

LORRAINE MARCELE LOPES DA COSTA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA EM JUMENTAS E
ÉGUAS INSEMINADAS COM SÊMEN CRIOPRESERVADO DE ASININOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Yamê Fabres Robaina Sancler da
Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C837a
2022

Costa, Lorraine Marcele Lopes da, 1996-
Avaliação da resposta inflamatória uterina em jumentas e
éguas inseminadas com sêmen criopreservado de asininos /
Lorraine Marcele Lopes da Costa. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (89 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.363>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Jumentos - Reprodução. 2. Endometrite. 3. Citologia
veterinária. 4. Sêmen - Criopreservação. 5. Proteínas de fase
aguda. I. Silva, Yamê Fabres Robaina Sancler da, 1987-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.180824

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

LORRAINE MARCELE LOPES DA COSTA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA EM JUMENTAS E
ÉGUAS INSEMINADAS COM SÊMEN CRIOPRESERVADO DE ASININOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de novembro de 2022.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente

gov.br

LORRAINE MARCELE LOPES DA COSTA

Data: 06/07/2023 17:15:37-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Lorraine Marcele Lopes da Costa
Autora

Documento assinado digitalmente

gov.br

YAME FABRES ROBAINA SANCLER DA SILVA

Data: 06/07/2023 18:36:50-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Toda minha gratidão a Deus por ser sempre o meu maior apoio, consolo e fortaleza.

Agradeço aos meus pais, Marcelo e Meiri, e ao meu namorado João Paulo, por todo incentivo, amparo e compreensão.

À minha professora Yamê, pela orientação, dedicação, incentivo e disponibilidade na elaboração do projeto, na execução da fase experimental e na correção da escrita.

À todos os estagiários e estudantes de pós-graduação, que se empenharam na execução da fase experimental, especialmente aos meus amigos: Carolina Fontes, Matheus Vilella, Marcela Freitas, Cristian Silva, Davi Silva, Tiago Martins, Luíza Vitarelli e Thiago Vieira. Vocês foram essenciais! Muito obrigada por toda força, ajuda e amizade.

À UEPE em Equideocultura da UFV pela concessão dos animais, pela infra-estrutura disponível e por todo amparo durante o período experimental. Aos funcionários da UEPE em Equideocultura da UFV, por todo auxílio no manejo dos animais.

À professora Érica Schultz, pelo grande auxílio nas análises estatísticas, ao Professor Leandro de Abreu e todos do Laboratório de Pesquisa em Patologia clínica veterinária pela disponibilidade e auxílio, à professora Mariana Neves e professor Gabriel Monteiro, por estarem sempre dispostos a ajudar e ensinar.

Ao Departamento de Zootecnia, seus professores e funcionários.

Aos funcionários da Veterinária, especialmente Adão e Cláudio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Setor de equideocultura, lugares pelos quais tenho um imenso carinho. Obrigado pelos inúmeros aprendizados e oportunidades.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

COSTA, Lorraine Marcelle Lopes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2022. **Avaliação da resposta inflamatória uterina em jumentas e éguas inseminadas com sêmen criopreservado de asininos.** Orientadora: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva.

Existe um grande interesse no fomento da criação e reprodução asininos e seus híbridos na equideocultura mundial. No entanto, essa espécie vem sendo ameaçada de extinção em diversos países, devido à atividade crescente de abate clandestino que tem por objetivo a comercialização de subprodutos, como a pele. Estudos voltados para criopreservação do sêmen de jumentos mostraram bons resultados quanto à viabilidade espermática, no entanto, a capacidade de concepção das jumentas com esse sêmen é baixa, alcançando índices que variam de 0% a 11%. Em contrapartida, em estudos com éguas, o uso do sêmen asinino criopreservado mostrou resultados superiores na taxa de fertilidade (33-53%). Diversos estudos buscaram elucidar os resultados negativos desta biotécnica na espécie asinina, como o efeito tóxico dos crioprotetores e a congelabilidade do sêmen asinino. O processo de congelamento do sêmen, que submete os espermatozoides a grandes variações de temperatura, associado à remoção de componentes imunomodulatórios do plasma seminal e a incorporação de crioprotetores, como o glicerol, são fatores que podem contribuir para o insucesso dessa biotécnica na espécie asinina, mas não explicam as diferenças no índice de concepção em comparação às fêmeas equinas. A resposta inflamatória do útero ao entrar em contato com o sêmen congelado pode diferir entre éguas e jumentas e pode ser causa da redução da taxa de prenhez na espécie asinina. Assim, é necessário compreender melhor os mecanismos envolvidos no processo inflamatório nas duas espécies após inseminação, a fim de estabelecer as diferenças que podem explicar as diferenças nas taxas de concepção. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo avaliar e comparar o processo inflamatório uterino nas jumentas e éguas inseminadas com sêmen asinino criopreservado.

Palavra-chave: Endometrite. Citologia endometrial. Eosinófilos. Polimorfonucleares. Fluxo sanguíneo. Proteínas de fase aguda.

ABSTRACT

COSTA, Lorraine Marcele Lopes da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November 2022. **Evaluation of uterine inflammatory response in jennies and mares inseminated with cryopreserved donkey sêmen.** Adviser: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva.

There is great interest in fostering the breeding and reproduction of donkeys and their hybrids in equine breeding worldwide. However, this species has been threatened with extinction in several countries, due to the growing activity of clandestine slaughter to commercialization of by-products, such as the skin. Studies about cryopreservation of donkey semen have shown good results regarding sperm viability, however, the ability of jennies to conceive with this semen is low, reaching rates ranging from 0% to 11%. In comparison, in studies with mares, the use of cryopreserved donkey semen showed superior results in the fertility rate (33-53%). Several studies have sought to elucidate the negative results of this biotechnique in the donkey species, such as the toxic effect of cryoprotectants and the freezability of donkey semen. The semen freezing process, which subjects the spermatozoa to large temperature variations, associated with the removal of immunomodulatory components from the seminal plasma and the incorporation of cryoprotectants, such as glycerol, are factors that may contribute to the failure of this biotechnique in the asinine species, but they do not explain the differences in conception rate compared to equine females. The inflammatory response of the uterus once it contacts to frozen semen may differ between mares and jennies and may be the cause of reduced pregnancy rates in asinine species. Thus, it is necessary to better understand the mechanisms involved in the inflammatory process in both species after insemination, in order to establish the differences that may explain the divergence in conception rates. In this sense, the present study aims to evaluate and compare the uterine inflammatory process in jennies and mares inseminated with cryopreserved donkey semen.

Keywords: Endometritis. Endometrial cytology. Eosinophils. Polymorphonuclear. Blood flow. Acute phase proteins.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
Alb	Albumina
ANOVA	Análise de variância
APC's	Células apresentadoras de antígeno
ASA	Amiloide sérica a
CBRA	Colégio brasileiro de reprodução animal
CEUAP	Comissão de ética no uso de animais de produção
cm	Centímetro
CONCEA	Conselho nacional de controle de experimentação animal
COX-2	Cicloxygenase-2
Cp	Ceruloplasmina
DAMPs	Damage associated molecular patterns
D0	Dia da ovulação
D5	Quinto dia pós ovulação
D9	Nono dia pós ovulação
DG	Diagnóstico de gestação
dL	Decilitro
DMF	Dimetilformamida
DTT	Ditiotreitol
EG	Etilenoglicol
EROs	Espécie reativa de oxigênio
FAO	Food and agriculture organization
Fb	Fibrinogênio
FN	Ninhos fibróticos
GD	Dilatação glandular
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GPA	A1-glicoproteína ácida
h	Horas
HD	Hiperplasia glandular

Hem ISC	Hemorragia no estrato compacto
Hem ISS	Hemorragia no estrato esponjoso
HP	Haptoglobina
IA	Inseminação artificial
IgA	Imunoglobulina a
IgE	Imunoglobulina e
I	Escore histopatológico 1
IIA	Escore histopatológico 2a
IIB	Escore histopatológico 2b
III	Escore histopatológico 3
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina-10
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-33	Interleucina-33
IL-6	Interleucina-6
ILRN	Antagonista-1r
IM	Infiltrado mononuclear
KD	Kilodalton
LIU	Líquido intra-uterino
LL	Lacunas linfáticas
mg	Miligramas
MHz	Mega-hertz
ml	Mililitro
mm	Milímetro
Mmol	Milimolar
N ₂	Nitrogênio líquido
ng	Nanograma
NO	Óxido nítrico
Nº	Número
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
P4	Progesterona
PCR	Proteína c reativa
PFA's	Proteínas de fase aguda

PGE	Prostaglandina e
PGF2 α	Prostaglandina f2 α
PMN G	Polimorfonucleares no lúmen das glândulas
PMN ISC	Polimorfonucleares no estrato compacto
PMN ISS	Polimorfonucleares no estrato esponjoso
PMN V ISC	Polimorfonucleares em vênulas do estrato esponjoso
PMN V ISS	Polimorfonucleares em vênulas no estrato esponjoso
PSB	Tampão-fosfato
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio
ssp	Várias espécies de gêneros
T0	Avaliação imediatamente após a ovulação, antes da inseminação
T12	Doze horas pós inseminação
T120	Cento e vinte horas pós inseminação
T24	Vinte e quatro horas pós inseminação
T48	Quarenta e oito horas pós inseminação
T6	Seis horas pós inseminação
T72	Setenta e duas horas pós inseminação
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
Trf	Transferrina
UFV	Universidade federal de viçosa
V	Volt
α 1-antitrip	A1-antitripsina
α 2-macro	A2-macroglobulina

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Medianas e intervalos interquartis dos escores de edema uterino das éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado57
- Tabela 2.** Medianas e intervalos interquartis dos escores de edema uterino das éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado.....58
- Tabela 3.** Medianas e intervalos interquartis do escore total de inflamação uterina aguda, avaliadas por histopatologia da biópsia uterina, 12 e 48 horas após a inseminação com sêmen asinino congelado68
- Tabela 4.** Medianas e intervalos interquartis do escore total de inflamação uterina crônica, avaliadas por histopatologia da biópsia uterina, 12 e 48 horas após a inseminação com sêmen asinino congelado69
- Tabela 5.** Medianas e intervalos interquartis do escore total de inflamação (aguda + crônica), avaliadas por histopatologia da biópsia uterina, 12 e 48 horas após a inseminação com sêmen asinino congelado69

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ativação das vias canônicas e alternativas, iniciando o processo inflamatório no endométrio das éguas, após reconhecimento de antígeno19
- Figura 2.** Resposta inflamatória aguda mediada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, a partir da sinalização dos PAMPs e DAMPs20
- Figura 3.** Vias Clássica e Alternativa de ativação do Sistema Complemento que ocorre no lúmen uterino de éguas pós-cobertura21
- Figura 4.** Médias e erros-padrão da área de pixels totais do corno inseminado das éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado59
- Figura 5.** Médias e erros-padrão da área de pixels totais do corno não inseminado das éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado60
- Figura 6.** Médias e erros-padrão da área de pixels totais do corpo uterino das éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado60
- Figura 7.** Médias e erros-padrão da porcentagem de pixels coloridos no corpo uterino das éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado61
- Figura 8.** Médias e erros padrão da porcentagem de células endometriais em esfregaços de citologia uterina de éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 48 horas da inseminação com sêmen asinino congelado62
- Figura 9.** Médias e erros padrão da porcentagem de células inflamatórias em esfregaços de citologia uterina de éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 48 horas da inseminação com sêmen asinino congelado63
- Figura 10.** Médias e erros padrão da porcentagem de células polimorfonucleares (neutrófilos) em esfregaços de citologia uterina de éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 48 horas da inseminação com sêmen asinino congelado64
- Figura 11.** Médias e erros padrão da porcentagem de células mononucleares (monócitos) em esfregaços de citologia uterina de éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 48 horas da inseminação com sêmen asinino congelado65
- Figura 12.** Médias e erros-padrão da porcentagem de células inflamatórias (eosinófilos, linfócitos e basófilos) em esfregaços de citologia uterina de éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 48 horas da inseminação com sêmen asinino congelado65

Figura 13. Comparação de imagens de citologia uterina de éguas e jumentas (objetiva 40X) em coletas realizadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 48 horas da inseminação com sêmen asinino congelado	66
Figura 14. Imagem de citologia uterina (objetiva 40X) evidenciando eosinófilos (seta preta) e neutrófilos (seta vermelha) na inflamação endometrial de jumentas, 6 horas após inseminação artificial com sêmen asinino congelado	68
Figura 15. Médias da concentração (mg/dL) de proteínas de fase aguda presentes no soro sanguíneo das éguas, avaliados imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado	70
Figura 16. Médias da concentração (mg/dL) de proteínas de fase aguda presentes no soro sanguíneo das jumentas, avaliados imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado	71
Figura 17. Médias e erros-padrão da taxa de concepção (%) aos 14 dias após inseminação com sêmen asinino congelado, em éguas e jumentas	71
Figura 18. Nível sérico de progesterona (ng/ml) de éguas e jumentas no D5 (5 dias pós ovulação e IA com sêmen asinino congelado)	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Sistema Reprodutor da Égua x Jumenta.....	14
2.2. Mecanismos de defesa uterina.....	17
2.2.1. Barreiras físicas.....	17
2.2.2. Sistema imune inato e adaptativo.....	18
2.2.3. Limpeza uterina.....	23
2.3. Endometrite fisiológica e não fisiológica.....	24
2.4. Uso do sêmen congelado.....	27
3. OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	30
4. REFERÊNCIAS.....	30
ARTIGO	41
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3. RESULTADOS.....	55
4. DISCUSSÃO.....	70
5. CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

A equideocultura ocupa papel relevante dentro do complexo do agronegócio brasileiro. Nesse cenário, há um crescente interesse pelos asininos e seus híbridos, principalmente no fomento da criação e reprodução desses animais. No entanto, nos últimos anos o número de indivíduos diminuiu substancialmente devido principalmente ao avanço dos meios tecnológicos e substituição desses animais pela mecanização rural (SALLES *et al.*, 2013). A atividade crescente de abate, motivada principalmente pelo interesse da indústria farmacêutica chinesa na produção do Ejiao feito a partir da pele de jumento (GAMEIRO *et al.*, 2021), coloca em risco a espécie em todo o mundo, uma vez que a taxa de reprodução desses animais em larga escala ainda apresenta entraves.

