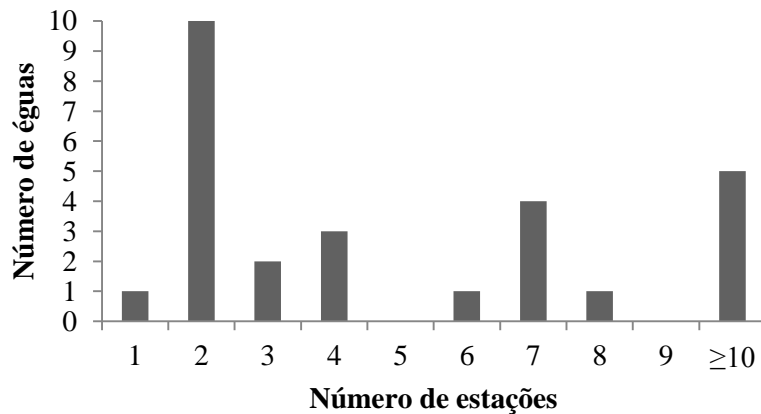


Figura 08: Distribuição das éguas receptoras de acordo com o número de estações reprodutivas em que permaneceram na propriedade.

As éguas receptoras se tornaram gestantes e pariram em média 3,11 vezes na propriedade. Porém, 10 das 27 éguas (37%) não se tornaram gestantes e não pariram nenhuma vez (Figura 09). Deste modo, 37% das éguas receptoras podem ter sido inseridas no programa de TE da propriedade já com algum problema reprodutivo, como a endometrite. Estes dados evidenciam a importância de um exame ginecológico completo no momento de integrar uma égua receptora ao programa de TE.

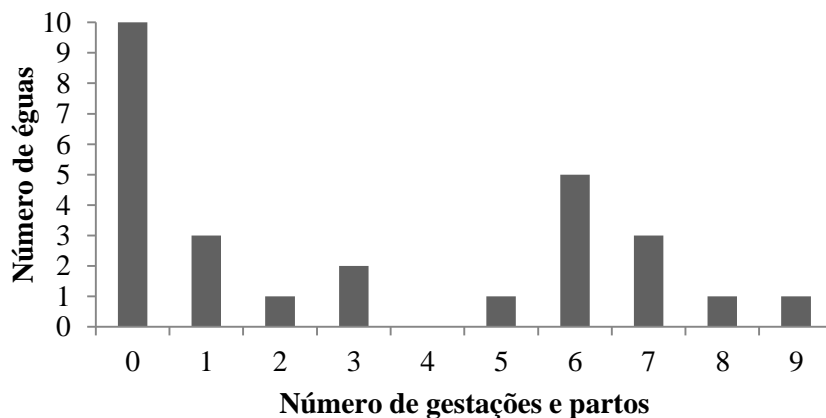


Figura 09: Distribuição das éguas receptoras de acordo com o número de gestações e partos que estiveram na propriedade.

As éguas receptoras receberam, em média, 1,11 embriões, sem consequente confirmação da prenhez aos 60 dias de gestação na estação reprodutiva anterior ao estudo. Porém, 62,96% das éguas com histórico coletado (17/27), não estavam aptas a receber o embrião durante a seleção no momento da TE, não lhe sendo transferido nenhum embrião durante toda a estação (Figura 10).

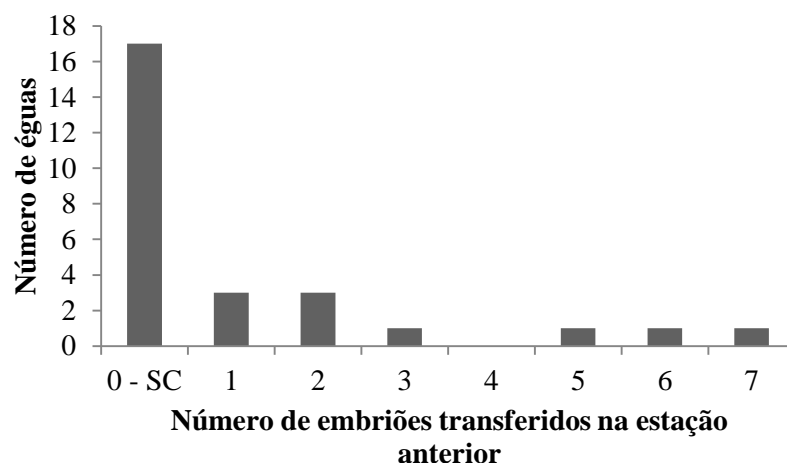


Figura 10: Distribuição das éguas receptoras de acordo com o número de embriões transferidos na estação reprodutiva anterior. SC: sem condições de receber embrião.

Estes dados demonstram que a maioria das éguas receptoras consideradas problema e retiradas do programa de TE, sequer estiveram aptas para receber o embrião durante a estação reprodutiva. Portanto, a perda embrionária precoce não foi a principal causa de problemas reprodutivos em receptoras, e sim os achados clínico-reprodutivos durante o exame rotineiro de palpação e ultrassonografia destes animais, principalmente na avaliação da égua no momento da TE.

O exame ginecológico antes da estação reprodutiva poderia ter diagnosticado o *status* reprodutivo destes animais, a fim de tratá-los ou mesmo substituí-los antes da utilização no programa de TE.

2. Exame clínico reprodutivo

2.1. Conformação do períneo

Os resultados do exame de conformação do períneo demonstram que 13 das 40 éguas avaliadas (32,5%) foram positivas, possuindo pelo menos um dos parâmetros avaliados neste exame (conformação vulvar, fechamento vulvar, IC e presença de pneumovagina e/ou urovagina) considerado positivo. Das 26 éguas com endometrite diagnosticada, 11 (42,30%) foram positivas para conformação do períneo (Figura 11). Estes animais podem ter tido a má conformação associada à contaminação ascendente do útero e a predisposição à inflamação como fatores desencadeantes da endometrite.



Figura 11: Períneo de égua receptora com resultado positivo no exame de conformação do períneo durante avaliação ginecológica. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.

Os valores médios entre as 40 éguas avaliadas de comprimento da comissura vulvar, comprimento efetivo e ângulo de inclinação foram 9,8 cm, 3,2 cm, e 18,8° respectivamente.

Foram consideradas positivas 10 éguas (25%) por possuírem a conformação vulvar ruim, entretanto, a maioria, 21 animais (52,5%), foi classificada com a conformação da vulva boa, e o restante, 9 animais (22,5%), como ótima (Figura 12). Das 10 éguas classificadas com conformação ruim, 9 foram positivas para endometrite.

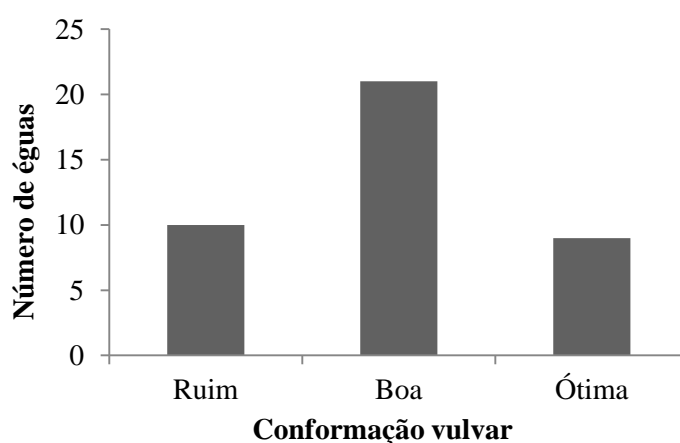


Figura 12: Distribuição das éguas receptoras de acordo com a classificação da conformação vulvar.

Foram consideradas positivas para o fechamento vulvar 11 éguas (27,5%), que possuíam fechamento ruim e teste de *windsuck* positivo. 22 (55%) foram classificadas com o fechamento vulvar bom e o restante, 7 animais (17,5%), como

ótimo (Figura 08). Das 11 éguas classificadas com o fechamento vulvar ruim, 9 foram positivas para endometrite.

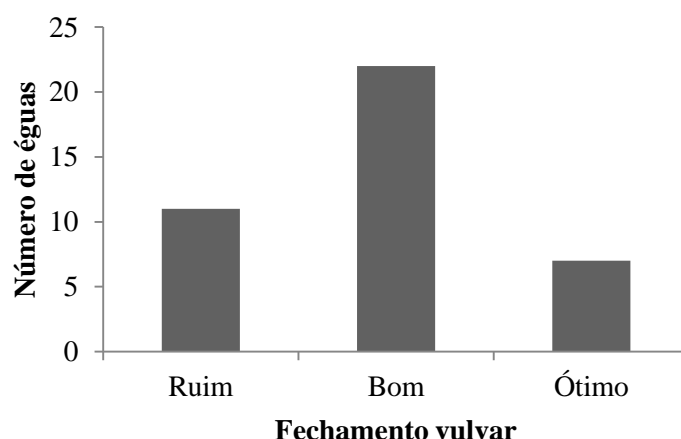


Figura 13: Distribuição das éguas receptoras de acordo com a classificação do fechamento vulvar.

Dos animais avaliados, 10 éguas apresentavam pneumovagina e/ou urovagina (25%), sendo que 8 possuíam apenas pneumovagina e 2 pneumovagina e urovagina. Todas as éguas positivas para presença de pneumovagina e/ou urovagina, também foram positivas para pelo menos um dos outros parâmetros avaliados durante o exame de conformação do períneo. Das 10 éguas que apresentavam pneumovagina e/ou urovagina, 9 foram positivas para endometrite.

O valor encontrado neste estudo referente à porcentagem de éguas com pneumovagina (25%) foi inferior ao encontrado por CARVALHO *et al.* (2011), que relataram 42,8% dos animais apresentando pneumovagina.

O Índice de Caslick variou de 3,5 a 350 e o valor médio entre os animais foi de 74,65, sendo 9 éguas (22,5%) consideradas positivas por apresentarem valores acima de 150, necessitando de correção por vulvoplastia.

Nenhum dos animais avaliados possuía evidências de realização de vulvoplastia, mesmo este procedimento sendo relativamente simples e podendo ser realizado a campo. A correção perineal ainda sofre resistência quanto a sua realização e praticidade, principalmente em éguas receptoras, porém, tal cirurgia poderia corrigir grande parte dos problemas anatômicos encontrados, e até mesmo diminuir o número de animais positivos para endometrite.

A má conformação anatômica dos animais considerados positivos neste parâmetro pode ter levado a inflamação persistente, visto que, torna as éguas

susceptíveis a infecção, além de ter sido um fator responsável por falhas nos tratamentos realizados.

2.2. Palpação e ultrassonografia

A partir do exame de palpação e ultrassonografia transretal, 21 animais foram classificados como positivos (52,5%), possuindo edema endometrial não condizente com a fase do ciclo estral, edema endometrial exagerado ou hiperedema e/ou Líquido Intrauterino (LIU).

Classificando os 40 animais de acordo com a fase do ciclo estral, não foi diagnosticado animal em anestro, 22 estavam no estro e 18 em diestro (Figura 14), e todos apresentaram tônus cervical e uterino condizentes com a fase do ciclo estral.

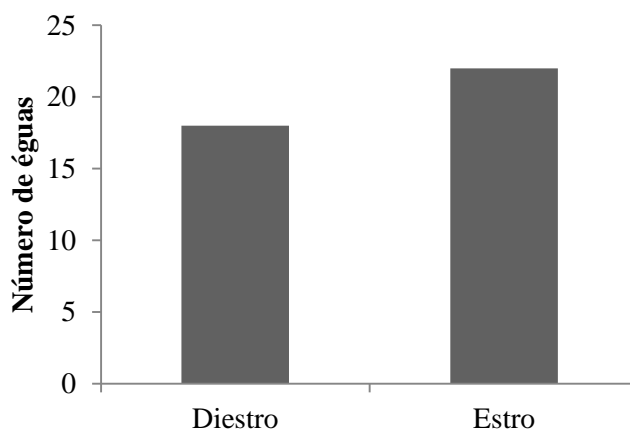


Figura 14: Distribuição das éguas receptoras de acordo com a fase do ciclo estral.

Quanto à classificação do edema endometrial, 10 animais (25%) foram considerados com edema anormal, sendo que um apresentou edema 4 (exagerado), dois apresentaram edema 5 (hiperedema) e sete apresentaram edema não condizente com a fase do ciclo estral.

O edema endometrial apresentou efeito significativo sobre a probabilidade de infecção uterina, isto é, de cultura positiva, de modo que o edema anormal aumentou em 11,77 vezes as chances de haver infecção uterina. RASMUSSEN *et al.* (2015) também encontraram éguas com edema anormal e maior propensão a cultura positiva, porém com 5,48 vezes mais chances apresentar infecção.

A presença de LIU foi detectada em 15 animais (37,5%). CARVALHO *et al.* (2011) também avaliando éguas com histórico de subfertilidade, encontrou valor comparável ao presente estudo, em que 38,1% dos animais apresentavam LIU. Já

OVERBECK *et al.* (2011) encontrou valores inferiores, de 16,7% das éguas com presença de LIU.

A classificação dos animais que apresentaram LIU quanto ao volume e à ecogenicidade encontram-se nas Tabelas 05 e 06.

Tabela 05: Distribuição das éguas receptoras que possuíram líquido intrauterino de acordo com o volume apresentado.

Classificação quanto ao volume	Número de animais	Porcentagem
1 (menor que 1 cm)	1	6,66%
2 (1 a 2 cm)	6	40%
3 (2 a 4 cm)	4	26,66%
4 (4 a 10 cm)	1	6,66%
5 (maior que 10 cm)	3	20%

Tabela 06: Distribuição das éguas receptoras que possuíram líquido intrauterino de acordo com a ecogenicidade apresentada.

Classificação quanto à ecogenicidade	Número de animais	Porcentagem
1 (não ecogênico)	7	46,66%
2 (pouco ecogênico)	3	20%
3 (moderada ecogenicidade)	3	20%
4 (muito ecogênico)	2	13,33%

A presença de ecogenicidade (de qualquer classificação) apresentou efeito significativo sobre a probabilidade de haver infecção uterina e de se obter diagnóstico positivo para endometrite, de modo que a presença de ecogenicidade aumenta em 9,6 vezes as chances de haver infecção, e 12,99 vezes as chances de se obter o diagnóstico positivo ($P < 0.05$).

O volume de LIU também afetou significativamente a probabilidade de se obter diagnóstico positivo para endometrite, de modo que quanto maior o volume, maior a probabilidade de se ter um diagnóstico positivo (Figura 15).

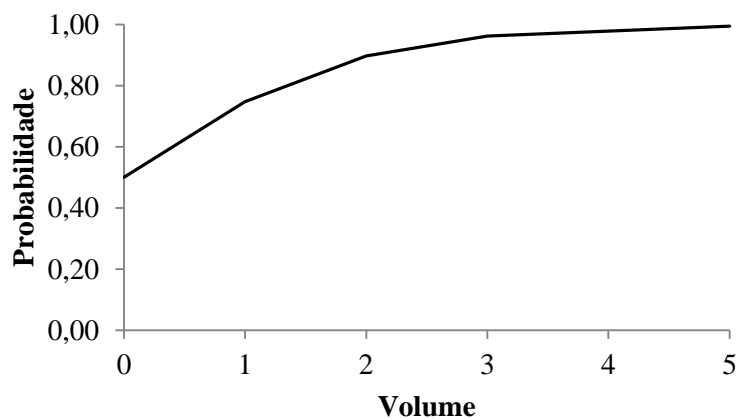


Figura 15: Probabilidade do diagnóstico positivo para endometrite em éguas receptoras de acordo com a classificação do volume do líquido intrauterino.

2.3. Vaginoscopia

No exame de vaginoscopia, 10 animais (25%) apresentaram uma ou mais alterações, sendo considerados positivos neste exame. Cinco animais possuíam a abertura da cérvix tortuosa, em três a coloração da mucosa foi classificada como hipocorada, em seis algum tipo de secreção identificada ao exame (Figura 16) e quatro apresentaram indício de traumas. Todos os animais tiveram o posicionamento e tônus da cérvix condizente com a fase do ciclo estral em que se encontravam.



Figura 16: Égua receptora apresentando secreção durante o exame de vaginoscopia na avaliação ginecológica. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.

2.4. Exame da cérvix

Para o exame da cérvix, foram observados 15 animais (37,5%) positivos, sendo detectadas uma ou mais alterações nas éguas. Doze animais apresentaram a cérvix tortuosa, seis possuíam divertículo, em cinco havia fibrose, quatro

apresentavam aderências, em três havia secreção e em um havia laceração. Tais defeitos anatômicos podem comprometer a eficiência da proteção e limpeza uterina realizada pela cérvix, podendo ser um fator que leve a infecção recorrente dos animais, e conseqüentemente, a inflamação persistente, isto é, a endometrite.

3. Exames laboratoriais

3.1. Avaliação do efluxo do LBV

Neste estudo, após infusão de 60 mL de solução no útero, foi recuperado, em média, 30 mL para avaliação do efluxo, exame citológico endometrial e exame de cultura microbiológica uterina. COCCHIA *et al.* (2012) e LEBLANC *et al.* (2007), infundindo 60 mL de solução e utilizando sonda com balão, recuperaram 30 mL e 34 mL em média respectivamente. Assim os valores médios de líquido recuperados utilizando sonda com balão foram semelhantes ao do presente estudo utilizando sonda sem balão, sendo esta técnica também viável para realização do LBV, e possuindo a vantagem da sonda possuir menor custo e ser descartável.

A avaliação da característica do efluxo recolhido durante o LBV resultou em sete animais (17,5%) positivos, apresentando aspecto e celularidade anormais, e/ou a presença de secreção. LEBLANC *et al.* (2007) e AMORIM *et al.* (2016) encontraram 65% e 40% dos animais com alterações no efluxo respectivamente. Estes dados foram superiores ao do presente estudo (17,5%), podendo ser explicado pelos diferentes microrganismos isolados e suas diferentes prevalências, além deste ser um método subjetivo de avaliação.

3.2. Citologia endometrial

No exame citológico, das 40 éguas avaliadas, 21 foram positivas (52,5%) levando em consideração os três métodos de coleta de amostras (Tabela 07). Entre as éguas positivas, 14 (66%) tiveram a inflamação classificada como leve, sete (33%) como moderada e nenhuma égua teve inflamação grave.

Tabela 07: Número, porcentagem e classificação das éguas receptoras de acordo com os resultados do exame citológico endometrial.

Resultado	Número de animais	Porcentagem	Classificação		
			Leve	Moderada	Grave
Negativo	19	47,5%	-	-	-
Positivo	21	52,5%	14	7	0

A porcentagem de animais positivos para o exame citológico no presente estudo (52,5%) é comparável as relatadas por NIELSEN (2005) e AMORIM *et al.* (2016) de 56% e 46% respectivamente. Porém o valor percentual foi superior aos relatados por OVERBECK *et al.* (2011), LEBLANC *et al.* (2007) e RASMUNSSSEN *et al.* (2015), que encontraram os valores de 20,0%, 26,0% e 28,6% respectivamente, e inferior ao relatado por CARVALHO *et al.* (2011) de 85,7% de animais positivos.

A discrepância entre os resultados pode ser explicada pelas diferentes técnicas de coleta de amostras e análises dos resultados, animais de categorias distintas utilizados para o exame nos estudos, além da diferença entre os microrganismos mais comumente isolados, visto que, alguns microrganismos causam uma maior resposta inflamatória que outros.

Nenhum dos animais foi diagnosticado com inflamação grave perante o exame citológico, sendo a maioria dos animais com inflamação leve. Isto significa que grande parte dos animais teria prognóstico favorável se o tratamento adequado fosse implementado.

3.3. Cultura microbiológica uterina

Os resultados do exame de cultura uterina foram positivos em 25 dos 40 animais avaliados (62,5%), levando em consideração as três técnicas de coleta de amostras utilizadas (Tabela 08). Apesar das diferentes localizações geográficas, técnicas de coleta de amostras e interpretações, tal resultado é semelhante, aos de JACOB *et al.* (2002), CABRERA *et al.* (2016), LEBLANC *et al.* (2007) OLIVEIRA *et al.* (2007) e CARVALHO *et al.* (2011), que também utilizando animais com histórico de subfertilidade, encontraram respectivamente 73,3%, 71,4%, 70%, 68,0%, 61,9% dos animais apresentando crescimento bacteriano.

Tabela 08: Número e porcentagem de éguas receptoras de acordo com o resultado do exame de cultura microbiológica uterina.

Resultado	Número de animais	Porcentagem
Negativo	15	37,5%
Positivo	25	62,5%

Entre os 25 animais positivos no exame de cultura uterina, 14 (56%) tiveram crescimento de apenas uma espécie de microrganismo, enquanto 11 (44%) tiveram crescimento misto, isto é, de duas ou mais espécies de microrganismos (Tabela

09). Estes resultados são semelhantes aos de CARVALHO *et al.*, (2011), em que o isolamento concomitante de mais de um microrganismo foi observado em 42,8% das amostras positivas para cultura uterina de éguas com histórico de subfertilidade.

Tabela 09: Número e porcentagem de éguas receptoras de acordo com o crescimento de microrganismos isolados ou misto.

Crescimento do microrganismo	Número de animais	Porcentagem
Isolado	14	56%
Misto	11	44%

A maior frequência de crescimento foi de *Staphylococcus* spp. (60%), seguida de *Escherichia coli* (40%), *Enterobacter* spp. (28%) e *Citrobacter* spp. (20%) (Tabela 10).

Tabela 10: Distribuição dos gêneros de microrganismos isolados na cultura microbiológica uterina de éguas receptoras.

Microrganismo	Frequência	Porcentagem	Crescimento isolado	Crescimento misto
<i>Staphylococcus</i> spp.	15	60%	4	11
<i>Escherichia coli</i>	10	40%	5	5
<i>Enterobacter</i> spp.	7	28%	5	2
<i>Citrobacter</i> spp.	5	20%	2	3

Todos os gêneros encontrados no estudo são comumente isolados do útero de éguas, porém a que apresenta maior frequência, *Staphylococcus* spp., diferiu da maioria das citações bibliográficas, visto que, *Streptococcus* spp. (RIDDLE *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2010; RICKETTS, 2011; BUCZKOWSKA *et al.*, 2014) e *Escherichia coli* (CABRERA *et al.*, 2016; LEBLANC *et al.*, 2007; CHRISTOFFERSEN *et al.* 2015; DAVIS *et al.*, 2013) são as mais frequentemente isoladas.

Em estudo semelhante, JACOB *et al.* (2002) relataram que *Enterobacter* spp. foi o gênero mais frequentemente isolado, também contrariando a maioria dos resultados já encontrados. Esta diferença de frequência de microrganismo mais comumente isolado pode ser explicada devido às diferentes localizações geográficas em que os animais estudados encontram-se, e a exposição a diferentes antimicrobianos (CABRERA *et al.* 2016).