Estudos sobre a diversidade genética são desenvolvidos, no intuito de preservar e conservar as raças asininas ameaçadas de extinção no Brasil (ALMEIDA, 2009). Por isso, nos últimos anos, a incorporação das biotecnologias dentro da reprodução da espécie asinina, por meio de técnicas consagradas aplicadas à espécie equina, possibilitou acelerar o ganho e a dispersão genética dos asininos, a fim de abrir portas para o mercado de produção e comercialização de asininos e muares de alto valor genético. Dentre elas está a criopreservação do sêmen, que tem como finalidade a preservação de material genético por longo período de tempo, possibilitando a criação de um banco de recursos genéticos. Os estudos voltados para criopreservação do sêmen de jumento mostraram bons resultados para a congelabilidade, uma vez que obtiveram boa viabilidade e motilidade espermática nos pós descongelamento (ROTA *et al.*, 2008; SABATINI *et al.*, 2014).

No entanto, a capacidade de concepção das jumentas com sêmen congelado de jumentos foi baixa, em comparação com as éguas (VIDAMENT *et al.*, 2009; CANISSO *et al.*, 2011). Oliveira *et al.* (2006) e Vidament *et al.* (2009) obtiveram resultados insatisfatórios de 0% (0/53) e 11% (4/38), respectivamente, na taxa de prenhez de jumentas inseminadas com sêmen asinino criopreservado. No entanto, em estudos com éguas, o uso do sêmen asinino criopreservado mostrou resultados superiores na taxa de fertilidade (33-53%) (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Existem muitas linhas de pesquisa que almejam elucidar os resultados negativos desta biotécnica na espécie asinina. Um dos fatores que podem contribuir para tais resultados pode ser o próprio processo de congelamento que submete os espermatozoides à grandes variações de temperatura, além da remoção de componentes imunomodulatórios do plasma seminal, que inferem na viabilidade do sêmen, sobretudo o de jumentos (VIDAMENT *et al.*, 2009). Os crioprotetores que são incorporados no congelamento do sêmen podem induzir uma reação de

hipersensibilidade uterina, principalmente o glicerol (PALMER, 1984). Vidament *et al.* (2002), Ball e Vo (2001), Montavani *et al.* (2002), Squires *et al.* (2004), Alvarenga *et al.* (2005) e Vidament *et al.* (2009) propuseram a substituição do glicerol por outros crioprotetores, como a dimetilformamida (DMF) e o etilenoglicol, obtendo resultados variáveis.

Além de todos esses fatores, a resposta uterina ao sêmen congelado pode diferir entre éguas e jumentas, tornando-se uma hipótese a ser considerada (MIRÓ *et al.*, 2017). Fatores inerentes à resposta inflamatória uterina em jumentas, pode ser causa da redução da taxa de prenhez com o uso do sêmen criopreservado, sendo necessário compreender melhor os mecanismos do processo inflamatório nas duas espécies. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo avaliar e comparar o processo inflamatório uterino, entre jumentas e éguas inseminadas com sêmen criopreservado de asininos.

2. Revisão de Literatura

2.1 Sistema Reprodutor da Égua x Jumenta

De forma geral, a anatomia dos órgãos reprodutores das fêmeas equídeas é similar, divergindo sobretudo no tamanho e dimensões dos órgãos e estruturas, os quais são proporcionais ao tamanho de cada espécie (RENNER-MARTIN *et al.*, 2009). Ele dispõe de barreiras naturais, com mecanismos de defesa físicos, mecânicos e celulares, cuja função é proteger o ambiente uterino. As barreiras físicas envolvem as estruturas mais caudais do sistema reprodutivo, dentre elas a vulva, o esfíncter vestibulo-vaginal e a cérvix (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A vulva é a primeira barreira de proteção e é a porção terminal do aparelho genital, formada pelos lábios vulvares que se unem nos cantos dorsal e ventral; a boa coaptação dos lábios vulvares impede a entrada de sujidades e contaminantes, prevenindo as infecções uterinas. Cranialmente à comissura ventral da vulva localiza-se o clitóris, o qual é o órgão homólogo rudimentar à glândula do pênis (LEISER, 1999; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O vestibulo é o assoalho da vagina na sua porção mais caudal e nela se encontra o orifício uretral externo, seu comprimento varia de 10-12 cm nas éguas e nas jumentas (BLANCHARD *et al.*, 2003; RENNER-MARTIN *et al.*, 2009) com inclinação ventralmente à abertura da vulva. Também é responsável pela produção glandular (Glândulas de Garter e vestibulares) do trato reprodutor posterior. A delimitação entre o vestibulo e a vagina se dá pela presença da prega vestibulo-vaginal, que protege a vagina cranial à entrada de microrganismos (BLANCHARD *et al.*, 2003).

A vagina é o órgão copulatório tendo um papel importante também como o canal do parto. É uma estrutura tubular, fibromuscular que se estende da cérvix à vulva, com cerca de 15 a 20 cm de comprimento na égua (LEISER, 1999) e 9,5 cm nas jumentas (RENNER-MARTIN *et al.*, 2009). Em ambas espécies, a parte cranial da vagina, que circunda a proeminência do colo do útero, forma um espaço anular, denominado fórnix (BLANCHARD *et al.*, 2003; HAFEZ e HAFEZ, 2004; RENNER-MARTIN *et al.*, 2009).

A cérvix ou colo uterino é um esfíncter tubular que se projeta na vagina e separa o útero da vagina. O lúmen da cérvix é denominado canal cervical, formada longitudinalmente por camada muscular circular bem desenvolvida que contém fibras elásticas. Nas éguas, seu comprimento varia entre 5 e 7,5 cm (BARONE, 1978; GINTHER, 1992; LEISER, 1999) e nas jumentas 4,5 a 8,0 cm (MOREAU, 1958; VENDRAMINI *et al.*, 1998; RENNER-MARTIN *et al.*, 2009), a mucosa possui pregas longitudinais contínuas com as pregas uterinas e seu epitélio é formado por células produtoras de muco (BLANCHARD *et al.*, 2003). A estrutura anatômica da cérvix da jumenta se diferencia pelo canal cervical ser um seguimento longitudinal tortuoso, mais flexível e de menor diâmetro (GUINTARD *et al.*, 1996; VENDRAMINI *et al.*, 1998).

As jumentas, assim como as éguas, possuem útero do tipo bicornu, com fusão intercornual alta, no qual os cornos são mais curtos e o corpo uterino bem desenvolvido, apresentando-se em formato de “T” (DYCE, 1996). Os cornos se encontram dentro da cavidade abdominal e divergem lateralmente sendo suspensos pelos ligamentos largos na parede dorsal do abdômen; o comprimento dos cornos na espécie asinina e equina variam de 6,5 a 13 cm e cerca de 25 cm, respectivamente (LEISER, 1999). Comparado a égua, o corpo do útero das jumentas é em média 13 cm mais curto, situando-se parte em região de pelve e parte dentro do abdômen (RENNER-MARTIN *et al.*, 2009); na égua o comprimento do corpo uterino varia entre 18 a 20 cm, enquanto na jumenta varia de 4,5 a 7,5 cm. Em ambas as espécies, o útero apresenta formato quase cilíndrico, ligeiramente aplainado dorso-ventralmente, comunicando-se caudalmente com a vagina por intermédio da cérvix. Sua principal função é ser local para o desenvolvimento gestacional, mas também realiza o transporte de espermatozoides até o oviduto e participa da produção hormonal na regulação do sistema reprodutivo (GUINTARD *et al.*, 1996).

Histologicamente o útero é constituído pelas camadas serosa, muscular e endométrio. A camada muscular é formada por duas camadas de musculo liso (interna circular e externa longitudinal) importantes para a contração uterina. O endométrio possui epitélio colunar simples parcialmente ciliado e uma lâmina própria contendo glândulas secretoras, responsáveis

pela produção de conteúdo que funciona como barreira à agentes contaminantes e como reservatório de espermatozoides durante o transporte espermático (BLANCHARD *et al.*, 2003).

As tubas uterinas ou ovidutos são estruturas tubulares, pequenas, responsáveis pela captação do ovócito no momento da ovulação, é o local de fertilização, além de ser um reservatório espermático (DYCE, 1996; HAFEZ e HAFEZ, 2004). É composta pelas regiões de infundíbulo (região mais próxima do ovário, que possui fímbrias para captação do ovócito), ampola (porção intermediária, no qual ocorre a fecundação, na sua ligação com o ístimo) e o ístimo (porção mais próxima do corno uterino, que se liga a ele pela junção tubárica). As camadas que constituem as tubas uterinas são a serosa, a muscular e a mucosa, essa última, por sua vez possui uma camada de lâmina própria e uma epitelial constituída por epitélio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, com células secretoras não ciliadas, células intercalares e basais (BLANCHARD *et al.*, 2003; HAFEZ e HAFEZ, 2004). Elas variam em sua proporção e tamanho de um segmento para outro do oviduto e de acordo com fase do ciclo estral (SILVA, 2020).

Os ovários são estruturas circulares, pares, suspensos pelo ligamento suspensório e localizados caudolateral ao rim, sendo o ovário esquerdo mais caudal que o direito. Eles são responsáveis pela função exócrina (produção de gametas) e endócrina (produção de hormônios). Possuem uma divisão estrutural no qual a região medular é constituída por vasos sanguíneos, linfáticos e nervos e o córtex, que contém folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, corpos lúteos, hemorrágicos, folículos atrésicos e corpos *albicans* (HAFEZ e HAFEZ, 2004; SILVA, 2020). O ovário das fêmeas equídeas caracteriza-se pela inversão entre essas duas regiões, que ocorre a partir do sétimo mês de desenvolvimento fetal, o que configura a região de córtex estar no centro do órgão e a região medular, em sua periferia (LEISER, 1999; RENNER-MARTIN *et al.*, 2009). Essa inversão resulta na formação de uma estrutura denominada fossa de ovulação, o qual é o local específico de ruptura do folículo pré-ovulatório (BLANCHARD *et al.*, 2003).

Tanto na égua quanto na jumenta, as estruturas foliculares são palpáveis a partir de 15 mm de diâmetro. No entanto, nas éguas esses folículos poder alcançar 40 a 60 mm nos momentos antecedentes à ovulação (LEISER, 1999). Já nas jumentas, os folículos podem apresentar diâmetros variáveis, considerados grandes aqueles que apresentam 25 mm ou mais, médios de 20 a 24 mm e pequenos menores que 20 mm e o folículo pré-ovulatório alcança seu diâmetro máximo um dia antes da ovulação (RENNER-MARTIN *et al.*, 2009).

A vascularização do trato reprodutor se assemelha entre éguas e jumentas (KONIG E RIES, 1987; KONIG E LIEBICH, 2007; RENNER-MARTIN *et al.*, 2009). No entanto, o

ligamento mesossalpinge nas jumentas é mais amplo, cobrindo a face lateral do ovário, além da estrutura apêndice cranial do ligamento redondo do útero ser bem mais proeminente (RENNER-MARTIN *et al.*, 2009). Os órgãos genitais internos são sustentados por ligamentos, mesovário, mesossalpinge e mesométrio, os quais formam um conjunto denominado de ligamento largo do útero (GETTY *et al.* 1981).

2.2 Mecanismos de Defesa Uterina

2.2.1 Barreiras Físicas

As barreiras físicas envolvem as estruturas mais caudais do sistema reprodutor, dentre elas a vulva, o esfíncter vestibulo-vaginal e a cérvix. A vulva é a primeira barreira de proteção e a boa coaptação dos lábios vulvares impede a entrada de fezes e outros contaminantes para dentro da vagina, assim como o funcionamento adequado da prega vestibulo-vaginal atua como importante barreira contra a ascensão bacteriana e fúngica, prevenindo infecções. A cérvix também constitui uma barreira física, por sua característica anatômica tubular, composta por musculatura lisa e com capacidade secretora de muco, que conferem eficiente proteção ao útero (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

No entanto, qualquer transposição destas barreiras naturais do trato reprodutor irá predispor a égua a uma infecção uterina (FERRIS, 2016). Alterações morfológicas ou nos mecanismos físicos de proteção estão relacionados à incidência de subfertilidade, que ocorre principalmente em fêmeas senis, multíparas e com baixo escore de condição corporal (BRINSKO *et al.*, 2012). Se não há a funcionalidade de coaptação dos lábios vulvares, do esfíncter vestibulo vaginal e da cérvix, a fêmea se torna susceptível a desenvolver afecções como pneumovagina e/ou urovagina (acúmulo de ar e urina na vagina) predispondo a contaminação ascendente do útero (CANISSO *et al.*, 2016).

O acúmulo de ar na vagina (pneumovagina) decorre da alteração da conformação perineal com a comissura dorsal da vulva, no qual o ânus fica retraído e os lábios vulvares se apresentam inclinados horizontalmente (BRINSKO *et al.*, 2012), resultando na falha do esfíncter que auxilia na prevenção da aspiração do ar e dilatação da vagina, além de haver contaminação fecal. Nesses casos, devido ao maior relaxamento do períneo, a fase de estro pode predispor a ocorrência dessa afecção. Além disso, sua ocorrência pode ser secundária à traumatismos durante o parto (WOODIE, 2012). Já o acúmulo de urina (urovagina) ocorre pelo desvio crânio ventral da vagina responsável por tracionar o orifício da uretra cranialmente. As alterações de

conformação modificam o posicionamento do orifício da uretra, levando ao acúmulo de urina no fundo de saco vaginal (BRINSKO *et al.*, 2012).

2.2.2 Sistema imune inato e adaptivo

A inflamação é uma resposta de proteção ao organismo frente à patógenos invasores, que promove a neutralização de estímulos nocivos, visando o reparo tecidual. Essa resposta, inicia-se com a detecção de PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos) e DAMPs (padrões moleculares associados à danos) por receptores de reconhecimento de padrões codificados por linhagem germinativa (PRRs) (SLAATS *et al.*, 2016).

A resposta imune inata local é a primeira linha de defesa do endométrio, ativada imediatamente após reconhecimento de determinado antígeno. Sua principal função é atrair localmente as células do sistema imune por meio da sinalização de quimiocinas, promover a ativação do Sistema Complemento e do sistema imunológico adaptativo, por meio da apresentação de antígenos, além de atuar como barreira física aos organismos invasores (CANISSO *et al.*, 2020).

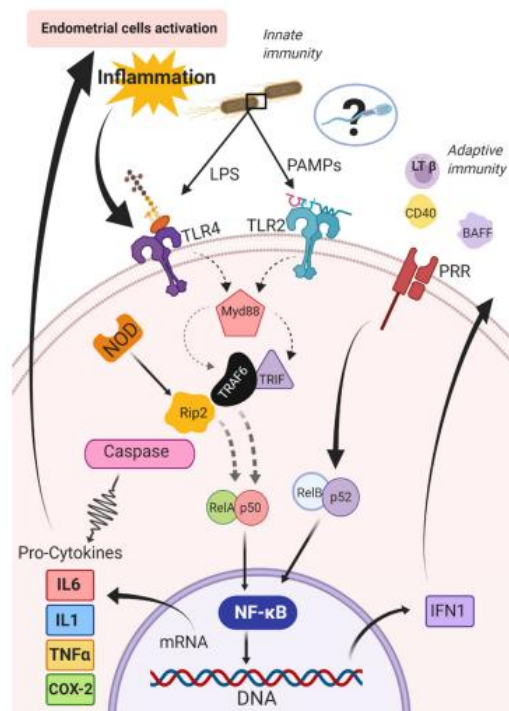


Figura 1. Ativação das vias canônicas e alternativas, iniciando o processo inflamatório no endométrio das éguas, após reconhecimento de antígeno. (CANISSO, 2020)

O reconhecimento da presença de antígenos pelo sistema imune inato, influi na liberação de prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias, principalmente as interleucinas (IL) IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF), culminando na ativação do endotélio vascular. A vasodilatação aumenta a permeabilidade vascular local, gerando edema, para que se inicie as respostas celulares (CONTRAN, 1999). Por meio desse estímulo inflamatório, moléculas de adesão presentes nas células endoteliais, são capazes de recrutar neutrófilos da corrente sanguínea, por meio da ligação dessas moléculas de adesão com as integrinas expressas na superfície dos neutrófilos (DORÉ e SIROIS, 1996; TIZARD, 2009). Esse mecanismo permite a migração dessas células imunes para o endométrio, que chegam ao lúmen uterino cerca de 30 minutos após estímulo (KÁTILA, 1995). Em 6 a 12 horas após a migração dessas células para o lúmen uterino, se estabelece o pico inflamatório (TROEDSSON *et al.*, 1999).

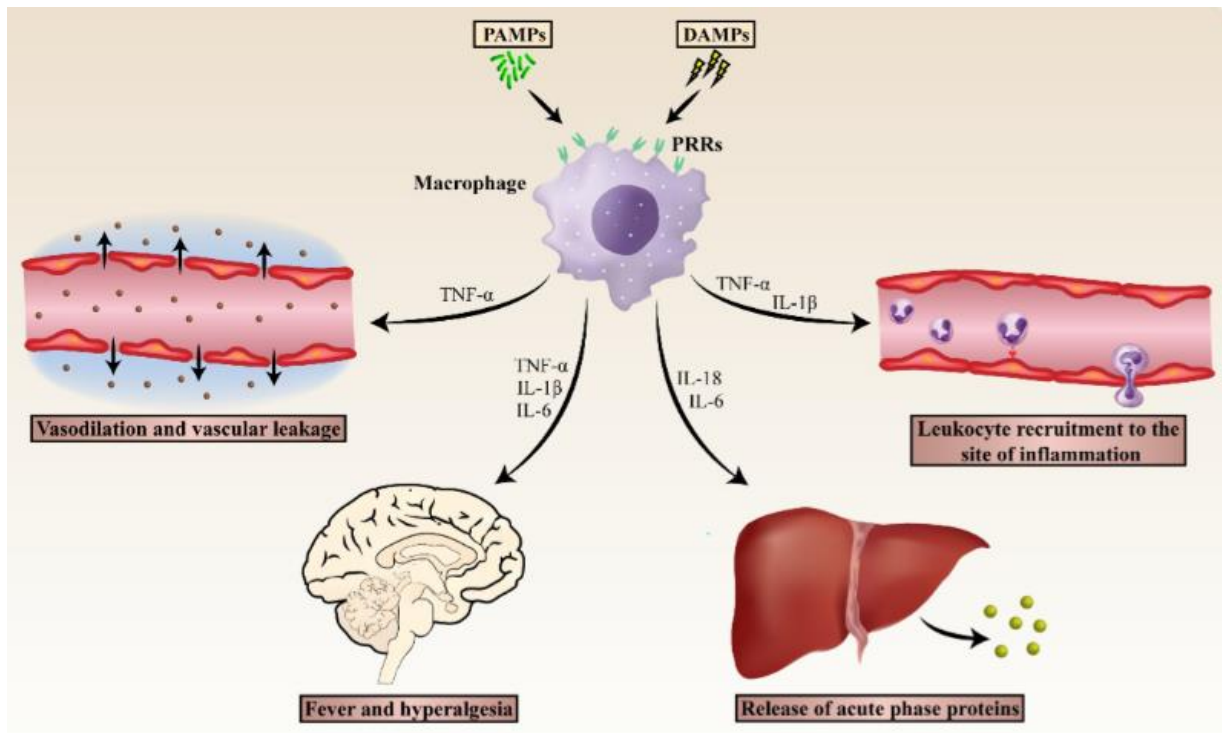


Figura 2. Resposta inflamatória aguda mediada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, a partir da sinalização dos PAMPs e DAMPs. (SLAATS *et al.*, 2016)

O Sistema complemento, é um complexo proteico existente no plasma sanguíneo, sob a forma inativa. Esse sistema tem como função promover eventos vasculares que recrutam fagócitos ao local da atividade inflamatória e eliminar agentes estranhos por fagocitose. Algumas proteínas ativadas do complemento unem-se a bactérias, opsonizando-as para ingestão pelos fagócitos. Outra função do sistema complemento é a promoção da lise de microrganismos,

já que, uma vez desencadeada a cascata, os componentes terminais do complemento lesam microorganismos e outras células formando poros na membrana celular (MOLINARO *et al.*, 2013). As vias do Sistema Complemento ativam cascatas de enzimas, prostaglandinas, leucotrienos e outras moléculas ativas que resultam em maior atividade quimiotática para aumentar, de forma inespecífica, as funções de depuração, pelas células fagocíticas (KOTILAINEN *et al.*, 1994; TROEDSSON *et al.*, 1997 e 2001).

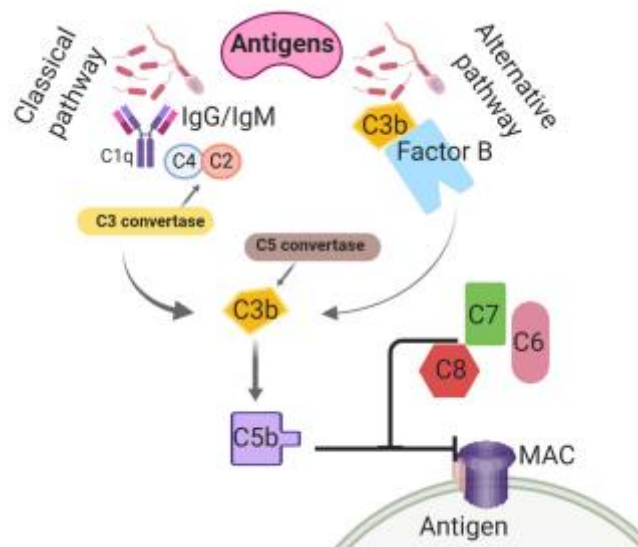


Figura 3. Vias Clássica e Alternativa de ativação do Sistema Complemento que ocorre no lúmen uterino de éguas pós-cobertura (CANISSO *et al.*, 2020).

Se a resposta inata for suficiente para solucionar a inflamação, não ocorrerá a ativação da resposta imune adaptativa e, portanto, não será formada uma memória imunológica. Diferente da imunidade inata, a resposta imune adaptativa do trato reprodutor ocorre de forma gradual, seletiva e específica à detecção dos antígenos, sendo mediado principalmente pelas células T, que induzem a necrose e apoptose de células infectadas (LIEBERMAN, 2003). Quando necessário, há ativação da resposta imune adaptativa, de forma que a resposta humoral participa do processo destruindo os microrganismos extracelulares e seus produtos, como as toxinas, além de prevenir ou diminuir as infecções intracelulares, mediante neutralização desses agentes, por meio da produção de anticorpos, liberados na secreção uterina (MOLINARO *et al.*, 2013)

As respostas imunes são mediadas por uma variedade de células e moléculas que elas produzem. Os macrófagos são as células fagocíticas mais relevantes, apresentando-se em ambiente uterino em sua forma diferenciada como monócito, porém pouco presente. Em éguas,

os eosinófilos participam da resposta inflamatória frente à presença de fungos ou ar (pneumometra). No entanto, em jumentas os eosinófilos parecem ser importantes, pois estão comumente presentes em fase de estro e em maior proporção no início do processo inflamatório uterino, após inseminação (MIRÓ *et al.*, 2020). Neste contexto, os basófilos e mastócitos são células dificilmente encontradas. Os neutrófilos possuem função fagocítica e são as células mais numerosos e importantes da resposta inata uterina, além de serem as primeiras células a chegarem na linha de defesa do útero, em resposta à um antígeno. Também são capazes de produzir citocinas e mediadores quimiotáticos adicionais, para induzir maior inflamação (TIZARD, 2009). Já os linfócitos (T e B), participam do processo em uma fase mais tardia da inflamação (MOLINARO *et al.*, 2013)

Depois de estabelecida uma resposta inflamatória pelos mecanismos pró inflamatórios citados, também são necessários mecanismos para a resolução desse processo. As interleucinas, IL-10 e IL-6, são sintetizadas em uma fase mais tardia da inflamação, atuando como efetores anti-inflamatórios, desempenhando papel de mitigar as transcrições de moléculas pró-inflamatórias e conseqüentemente reduzindo as respostas celulares (LÖGTERS *et al.*, 2009). Após 6 horas do início do processo inflamatório, ocorre um aumento da expressão de IL-6 e IL-10 principalmente pelos linfócitos, mastócitos e monócitos, a fim de promover o equilíbrio e cessar a resposta inflamatória (KÁTILA, 2012). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica atuando como um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação, enquanto o efeito principal da IL-10 é inibir a síntese de outras citocinas (VARELLA *et al.*, 2011).

Existem outros componentes do plasma que participam de forma inespecífica na resposta imune inata, denominadas proteínas de fase aguda (PFA) (MURATA *et al.*, 2004). Essas proteínas são sintetizadas pelos hepatócitos e são liberadas na corrente sanguínea, por meio da sinalização de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 e IL-6), devido à um desequilíbrio na homeostase do organismo (MEDZHITOV, 2010; CRISMAN *et al.*, 2008). A concentração dessas proteínas varia entre as espécies e ao longo do processo inflamatório. Elas são categorizadas em positivas ou negativas, quanto à sua concentração, aumentando ou diminuindo, respectivamente, no plasma sanguíneo ao longo da inflamação (CONTIN *et al.*, 2015).

As PFA's positivas podem apresentar uma resposta exacerbada, alcançando seu pico em 24 a 48 horas pela elevação da concentração até 1000 vezes mais; ou moderada, aumentando sua concentração em até 10 vezes, atingindo a concentração máxima em 48 a 72 horas. Outras PFA's, apresentam apenas um discreto aumento na concentração sanguínea. São proteínas de fase aguda positivas: Amilóide Sérica A (ASA), Proteína C reativa (PCR), α 1-Glicoproteína

ácida (GPA), Haptoglobina (Hp), α 1-Antitripsina (α 1-antitrip), α 2-Macroglobulina (α 2-macro), Ceruloplasmina (Cp) e fibrinogênio (Fb) (CRAY, 2012; ECKERSALL, 2008). No entanto, há também PFA's negativas no soro ou plasma, que podem apresentar um decréscimo de concentração em 25% em um período de 24 horas, em um processo rápido, ou diminuir de forma gradual, ao longo dos dias. Dentre elas estão a albumina (alb) e transferrina (Trf) (ECKERSALL, 2008).

De forma geral, segundo Cywińska *et al.* (2012) a amilóide sérica A (ASA), proteína C reativa (PCR) e haptoglobina (Hp) são as PFAs com maior sensibilidade em animais. Como função, a ASA possui atividade imunomoduladora, com efeito quimiostático em monócitos e PMN's, inibe a resposta oxidativa por macrófagos e participa da opsonização. Já a PCR realiza a opsonização das bactérias, induzindo a produção de citocinas inflamatórias, inferindo no infiltrado neutrofílico no local da inflamação (ECKERSALL, 2008; PETERSEN *et al.*, 2004). A GPA também participa da atividade imunomoduladora, se ligando e transportando principalmente substâncias como heparina, histamina e catecolaminas (FOURNIER *et al.*; MEDJOUBI *et al.*, 2000), enquanto a principal função da Hp é evitar o dano oxidativo dos tecidos, por se ligar a fração de hemoglobina livre no plasma sanguíneo (ECKERSALL, 2008; JAIN, *et al.*, 2011). A proteína Hp possui atividade antibacteriana por indisponibilizar o ferro do grupo heme para os microrganismos, além de atuar como receptor na superfície dos macrófagos (ECKERSALL, 2008).

As PFA's α 1-antitripsina e α 2-macroglobulina possuem atividade antiproteases, por neutralizarem a atividade de enzimas proteolíticas liberadas por células do sistema imunológico durante o processo inflamatório, minimizando os danos aos tecidos sadios. A Cp apresenta atividade enzimática e antioxidante e possui uma importante função no processo de cicatrização de feridas e produção de colágeno (JAIN *et al.*, 2011). Por meio da ligação nas integrinas presentes na superfície celular dos macrófagos, o Fb desencadeia uma série de respostas intracelular, capazes de aumentar a degranulação, fagocitose e retardo na apoptose (RUBEL *et al.*, 2001). Já a Trf é responsável pelo transporte de ferro circulante e quando sua síntese é estimulada, o ferro livre acaba sendo indisponibilizado para os microrganismos invasores, o que confere a essa PFA características antibacteriana e antiviral (CONTIN *et al.*, 2015).