Os microrganismos menos isolados foram *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp., mas existem controvérsias quanto à patogenicidade e importância destes na endometrite, devendo levar em consideração outros achados indicativos de endometrite durante o exame ginecológico, a fim de se obter um diagnóstico preciso.

No teste *in vitro* de susceptibilidade aos antimicrobianos, observou-se que todos os microrganismos encontrados foram sensíveis a sulfa/trimetoprim, enrofloxacina e florfenicol (Tabela 11). Estes resultados corroboram com JACOB *et al.* (2002) que observaram que a maioria dos microrganismos foram sensíveis a ação da sulfa/trimetoprim, seguido pela enrofloxacina e florfenicol, e com CÂMARA *et al.* (2013) e CABRERA *et al.* (2016) que observaram a enrofloxacina apresentando a maior sensibilidade.

Tabela 11: Susceptibilidade *in vitro* dos microrganismos isolados de éguas receptoras aos antimicrobianos.

Microrganismo	AMP	PEN	GEN	TET	CEF	STR	ENR	FLO	NEO
<i>Staphylococcus</i> spp.	R	R	R	S	S	S	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	R	R	S	R	R	S	S	S	R
<i>Enterobacter</i> spp.	R	R	S	S	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter</i> spp.	R	R	S	S	S	S	S	S	R

Ampicilina (AMP), Penicilina (PEN), Gentamicina (GEN), Tetraciclina (TET), Ceftiofur (CEF), Sulfa/trimetoprim (STR), Enrofloxacina (ENR), Florfenicol (FLO) e Neomicina (NEO). Sensível (S) e Resistente (R) ao antimicrobiano.

A maioria dos animais já havia sido submetida ao tratamento com antimicrobianos, porém o uso da droga sem a realização da cultura uterina e do teste de susceptibilidade pode ter causado a falha no tratamento, uma vez que um ou mais dos microrganismos são resistentes aos antimicrobianos. Além disto, animais susceptíveis podem ter contribuído para recidiva da infecção e da inflamação.

3.4. Avaliação histopatológica endometrial

A avaliação histopatológica detectou alterações condizentes com a inflamação do endométrio em 65% dos animais (26/40). A classificação de acordo com os graus de alterações foram de 35% das éguas grau 1, sem alterações ou negativas (Figura 17), 37,5% grau 2A, com alterações leves, 17,5% grau 2B, com alterações moderadas, e 10% grau 3, com alterações graves (Figura 18).

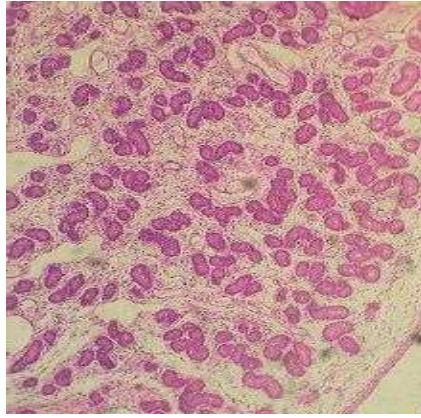


Figura 17: Imagem microscópica de lâmina histológica do endométrio de égua receptora sem alterações histopatológicas, grau 1. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.

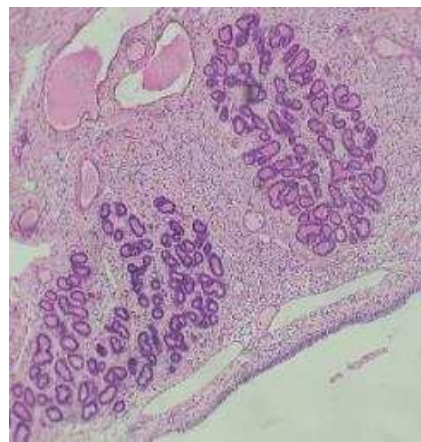


Figura 18: Imagem microscópica de lâmina histológica do endométrio de égua receptora com alterações histopatológicas, grau 3. Fonte: arquivo pessoal Carlos Mattos.

Apenas 10% dos animais foram considerados com endometrite grave, com conseqüente prognóstico ruim, e os demais animais com endometrite leve e moderada, totalizando 55% dos animais. Os animais com endometrite leve e moderada poderiam ser tratados, com uma expectativa de bom prognóstico. Após o tratamento e nova avaliação, os animais poderiam ser reintroduzidos no programa de TE, diminuindo custos com aquisição de novos animais.

O valor de prevalência da endometrite encontrado no presente estudo foi comparável aos relatados por KOZDROWSKI *et al.* (2015) e BUCZKOWSKA *et al.* (2014), que encontraram 66% e 68,3% respectivamente dos animais com endometrite.

A endometrite é a principal causa de subfertilidade e, conseqüentemente, éguas problemas na reprodução equina, porém diferentes prevalências desta patologia foram descritas no passado, variando de 25 a 60% dos animais

acometidos por tal afecção (DIMOCK & EDWARDS, 1928; COLLINS, 1964; BAIN, 1966; DOIG *et al.*, 1981). Contudo, pesquisas recentes demonstram que a porcentagem de animais com endometrite pode superar os 60%, alcançando valores como 90,4% e 97,0% (OVERBECK *et al.*, 2011; LEBLANC *et al.*, 2007).

Os estudos supracitados utilizaram o exame histológico, a partir da coleta de amostras por biópsia endometrial, como referência de diagnóstico da endometrite, porém, não utilizaram éguas receptoras com problemas reprodutivos para diagnóstico da endometrite, mas sim outras categorias de animais, como matrizes e doadoras, o que poderia explicar a diferença nos resultados obtidos. O manejo das diferentes categorias de animais poderia influenciar diretamente os resultados, visto que as receptoras não recebem os mesmos cuidados que as doadoras e matrizes em um mesmo plantel.

4. Comparação entre os exames de diagnóstico da endometrite

A presença de PMNs no estrato compacto endometrial durante a avaliação histopatológica é atualmente o método mais confiável para o diagnóstico da endometrite, sendo usado como referência para este diagnóstico (NIELSEN, 2005; LEBLANC *et al.*, 2007; OVERBECK *et al.*, 2011, KOZDROWSKI *et al.*, 2015). Sustentando este fato, NIELSEN *et al.* (2012) demonstraram uma forte correlação negativa entre a presença de PMNs no exame histológico e o diagnóstico de gestação em éguas.

Entretanto, assim como a presença de PMNs, outras alterações durante o exame histológico podem ser associadas com a endometrite. Os resultados do exame histológico no presente estudo demonstraram que houve associação ($p < 0,05$) entre a distribuição das glândulas endometriais e o diagnóstico positivo da endometrite, sendo que as formações de aglomerações glandulares contribuíram para o diagnóstico positivo. Esta distribuição glandular se dá devido à presença de fibrose no tecido endometrial, e principalmente pela fibrose periglandular, as quais também tiveram associação ($p < 0,05$) com o diagnóstico positivo (Tabela 12).

Tabela 12: Associação das alterações encontradas durante o exame histológico e seu resultado utilizando o Teste exato de Fisher.

Parâmetro avaliado	Presença de alteração	Resultado do exame histológico	
		Negativo	Positivo
Distribuição glandular em aglomerações	Sim	0 (0,0)	11 (27,5)
	Não	14 (35,0)	15 (37,5)
Fibrose endometrial	Sim	0 (0,0)	25 (62,5)
	Não	14 (35,0)	1 (2,5)
Fibrose periglandular	Sim	0 (0,0)	11 (27,5)
	Não	14 (35,0)	15 (37,5)

Durante a avaliação histológica devem ser levadas em consideração as demais alterações além da presença de PMNs. Tais anormalidades podem auxiliar na classificação da endometrite e aumentar a sensibilidade e especificidade do exame, e até mesmo na decisão do profissional quanto ao tratamento e prognóstico do animal.

Neste sentido, o presente estudo utilizou as alterações encontradas durante a avaliação histológica, incluindo a presença de PMNs, distribuição das glândulas e presença de tecido fibrótico para determinar se o animal é positivo no exame histológico. Este foi considerado como padrão ouro para o diagnóstico da endometrite, isto é, serviu como referência para comparação e correlação dos métodos de coleta de amostras e dos exames de diagnóstico utilizados no estudo.

Ao interpretar os resultados, deve-se considerar que nenhum teste de diagnóstico é totalmente preciso, e, além disto, que nem sempre há condições ideais para a realização do exame com maior sensibilidade e especificidade. Para o exame histológico é necessário a coleta de amostra a partir da biópsia uterina, porém, é considerada um método invasivo, pouco prático e de resultado demorado em relação aos demais métodos de diagnóstico. Assim, buscam-se métodos, ou a associação destes, para tornar o diagnóstico mais rápido e eficiente. Deste modo, foram comparados ao exame histológico os demais métodos de diagnóstico rotineiramente realizados durante o exame ginecológico, sendo os resultados obtidos demonstrados na Tabela 13.

Entre os exames clínicos reprodutivos, a avaliação do animal por palpação e ultrassonografia apresentou os melhores resultados, seguidos pelo exame da cérvix, da conformação do períneo e da vaginoscopia. O exame de palpação e ultrassonografia é realizado rotineiramente na avaliação da égua receptora, podendo ser eficaz para triagem dos animais e posterior utilização de métodos de

diagnóstico mais avançados, visto que, possuiu resultados substanciais para o diagnóstico da endometrite, além de ser de simples e rápida execução.

Tabela 13: Comparação entre os diferentes métodos de diagnóstico da endometrite utilizados no exame ginecológico em comparação ao exame histopatológico do endométrio.

Método de diagnóstico	Coefficiente Kappa e força de acordo*	Sensibilidade	Especificidade	IC _{95%}	P-valor
Palpação e US	0,6447 - Substancial	0,76	0,92	0,4135 – 0,8758	<0,0001
Con. do Périneo	0,2308 - Leve	0,42	0,85	-0,0010 – 0,4626	0,0711
Vaginoscopia	0,1304 - Pobre	0,30	0,85	-0,0779 – 0,3388	0,2508
Exame da cérvix	0,3023 - Leve	0,50	0,85	0,0582 – 0,5465	0,0261
Cultura CC	0,7938 - Substancial	0,84	1,00	0,6062 – 0,9814	<0,0001
Cultura LBV	0,6907 - Substancial	0,80	0,92	0,4677 – 0,9138	<0,0001
Cultura LFBE	0,2373 - Leve	0,30	1,00	0,0683 – 0,4063	0,0203
Citologia CC	0,7000 - Substancial	0,76	1,00	0,4889 – 0,9111	<0,0001
Citologia LBV	0,7000 - Substancial	0,76	1,00	0,4889 – 0,9111	<0,0001
Citologia LFBE	0,2373 - Leve	0,30	1,00	0,0683 – 0,4063	0,0203
Avaliação do efluxo de LBV	0,2050 - Leve	0,26	1,00	0,0479 – 0,3621	0,0326

*Valores Kappa e força de acordo 0,00-0,19 (pobre); 0,20-0,39 (leve); 0,40-0,59 (moderada); 0,60-0,79 (substancial); 0,80-1,00 (quase perfeita) (LANDIS & KOCH, 1977). US = Ultrassonografia; CC = Coletor Comercial; LBV = Lavado de Baixo Volume; LFBE = Lavado do Fragmento da Biópsia Endometrial; IC = Índice de Confiança.