2.2.3 Limpeza uterina

A resolução da inflamação uterina depende das ações coordenadas das vias de resposta mecânica e imunológica e a contratilidade miometrial é um fator importante nos mecanismos

de limpeza do útero. Após inseminação ou acasalamento, há a liberação de ocitocina decorrente da estimulação da vagina e colo do útero. A ocitocina promove as contrações rítmicas, que atuam sobre o sistema linfático, proporcionando o retorno dos fluidos presentes nos espaços intersticiais para o sangue, retirando os componentes nocivos. Da mesma forma, torna-se fundamental a liberação de PGF-2 α a partir da inflamação uterina para auxílio na depuração uterina, realizada pela cérvix 6 a 12 horas após IA, para remoção de líquido, componentes celulares e células (PMN's, espermatozoides) (LEBLANC *et al.*, 1995; TROEDSSON 1997).

No entanto, a capacidade de depuração uterina por meio da contração do útero difere entre fêmeas jovens e pluríparas de idade avançada. Os defeitos anatômicos adquiridos ao longo da vida e mudanças físicas decorrentes do avanço da idade e número de partos (má conformação perineal, útero pendular, deformidade da cérvix e fibrose endometrial), podem tornar ineficiente esse mecanismo de depuração, caracterizando essas éguas como susceptíveis à endometrite. Em associação a essas características do trato reprodutor, existe o comprometimento da atividade contrátil do endométrio. A redução da atividade miolétrica do miométrio, devido à fatores endócrinos, imunológicos e químicos da reação inflamatória, implica em comprometimento da ação contrátil miometrial, permitindo o acúmulo de LIU (WOODWARD *et al.* 2013; KHAN *et al.* 2017). Em estudos, Troedsson *et al.* (1999) e LeBlanc *et al.* (1994) concluíram que déficits na contratilidade uterina, como mudança na frequência, duração e intensidade das contrações, podem ser o princípio de uma condição patológica.

A sinalização imunológica também está associada às funções contráteis do útero, principalmente na indução de síntese citocinas inflamatórias, pela presença do óxido nítrico. O óxido nítrico é uma molécula de sinalização da inflamação, que induz o relaxamento da musculatura lisa, no qual a sua ação independe de cálcio (LIU *et al.*, 1997). Portanto, se tratando de éguas susceptíveis à endometrite, o aumento prolongado e indeterminado de citocinas pró-inflamatórias, induz a expressão e atividade do óxido nítrico no miométrio, levando ao relaxamento e diminuição da atividade miometrial, contribuindo para a fisiopatologia da endometrite persistente pós-cobertura (ALGHAMDI *et al.*, 2007; WOODWARD *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2016).

2.3 Endometrite pós cobertura e endometrite persistente pós-cobertura

A resposta inflamatória uterina das fêmeas equídeas inseminadas ou cobertas na monta natural, é um processo fisiológico em resposta à presença de espermatozoides, substâncias do plasma seminal e agentes contaminantes que entram em contato com o endométrio

(TROEDSSON *et al.*, 1999) e por isso é denominada como endometrite pós cobertura. Os espermatozoides e componentes do plasma seminal atuam como corpos estranhos ao endométrio, promovendo uma sinalização à presença de antígenos. Essa resposta induz a liberação de mediadores inflamatórios quimiotáticos, responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e migração de neutrófilos, macrófagos e demais células de defesa para o lúmen uterino. Essas células realizam a fagocitose e opsonização de espermatozoides mortos ou defeituosos, em um processo de reação inflamatória fisiológica transitória (TROEDSSON *et al.*, 1995; PYCOCK E ALLEN, 1998; TROEDSSON *et al.*, 2001). De forma geral, o pico inflamatório ocorre cerca de 6 a 12 horas após o estímulo e a resolução da inflamação se inicia após 12 horas, com a síntese de citocinas anti-inflamatórias, reestabelecendo a homeostase uterina em 24 horas (TROEDSSON *et al.*, 1999; WOODWARD *et al.* 2013; TROEDSSON, 2013).

Em condição saudável, o útero possui um sistema imune eficiente e bom padrão de contratilidade e essas ações em conjunto solucionam a resposta inflamatória no período de 36 a 48 horas após inseminação artificial (IA) ou monta natural e propiciam até o 5º dia pós ovulação, um ambiente adequado para o reconhecimento embrionário e sua implantação (KÁTILA, 1995). A síntese de PGF-2 α pelo útero também é essencial nesse processo para que ocorra as contrações miométriais necessárias para que haja uma depuração uterina eficiente pelos vasos linfáticos e através da cérvix (TROEDSSON *et al.*, 2001).

No entanto, na endometrite persistente pós-cobertura, a resposta inflamatória é prolongada devido às falhas nos mecanismos de defesa. A liberação de prostaglandinas inflamatórias, somada à neutrofilia persistente e frequentemente à presença de líquido intraluminal, contribuem para a perda embrionária (NEEYLE *et al.*, 1979). Portanto, éguas diagnosticadas com essa condição patológica, em que a inflamação do endométrio pós cobertura persiste, são denominadas susceptíveis à endometrite.

A categorização de éguas susceptíveis à endometrite, se deu quando, pesquisadores induziram a endometrite, de forma experimental, com a bactéria *S. equi ssp. Zooepidemicus* em éguas jovens e férteis, e éguas mais velhas e subférteis, e observaram que as jovens e férteis eram mais propensas a debelar a inflamação (HUGHES E LOY, 1969). Em outros testes de susceptibilidade, éguas que foram incapazes de eliminar a endometrite bacteriana induzida dentro de 72 horas e incapazes de conceber no ciclo estral subsequente, foram diagnosticadas com endometrite persistente (FUMOSO *et al.*, 2003 e 2006).

Diversos fatores implicam nessa susceptibilidade, dentre elas a má conformação da área perineal, que inferem na anatomia vulvar e na função da barreira física exercida pelos

lábios vulvares (HEMBERG *et al.*, 2005). Da mesma forma, animais que apresentam útero pendular estão propensos ao acúmulo de líquido intrauterino, bem como a agentes contaminantes, e possuem dificuldade de eliminá-los pela disposição anatômica desfavorável do órgão (LEBLANC *et al.*, 1998). Além disso, um fator importante a ser considerado é a qualidade endometrial, usado como bom marcador de saúde uterina (LUDWIG *et al.*, 2001; SCHLAFER, 2007). Estudos que avaliaram os aspectos endometriais na histopatologia de biópsias uterinas, sugerem que há correlação de fêmeas com histórico de susceptibilidade à endometrite, com os escores de lesões uterinas IIb (presença de inflamação e fibrose moderadas com formação de aglomerações glandulares, presença moderada de PMN's e hiperplasia ou cistos glandulares) e III (presença de inflamação e fibrose graves com grande presença de PMNs e aglomerações, cistos e hiperplasias glandulares) (WOODWARD *et al.*, 2012), com base no sistema de classificação proposta por Kenney e Doig (1986). Esses fatores mencionados, podem estar mais associados à animais de idade avançada e que podem apresentar tal patologia (RICKETTS E ALONSO, 1991; CARNEVALE E GUINTER, 1992). No entanto, deve-se ressaltar que animais jovens também podem se apresentar susceptíveis, devido a defeitos cervicais, por exemplo (KÁTILA, 1996).

Nessas condições, infecções por microrganismos oportunistas que acessam o útero no momento da cobertura ou inseminação, podem ser levadas adiante, pelas falhas na resposta imune inata. Alguns trabalhos demonstraram que fêmeas com maior susceptibilidade à endometrite possuem inicialmente maior expressão endometrial de interleucinas pró-inflamatórias, como a IL1 β e TNF α , à exposição a patógenos e até mesmo aos espermatozoides, quando comparado às éguas consideradas não susceptíveis (FUMOSO *et al.*, 2006 e 2007; PALM *et al.*, 2008). Somado a isso, essa resposta inflamatória difere nas primeiras 12 horas, por apresentar uma crescente no infiltrado neutrofílico (WOODWARD *et al.*, 2013) e produção inadequada de interleucinas anti-inflamatórias.

Na endometrite infecciosa, a presença de bactérias e fungos patogênicos ou oportunistas é que determina o processo inflamatório uterino. Segundo Riddle *et al.* (2007), os principais patógenos envolvidos nesse processo são as bactérias anaeróbicas, sendo as mais comumente isoladas: *Streptococcus* (*S. equi* subspécie *zooepidermicus*), *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (CANISSO *et al.*, 2016; LEBLANC *et al.*, 2007 e 2009; WALTER *et al.*, 2012). Os fungos, representam 1 a 5% das endometrites, e quase sempre estão associados a outras bactérias (DASCANIO *et al.*, 2010). A endometrite fúngica geralmente ocorre como uma infecção oportunista, sendo os principais isolados a *Candida* e o *Aspergillus* (COUTINHO *et al.*, 2011; STOUT, 2008; DASCANIO *et al.*, 2010).

Alguns agentes patogênicos, dentre as bactéria e fungos, são capazes de produzir uma substância composta por matriz extracelular e de se unir a ela, formando um complexo denominado biofilme. Esse agregado funciona como uma barreira física de proteção contra o sistema imunológico, impossibilitando o combate à infecção, conferindo cronicidade ao processo inflamatório (JENSEN *et al.*, 1990; STOODLEY *et al.*, 2002; THURLOW *et al.*, 2004; SHAH *et al.*, 2006).

2.4 Uso do sêmen congelado

A maximização do uso dos garanhões com grande potencial genético permite a formação de um importante banco de dados (SQUIRES *et al.*, 1999; MARIANTE e CAVALCANTE, 2000). A criopreservação do sêmen na espécie equina e asinina é uma potente ferramenta para os avanços do melhoramento genético. Durante o processo de congelamento, o plasma seminal (PS) é retirado e as células espermáticas são submetidas à baixas temperaturas e por isso se faz necessário a adição de crioprotetores, que conferem proteção física e química a essas células (ARRUDA, 2000).

A transferência de técnicas reprodutivas desenvolvidas para uma espécie e aplicadas em outras, podem implicar em resultados insatisfatórios, pois as espécies se diferem quanto à anatomia e fisiologia do aparelho reprodutor (WILDT *et al.*, 1995). Portanto, a variação nas taxas de fertilidade entre as espécies ocorre. Muitos estudos acerca das biotecnologias da reprodução equina, sobretudo no uso do sêmen congelado, estão consolidados obtendo-se resultados positivos na fertilidade. No entanto, o uso de sêmen asinino criopreservado em éguas e jumentas apresentam insatisfatórios resultados de fertilidade, apesar de satisfatórios parâmetros seminais de viabilidade e motilidade pós congelamento (OLIVEIRA, 2005; CANISSO *et al.*, 2008; VIDAMENT *et al.*, 2008).

Para as taxas de prenhez de jumentas inseminadas com sêmen asinino criopreservado, Oliveira *et al.* (2006) e Vidament *et al.* (2009), obtiveram resultados de 0% e 11%, respectivamente; já a taxa de fertilidade com uso do sêmen asinino criopreservado em éguas variou de 33-53% (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Apenas Rota *et al.*, (2012), obtiveram um índice notável de 61,5%, ressuspendendo o sêmen congelado com o plasma seminal previamente às IA's em jumentas e realizando a lavagem uterina 4 ou 6 horas após IA. Esse resultado foi justificado devido às propriedades do PS de proteção dos espermatozoides à ligação dos PMN's, reduzindo a liberação de citocinas inflamatórias, por meio da supressão da cicloxigenase 2 (COX-2) (VILÉS *et al.*, 2013).

Diversos fatores inerentes ao processo de criopreservação, que provocam alterações das células espermáticas, sejam elas físico-químicas ou estruturais, devem ser considerados como causas importantes na queda da fertilidade do sêmen de jumento. Sendo assim, deve-se ressaltar a sensibilidade dos espermatozoides à refrigeração, ao estresse osmótico e à adição de crioprotetores como pontos críticos (WATSON *et al.*, 2000). Inicialmente a toxicidade promovida pelos crioprotetores aos espermatozoides (TRIMECHE *et al.*, 1998) ou ao endométrio, que poderia exercer um efeito negativo na fertilidade da jumenta (VIDAMENT, 2005), foi a principal hipótese levantada para justificar a baixa fertilidade com o uso dessa biotecnologia. O efeito negativo do glicerol sobre a fertilidade das éguas foi observado por Pace Sullivan (1975), Pickett *et al.* (1975) e Palmer (1984), sendo proposto então a sua substituição por Dimetilformamida (VIDAMENT *et al.*, 2002; SQUIRES *et al.*, 2004; ALVARENGA *et al.*, 2005) por Etilenoglicol (BALL e VO, 2001; MONTAVANI *et al.*, 2002; SQUIRES *et al.*, 2004). A adição do glicerol à 2,2% ao sêmen resfriado reduziu a taxa de prenhez nas jumentas de 63% à 0% (VIDAMENT *et al.*, 2009). A substituição do glicerol por outros crioprotetores foi proposto neste mesmo estudo, mas o uso de ambos crioprotetores, foi negativo para a fertilidade nas jumentas.

A resposta uterina frente à esses fatores deve ser considerada. A adição de diluentes ao sêmen é fundamental para a criopreservação (AMANN e PICKETT, 1987). Porém, o leite, principal componente dos diluentes de sêmen, quando infundidos no útero gera uma reação inflamatória, assim como o glicerol e outros crioprotetores (FIALA, 2017). Associado a isso, a resposta uterina pode ser alterada, considerando a ausência do plasma seminal (PS), o qual é removido durante o processo de criopreservação do sêmen (PORTUS *et al.*, 2005).

O plasma seminal possui funções de modulação nos tecidos femininos, durante a capacitação espermática e na interação entre gametas, e papel fundamental na resposta inflamatória uterina (GUTSCHE *et al.*, 2003; TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005;). Ele possui propriedades protetoras para os espermatozoides viáveis e de sinalização para as células imunes. Embora o plasma seminal induza uma inflamação endometrial transitória, ele altera a duração e a intensidade desta resposta (WOODWARD *et al.* 2013; TROEDSSON, 2013; MORELLI *et al.*, 2021). Nesse contexto, é evidente que há um equilíbrio nas respostas pró e anti-inflamatórias, por meio das citocinas presentes no plasma seminal, na tentativa de regular e preservar o endométrio (TROEDSSON *et al.*, 2005).

Segundo Troedsson *et al.* (2000; 2001), o plasma seminal contém proteínas com características imunomoduladoras, que agem suprimindo a quimiotaxia e reduzindo o infiltrado neutrofílico e a fagocitose. A caracterização, fracionamento por peso molecular e identificação

dos componentes do plasma seminal, permitiram isolar àqueles responsáveis pelos efeitos imunossupressores à quimiotaxia de polimorfonucleares (PMN's). Troedsson *et al.*, (1999) identificaram que esses componentes possuem peso molecular variando de 50-100 kDa.

Estudos em éguas demonstraram que há redução significativa de PMN's em 24 horas após inseminação artificial de sêmen congelado com adição do PS, resultando em diminuição do período inflamatório uterino. Contraposto a isso, foi observado que após IA com sêmen congelado, sem adição do plasma seminal, não há diferença significativa no número de polimorfonucleares entre os tempos 6, 12 e 24 horas pós IA (TROEDSSON *et al.* 2000; 2001). Esses resultados sugerem uma predisposição à um quadro de endometrite persistente pós cobertura em éguas inseminadas com sêmen criopreservado, devido a remoção de grande parte do plasma seminal em seu processamento e elevada concentração de espermatozoides na dose inseminante, resultando em mudanças no padrão da resposta inflamatória (TROEDSSON *et al.*, 2008). Uma reação inflamatória exacerbada e acúmulo de líquido no interior do útero em éguas inseminadas com sêmen congelado foi observada quando comparado com o uso sêmen fresco (KOTILAINEN *et al.*, 1994; TROEDSSON *et al.*, 2001).

Rota *et al.* (2008) utilizando sêmen resfriado e Miró *et al.* (2013) avaliando resposta ao sêmen congelado, observaram maior infiltrado de polimorfonucleares e eosinófilos no lúmen uterino de jumentas 6 horas após a IA confirmando a hipótese de que a fisiologia da reação inflamatória endometrial das fêmeas asininas difere das equinas. Alguns estudos mostraram que as jumentas possuem uma resposta inflamatória mais intensa com grande acúmulo de PMN's no lúmen uterino, semelhante às éguas com endometrite persistente pós cobertura. Além disso, é considerado fisiológico a presença de um infiltrado eosinofílico no útero da espécie asinina, pois essas células são encontradas em baixa quantidade em período de estro e em quantidades moderadas após IA, como resposta à presença do sêmen (VILÉS *et al.* 2013; MIRÓ *et al.*, 2017). Essas células contribuem para a regulação da homeostase e remodelação tecidual nas reações inflamatórias. Estimulado pela IL-33, o infiltrado eosinofílico se estabelece, atraindo de forma autócrina e parácrina, macrófagos, linfócitos, TGF- β 1 e IL-13 (ROTHENBERG *et al.*, 2006).

Deve-se ressaltar que a resposta inflamatória difere não só entre uso de sêmen fresco ou refrigerado e sêmen congelado (KOTILAINEN *et al.*, 1994), mas também quanto ao número de espermatozoides na dose inseminante e local de deposição do sêmen no útero (corpo ou corno uterino) (GOMES *et al.*, 2004; 2018). Cazales *et al.*, (2020) avaliou o número de espermatozoides recuperados na tuba uterina ipsilateral e contralateral ao folículo dominante e a resposta inflamatória no endométrio após IA com sêmen congelado, utilizando diferentes

concentrações e depositados em locais distintos do útero. Em suma, referente à resposta inflamatória, as doses inseminantes com maior concentração espermática levou à um efeito quimiostático substancial de PMN's, em um processo inflamatório intenso e que perdurou por um período curto de tempo. Contraposto a isso, utilizando dose inseminante com concentração espermática baixa, observaram baixo estímulo inflamatório no endométrio, performando uma resposta inflamatória leve e prolongada. Esses resultados corroboram com os trabalhos de Kotilainen *et al.* (1994), Troedsson *et al.* (1998) e Katila (2011), que apontam relação direta entre a concentração espermática na dose inseminante e a intensidade da resposta inflamatória.

3. Objetivos e Hipóteses

3.1. Objetivo Geral

Avaliar e comparar o padrão de resposta inflamatória uterina e sistêmico entre jumentas e éguas inseminadas com sêmen congelado de jumento, buscando elucidar os fatores inerentes ao processo inflamatório no endométrio das jumentas, a fim de auxiliar no entendimento das baixas taxas de fertilidade após o uso desta biotecnologia para esta espécie

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar e comparar a resposta inflamatória celular no útero em diferentes momentos após a IA utilizando sêmen asinino criopreservado no útero de jumentas e éguas.
- ✓ Avaliar e comparar a resposta inflamatória sistêmica pela mensuração das proteínas de fase aguda em diferentes momentos após a IA utilizando sêmen asinino criopreservado de jumentas e éguas.
- ✓ Avaliar e comparar a perfusão sanguínea uterina em diferentes momentos após a IA utilizando sêmen asinino criopreservado de jumentas e éguas.
- ✓ Avaliar e comparar o índice de fertilidade de jumentas e éguas inseminadas com sêmen asinino criopreservado.

4. Hipótese

A resposta inflamatória uterina e sistêmica difere entre jumentas e éguas inseminadas com sêmen asinino criopreservado, quanto ao tempo-resposta pós IA e quanto ao perfil celular e intensidade do processo.

Referências

- Alghamdi, A. S.; Foster, D. N.; Carlson, C. S.; Troedsson, M. H. T. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Am. J. Reprod. Immunol*, 53, 230–237, 2005.
- Almeida, L. D. Diversidade genética de raças asininas criadas no Brasil, baseada na análise de locos microssatélites e DNA mitocondrial. 2009. 83 p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim - Alvarenga, F. C., Medeiros, A. S. L. Utilization of amides as cryoprotectors for freezing stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 105–113, 2005.
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7(3), 145–173, 1987. Disponível em: [https://doi:10.1016/s0737-0806\(87\)80025-4](https://doi:10.1016/s0737-0806(87)80025-4).
- Arruda, R. P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas de motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). São Paulo: Departamento de Reprodução Animal – Universidade de São Paulo, 2000. 120p. Tese (Tese de Livre Docência em Reprodução Animal) FMVZ – Universidade de São Paulo, 2000.
- Ball, B. A., Vo, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.* 72, 1061–1069, 2001.
- Barone, R. Anatomie compare'e des mammiferes domestiques. vol. 2, part 3. Vigot, Lyon, 1978.
- Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Brinsko, S. P., & Rigby, S. L. *Manual of Equine Reproduction* (2nd ed.). EUA: Mosby, 2003.
- Brinsko, S. P. *Manual of equine reproduction*. 3ª Ed., Mosby Elsevier, China, p. 1-325, 2012.
- Camillo F., Rota A., Biagini L., Tesi M., Fanelli D., Panzani D. The current situation and trend of donkey industry in Europe. *J Equine Vet Sci.* 65, 44-9, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2017.11.008>.
- Canisso, I., Souza, F., Ortigoza, J. Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*). *Rev. Investig. Vet.* 19, 113–125, 2008.

Canisso I. F., Carvalho G. R., Morel M. D., Ker P. G., Rodrigues A. L., Silva E. C. Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey jack semen after insemination of horse mares. *Equine Vet J*, 43:183, 2011.

Canisso, I. F.; Stewart, J.; Coutinho da Silva, M. A. Endometritis: Managing persistent post-breeding endometritis. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract*, 32, 465–480, 2016.

Canisso, I. F.; Segabinazzi, L. G. T. M.; Fedorka, C.E. Persistent Breeding-Induced Endometritis in mares—A multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. *Int. J. Mol. Sci*, 21, 1432, 2020.

Carnevale, E. M. and Ginther, O. J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology* 37, 1101-1115, 1992.

Castiglione Morelli, M. A., Ostuni, A., Giangaspero, B., Cecchini, S., Carluccio, A., & Boni, R. Relationships between Seminal Plasma Metabolites, Semen Characteristics and Sperm Kinetics in Donkey (*Equus asinus*). *Animals*, 11(1), 201, 2021. Disponível em: <https://doi:10.3390/ani11010201>.

Cazales, N., Estradé, M. J., Pereyra, F., Fiala-Rechsteiner, S. M., & Mattos, R. C. Sperm transport and endometrial inflammatory response in mares after artificial insemination with cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology*, 2020. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2020.09.021>.

Contin, C. M. Proteínas de fase aguda: Revisão de literatura. *Investigação Medicina Veterinária*, v. 14, n. 2, p. 73–76, 2015.

Contran, R. S.; Kumar, V.; Collins, T.; Robbins, S. L. Robbins Pathologic Basic of Disease, 6th ed.; W.B. Saunders: Philadelphia, PA, USA, 1999.

Coutinho da Silva, M. A.; Alvarenga, M. A. Fungal endometritis. In *Equine Reproduction*; McKinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, W.E., Varner, D.D., Eds.; Blackwell Publishing Ltd.: Hoboken, NJ, USA, pp. 2643–2651, 2011.

Cray, C. Acute phase proteins in animals. In: CONN, P. M. (Ed.). *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Oxford, UK: Elsevier Inc. v. 105p. 113–150, 2012.

Crisman, M. V.; Kent, S. W.; Zimmerman, K. L. Blood Proteins and Inflammation in the Horse. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, v. 24, n. 2, p. 285–297, 2008.

Cywińska, A. Acute phase protein concentrations after limited distance and long distance endurance rides in horses. *Research in Veterinary Science*, v. 93, n. 3, p. 1402–1406, 2012.

Dascanio, J.J.; Schweizer, C.; Ley, W.B. Equine fungal endometritis. *Equine Vet. Educ*, 13, 324–329, 2010.

- Doré, M.; Sirois, J. Regulation of P-selectin expression by inflammatory mediators in canine jugular endothelial cells. *Vet. Pathol.* 1996, 33, 662–671.
- Dyce, K. M.; Sack, W. O.; Wensing, C. J. G. *Tratado de anatomia veterinária*, 2ª Edição, 663p. 1996.
- Eckersall, P. D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117–156.
- Ferris, R. A. *Endometritis - Diagnostic Tools for Infectious Endometritis*. Elsevier Inc, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.001>.
- Fiala, S. M. Endométrio da égua pós-cobertura – ênfase na resposta inflamatória. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.326-329, jan./mar. 2017. Disponível em www.cbra.org.br.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations - FAO. Statistical Database Website [Internet]. Rome: FAO; 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>.
- Fournier, T.; Medjoubi, N.; Porquet, D. Alpha-1-acid glycoprotein 1. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1482, p. 157–171, 2000.
- Fumuso, E., Giguere, S., Wade, J., Rogan, D., Videla-Dorna, I. and Bowden, R.A. Endometrial IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha, mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis. Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 96, 31-41, 2003.
- Fumuso, E.; Aguilar, J.; Gigu, S. Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. *Anim. Reprod. Sci.* 2006, 94, 282–285.
- Fumuso, E.A.; Aguilar, J.; Giguère, S.; Rivulgo, M.; Wade, J.; Rogan, D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2007, 118, 30–39.
- Gameiro M. B. P., Rezende V. T., Zanella A. J. Brazilian donkey slaughter and exports from 2002 to 2019. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 58, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2021.174697>.
- Getty, R. *Anatomia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Interamericana, p. 507- 512, 1981.
- Ginther, O. J. *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*, second edition. Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, 1992.
- Gomes G. M., Crespilho A. M., Leão K. M., Jacob J. C. F., Gomes L. P. M., Segabinazzi L. G., Papa F. O., Alvarenga M. A. Can sperm selection, inseminating dose and artificial insemination

technique influence endometrial inflammatory response in mares? *J Equine Vet Sci*, 73:43, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.09.010>.

Gomes G. M., Leão K. M., Macedo L. P., Jacob J. C. F., Papa F. O., Oliveira J. V., Alvarenga M. A. Effect of spermatozoa number, site of semen deposition and spermatozoa selection by Percoll on the post insemination uterine inflammatory reaction with stallion frozen semen. *Acta Sci Vet*, 32 (Supplement), 170, 2004.

Guintard, D.; Vendramini, O. M.; Tainturier, D. Quelques éléments de l'anatomie Du col de l'utérus chez l'ânesse «Baudet Du Poitou». *Reveu Médecine Vétérinaire*. v.147, n.8-9, p.599-606, 1996.

Hafez, Elsayed Saad Eldin; Hafez, B. *Reprodução animal*. São Paula: Manole, 2004.

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, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. 52, 474-477, 2005.

Hughes, J., Loy, R. Investigations on the effect of intrauterine inoculations of streptococcus zooepidemicus in the mare. In: *Annual Meeting of the American Association of Equine Practitioners*. 289-292, 1969.

Jain, S.; Gautam, V.; Naseem, S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *Journal of pharmacy and bioallied sciences*, v. 3, n. 1, p. 118–127, 2011.

Jensen, E. T.; Kharazmi, A.; Lam, K.; Costerton, J. W., Hoiby, N. Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infect. Immun*. 1990, 58, 2383–2385.

Katila, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biol. Reprod. Monogr*. 1, 515–517, 1995.

Katila, T. Uterine defence mechanisms in the mare. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 197–204, 1996. Disponível em: [https://doi:10.1016/0378-4320\(96\)01507-2](https://doi:10.1016/0378-4320(96)01507-2).

Katila T. Sperm-uterine interactions. In: Mckinnon A. O., Squires E. L., Vaala W. E., Varner D. D., editors. *Equine reproduction*. second ed. Blakwell Publishing Ltd; p. 1092-1098, 2011.

Katila T. Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reprod Domest Anim*, 47, 31–41, 2012.

Khan F. A., Chenier T. S., Murrant C. L., Foster R. A., Hewson J. e Scholtz E. Dose-dependent inhibition of uterine contractility by nitric oxide: a potential mechanism underlying persistent breeding-induced endometritis in the mare. *Theriogenology* 90, 59–64, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.026>.