Os exames laboratoriais de citologia e cultura uterina, independente da técnica de coleta de amostras, são considerados mais complexos do que os exames de avaliação clínica, exigindo equipamentos e materiais específicos, maior tempo de execução e custo e, por isso, não são rotineiramente realizados a campo em éguas receptoras. Entretanto, estes exames apresentaram melhores resultados quando comparados aos demais exames clínicos, podendo ser realizados após uma triagem dos animais.

A avaliação do efluxo do LBV não apresentou resultados satisfatórios no diagnóstico da endometrite, porém esta técnica pode ser utilizada como uma ferramenta auxiliar para diagnóstico quando associada a outros métodos, principalmente o exame da cultura uterina. LEBLANC *et al.* (2007), em um estudo também avaliando o efluxo do LBV, correlacionaram anormalidades com a presença de microrganismos. Assim, a avaliação do efluxo pode aumentar a sensibilidade e a especificidade dos exames, diminuindo o índice de resultados falsos positivos e negativos.

A realização de vários métodos de diagnóstico durante a avaliação ginecológica pode ser uma alternativa quando não é possível a prática de algum exame, ou até mesmo para se tomar decisões antes do resultado final do exame ginecológico completo. Neste sentido, AMORIM *et al.* (2016) desenvolveram uma lista de verificação da endometrite, utilizando cinco indicadores (achados clínicos, característica do efluxo do LBV, citologia uterina, cultura uterina e histologia uterina), e, se o animal apresentasse dois destes indicadores positivos, seria considerado positivo para endometrite.

No presente estudo, comparando os sete exames realizados (conformação do períneo, palpação e ultrassonografia, vaginoscopia, exame da cérvix, avaliação do efluxo de LBV, citologia uterina e cultura uterina) com o exame histopatológico, verificou-se que o número de diagnósticos positivos apresentou influência na probabilidade de se obter um diagnóstico para endometrite, de modo que, quanto maior o número de exames positivos, maior a probabilidade da égua realmente ter endometrite (Figura 19). Desta forma, a realização de diferentes exames e a associação de resultados podem ser alternativas eficientes para o diagnóstico da endometrite.

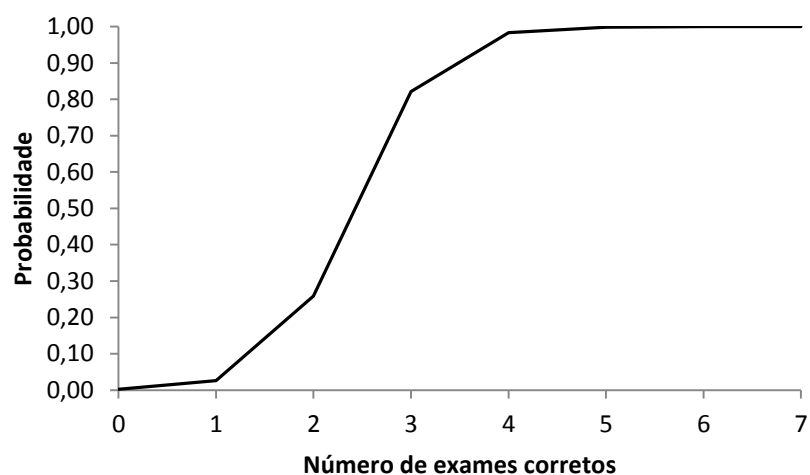


Figura 19: Probabilidade de se obter o diagnóstico positivo para endometrite pelo exame histológico em relação ao número de exames corretos.

5. Comparação entre as técnicas de coleta de amostras

Foram comparadas três técnicas de coleta de amostras comumente utilizadas para o exame de citologia e cultura uterina, (1) CC, (2) LBV e (3) BE, porém, para esta última, com intuito de maior preservação celular e evitar contaminações, foi realizado um processamento diferente da amostra, ainda não

descrito, no qual o fragmento resultado de BE foi lavado para a obtenção da amostra, sendo denominado de lavado do fragmento da biópsia endometrial (LFBE).

Comparando as três técnicas para o exame citológico, CC e LBV detectaram 20 animais (50%) como positivos, enquanto LFBE detectou apenas oito animais positivos (20%) (Tabela 14). Os valores de sensibilidade de CC e LBV foram iguais (0,76), e o de LFBE foi inferior (0,30), possuindo este, um alto índice de resultados falsos negativos. Quanto aos valores referentes à especificidade, foram idênticos entre os três métodos de coleta (1,00), isto é, nenhum dos métodos diagnosticou um animal como positivo para endometrite, sendo que este foi negativo perante o exame histológico, não sendo evidenciado o risco de falso positivo para citologia uterina neste estudo.

Tabela 14: Número de animais e porcentagem de acordo com o resultado do exame citológico uterino a partir de diferentes formas de coleta de amostra e sua classificação.

Forma de coleta	Resultado	Número de animais	Porcentagem	Classificação		
				Leve	Moderada	Grave
CCE	Negativo	20	50%	-	-	-
	Positivo	20	50%	13	7	0
LBV	Negativo	20	50%	-	-	-
	Positivo	20	50%	13	7	0
LFBE	Negativo	32	80%	-	-	-
	Positivo	8	20%	6	2	0

CCS = Coletor Comercial do tipo escova citológica; LBV = Lavado intrauterino de Baixo Volume; LFBE = Lavado do Fragmento da Biópsia Endometrial.

No exame de cultura uterina, CC e LBV detectaram 22 animais dos 40 avaliados (55%) como positivos, enquanto LFBE detectou apenas oito animais positivos (20%) (Tabela 15). O CC apresentou o maior valor referente à sensibilidade do exame (0,84), seguido por LBV (0,80), e LFBE (0,30). Quanto à especificidade, CC e LFBE apresentaram o valor 1,00, ou seja, não havendo risco de falso positivo, seguido por LBV, com 0,92.

Tabela 15: Crescimento de microrganismos de acordo com a forma de coleta de amostra utilizada na cultura uterina.

Forma de coleta	Crescimento de microrganismo	Número de animais	Porcentagem
CCS	Negativo	18	45%
	Positivo	22	55%
	Isolado	13	32,5%
	Misto	9	22,5%
LBV	Negativo	18	45%
	Positivo	22	55%
	Isolado	17	42,5%
	Misto	5	12,5%
LFBE	Negativo	32	80%
	Positivo	8	20%
	Isolado	8	20%
	Misto	0	0

CCS = Coletor Comercial do tipo *swab*; LBV = Lavado intrauterino de Baixo Volume; LFBE = Lavado do Fragmento da Biópsia Endometrial.

5.1. Coletor comercial (CC)

A técnica de coleta de amostras a partir do CC, seja CCS para cultura ou CCE para citologia, foi de rápida e prática execução em condições a campo, além de demonstrar valores satisfatórios de sensibilidade e especificidade.

Quando comparada às demais técnicas, o CCE possuiu um maior número de células coletadas durante o exame citológico, visto que, a celularidade observada foi classificada como alta na maioria das lâminas avaliadas, semelhante ao encontrado por KOZDROWSKI *et al.* (2015). Isto pode ser explicado pelo fato de as fibras da escova adentrarem o epitélio e permitirem a colheita de um número maior de células, o que, conseqüentemente, permite uma avaliação mais rápida do esfregaço (OVERBECK *et al.*, 2011).

A utilização de CCE no exame citológico possuiu valor de sensibilidade comparável aos relatados por BUCZKOWSKA *et al.* (2014) e KOZDROWSKI *et al.* (2015) usando a mesma técnica (0,71 e 0,70). Quanto à especificidade de CCE, não houve grande discrepância em relação aos estudos, já que estes observaram sempre valores acima de 0,80 (OVERBECK *et al.*, 2011; BUCZKOWSKA *et al.*, 2014; KOZDROWSKI *et al.*, 2015).

No exame de cultura uterina, o CCS possuiu valores superiores quando comparados às demais técnicas utilizadas no estudo, mostrando ser mais sensível e específica ao mesmo tempo, além de suas vantagens de praticidade no momento

da coleta. O valor de especificidade foi igual ao relatado por NIELSEN (2005) (1,00), e comparável aos de OVERBECK *et al.* (2011) e CHRISTOFFERSEN *et al.* (2015) (0,83; e 0,90). Porém, quanto à sensibilidade, o valor encontrado no presente estudo (0,84) foi superior e diferiu dos autores citados anteriormente, que relataram valores parecidos entre si (0,34; 0,33; e 0,33), sendo justificados por diferentes frequências e tipos de microrganismos isolados nos estudos, além das diferentes categorias de animais examinadas.

5.2. Lavado intrauterino de baixo volume (LBV)

O LBV foi desenvolvido com o intuito de se apresentar como um teste de diagnóstico com sensibilidade e especificidade comparáveis aos de uma biópsia (CHRISTOFFERSEN, 2015), contudo, permitindo a amostragem de uma área maior do endométrio, diferentemente do contato limitado proporcionado pelo CC. Entretanto, no presente estudo, os valores de sensibilidade e especificidade do LBV e de CCE foram iguais para o exame citológico. Este fato pode ser explicado por uma baixa taxa de recuperação celular por LBV, sugerindo uma distribuição desigual do fluido, que pode não ter atingido todo o útero (KATILA, 2016). Além disto, LEBLANC *et al.* (2007) também relataram que a centrifugação após o LBV pode romper as paredes celulares, levando a maior quantidade de detritos e dificultando a avaliação das lâminas citológicas.

O valor de sensibilidade encontrado neste estudo utilizando LBV para o exame citológico foi comparável ao relatado por LEBLANC *et al.* (2007) – 0,80 – utilizando a mesma técnica de amostragem, porém antagônico ao encontrado por CHRISTOFFERSEN *et al.* (2015) – 0,08. Quanto à especificidade, o resultado foi comparável ao de CHRISTOFFERSEN *et al.* (2015) – 0,95 – e com maior discrepância quanto ao valor encontrado por LEBLANC *et al.* (2007) – 0,67. Estes valores podem estar associados a diferentes formas de interpretação de resultados, uma vez que os parâmetros de referência de PMNs variavam entre os estudos.

Para o exame de cultura uterina utilizando o LBV, LEBLANC *et al.* (2007) encontraram valores de sensibilidade e especificidade relativamente maiores que as demais técnicas. Esta técnica abrange uma maior área uterina durante a amostragem, e algumas bactérias como a *Escherichia coli*, a mais isolada pelos autores, possui a característica de ocorrer de forma localizada, sugerindo que o uso do lavado permite a cultura desta bactéria mais facilmente em comparação as

técnicas consideradas localizadas (LEBLANC *et al.*, 2007; KATILA, 2016). No presente estudo, utilizando-se o CC e o LFBE, *Staphylococcus* spp. foi o microrganismo mais isolado, porém para o LBV, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., foram as bactérias mais isoladas (Tabela 16). Este resultado sugere que LBV é mais sensível para obtenção de *Escherichia coli*.

Com intuito de aumentar a sensibilidade do LBV para o exame da cultura, CHRISTOFFERSEN *et al.* (2015) utilizaram a técnica de LBV protegida, pois consideraram a microbiota vaginal como uma possível fonte de resultados de cultura falso positivo. LEBLANC *et al.* (2007), com intuito de aumentar a sensibilidade da técnica, sugeriram que apenas fossem classificadas as amostras como positivas se o crescimento fosse obtido junto com um líquido de efluxo turvo e detritos no exame de citologia.

Tabela 16: Distribuição dos microrganismos isolados no exame microbiológico uterino de éguas receptoras de acordo com os diferentes tipos de coleta de amostras.

Forma de coleta	Bactéria isolada	Número de amostras	Porcentagem	Crescim. isolado	Crescim. misto
CC	<i>Staphylococcus</i> spp.	12	54,54%	3	9
	<i>Escherichia coli</i>	9	40,9%	5	4
	<i>Enterobacter</i> spp.	7	31,81%	5	2
	<i>Citrobacter</i> spp.	4	18,18%	0	4
LBV	<i>Staphylococcus</i> spp.	8	36,36%	3	5
	<i>Escherichia coli</i>	8	36,36%	6	2
	<i>Enterobacter</i> spp.	6	27,27%	6	0
	<i>Citrobacter</i> spp.	5	22,72%	2	3
LFBE	<i>Staphylococcus</i> spp.	4	50%	3	0
	<i>Escherichia coli</i>	3	37,5%	6	0
	<i>Enterobacter</i> spp.	1	12,5%	6	0

CC = Coletor Comercial; LBV = Lavado intrauterino de Baixo Volume; LFBE = Lavado do Fragmento da Biópsia Endometrial.

Entretanto, no presente estudo, sem utilizar de técnicas com a finalidade de aumentar a sensibilidade para cultura uterina, o LBV mostrou resultados satisfatórios, uma vez que o valor foi comparável ao relatado por LEBLANC *et al.* (2007) – 0,71 – e CHRISTOFFERSEN *et al.* (2015) – 0,75. Quanto à especificidade, os resultados também foram satisfatórios, uma vez que também foram comparáveis aos de LEBLANC *et al.* (2007) e CHRISTOFFERSEN *et al.* (2015) – 0,86; e 0,72.

A realização do LBV em nosso estudo se tornou laboriosa, visto que necessitou da realização de uma etapa de centrifugação da amostra posterior a coleta, o que requer equipamentos e demanda mais tempo, podendo ser um empecilho sua aplicação a campo, além da diluição das amostras, diminuindo o número de células durante a avaliação do esfregaço citológico.

5.3. Lavado do fragmento da biópsia endometrial (LFBE)

A técnica de processamento do fragmento obtido por biópsia endometrial a partir do lavado com solução estéril foi realizada como alternativa ao *imprint* na lâmina para citologia, na tentativa de diminuir a contaminação e aumentar a qualidade das células coletadas. No entanto, o LFBE, em relação aos demais métodos de coleta de amostras para exame citológico, possuiu valor de sensibilidade inferior (0,30). Quanto à especificidade, o valor foi igual aos das demais técnicas, possuindo o valor máximo (1,00), não havendo o risco de falso positivo para o exame citológico no presente estudo.

Desta forma, o LFBE obteve, quando comparada a estudos que utilizaram a técnica de *imprint* de BE, valores de sensibilidade semelhantes, como aos de OVERBECK *et al.* (2011) e CHRISTOFFERSEN *et al.* (2015) – 0,25 e 0,23 – e valores distintos aos encontrados por NIELSEN (2005), BUCZKOWSKA *et al.* (2014) KOZDROWSKI *et al.* (2015) e RASMUSSEN *et al.* (2015), que encontraram os valores de 0,77; 0,73; 0,77; e 0,78 respectivamente. Quanto à especificidade, o LFBE obteve no presente estudo o valor 1,00, que foi igual aos relatados por NIELSEN (2005) e CHRISTOFFERSEN *et al.* (2015), e sem grande discrepância aos demais estudos, que observaram sempre valores acima de 0,80 (OVERBECK *et al.*, 2011; BUCZKOWSKA *et al.*, 2014; KOZDROWSKI *et al.*, 2015; RASMUSSEN *et al.*, 2015).

O LFBE forneceu menor número de células em comparação às demais técnicas, porém foi possível a leitura de todos os esfregaços. KOZDROWSKI *et al.* (2015) também observaram o menor número de células colhidas utilizando a técnica de *imprint* do fragmento na lâmina. Esta baixa celularidade observada pode ser atribuída ao método de coleta da amostra (biópsia uterina), além do lavado do fragmento realizado no estudo.

Para o exame de cultura uterina, a técnica LFBE foi utilizada como alternativa a passagem do fragmento diretamente na placa de cultura ainda a campo, com intuito de diminuir a contaminação ambiental da placa. Assim, esta

técnica apresentou valor de sensibilidade baixo (0,30) em relação aos demais métodos utilizados neste estudo para cultura uterina, e comparável quanto à especificidade (1,00). Tais valores foram semelhantes aos relatados por OVERBECK *et al.* (2011) – 0,25 e 0,95 – e CHRISTOFFERSEN *et al.* 2015 – 0,50 e 0,90 – porém, distintos aos de BUCZKOWSKA *et al.* (2014) – 0,63 e 0,54 – e RASMUSSEN *et al.* (2015) – 0,81 e 0,69. Já NIELSEN (2005) relatou valor de sensibilidade superior e de especificidade comparável – 0,82 e 0,92, respectivamente.

A alta sensibilidade no estudo de NIELSEN (2005) e RASMUSSEN *et al.* (2015) pode ser explicada pelo alto índice de isolamento de *Streptococcus*, que já foi demonstrado por PETERSEN *et al.* (2009), que estes microrganismos podem residir profundamente no tecido endometrial e, portanto, ser difícil de isolar da superfície uterina, obtendo alto índice de isolamento quando a técnica de BE é utilizada. Neste estudo, esta bactéria não foi isolada, podendo ser um fator relevante para o baixo índice de sensibilidade quando comparada a estes autores.

A técnica de BE, embora tenha desvantagens descritas no Item 2 da seção Resultados e Discussão e tenha demonstrado resultados inferiores de sensibilidade em comparação às técnicas de CC e LBV, tem a vantagem de permitir a realização do exame histológico posteriormente, promovendo uma avaliação precisa do endométrio, incluindo o diagnóstico de alterações inflamatórias e fibrose.

CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi realizado e a partir dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- A endometrite é a principal causa de éguas receptoras com problemas reprodutivos em programas de TE;
- O exame ginecológico é essencial para o diagnóstico de éguas receptoras consideradas éguas problema;
- O exame de palpação e ultrassonografia pode servir de triagem dos animais para os exames laboratoriais;
- O coletor comercial foi mais prático e eficaz na coleta de amostras para o exame de citologia endometrial e cultura microbiológica uterina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, J., HANKS, M., SHAW, D.J., ELSE, R., WATSON, E., 2006. Importance of using guarded techniques for preparation of endometrial cytology smears in mares. **Theriogenology** 66, 423–430.
- ALLEN, W. R., WILSHER, S., MORRIS, L. *et al.* Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. **Anim. Reprod. Sci.**, v.94, p.242-243, 2006.
- ALONSO, M. A. FLEURY, P. D. C. ALVARENGA, M. A. Utilização de éguas receptoras de embrião três dias (d3) após a ovulação. Apresentação, **ABRAVEQ - Associação Brasileira de Veterinários de Equídeos**, 2010.
- ALONSO, M. A. Seleção, manejo e fatores que influenciam as taxas de prenhez em éguas receptoras de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, p. s207-s214, 2008. Suplemento2.
- ALVARENGA, M. A. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, p. s319-s333, 2010. Suplemento1.
- 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.**1990; 42:67-8.
- AMORIM, M. D., GARTLEY, C. J., FOSTER, R. A., HILL, A., SCHOLTZ, E. L., HAYES, A., CHENIER, T. S. Comparison of Clinical Signs, Endometrial Culture, Endometrial Cytology, Uterine Low-Volume Lavage, and Uterine Biopsy and Combinations in the Diagnosis of Equine Endometritis. **Journal of Equine Veterinary Science**, Volume 44, September 2016, Pages 54–61.
- BAIN A. M. The role of infection in infertility in the thoroughbred mare. **Vet Rec** 1966; 78:168-73.
- BALL B. A., HILLMAN R. B., WOODS G. L. Survival of equine embryos transferred to normal and subfertile mares. **Theriogenology** 1987; 28: 167–74.
- BALL B. A., SHIN S. J., PATTEN V. H., LEIN D. H., WOODS G. L. Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mares endometrium. **Theriogenology** 1988; 29:1269–83.
- BARBACINI, S., NECCHI, D., ZAVAGLIA, G., SQUIRES, E.L. Retrospective study on the incidence of post insemination uterine fluid in mares inseminated with frozen/thawed semen. **J Vet Sci**, 23 (2003), pp. 493–496.
- BEEHAN D. P., MCKINNON A. O. How to diagnose common equine reproductive tract bacterial pathogens using chromogenic agar. Proc 55th **Ann Conv Am Ass Equine Practitioners** 2009. . <www.ivis.org>.
- BENNETT, D. G. (1987) Diagnosis and treatment of equine bacterial endometritis. **Journal of Equine Veterinary Science**7, 345–350.

BLANCHARD T. L., CUMMINGS M. R., GARCIA M. C., HURTGEN J. P., KENNEY R. M. Comparison between two techniques for endometrial swab culture and between biopsy and culture in barren mares. **Theriogenology** 1981; 16: 541–52.

BLANCHARD, T. L., VARNER, DICKSON, SHUMACHER, **Manual of Equine Reproduction. United States of America: Mosby** – Year Book, 1998, p. 5, 54-58, 133-134, 1998.

BOURKE M., MILLS J. N., BARNES A. L. Collection of endometrial cells in the mare. **Aust Vet J** 1997; 75:755– 8.

BOWMAN, T. R. Direct rectal palpation. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction, Second Edition**. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.

BRADECAMP, E. A. Pneumovagina. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction, Second Edition**. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.

BRANDIS L., CHRISTIFFERSEN M., BOJESEN A. M., PETERSEN M. R. Endometritis hos hest. Dansk **Veternærtidsskrift** 2010; 93:26 –31.

BRINSKO, S. P., RIGBY, S. L., VARNER, D. D., BLANCHARD, T. L. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. **Proc Am Assoc Equine Pract**, 49 (2003), pp. 363–365.

BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D. Endometritis in mares. **Large Animal Veterinary Rounds**. v. 3, i. 9, p. 279-283, 2003.

BROOK D. Exfoliative endometrial cytology in the mare. **Master thesis**. Stellenbosch, South Africa; 1983.

BROOK D. The diagnosis of equine bacterial endometritis. **Compend Contin Educ Pract Vet** 1984; 6: S300–6.

BROOK D. Uterine culture in mares. **Mod Vet Pract** 1984; 65: A3–8.

BUCZKOWSKA J., KOZDROWSKI R., NOWAK M., RAS A., STARONIEWICZ Z., SIEMIENIUCH M. J. Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. **Reprod Biol Endocrinol**. 2014.

BUCZKOWSKA J., KOZDROWSKI, R., NOWAK, M., RAŚ, A., MROWIEC J. Endometrosis – significance for horse reproduction, pathogenesis, diagnosis, and proposed therapeutic methods. **Polish Journal of Veterinary Sciences** Vol. 17, No. 3 (2014), 547–554.

BUFF, P. E MORRISON, C. Effects of short-term feed deprivation and melatonin implants on circadian patterns of leptin in the horse. **J AnimSci**, 83 (2005), pp. 1023–1032.

BUITEN, A.V.; WESTERS, P.; COLENBRANDER, B. Male, female and management risk factors for non-return to service in dutch mares. **Prev. Vet. Med.**, v.61, p.17-26, 2003.

BURROWS, A. M., BAKER, L. A., HOLMES, L. D., MCEVERS, T. J., NONELLA, K. J., PIPKIN, J. L., TENNANT, T. C., TISDALE, Z. M., VOYLES, A. H., LAWRENCE, T. E. Relationship between live body condition score and internal kidney, pelvic, and heart fat measurements in equine carcasses. **Journal of equine veterinary science** [0737-0806] Burrows, A. M. yr: 2013 vol: 33 iss:5 pg:361 -362.