- Kenney, R. M.; Doig, P. A. Equine endometrial biopsy. In: Morrow D. A. (Ed). *Current Therapy in Theriogenology*. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 723-729, 1986.
- König, H. E., and Reis, R. Korrosionsanatomische Untersuchungen am Blutgefäßsystem des Eierstockes der Stute. *Tierarztl. Prax.* 15, 181–184, 1987.
- König, H. E., and H.-G. Liebich. *Veterinary Anatomy of domestic mammals*, 3rd edn. Stuttgart: Schattauer Verlagsgesellschaft, 2007.
- Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, 41:629–36, 1994.
- Leblanc, M. M., Neuwirth, L., Asbury, A. C., Tran, T., Mauragis, D., Klapstein, E. Scintigraphic measurements of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine veterinary journal*. v. 26, p. 109-113, 1994.
- LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Jones, L., Cage, C. and Mauragis, D. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. *Theriogenology* 50, 49-54, 1998.
- LeBlanc, M. M.; Magsig, J.; Stromberg, A. J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, 68, 403–412, 2007.
- Leblanc, M.; Causey, R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. *Reprod. Domest. Anim.* 2009, 44, 10–22.
- Leiser, R. Weibliche Geschlechtsorgane, Organa genitalia feminina. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band 2, 8. Auflage (R. Nickel, A. Schummer and E. Seiferle, eds). Berlin-Wien: Blackwell Wissenschaftsverlag, pp. 393–439, 1999.
- Li X., Shi F., Gong L., Hang B., Li D., Chi L. Species-specific identification of collagen components in *Colla corii asini* using a nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry proteomics approach. *Int J Nanomedicine*, 54, 12:4443, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S136819>. PMID:28670118.
- Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: New weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol*, 3, 361–370, 2003.
- Liu, I.; Rakestraw, P.; Coit, C.; Harmon, F.; Snyder, J. An in vitro investigation of the mechanism of neuromuscular regulation in myometrial contractility. *Pferdeheilkunde*, 13, 557, 1997.
- Lögters, T.; Margraf, S.; Altrichter, J.; Cinatl, J.; Mitzner, S.; Windolf, J.; Scholz, M. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med. Microbiol. Immunol.* 2009, 198, 211–219.

- Ludwig, S., Schoon, D., Aupperle, H., von Rechwitz, A. and Schoon, H. A. Angiopathies in the equine endometrial biopsy - a marker for extrauterine vascular lesions? *Pferdeheilkunde*. 17, 608-614, 2001.
- Mantovani, R., Rota, A., Falomo, M. E., Bailoni, L., Vincenti, L. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 217–226, 2002.
- Mariante, A. da S. e N. Cavalcanti. *Animais do Descobrimento. Raças Domésticas da História do Brasil*. Brasília: Embrapa Sede/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 232, 2000.
- Medjoubi, S.-A., Tissot, A., Jurado, A., Hibon, J., Terris, C., & Bornet, P. Giant Aneurysm of the Splenic Artery. *Angiology*, 51(4), 343–347, 2000. Disponível em: <https://doi:10.1177/000331970005100411>.
- Medzhitov, R. Inflammation: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.
- Miró J., Vilés K., Fernández M., Fábregas N., Soares J., García W. Induced acute endometritis by frozen semen insemination in donkey. *Anim Reprod Sci*, 46(Suppl. 3):130, 2011.
- Miró, J.; Vilés, K.; García, W.; Jordana, J.; Yeste, M. Effect of donkey seminal plasma on sperm movement and spermpolymorphonuclear neutrophils attachment in vitro. *Anim. Reprod. Sci*, 140, 164–172, 2013.
- Miró J., Papas M., Post Artificial Insemination Endometrial Inflammation and its Control in Donkeys, *Journal of Equine Veterinary Science*, 2017. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.jevs.2017.11.007>.
- Miró, J.; Marín, H.; Catalán, J.; Papas, M.; Gacem, S.; Yeste, M. Seminal Plasma, Sperm Concentration, and Sperm-PMN Interaction in the Donkey: An In Vitro Model to Study Endometrial Inflammation at Post-Insemination. *Internacional Journal of Molecular Science*, 21, 3478, 2020.
- Molinaro, E. M.; Caputo, L. F. G.; Amendoeira, M. R. R. (Org.). *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde*. v. 3. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2013.
- Moreau, J. *L'eleve du Baudet du Poitou*. These Doctorat Veterinaire, Alfort, 1958.
- Murata, H.; Shimada, N.; Yoshioka, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. *Veterinary Journal*, v. 168, n. 1, p. 28–40, 2004.
- Neely, D. P., Kindahl, H., Stabenfeldt, G. H., Edquist, L. E., Hughes, J. P. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological and therapeutic responses. *J. Reprod. Fertil.* 27 (Suppl.), 181–189, 1979.

Oliveira, J. V. Estudo de metodologias para a criopreservação de sêmen de jumento (*equus asinus*) por meio de testes laboratoriais e fertilidade. Master of Science Thesis, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, 2005.

Oliveira J. V., Alvarenga M. A, Melo C. M., Macedo L. M., Dell'Aqua J. A. Jr., Papa, F. O. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility, In: Equine Reproduction IX, Evans MJ (Ed.), Anim Reprod Sci, 94:82– 84, 2006.

Oliveira J. V., Freire Oliveira P. V. L, Melo e Oña C. M., Guasti P. N., Monteiro G. A, da Silva Y. F. R. S., Mello Papa Pd, Alvarenga MA, Dell'Aqua Junior JA, Papa FO, Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen, Theriogenology, 2016. Disponível em: <https://doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.12.010>.

Pace, M. M., Sullivan, J. J. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. In: Rowland, I.W., Allen, W.R., Rossdale, P.D. (Eds.), Equine Reproduction. J. Reprod. Fert. Suppl. 23, 115–121, 1975.

Palm, F.; Walter, I.; Budik, S.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N.; Aurich, C. Influence of different sêmen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α and COX-2 mRNA in the equine endometrium. Theriogenology, 70, 843–851, 2008.

Palmer, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: Proceedings 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, vol. 3, Urbana (Abstract 377), 1984.

Petersen, H. H., Nielsen, J. P., Heegaard, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. Veterinary Research, v. 35, p. 163–187, 2004.

Pickett, B.W., Sullivan, J.J., Byers, W. W., Pace, M. M., Remmenga, E. E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. Fertil. Steril. 26, 167–174, 1975.

Portus B. J., Reilas T, Katila T. Effect of seminal plasma on uterine inflammation and pregnancy rates in mares. Equine Vet J, 6:515–9, 1975.

Pycok, J. F., Allen, W. E. Pre-chemotactic and chemotactic properties of uterine fluid from mares with experimentally induced endometritis. Vet. Rec. 123, 193–195, 1988.

Renner-Martin, T. F. P., Forstenpointner, G., Weissengruber, G. E., & Eberhardt, L. Gross Anatomy of the Female Genital Organs of the Domestic Donkey (*Equus asinus* Linné, 1758). Anatomia, Histologia, Embryologia, 38(2), 133–138, 2009. Disponível em: <https://doi:10.1111/j.1439-0264.2008.00911.x>.

Ricketts, S.W. and Alonso, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. Equine Vet. J. 23, 189-192. 27, 1991.

- Riddle, W. T.; LeBlanc, M. M.; Stromberg, A. J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*, 68, 395–402, 2007.
- Rota, A.; Magelli, C.; Panzani, D.; Camillo, F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiate donkey spermatozoa. *Theriogenology*, 69, 176–185, 2008.
- Rota, A., Panzani, D., Sabatini, C., & Camillo, F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*, 78(8), 1846-1854, 2012.
- Rothenberg M. E, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*, 24:147–74, 2006. Disponível em: [https://doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720).
- Rubel, C. et al. Fibrinogen Promotes Neutrophil Activation and Delays Apoptosis. *The Journal of Immunology*, v. 166, n. 3, p. 2002–2010, 2001.
- Sabatini, C.; Mari, G.; Mislei, B.; Love, C.; Panzani, D.; Camillo, F.; Rota, A. Effect of post-thaw addition of seminal plasma on motility, viability and chromatin integrity of cryopreserved donkey jack (*Equus asinus*) spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 2014, 49, 989–994.
- Salles P. A., Sousa L. O., Gomes L. P. B., Barbosa V. V., Medeiros G. R., Sousa C. M., Weller M. Analysis of the population of equidae in semiarid region of Paraíba. *J Biotechnol Biodivers.* 4(3):269-75, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v4n3.salles>.
- Schlafer, D. H. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? *Theriogenology*. 68, 413-422, 2007.
- Shah, D.; Zhang, Z.; Khodursky, A.; Kaldalu, N.; Kurg, K.; Lewis, K. Persisters: A distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol*, 6, 53, 2006.
- Silva, Emanuel Isaque Cordeiro. *Anatomia e Fisiologia do Sistema Reprodutivo dos Animais Domésticos*. Departamento de Reprodução Animal - Instituto Federal de Pernambuco. Belo Jardim: [s.n.], 48 p, 2020.
- Slaats J., ten Oever J., van de Veerdonk F. L., Netea M. G. IL-1 β /IL-6/CRP e IL-18/ferritina: programas inflamatórios distintos em infecções. *PLoS Pathog*, 12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005973>.
- Squires, E., McCue, P., & Vanderwall, D. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51(1), 91–104, 1999. Disponível em: [https://doi:10.1016/s0093-691x\(98\)00234-9](https://doi:10.1016/s0093-691x(98)00234-9).
- Squires, E. L., Keith, S. L., Graham, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62, 1056–1065, 2004.

Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D. G.; Costerton, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol*, 56, 187–209, 2002.

Stout, T.A.E. Fungal endometritis in the mare. *Pferdeheilkunde*, 24, 83–87, 2008.

Taberner, E., Morató R., Mogas T., Miró J. Ability of Catalonian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured in vitro. *Anim Reprod Sci*, 118:354- 361, 2010.

Thurlow, L. R.; Hanke, M. L.; Fritz, T.; Angle, A.; Aldrich, A.; Williams, S. H.; Engebretsen, I. L.; Bayles, K. W.; Horswill, A. R.; Kielian, T. Staphylococcus aureus biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J. Immunol*, 186, 6585–6596, 2011.

Mustoe, T. Understanding chronic wounds: A unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am. J. Surg*, 187, 65–70, 2004.

Tizard, I. R. Innate immunity: The recognition of invaders. In *Vet. Immunol.*, 9th ed.; Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, Volume 1, pp. 11–20, 2009.

Töpfer-Petersen, E.; Ekhlesi-Hundrieser, M.; Kirchhoff, C. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.159-170, 2005.

Trimeche, A., Renard, P., Tainturier, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology*, 50:793– 806, 1998.

Troedsson, M. H. T, Steiger, B. N., Ibrahim, N. M., Foster, D. N., Crabo, B. G. Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. *Biol. Reprod.* 52 (Suppl.), 307, (abstract), 1995.

Troedsson, M. H. T. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. *Pferdeheilkunde*, 13, 516–520, 1997.

Troedsson M. H. T., Liu I. K. M., Crabo B. G. Sperm transport and survival in the mare. *Theriogenology*, 5:807, 18, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00185-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00185-x).

Troedsson, M. H. T., Franklin, R. K., Crabo, B. G. Suppression of PMN-chemotaxis by different molecular weight fractions of seminal plasma. *Pferdeheilkunde* 15 (6), 568–573, 1999.

Troedsson, M. H., Lee, C. S., Franklin, R. D., Crabo, B. G. The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation. *J Reprod Fertil Suppl* 56:341–9, 2000.

Troedsson, M. H., Loset K., Alghamdi A. M., Dahms B., Crabo B. G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Anim Reprod Sci*, 68: 273– 8, 2001.

Troedsson, M. H. T., Desvovsuges, A.S., Alghamdi, A.S., Dahms, B., Dow, C. A., Hayna J. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, 89:171-86, 2005.

Troedsson, M. H., Desvovsuges, A., Macpherson, M. L., & Pozor, M. P. Persistent breeding-induced endometritis. *Pferdeheilkunde*, 24 (1), 56, 2008.

Troedsson, M. H. T. Mating-induced endometritis: Physiology or pathology? *The Veterinary Journal*, v. 199, n. 1, p. 9–10, jan. 2014.

Varella, Pedro P. V; Forte, Wilma C. Neves. Citocinas: revisão / Citokines: a review. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 146-154, jul/ago, 2001.

Vendramini, O. M.; Guintard, C.; Moreau, J.; Tainturier, D. Cervix conformation: a first anatomical approach in Baudet Du Poitou jenny asses. *Animal Science*. v.66, p.741-744, 1998.

Vidament, M., Daire, C., Yvon, J. M., Doligez, P., Bruneau, B., Magistrini, M., Ecot, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. In: Evans, Margaret J. (Ed.), *Equine Reproduction VIII. Theriogenology* 58, 249–251, 2002.

Vidament, M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. In: Edward Squires (Ed.), *Proceedings of the 4th International Symposium on Stallion Reproduction. Anim. Reprod. Sci.*, vol. 89, pp. 115–136, 2005.

Vidament, M.; Vicent P.; Martin, F. X.; Magistrini, M.; Blesbois, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Animal Reproduction Science*, 2008.

Vidament, M; Vincent, P; Martin, F.X.; Magistrini, M.; Blesbois, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Animal Reproduction Science* 112, p. 22–35, 2009.

Vilés, K.; Rabanal, R.; Rodríguez-Prado, M.; Miró, J. Effect of ketoprofen treatment on the uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen. *Theriogenology*, 79, 1019–1026, 2013.

Vilés, K.; Rabanal, R.; Rodríguez-Prado, M.; Miró, J. Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen-thawed semen. *Animal Reproduction Science* 143, p. 57-63. 2013.

Walter, J.; Neuberg, K.P.; Failing, K.; Wehrend, A. Cytological diagnosis of endometritis in the mare: Investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. *Anim. Reprod. Sci*, 132, 178–186, 2012.

Watson, P. F., Green, C. E., Cooling and capacitation of boar spermatozoa: what do they have in common? *Boar Semen Preservation*, Vol. IV, 53–60, 2000.

Wildt D. E.; Pukazhenti B.; Brown J.; Monfort S.; Howard J. G.; Roth. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. *ReprodFertil Dev* 7, p. 811–824, 1995.

Woodie, J. B. Vulva, vestibule, vagina and cervix. In: AUER, J. A.; STICK, J. A. *Equine Surgery*, 4^a Ed., Estados Unidos, Elsevier Saunders, p. 866-875, 2012.

Woodward E. M., Christoffersen M., Campos J., Squires E. L., Troedsson M. H. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: Relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology*, 78(3):495- 501, 2012.

Woodward, E. M.; Christoffersen, M.; Campos, J.; Betancourt, A.; Horohov, D.; Scoggin, K. E.; Squires, E. L.; Troedsson, M. H. T. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reproduction*, 145, 289–296, 2013.

Woodward, E. M., & Troedsson, M. H. Equine breeding-induced endometritis: A review. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(9), 673-682, (2013).