CABRERA, T., PASTORELLO, M., ALVARENGA, M. A. Prevalência e perfil de sensibilidade bacteriana em éguas com Endometrite. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.23; p.1013. 2016.

CÂMARA, W. M., CANCEMANSI, J. A. N., SHIMODA, E., FAGUNDES, B., BARRETO, M. A. P., SILVA, J. F. S. Identificação e perfil de sensibilidade antimicrobiana de bactérias isolada de éguas suspeitas ou não de endometrite. **Agrária- Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.8, n.4, p.669-674, 2013.

CANISSO, I. F., STEWART, J., SILVA, M. A. C. Endometritis - Managing Persistent Post-Breeding Endometritis. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.004>>. 0749-0739/16/ª 2016 **Elsevier Inc**.

CARD C, CARLEY S, GREEN J, CHIRINO-TREJO M. Endometrial cytology in mares bred with frozen semen. **AAEP Proc** 2004; 50: 505–9.

CARD C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares **Theriogenology** 2005;64: 580–8.

CARNEVALE E. M., RAMIREZ R. J., SQUIRES E. L., ALVARENGA M. A., VANDERWALL D. K., MCCUE P. M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology** 2000; 54:965–79.

CARVALHO, C. F. P M., BORBA, H. S., RIBAS, J. A. S., BARROS, R. R. Diagnóstico bacteriológico, citológico e histopatológico da endometrite equina. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 18, n. 1, p. 19-22, jan./abr. 2011.

CARVALHO, G. R. 2000. **Estudos de alguns aspectos da transferência de embriões eqüinos**. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG. 102p.

CASLICK E. A. The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the thoroughbred mare. **Cornell Veterinary** , Cornell. v.27, n. 4, p.178, Dec.1937.

CASTRO CHAVES, M. M. B. **Estudo da microbiota vaginal de éguas com ênfase na pesquisa de lactobacilos**. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011.

CAUSEY, R. C. Making sense of equine uterine infections: The many faces of physical clearance **Vet J**, 172 (2006), pp. 405–421.

CHRISTIE J. L., HEWSON C. J., RILEY C. B., MCNIVEN M. A., DOHOO I. R., BATE L. A. (2006) Management factors affecting stereotypes and body condition score in non-racing horses in Prince Edward Island. **Can Vet J** 47(2): 136–143.

CHRISTOFFERSEN, M., MAJA SÖDERLIND, M., RUDEFALK, S. R., PEDERSEN, H. G., ALLEN, J., KREKELER, N. Risk factors associated with uterine fluid after breeding caused by *Streptococcus zooepidemicus*. Volume 84, Issue 8, November 2015, Pages 1283–1290.

CHRISTOFFERSON M., BRANDIS L., SAMUELSSON J., BOJESEN A. M., TROEDSSON M. H. T., PETERSON M. R. Diagnostic double-guarded low-volume uterine lavage in mares. **Theriogenology** 2015; 83: 222–7.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100-S19. **Clinical Laboratory Standard Institute**. Wayne, Pa. 2009.

COCCHIA N., PACIELLO O., AULETTA L., et al. Comparison of the cytobrush, cotton swab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology** 2012; 77.

COLLINS S. M. A study of the incidence of cervical and uterine infection in thoroughbred mares in Ireland. **Vet Rec** 1964; 76: 673-6.

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

DASPET S. M., PONTHER J., JOLLY S., DELEUZE S. Cytological diagnosis of endometritis in the mare: A comparative study. **Reprod Dom Anim** 2010; 45 S3:64.

DAVIES MOREL M. C., LAWLOR O., NASH D. M. Equine endometrial cytology and bacteriology: effectiveness for predicting live foaling rates. **Vet J** 2013; 198:206–11.

DAVIS, H. A., STATON, M. B., THUNGRAT, K., BOOTHE, D. M. uterine bacterial isolates from mares and their resistance to antimicrobials: 8,296 cases (2003-2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 7, p. 977-983, 2013.

DAVISON K, P. G, GREENE L. Lactation and reproductive performance of mares fed added dietary fat during late gestation and early lactation. **Equine NutrPhysiolSoc 10th Symp** 1991; 11(2):111–5.

DEFONTIS, M., VAILLANCOURT, D., GRAND, F.X., 2011. Comparison of three methods of sampling for endometrial cytology in the mare. **Tierarztl. Prax.** 39 (G), 171–175.

DIGBY N. J. W., RICKETTS S. W. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. **J Reprod Fert** 1982; 32: 181–5.

DIMOCK W. W., EDWARDS P. R. The pathology and bacteriology of the reproductive organs of mares in relation to sterility. **KY Agric Exper Station Bulletin** 1928; 286:157-237.

DOIG P. A., MCKNIGHT J. D., MILLER R. B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. **Can Vet J** 1981; 22:72– 6.

DYBDAL N. O., DAELS P. F., COUTO M. A., HUGHES J. P., KENNEDY P. C. Investigation of the reliability of a single endometrial biopsy sample, with a note on the correlation between uterine cysts on biopsy grade. **ISER Proc** 1991; 5:697.

- EVANGELISTA, R. M. **A transferência de embriões em equinos e a importância da égua receptora.** <<http://hdl.handle.net/10183/69874>>, 2012.
- FALOMO M. E., CORRÒ M., CAVICCHIOLI L., CASTAGNARO M., MARZINI B., VENTURA S., ROTA A. Interpretazione degli esami batteriologico, citologico e bioptico uterino nella fattrice. **Ippologia** 2006; 4:27–32.
- FERRIS, R. A. Endometritis - Diagnostic Tools for Infectious Endometritis. 0749-0739-16 - Published by **Elsevier Inc.** <http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.001>.
- FIALA, S. M., ESMERALDINO, A., JOBIM, M. I. M., GARBADE, P., WOLF, C. A., RICHTER, G., GREGORY, R. M., MATTOS, R. C., 2010. Edmometrial fibrotic changes. Is one biopsy enough to diagnose degenerative changes? **Anim. Reprod. Sci.** 121, 89–90.
- FLEURY J. J., ALVARENGA M. A., COSTA NETO J. B. F. & PAPA F. O. 1987. Transferência de embriões em eqüinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 39:485-487.
- FLEURY P. D. C., ALONSO M. A., SOUSA F. A. C., ANDRADE A. F. C., ARRUDA R. P. 2007. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões eqüinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** 31:27-31.
- FRANK, N. Equine metabolic syndrome. **Vet Clin N Am-equine**, 27 (5) (2009), pp. 259–267.
- GASTAL, M. O., GASTAL, E. L., SPINELLI, V., GINTHER, O. J. Relationships between body condition and follicle development in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 115-121, Oct./Dec. 2004.
- GINTHER O. J. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. Cross Plains, WI: **Equiservices** (1986).
- GINTHER O. J., PIERSON R. A. Ultrasonic anatomy and pathology of the equine uterus. **Theriogenology** 1984;21: 505–16.
- GUYTON A. C., HALL J. E. **Textbook of medical physiology. Ninth edition.** Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 1996. p. 440.
- HEMBERG, E., LUNDEHEIM, N., EINARSSON, S. Retrospective study on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in thoroughbred mares. **J Vet Med A PhysiolPatholClin Med**, 52 (2005), pp. 474–477.
- HENINGER, N. L. Puberty. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction, Second Edition.** U.K: Wiley-Blackwell; 2011.
- HENNEKE D. R., POTTER G. D., KREIDER J. L., YEATES B. F. Relationship between condition score, physical measurement, and body fat percentage in mares. **Equine Vet J** 1983;15: 371–2.
- HENNEKE, D. G.; POTTER, G. D.; KREIDER, J. L. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, Stoneham, v. 21, n. 6, p. 897-909, June 1984.

- HINES, K. K.; HODGE, S. L.; KREIDER, J. L.; POTTER, G. D.; HARMS, P. G. Relationship between body condition and levels of serum luteinizing hormone in postpartum mares. **Theriogenology**, Stoneham, v. 28, n. 6, p. 815- 825, Dec. 1987.
- HINRICHS K. & CHOI Y. H. 2005.Assisted reproductive techniques in the horse. Clin.Tech. **EquinePract**.4:210-218.
- HURTGEN, J. P. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. **Theriogenology**, v.66, p.560-566, 2006.
- INOUE, Y., SEKIGUCHI, M. Vestibuloplasty for Persistent Pneumovagina in Mares. **Journal of Equine Veterinary Science** 48 (2017) 9–14
- JACOB J. C. F. et al. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, Stoneham, v. 77, n. 6, p. 1159- 1166, Apr.2012.
- JACOB, J. C. F.; JESUS, V. L. T. de; BARBOSA, H. P.; ZIMMERMAN, M. F.; SILVA, A. G. da; MELO, C. M.; Antimicrobial susceptibility of uterine and clitoral swabs of mares with endometritis. **Rev. Univ. Rural, Sér. Ciên. da Vida**, V.22 n2, 2002 (Suplemento), p. 109-114.
- JACOB, J.C.F. et al. The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, n.1, p. 545, Apr. 2002.
- JOHNSON, P. J.,WIEDMEYER, C. E., MESSER, N. T.,GANJAM, V. K. Medical implications of obesity in horses—lessons for human obesity. **J Diabetes Sci Technology**, 3 (1) (2009), pp. 163–174.
- KATILA T, REILAS T, SAIRANEN J, NIVOLA K. Factors affecting reproductive performance of horses. **Pferdeheilkunde** 2010; 26: 6–9.
- KAVAK ZN, EREN F, PEKIN S, KULLU S.A randomised comparison of the 3 Papanicolaou smear collection methods.**Aust NZJ Obstet Gynaecol**1995;65:689 –91.
- KELLER, A., NEVES, A.P., AUPPERLE, H., STEIGER, K., SCHOON, H. A., KLUG, E., GREGORY, R. M., MATTOS, R. C. Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais repetidas e cinco diferentes tratamentos: aspectos inflamatórios. **Acta Sci. Vet.**, v. 32, n. 3, p. 215-223, 2004.
- KENNEY R. M. (1978) Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **J Am Vet Med Assoc** 172: 241-262.
- KENNEY R. M., DOIG P. A. Equine endometrial biopsy. **Current therapy in theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders; 1986. p. 723–9.
- KNUDSEN O. Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. **Cornell Vet** 1964;54 :415–22.
- KOZDROWSKI, R., SIKORA, M., BUCZKOWSKA, J., NOWAK, M., RA'S, A., DZIECIOŁ, M. Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. **Animal Reproduction Science** 154 (2015) 56–62.

LAFER D. H. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? **Theriogenology** 2007;68: 413–23.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, n.1, p.159-174, 1977.

LANGONI, H. et al. Participação de bactérias aeróbicas, microaerófilas e anaeróbicas na endometrite eqüina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.1, p.44-51, 1999.

LEBLANC M. M. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare. **Reprod Dom Anim** 2010; 45:21–7.

LEBLANC M. M., MAGSIG J., STROMBERG A. J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology** 2007; 68:403–12.

LEBLANC, M. M. E MCKINNON, A. O. Breeding the problem mare. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction, Second Edition**. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.

LEBLANC, M. M. Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. Publisher: **International Veterinary Information Service**. 2003.

LEBLANC, M. M. Uterine cytology. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction, Second Edition**. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.

LEBLANC, M. M. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. **Theriogenology** 70 (2008) 421–429.

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

LEBLANC, M. M., NEUWIRTH, L., JONES, L., CAGE, C., MAURAGIS, D. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. **Theriogenology**, 50 (1998), pp. 49–54.

LEBLANC, M.M., R.C. CAUSEY. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. **ReprodDomestAnim**, 44 (2009), pp. 10–22.

LINTON, J.K., SERTICH P. L. The impact of low-volume uterine lavage on endometrial biopsy classification. **Theriogenology** (2016) 1–4.

LIRA, R. A., PEIXOTO, G. C. X., SILVA, A. R. Transferência de embrião em equinos: revisão. **Acta VeterinariaBrasilica**, v.3, n.4, p.132-140, 2009.

LIU, I. K. M.; TROEDSSON, M. H. T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. **Theriogenology**, 2008, Vol.70(3), pp.415-420.

LOSINNO, L.; ALONSO, C.; CASTANEIRA, C. Escore na biópsia endometrial e aptidão reprodutiva em éguas receptoras de embrião - resultados parciais. In: REUNIÃO

- ANUALDA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Angra dos Reis. **ActaScientiaeVeterinariae**, Porto Alegre, v. 33; n. 1, p. 201, 2005.
- LOSINNO, L.; ALVARENGA, M. A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. In: Reunião anual da sociedade brasileira de tecnologia de embriões, 18., 2006, Araxá. **ActaScientiaeVeterinariae**, Porto Alegre, v. 34, p. 39-49,2006.
- LOVE, C. C. Endometrial biopsy. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction, Second Edition**. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.
- LUDWIG S., SCHOON D., AUPPERLE H., VON REISWITZ A., SCHOON H. A. Angiopathies in the equine endometrial biopsyda marker for extrauterine vascular lesions? **Pferdeheilkunde** 2001;17: 608–14.
- MADILL S. Reproductive considerations: mare and stallion. **Vet Clin N Am-equine** 2002;18(3):591–619.
- MAMBELLI, L.I. et al. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis. **Theriogenology**, Los Altos.v.79 p.744-750 Mar.2013.
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. 2016.
- MARTIN-HIRSCH P., JARVIS G., KITCHENER H., LILFORD R. Collection devices for obtaining cervical cytology samples. **Cochrane Database Syst Rev** 2000;3:CD001036.
- MCCUE P. M., HUGHES J. P., JANG S. S., BIBERSTEIN E. L. Antimicrobial susceptibility patterns for aerobic bacterial isolates from the uterus of mares. **Calif Vet** 1991; 45:25–28.
- MCCUE, P. M. The Problem Mare: Management Philosophy, Diagnostic Procedures, and Therapeutic Options. **Journal of Equine Veterinary Science** _ Vol 28, No 11 (2008).
- MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., CARNEVALE E. M. 1988. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. **Theriogenology** 29:1055-1063.
- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Embryo Transfer and Related Technologies. In: Samper, J. C.; PYCOCK, J.F.; McKinnon, A. O. (Ed.). **Current therapy in equine reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. cap. 51, p.319-334.
- MONTECHIESI, D. F. Transferência de embriões em equinos e os fatores relacionados as taxas de prenhez. **Ciência Animal**, 25(1); 187-194, 2015 – Edição Especial.
- MOREL, M. C. G. D., **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management 2nd Edition**. CAB International 2003.
- MORLEY, S. A., MURRAY, J. A. Effects of Body Condition Score on the Reproductive Physiology of the Broodmare: A Review. **Journal of equine veterinary science** [0737-0806] Morley, SA yr:2014 vol:34 iss:7 pg:842 -853.
- MORRIS L. H., ALLEN W. R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. **Equine Vet J** 2002; 34(1):51–60.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of horses**. (6th ed.) National Academic Press, Washington DC (2007).

NIELSEN J. M. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology** 2005; 64:510–8.

NIELSEN J. M., NIELSEN F. H., PETERSEN M. R. Diagnosis of equine endometritis microbiology, cytology and histology of endometrial biopsies and the correlation to fertility. **Pferdeheilkunde** 2012;1:14.

NIELSEN J. M., TROEDSSON M. H., PEDERSEN M. R., BOJESEN A. M., LEHN-JENSEN H., ZENT W. W. Diagnosis of endometritis in the mare based on bacteriological and cytological examinations of the endometrium: comparison of results obtained by swabs and biopsies. **J Vet Sci**2010; 30:27–30.

OLIVEIRA, I. B., PEIXOTO, R. M., SILVA, D. R., PINHEIRO JUNIOR, J. W., OLIVEIRA, A. A. F., MOTA, R. A. Etiologia e perfil de sensibilidade de bactérias aeróbias isoladas de éguas suspeitas de endometrite procedentes do Estado de Pernambuco. **Medicina Veterinária**, Recife, v.1, n.1, p.19-25, jan-jun, 2007 ISSN 1809-4678.

OVERBECK W., WITTE TS, HEUWIESER W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. **Theriogenology** 2011;75: 1311–8.

OVERBECK, W., JAGER, K., SCHOON, H. A., WITTE, T. S., 2013. Comparison of cytological and histological examinations in different locations of the equine uterus – an in vitro study. **Theriogenology** 79, 1262–1268.

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

PETERSEN M. R., NIELSEN J. M., LEHN-JENSEN H., BOJESEN A. M. Streptococcus equi subspecies zooepidemicus resides deep in the chronically infected endometrium of mares. **ClinTheriogenol** 2009; 1: 393–409.

PYCOCK J. How to maximize the chances of breeding successfully from the older maiden mare. **ProcAmAssocEquinePract** 2006; 52.

PYCOCK J. Infertility in the mare. In: Noakes D. E., Parkinson T. J., England G. C. W., editors. **Arthur's veterinary reproduction and obstetrics**. Philadelphia: Saunders; 2001. p. 577–621.

RASMUSSEN C. D., MORTEN P. R., BOJESEN A. M., et al. Equine infectious endometritis clinical and subclinical cases. **J Equine Vet Sci** 2015;35:95–104.

RAUB-DARGATZ J. L., SALMAN M. D., VOSS J. L. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. **J Am Vet Med Assoc** 1991; 198:1745–7.

REILAS, T., KATILA, T. Proteins and enzymes in uterine lavage fluid of postpartum and nonparturient mares. **Reprod Dom Anim** 2002; 37:261–8.

RICH G. A., BREUER L. H. Recent developments in equine nutrition with farm and clinic applications. **Proc Annu Convention AAEP** 2002;48: 24–40.

- RICKETTS S. W. Bacteriological examinations of the mare's cervix: techniques and interpretation of results. **Vet Rec** 1981; 108:46–51.
- RICKETTS S. W., ALONSO S. Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. **Equine Vet J** 1991;23: 185–8.
- RICKETTS S. W., BARRELET A. (1997) A retrospective review of the histopathological features seen in a series of 424 endometrial biopsy samples collected from UK Thoroughbred mares over a 25 year period. **Pferdeheilkunde** 13: 525-530.
- RICKETTS S. W., MACKINTOSH M. E. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. **J Reprod Fertil** 2016; 1987(Suppl. 35):343–51.
- RICKETTS, S. W. Uterine and clitoral cultures. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction, Second Edition**. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.
- RIDDLE, W. T., LEBLANC, M. M., STROMBERG, A. J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a thoroughbred practice. **Theriogenology**, 68 (2007), pp. 395–402.
- RIERA F. L. General techniques and organization of large commercial embryo transfer programs. **Clinical Theriogenology**, Philadelphia, v. 3, p. 318-324, 2011.
- RIERA F.L. Equine embryo transfer. In: SAMPER, J. C. (Ed.). **Equine breeding management and artificial insemination**, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. p.185-199.
- RODRIGUES, P. G. **Comparação entre escore de condição corporal e espessura de gordura subcutânea e sua relação com a eficiência reprodutiva de éguas doadoras Mangalarga Marchador**. 2009. 67 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ROSE, R. J., HODGSON, D. R. **Manual of Equine Practice**. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, p. 316 – 317, 1993.
- ROSSI, R., SILVA FILHO, J. M., PALHARES, M. S., MARTINS, R. A., ANJOS, F. R., SILVA, M. M. Efeito da idade sobre a fertilidade e perdas embrionárias de éguas inseminadas com sêmen asinino diluído e resfriado a 5°C por 12 horas de armazenamento. **Arq.Bras. Med. Vet. Zootec**. vol.66 no.5 Belo Horizonte Oct. 2014.
- ROSZEL J. F., FREEMAN K. P. Equine endometrial cytology. **Vet Clin North Am Equine Pract** 1988;4: 247– 62.
- SAS Institute Inc 2002: SAS/STAT® 9.0 User's guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SCHLAFER D. H. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? **Theriogenology** 2007;68: 413–22.
- SCHOON H. A., SCHOON D., KLUG E. Die endometrium biopsie bei der stute in klinisch-gynäkologischen kontext. **Pferdeheilkunde** 1997;5:453–64.

- SCHOON H-A, SCHOON D, KLUG E. Uterus biopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. **Pferdeheilkunde** 1992;8:355–62.
- SHIDELER R., MCCHESENEY A. Relationship of endometrial biopsy and other management factors on fertility of broodmares. **J Equine Vet Sci** 1982;5–10.
- SILVA, M. A. C. E ALVARENGA M. A. Fungal endometritis In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction, Second Edition**. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.
- SOTO S. M., SMITHSON A., HORCAJADA J. P., MARTINEZ J. A., MENSA J. P., VILA J. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Infect** 2006;12: 1034–6.
- SQUIRES, E. L. Management of the embryo donor and recipient mare. In: Robinson, N. E. (Ed.). **Current therapy in equine medicine 5**. Philadelphia: Saunders, 2003: p. 277-279.
- SQUIRES, E. L., MCCUE, P. M. Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 99, n. 1-2, p. 1-8, May, 2007.
- SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Woburn, v. 51, n. 1, p. 91-104, Jan. 1999.
- SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D.K. The current status of equine embryo transfer **Theriogenology**, v.51, p.91-104,1999.
- STANTON, M.B.; STEINER, J.B.; PUGH, D.G. Endometrial cysts in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, no.1, p,14-19, 2004.
- 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. **American Journal Vet. Res.**1992; 53:1641–44.
- TROEDSSON, M. H. T. Endometritis. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction, Second Edition**. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.
- TROEDSSON, M. H. T. Therapeutic consideration us for mating-induced endometritis. **Pferdeheilkund**. v. 13, p. 516-520, 1997.
- TROEDSSON, M. H. T., 1999. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology** 52, 461–471.
- TROEDSSON, M., LIU, I., Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **J ReprodFertil**, 99 (1993), pp. 307–313.
- TULLY R., CHABA G. N., DAVIES J. The reproductive anatomy of the mare. In: Morel M. C. G. D., editor. *Equine reproductive physiology, breeding and stud management*. 2nd ed. CAB International; 2002. p. 1–15.