Artigo 1 – O presente artigo será publicado no periódico Theriogenology (ISSN 0093-691X).

Título → AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA ENTRE ÉGUAS E JUMENTAS INSEMINADAS COM SÊMEN ASININO CRIOPRESERVADO

RESUMO

O uso de sêmen asinino criopreservado ainda consiste em um entrave à conservação dessa espécie, uma vez que o uso desta biotécnica produz índices insatisfatórios de fertilidade nas jumentas. Apesar disso, o uso desta mesma biotécnica produz índices satisfatórios de fertilidade nas éguas. A interação do sêmen criopreservado com o ambiente uterino pode explicar as diferenças nos índices de fertilidade entre as duas espécies. Assim, o presente estudo tem como principal objetivo avaliar o processo inflamatório no endométrio entre jumentas e éguas inseminadas com sêmen asinino criopreservado. Foram utilizadas 12 jumentas da raça Pêga e 12 éguas de raças distintas (Bretãs e Mangalarga), com idade entre 3 e 14 anos e histórico reprodutivo conhecido. Uma vez detectada a ovulação, as fêmeas eram inseminadas na extremidade do corno uterino, ipsilateral à ovulação, com sêmen asinino descongelado na dose de 1×10^9 espermatozoides. Foram avaliados os seguintes parâmetros em ambas as espécies imediatamente antes da IA (tempo 0h) e após a IA (tempos 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h): edema endometrial; líquido intrauterino; vascularização, citologia e histopatologia uterina; níveis séricos de proteínas de fase aguda (PFA's) e de progesterona (P4) e taxa de concepção. As éguas apresentaram maior grau de edema endometrial nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas após IA e também exibiram valores maiores na classificação dos escores de líquido intra-uterino (LIU) em relação às jumentas em quase todos os tempos avaliados. Houve uma tendência de diferença na área de pixels totais do corno inseminado, retratando na égua maior número pixels (em todos os tempos avaliados) e tendência de diferença estatística entre as espécies, na porcentagem de pixels coloridos do corpo uterino, sendo maior no tempo 6 nas jumentas. A área de pixels totais do corno não inseminado também foi maior na espécie equina em relação à asinina em todos os tempos avaliados. Para a área de pixels totais do corpo uterino, houve diferença estatística entre as espécies nos tempos 6, 72 e 120, sendo maior para a espécie equina. Na citologia, a porcentagem de células inflamatórias foi superior na espécie asinina no T12 e T48 em comparação à espécie equina. O pico inflamatório nas jumentas se manteve de 6 a 12 horas após a IA demonstrando que a resposta inflamatória celular é mais duradoura nas

jumentas do que nas éguas, apesar de haver resolução da resposta celular do processo inflamatório nas 48 horas pós IA. Apesar disso, a porcentagem de células inflamatórias se manteve superior em relação às éguas nesse momento. O infiltrado eosinofílico esteve presente na resposta de defesa uterina nas jumentas, enquanto não foi observado na espécie equina. Além disso, nas jumentas houve um aumento significativo de monócitos no tempo 12, comparado aos demais tempos. O escore total de inflamação aguda, observado por histopatologia da biópsia uterina, foi superior na espécie asinina 12 horas pós IA. No T48, observou-se elevação no escore de inflamação uterina crônica para as éguas em relação ao seu T12 e também quando essa espécie foi comparada à espécie asinina. Quando os parâmetros de inflamação aguda e crônica foram somados (Escore Total), observou-se diferença entre as espécies no T12, onde as jumentas apresentaram maior escore de inflamação uterina em comparação às éguas. A espécie asinina apresentou maior valor médio de P4 (13 ng/ml), em comparação com a espécie equina (6 ng/ml), porém ambas as espécies apresentaram valores de P4 compatíveis com a manutenção da gestação. A taxa de concepção foi maior nas éguas do que nas jumentas, atingindo taxa de 54,55% (6/11) versus taxa nula de concepção nas jumentas (0/12), aos 14 dias após IA. Dessa forma, o presente estudo demonstrou que a resposta inflamatória à presença do sêmen congelado de asininino nas jumentas difere da espécie equina em diversos aspectos. Apesar das jumentas apresentarem, comparado às éguas, menor grau de alterações vasculares, como edema e acúmulo de líquido no útero, elas denotam maiores características inflamatórias referentes à resposta celular. O padrão inflamatório uterino agudo da espécie asinina foi marcado pela presença de um grande infiltrado de células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), performando uma resolução inflamatória mais tardia. O grande infiltrado eosinofílico é a principal diferença relacionado a fisiologia da resposta inflamatória uterina da jumenta e pode ser um grande fator que leva às baixíssimas taxas de prenhez nessa espécie.

ABSTRACT

The use of cryopreserved donkey semen is still an obstacle to the conservation of this species, since the use of this biotechnique produces unsatisfactory fertility rates in jennies. Despite this, the use of this same biotechnique produces satisfactory fertility rates in mares. The interaction of cryopreserved semen with the uterine environment may explain the differences in fertility rates between the two species. Thus, the present study has as main objective to evaluate and compare the inflammatory process in the endometrium between jannies and mares inseminated with cryopreserved donkey semen. Twelve Pêga female donkeys and 12 mares of different breeds (Bretãs and Mangalarga), with ages between 3 and 14 years, with known reproductive history, were used. Once ovulation was detected, the females were inseminated at the end of the uterine horn, ipsilateral to ovulation, with thawed donkey semen at a dose of 1×10^9 spermatozoa. The following parameters were evaluated in both species immediately before artificial insemination (AI) (time 0h) and after AI (times 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h and 120h): endometrial edema; intrauterine fluid; uterine vascularization, cytology and histopathology; serum levels of acute phase proteins (APP's); progesterone (P4) and conception rate. The mares had a higher degree of endometrial edema at times 0, 6, 24 and 48 hours after AI and also showed higher values in the classification of intrauterine fluid scores in relation to the jannies at almost all times evaluated. There was a trend of difference in the total pixel area of the inseminated horn, portraying a greater number of pixels in the mare (at all times evaluated) and a trend of statistical difference between the species, in the percentage of colored pixels of the uterine body, being greater in T6 in the jannies. The total pixel area of the non-inseminated horn was also greater in the equine species compared to the asinine at all times evaluated. For the total pixel area of the uterine body, there was a statistical difference between the species at times 6, 72 and 120, being higher for the equine species. In cytology, the percentage of inflammatory cells was higher in the donkey species at T12 and T48 compared to the equine species. The inflammatory peak in jannies remained from 6 to 12 hours after AI, demonstrating that the cellular inflammatory response is longer lasting in jannies than in mares, despite the complete resolution of the process within 48 hours after AI. Although this, the percentage of inflammatory cells remained higher compared to the mares at that time. The eosinophilic infiltrate was present in the uterine defense response in donkeys, while it was not observed in the equine species. In addition, in jannies there was a significant increase in monocytes at time 12, compared to the other times. The total score of acute inflammation, observed by histopathology of the uterine biopsy, was higher in the asinine species 12 hours after AI. At

T48, there was an increase in the chronic uterine inflammation score for the mares in relation to their T12 and also when this species was compared to the asinine species. When the parameters of acute and chronic inflammation were added together (Total Score), there was a difference between species at T12, where jennies had a higher uterine inflammation score compared to mares. The donkey species had a higher mean P4 value (13 ng/ml), compared to the equine species (6 ng/ml), but both of them had P4 values compatible with the maintenance of pregnancy. The conception rate was higher in mares than in jennies, reaching a rate of 54.55% (6/11) versus zero conception rate in donkeys (0/12), at 14 days after AI. Thus, the present study demonstrated that the inflammatory response to the presence of frozen donkey semen in jennies differs from the equine species in several aspects. Despite the fact that jennies present, compared to mares, a lower degree of vascular alterations, such as edema and accumulation of fluid in the uterus, they denote greater inflammatory characteristics related to the cellular response. The acute uterine inflammatory pattern of the donkey species was marked by the presence of a large infiltrate of polymorphonuclear cells (neutrophils and eosinophils), performing a later inflammatory resolution. The large eosinophilic infiltrate is the main difference related to the physiology of the uterine inflammatory response in the donkey and may be a major factor that leads to the very low pregnancy rates in this species.

1. INTRODUÇÃO

Embora as espécies equina e asinina possuam um ancestral comum, as fêmeas destas duas espécies diferem em aspectos reprodutivos, por exemplo, quanto a características morfológicas do aparelho reprodutor, à influência do fotoperíodo, às características do ciclo estral, ao comportamento sexual e até mesmo quanto às taxas de concepção, ao serem inseminadas com sêmen criopreservado. Estas diferenças podem explicar o motivo de se obter resultados insatisfatórios quando técnicas reprodutivas desenvolvidas para uma espécie são aplicadas em outras (WILDT *et al.*, 1995).

Muitos estudos acerca das biotecnologias da reprodução equina, sobretudo quanto ao uso do sêmen congelado, estão consolidados obtendo-se resultados positivos na fertilidade desta espécie. No entanto, o uso de sêmen asinino criopreservado em jumentas apresentam resultados insatisfatórios de fertilidade, apesar de satisfatórios parâmetros seminais de viabilidade e motilidade pós congelamento (OLIVEIRA, 2005; CANISSO, 2008; VIDAMENT *et al.*, 2008). Oliveira *et al.* (2006) e Vidament *et al.* (2009), obtiveram resultados de taxas de prenhez variando de 0% a 11% em jumentas inseminadas com sêmen asinino criopreservado, no entanto, a fertilidade de éguas utilizando esta mesma biotecnologia variou entre 33-53% (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Diversas são as hipóteses levantadas para estes resultados, como a toxicidade do glicerol, utilizado como crioprotetor no processo de congelamento do sêmen, sobre as células espermáticas e o endométrio (TRIMECHE *et al.*, 1998; VIDAMENT *et al.*, 2009). O efeito negativo do glicerol sobre a fertilidade das éguas foi observado por Pace e Sullivan (1975) e Palmer (1984), sendo proposto a sua substituição por dimetilformamida (VIDAMENT *et al.*, 2002; SQUIRES *et al.*, 2004; ALVARENGA *et al.*, 2005) e etilenoglicol (BALL e VO, 2001; MONTAVANI *et al.*, 2002; SQUIRES *et al.*, 2004). Em um estudo, foi observado que houve redução na taxa de prenhez nas jumentas de 63% a 0%, após adição do glicerol a 2,2% ao sêmen resfriado (VIDAMENT *et al.*, 2009), sendo demontada a toxicidade deste crioprotetor também para a espécie asinina.

Outra hipótese em questão é a possível interferência desta biotécnica na resposta inflamatória do endométrio, podendo exercer efeito negativo na fertilidade das fêmeas equídeas, sobretudo nas jumentas (TROEDSSON, 1999; VIDAMENT, 2005), devido à ausência do plasma seminal (FIALA, 2017). O plasma seminal possui papel fundamental na imuno-modulação da resposta inflamatória uterina, conferindo proteção aos espermatozoides viáveis e influenciando na sinalização das células imunes (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005).

Embora o PS induza uma inflamação endometrial transitória, ele altera a duração e a intensidade da resposta (WOODWARD e TROEDSSON, 2013; MORELLI *et al.*, 2021), demonstrando que há um equilíbrio nas respostas pró e anti-inflamatórias, por meio das citocinas presentes no PS, para regular e preservar o endométrio (TROEDSSON *et al.*, 2005). Vilés *et al.* (2013) observaram, que a IA com sêmen congelado promoveu uma intensa expressão do COX-2, cerca de 6 horas após a IA; no entanto, também testaram a adição de PS imediatamente pós IA e observaram que houve redução na expressão da COX-2. Sêmen congelado ressuspendido pós descongelamento em meio diluidor (10% de gema de ovo de codorna + 80 mM de glutamina), para retirada do glicerol, diminuiu o número de PMN's no influxo endometrial (KOTILAINEN *et al.*, 1994) e aumentou as taxas de prenhez em jumentas (TRIMECHE *et al.*, 1998).

Há evidências de uma resposta inflamatória mais intensa em éguas inseminadas com sêmen equino congelado, comparado ao sêmen fresco (KOTILAINEN *et al.*, 1994; TROEDSSON *et al.*, 1995; CARD, 2005). Nesse contexto, a variação existente nas taxas de fertilidade entre éguas e jumentas quando se utiliza sêmen congelado de asinino (OLIVEIRA, 2005; CANISSO, 2008; VIDAMENT *et al.*, 2008), podem estar relacionadas a diferenças nas reações inflamatórias do endométrio.

A resposta uterina ao sêmen congelado pode diferir entre éguas e jumentas, tornando-se uma hipótese a ser considerada (MIRÓ *et al.*, 2017). Miró *et al.* (2011) e Rota *et al.* (2012) observaram um grande número de PMNs, 6 horas após a inseminação de jumentas com sêmen descongelado asinino. Em adição, Vilés *et al.* (2013) relataram influxo intenso de PMNs no endométrio das jumentas, realizando ou não a adição do PS. Miró *et al.* (2011) também observou a presença dos eosinófilos e relatou que essas células são um achado fisiológico no endométrio das jumentas durante a fase de estro e se elevam na reação inflamatória pós IA. No entanto, essa reação eosinofílica pode contribuir para o ambiente uterino inadequado, justificando a baixa fertilidade das jumentas com sêmen congelado. Alguns estudos mostraram que as jumentas possuem uma resposta inflamatória intensa com grande acúmulo de PMNs no lúmen uterino semelhante às éguas com endometrite persistente pós cobertura (Miró *et al.*, 2013; 2017).

Fatores inerentes à resposta inflamatória uterina em jumentas frente ao uso do sêmen congelado, podem ser causa da redução da taxa de prenhez, sendo necessário compreender melhor os mecanismos do processo inflamatório nas duas espécies. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo avaliar e comparar o processo inflamatório no endométrio entre jumentas e éguas inseminadas com sêmen asinino criopreservado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os animais selecionados para o experimento foram utilizados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV), conforme o protocolo N° 028/2021.

2.1 Animais e local de pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) Campus Viçosa (Latitude 20° 44' 58" S e Longitude 42° 51' 10" O) durante duas estações reprodutivas consecutivas no hemisfério sul.