- VAN CAMP S. D. Endometrial biopsy of the mare: A review and update. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1988; 4:229–45.
- VANDERWALL D. K. Current equine embryo transfer techniques. In: BALL, B. A. (Ed.) *Recent advances in equine theriogenology*, Ithaca: International Veterinary Information Service, 2000.
- VANDERWALL D. K. 2008. Early embryonic loss in the mare. *J. Eq. Vet. Sci.* 28:691-702.
- Vanderwall D.K. e Woods G.L. 2007. Embryotransfer and newer assisted reproductive techniques for horses, p 211-219. In: Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Eds) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Saunders, Missouri.
- VECCHI, I., SABBIONI, BIGLIARDI, E., MORINI, G., FERRARI, L., DI CIOMMO, F., SUPERCHI, P., PARMIGIANI, E. Relationship between body fat and body condition score and their effects on estrous cycles of the Standardbred maiden mare. **Veterinary Research Communications** [0165-7380] Vecchi, I yr: 2010 vol: 34 iss:S1 pg:1-5.
- VICK, M. M., ADAMS, A., MURPHY, B., SESSIONS, D.R., HOROHOV, D.W., COOK R.F., SHELTON B.J., FITZGERALD, B.P. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. **J AnimSci**, 85 (5) (2007), pp. 1144–1155.
- WAECHLI R. O., WINDER N. C. Distribution of histological lesions in the equine endometrium. **Vet Rec** 1989;124 :271–3.
- WALTER, J., NEUBERG, K. P., FAILING, K., WEHREND, A. 2012. Cytological diagnosis of endometritis in the mare: investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. **Anim. Reprod. Sci.** 132, 178–186.
- WILLIAMSON, P., MUNYUA, S. J. M., PENHALE, J. Endometritis in the mare: a comparison between reproductive history and uterine biopsy as techniques for predicting susceptibility of mares to uterine infection. **Theriogenology**, 32 (1989), pp. 351–357.
- WOODWARD E. M., CHRISTOFFERSEN M., CAMPOS J., SQUIRES E., TROEDSSON M. H. T. Susceptibility to persistent breeding induced endometritis: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. **Theriogenology** 2012; 78:495-501.
- ZENT W. W. E STEINER, J. V. Vaginal examination. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction, Second Edition**. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.
- ZENT, W., TROEDSSON, M.H.T., XUE, J.L. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of thoroughbred mares: a field study. **Proc Ann Conv Am Assoc Equine Pract**, 44 (1998), pp. 64–65.
- ZENT, W. W. History. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction, Second Edition**. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.

ANEXOS

1. Tabela de escores de condição corporal adaptado de Henneke et al., 1983.

ESCORE	CARACTERÍSTICAS
1 Extremamente Magro	<ul style="list-style-type: none"> • Processos espinhosos, costelas, base da cauda, tuberosidade coxal e tuberosidade do ísquio proeminentes; • Estrutura óssea de cernelha, ombros e pescoço facilmente perceptível; • Tecido adiposo não é palpável.
2 Muito magro	<ul style="list-style-type: none"> • Fina camada de gordura cobrindo a base do processos espinhosos; • Processos transversos da região lombar arredondados a palpação; • Processos espinhosos, costelas, base da cauda, tuberosidade coxal e tuberosidade do ísquio proeminentes; • Estrutura óssea de cernelha, ombros e pescoço perceptíveis.
3 Magro	<ul style="list-style-type: none"> • Adiposidade cobrindo aproximadamente a metade dos processos espinhosos; • Processos transversos não pode ser sentidos a palpação; • Processos espinhosos e costelas facilmente discernível; • Base da cauda proeminente; • Tuberosidade coxal aparecem arredondados, e são facilmente visíveis; • Tuberosidade do ísquio não distinguíveis. • Estrutura óssea de cernelha, ombros e pescoço pouco perceptíveis;
4 Moderadamente Magro	<ul style="list-style-type: none"> • Sulco ao longo da região lombar; • Linha das costelas visível; • “Gordura” pode ser palpada na base da cauda; • Tuberosidade coxal não visível; • Cernelha, ombros e pescoço não são facilmente visíveis.
5 Moderado	<ul style="list-style-type: none"> • Costelas não são observadas, porém facilmente palpável; • Adiposidade ao redor da base da cauda se torna esponjosa a palpação; • Cernelha arredondada ao longo dos processos espinhoso; • Ombros e pescoço conectados suavemente ao corpo do animal.
6 Moderadamente Gordo	<ul style="list-style-type: none"> • Pode haver pequena depressão na linha do dorso; • Adiposidade sobre as costelas se torna esponjoso a palpação; • Adiposidade ao redor da base da cauda é macia a palpação; • Tecido adiposo começa a ser depositado ao longo da cernelha, atrás dos ombros e ao longo do pescoço.
7 Gordo	<ul style="list-style-type: none"> • Pode haver uma depressão na linha do dorso; • Costelas podem ser individualmente palpável, sendo possível sentir gordura; • Gordura em torno da base da cauda é “macia”; • Gordura depositada ao longo de cernelha, atrás dos ombros e ao longo do pescoço.

<p>8 Muito Gordo</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Depressão na linha do dorso; • Difícil de sentir as costelas; • Muito tecido adiposo em torno da base da cauda na área ao longo cernelha e atrás do ombro; • Visível aumento na espessura do pescoço; • Gordura depositada ao longo da parte interna das coxas (nádegas);
<p>9 Extremamente Gordo</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Acentuada depressão na linha do dorso; • Adiposidade desigual, sendo mais evidente nas costelas; • “Dobra” de gordura ao redor da base da cauda, ao longo de cernelha, atrás dos ombros e ao longo do pescoço; • Adiposidade ao longo da parte interna das coxas; • Flanco preenchido com gordura.

2. Ficha de avaliação dos animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



FICHA DE AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

NOME OU N°	
LOCAL	
PROPRIETÁRIO	
PELAGEM	
MARCAS E CARAC.	
IDADE	
ESCORE DE C. C.	
OBSERVAÇÕES	

HISTÓRICO REPRODUTIVO

N° DE EST. QUE PARTICIPOU	
N° DE GESTAÇÕES	
N° EMBRIÕES PERDIDOS NA EST.	
DISTOCIA	
RETENÇÃO DE PLACENTA	
OUTRAS PATOLOGIAS	
TRATAMENTOS JÁ REALIZADOS	
OBSERVAÇÕES	

CONFORMAÇÃO DO PERÍNEO

CONF. DA VULVA	RUIM	BOA	ÓTIMA
INSERÇÃO DA VULVA	RUIM	BOA	ÓTIMA
FECHAMENTO VULVAR	RUIM	BOA	ÓTIMA
PNEUMOVAGINA	SIM		NÃO
UROVAGINA	SIM		NÃO
EVIDÊNCIAS DE VULVOP.	SIM		NÃO
COMPRIMENTO EFETIVO			
ÂNGULO			
ÍNDICE DE CASLICK			
COMPRIMENTO COMISSURA			
OBSERVAÇÕES			
SUGESTIVO DE ENDOMETRITE	SIM		NÃO

PALPAÇÃO TRANSRETAL E ULTRASSONOGRRAFIA

CÉRVIX			
ÚTERO			
EDEMA			
OVÁRIOS	D:	E:	
LIU			
CISTOS			
OBSERVAÇÕES			
SUGESTIVO DE ENDOMETRITE	SIM		NÃO

VAGINOSCOPIA

VAGINA			
ABERTURA DA CÉRVIX			
COLORAÇÃO MUCOSA			
SECREÇÃO			
TRAUMATISMOS			
OBSERVAÇÕES			
SUGESTIVO DE ENDOMETRITE	SIM		NÃO

EXAME DA CÉRVIX

LACERAÇÕES			
ADERÊNCIAS			
FIBROSES			
DIVERTÍCULOS			
TORTUOSIDADE			
SECREÇÕES			
OBSERVAÇÕES			
SUGESTIVO DE ENDOMETRITE	SIM		NÃO

COLETOR COMERCIAL - CULTURA UTERINA (SWAB COMERCIAL)

IDENTIFICAÇÃO			
CRESC BACT.	SIM	NÃO	
CARACT. DA COL. SUGESTIVO DE			
IDENTIFICAÇÃO LAB. DO MIC.			
OBSERVAÇÕES			
SUGESTIVO DE ENDOMETRITE	SIM	NÃO	

COLETOR COMERCIAL - CITOLOGIA UTERINA (ESCOVA COMERCIAL)

IDENTIFICAÇÃO				
CELULARIDADE	BAIXA	MODER.	ALTA	
PRESENÇA DE	MUCO	DETRITOS	SANGUE	CRISTAIS
CÉLULAS PRESENTES	NEUT.	EOS.	MACR.	LINF.
	BACT.	HIFAS	LEVED.	OUTROS:
OBSERVAÇÕES				
SUGESTIVO DE ENDOMETRITE	SIM	NÃO		

LAVADO INTRAUTERINO DE BAIXO VOLUME – CARACTERÍSTICAS

IDENTIFICAÇÃO	
VOLUME INFUNDIDO	
VOLUME RESGATADO	
ASPECTO	
CELULARIDADE	
SECREÇÃO	
OBSERVAÇÕES	

LAVADO DE BAIXO VOLUME – CULTURA UTERINA

IDENTIFICAÇÃO			
CRESC BACT.	SIM	NÃO	
CARACT. DA COL. SUGESTIVO DE			
IDENTIFICAÇÃO LAB. DO MIC.			
OBSERVAÇÕES			
SUGESTIVO DE ENDOMETRITE	SIM	NÃO	

LAVADO DE BAIXO VOLUME – CITOLOGIA UTERINA

IDENTIFICAÇÃO				
CELULARIDADE	BAIXA	MODER.	ALTA	
PRESENÇA DE	MUCO	DETRITOS	SANGUE	CRISTAIS
CÉLULAS PRESENTES	NEUT.	EOS.	MACR.	LINF.
	BACT.	HIFAS	LEVED.	OUTROS:
OBSERVAÇÕES				
SUGESTIVO DE ENDOMETRITE	SIM	NÃO		

BIÓPSIA ENDOMETRIAL – CULTURA UTERINA

IDENTIFICAÇÃO			
CRESC BACT.	SIM	NÃO	
CARACT. DA COL. SUGESTIVO DE IDENTIFICAÇÃO LAB. DO MIC.			
OBSERVAÇÕES			
SUGESTIVO DE ENDOMETRITE	SIM	NÃO	

BIÓPSIA ENDOMETRIAL – CITOLOGIA UTERINA

IDENTIFICAÇÃO				
CELULARIDADE	BAIXA	MODER.	ALTA	
PRESENÇA DE	MUCO	DETRITOS	SANGUE	CRISTAIS
CÉLULAS PRESENTES	NEUT.	EOS.	MACR.	LINF.
	BACT.	HIFAS	LEVED.	OUTROS:
OBSERVAÇÕES				
SUGESTIVO DE ENDOMETRITE	SIM	NÃO		

BIÓPSIA ENDOMETRIAL – HISTOLOGIA

IDENTIFICAÇÃO			
ALTERAÇÕES ENCONTRADAS	FIBR. ENDOM. (TEC. CONJ.)	FIBR. PERIGL. (NINHO)	
	HIPERP. GL. (CISTO GL.)	LACUNA LINF. (CISTO END.)	
	INFILTRADOS DE PMNS:		
GRAU			
OBSERVAÇÕES			
SUGESTIVO DE ENDOMETRITE	SIM	NÃO	

RESULTADOS SUGESTIVOS DE ENDOMETRITE

CONFORMAÇÃO DE PERÍNEO	SIM	NÃO
PALP. ULTRASSONOGRÁFIA	SIM	NÃO
VAGINOSCOPIA	SIM	NÃO
E. DA CÉRVIX	SIM	NÃO
CITOLOGIA - COLETOR ESCOVA	SIM	NÃO
CITOLOGIA - LAVADO	SIM	NÃO

CITOLOGIA - BIÓPSIA	SIM	NÃO
CULTURA -COLETOR SWAB	SIM	NÃO
CULTURA - LAVADO	SIM	NÃO
CULTURA - BIÓPSIA	SIM	NÃO
CARACT. DO LAVADO	SIM	NÃO
HISTOLOGIA - BIÓPSIA	SIM	NÃO