Durante o experimento, 3 jumentos da raça Pêga com fertilidade conhecida e idade entre 5 e 9 anos (mediana 7), foram coletados para obtenção do sêmen. Foram selecionadas 12 jumentas da mesma raça e 12 éguas (Bretãs e Mangalarga), com idade entre 3 e 14 anos (mediana 8,5), com histórico reprodutivo conhecido e citologia uterina negativa em fase de estro ($\leq 1\%$ de polimorfonucleares por contagem de 100 células), conforme descrito por Ley *et al.* (2002). Uma égua não se enquadrou nos parâmetros de triagem e foi excluída do experimento. As fêmeas eram mantidas no pasto (capim *Paspalum notatum*), enquanto os machos eram mantidos em baias individuais durante a noite e em piquetes no período do dia. Foi ofertado para todos os animais: capim picado (*Pennisetum purpureum*, cultivar *Cameron*), ração balanceada, água e sal mineral *ad libitum*.

2.2 Delineamento experimental

Durante o exame, as fêmeas equinas e asininas foram alocadas em tronco de contenção, facilitando o manejo e limitando a movimentação dos animais durante o exame. No ciclo 1, a avaliação citológica ocorreu no T0 (após detectada a ovulação, imediatamente antes da inseminação artificial), T6 (seis horas pós IA) e T12 (doze horas pós IA). A coleta de biópsia uterina foi realizada no T12.

- CICLO 1:



No ciclo 2, a avaliação citológica ocorreu no T0 (após detectada a ovulação, imediatamente antes da inseminação artificial), T6 (seis horas pós IA), T12 (doze horas pós IA), T24 (vinte e quatro horas pós IA) e T48 (quarenta e oito horas pós IA). A coleta de biópsia uterina foi realizada no T48.

- CICLO 2:



No ciclo 3, foi avaliado os parâmetros de vascularização uterina, edema endometrial e líquido intrauterino nos tempos 0 (imediatamente antes da IA) e 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas após IA, além da coleta de sangue em todos os tempos, para dosagem de progesterona e mensuração de proteínas de fase aguda.

- CICLO 3:



As biópsias endometriais foram realizadas em ciclos distintos de forma que, apenas uma biópsia foi coletada em cada ciclo, para evitar que o procedimento interferisse na resposta inflamatória uterina. Para todos os ciclos, a dinâmica folicular das fêmeas foi acompanhada por palpação transretal e ultrassonografia, para avaliação ovariana, uterina e cervical. Após 24 horas de indução da ovulação nas jumentas (Oliveira *et al.*, 2016) e 30 horas de indução nas éguas (Rota *et al.*, 2012), iniciavam-se as palpações de 6 em 6 horas até detecção da ovulação, para posteriormente iniciar as demais avaliações.

2.3 Coleta, preparação e congelamento do sêmen

Para estabilização das reservas extragonadais, todos os jumentos foram coletados por 6 dias consecutivos, anterior à fase experimental. Após a esgota, três ejaculados foram obtidos de cada jumento, a cada 48 horas, após estimulação dos machos pela presença de fêmeas em estro. Para isso, utilizou-se vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma[®], Botucatu/SP, Brasil). Posteriormente, o sêmen foi filtrado e removida a fração gel do ejaculado. Somente ejaculados que alcançaram motilidade padrão de qualidade classificado como satisfatório pelo CBRA (2013) foram armazenados para o uso no experimento (motilidade espermática de $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3). A determinação da concentração espermática foi realizada por meio de contagem em câmara de Neubauer (PRECISION, CRLA[®], São Paulo/Brasil).

Após avaliação, o sêmen foi diluído em diluente comercial a base de leite desnatado Botusêmen (Botupharma[®], Botucatu, Brasil) na proporção de 1:1 e centrifugado a 600 x g por 10 minutos, na temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspensionado com o diluente comercial a base de gema de ovo BotuCrio[®] (Botupharma[®], Botucatu, Brasil), na concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL, e posteriormente foram envasados em palhetas de 0,5 mL. Após o envase, as palhetas foram estabilizadas em geladeira automática digital (Minitub[®], Porto Alegre, Brasil), por 20 minutos a 5°C. Em seguida as palhetas foram acondicionadas em caixa isotérmica, preenchida com nitrogênio líquido (N₂) na marca de 3,5 cm de altura. Elas foram dispostas horizontalmente a 6,0 cm do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos e posteriormente, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e finalmente estocadas em botijão criogênico (PAPA *et al.*, 2008). Foram utilizados para inseminação o sêmen que pós descongelamento apresentou motilidade progressiva $\geq 30\%$ e vigor ≥ 3 (CBRA, 2013).

2.4 Controle do ciclo estral

Os ciclos reprodutivos das jumentas e éguas foram acompanhados diariamente, a partir da presença de folículos ovarianos de 20 mm de diâmetro. A avaliação ginecológica contava com avaliação do crescimento folicular, edema uterino, tônus uterino e cervical por meio de palpação transretal e exame ultrassonográfico (Z5VET[®], Mindray Medical International Limited, China). Nas jumentas, quando o maior folículo atingia diâmetro ≥ 30 mm, associado a edema uterino grau 3 e demonstração de cio (micção frequente, movimentos mastigatórios e imobilização na presença do macho), a ovulação era induzida com 1000 µg e 1500 µg (jumentas e éguas, respectivamente) do análogo do GnRH, histrelina (Hormônio Liberador de

Gonadotrofina, Botupharma[®], Botucatu, Brasil), por via intramuscular. Nas éguas, quando o maior folículo atingia ≥ 35 mm, associado a edema uterino grau 3, combinado a sinais de cio (como micção frequente, reflexo clitoriano, cauda levantada e imobilização na presença do macho), era induzida a ovulação da mesma maneira descrita para as jumentas.

2.5 Inseminação Artificial (IA) com sêmen congelado

Após 24 horas de indução da ovulação nas jumentas (Oliveira *et al.*, 2016) e 36 horas de indução nas éguas (Rota *et al.*, 2012), iniciavam-se as palpações de 6 em 6 horas até detecção da ovulação. As fêmeas que não ovularam em até 48 horas, tiveram o ciclo estral descartado da avaliação. Uma vez observado a ovulação, 10 palhetas de sêmen de 0,5 mL eram descongeladas a temperatura de 37°C por 30 segundos (3 de cada garanhão e 1 escolhida aleatoriamente), cada uma contendo 200×10^6 espermatozoides/ml, totalizando 1×10^9 espermatozoides na dose inseminante.

A higienização do períneo era realizada com sabão neutro e água (por 3 vezes consecutivas) e posteriormente secado com papel toalha. Posteriormente, o sêmen era depositado no ápice do corno uterino ipsilateral à ovulação, utilizando pipetas de haste flexível e ponta romba (Minitube[®], Porto Alegre/RS, Brasil).

2.6 Avaliações do aparelho reprodutor

2.6.1 Avaliação por ultrassonografia modo B

Inicialmente, as estruturas que compõem o aparelho reprodutor (ovários, corpo e cornos uterinos e cérvix) foram identificadas por meio da palpação transretal. Posteriormente, imagens ultrassonográficas foram feitas por todo o aparelho reprodutor com ultrassom modelo Z5VET[®] (Mindray Medical International Limited, China) equipado com uma sonda linear (6 - 8 MHz) e Doppler (modos colorido e espectral). As imagens foram produzidas em uma frequência de 7,5MHz e ganho de 94% (escala de cinza).

Por meio da ultrassonografia modo B, foi realizada a avaliação da aparência endometrial, avaliando-se presença de edema endometrial e de líquido intra-uterino. O escore utilizado para a classificação do edema uterino variou de 0 a 4, considerando a extensão do edema das pregas uterinas (áreas anecoicas): grau 0, sem edema; grau 1, edema discreto; grau

2, edema moderado; grau 3, edema abundante e grau 4, edema exacerbado (GINTHER, 1992; GASTAL e GINTHER, 1998).

A presença de fluido no lúmen uterino foi avaliada, de forma subjetiva, quanto a quantidade de líquido e sua extensão ao longo do corpo e dos cornos uterinos (GINTHER, 1992; GASTAL e GINTHER, 1998), sendo classificado em: grau 1, ausente; grau 2, discreto; grau 3, moderado e grau 4, abundante.

2.6.2 Avaliação por ultrassonografia modo Doppler

Para avaliação da vascularização uterina foi utilizado equipamento ultrassonográfico modelo Z5VET® (Mindray Medical International Limited, China) equipado com modos B e Doppler colorido e sonda linear (6-8 MHz). As imagens ultrassonográficas foram produzidas em uma frequência de 7,5 MHz com ganho de 94% (escala de cinza) e de 5,7 MHz com ganho de 60% (modo colorido), com frequência de repetição de pulso de 1,7 kHz.

A perfusão vascular do endométrio foi avaliada de forma objetiva, através da mensuração dos números de pixels coloridos, como indicador da vascularização uterina (SILVA e GUNTHER, 2005). Para cada tempo de avaliação, o modo Doppler colorido era acionado e cada região uterina era inteiramente escaneada em um movimento lento e contínuo. Três vídeos de aproximadamente trinta segundos foram realizados em cada segmento do útero (corte longitudinal do corpo uterino e transversal dos cornos uterinos, direito e esquerdo), sendo armazenados para posterior avaliação.

Com o auxílio do programa Adobe Premier Pro CC 2019 (Adobe Systems®, San Jose, CA), foi extraída uma imagem de maior vascularização, de cada vídeo, totalizando três imagens de cada um dos segmentos avaliados. Essas imagens foram, então, processadas no Adobe Photoshop CC 2019 (Adobe Systems®, San Jose, CA) para obtenção da área total da região uterina, área de pixels coloridos e porcentagem de pixels em relação a área total. Sendo assim, foi realizada uma média dos parâmetros avaliados nas três imagens de cada secção ultrassonográfica examinada. Todas as análises e captura das imagens foram realizadas pelo mesmo operador.

2.7 Citologia endometrial

Foram realizadas citologias esfoliativas do útero para obtenção de amostras que representassem o ambiente uterino, para verificação do perfil células endometriais em

comparação a células inflamatórias após IA. As coletas foram realizadas com o auxílio da escova ginecológica (ABSORVE, CRLA[®], São Paulo/Brasil) a qual era envolta por uma bainha descartável e estéril no momento da coleta, como foi descrito por Alvarenga e Matos (1990).

Após a coleta, foram realizados esfregaços da escova citológica em lâminas de vidro para microscopia, que foram secas em temperatura ambiente, coradas com kit Panótico Rápido (Laborclin[®], Rio de Janeiro, Brasil) e avaliadas em microscopia óptica de luz, em aumento de 1000x, sob óleo de imersão. A porcentagem de glóbulos brancos (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos e basófilos) em relação às células endometriais foi determinada a partir da contagem de 200 células, gerando uma porcentagem de cada tipo celular (REGHINI, 2013).

2.8 Biópsias endometriais e histopatologia

Um pequeno fragmento do endométrio foi coletado com o auxílio de uma pinça de biópsia (Botupharma[®], Botucatu, Brasil), esterilizada, coberta com uma camisinha sanitária estéril (TNB Brasil[®], São Paulo, Brasil). A pinça foi introduzida através da vagina e posicionada na parte caudal do canal cervical. A ponta da pinça de biópsia foi inserida através da camisinha sanitária, no lúmen do útero para retirada do fragmento na parte anterior do corpo uterino. Esse fragmento foi fixado em formalina tamponada à 10% por 24 horas e posteriormente imerso em álcool 70%, para posterior processamento histopatológico.

Os fragmentos de biópsias foram processados e emblocados em parafina pelos métodos histológicos convencionais e coradas com hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos de 5 µm de espessura foram avaliados em microscopia óptica de luz quanto ao aspecto do endométrio, presença de fibrose e de células inflamatórias por um avaliador experiente, sem o prévio conhecimento das espécies e tempos de avaliação.

A avaliação histopatológica considerou parâmetros de inflamação aguda e crônica, gerando escores de gravidade, de acordo com a intensidade de lesões no endométrio e quanto ao número e tipos de células inflamatórias. Os escores de classificação da inflamação aguda foram ausente (0), leve (1 a 2), moderado (3 a 4) e intenso (5 a 6), avaliados de acordo com a presença ou ausência das seguintes características: infiltrado de PMNs no estrato compacto (PMN ISC), infiltrado de PMNs no estrato esponjoso (PMN ISS), PMNs no lúmen das glândulas (PMN G), PMNs em vênulas do estrato compacto (PMN V ISC), PMNs em vênulas do estrato esponjoso (PMN V ISS), eosinófilos (E) e neutrófilos. Já os escores de classificação da inflamação crônica foram ausentes (0), leve (1 a 4), moderado (5 a 8), e intenso (9 a 12), avaliando as características de infiltrado de linfócitos (MI), fibrose periglandular (PGF), ninhos

fibróticos (FN), dilatação glandular (GD), hiperplasia glandular (HD), lacunas linfáticas (LL), edema, congestão, hemorragia no estrato compacto (Hem ISC) e hemorragia no estrato esponjoso (Hem ISS). O somatório das pontuações obtidas para classificação aguda e crônica, geraram um escore de inflamação total de ausente (0), leve (1 a 4), moderado (5 a 8) e intenso (9 a 13) (Adaptado de De Holanda *et al.*, 2019).

2.9 Avaliações séricas

O sangue foi coletado por venopunção da veia jugular externa em tubos não heparinizados, com a utilização de agulha Vacutainer[®], ligada ao acoplador. Obteve-se o soro pela centrifugação do sangue em rotação de 2.200 x g por 10 minutos. Posteriormente, o soro foi pipetado em eppendorfs de 2 ml e posteriormente as amostras foram congeladas a -20°C até o momento de dosagem da progesterona e de proteínas de fase aguda.

2.9.1 Proteínas de fase aguda

Para determinação das proteínas de fase aguda no soro sanguíneo, foi utilizado o método de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Para o fracionamento dos diferentes constituintes proteicos do soro, foi realizada a eletroforese das respectivas amostras em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970) modificada. A corrida foi realizada no sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI- VERTICAL ELETROPHORESIS CELLS[®] BIO-RAD, EUA). Foi utilizado o gel de empilhamento à 4% e o gel de separação à 10%. Para o preparo das amostras e fracionamento das proteínas, foi adicionado 10µL de soro sanguíneo diluídos em 30µL de tampão-fosfato (PBS) e 20µL de tampão de amostra posteriormente aquecidos em água em ebulição por 10 minutos. Para o preparo do marcador de peso molecular, foram adicionados 3µL do marcador de peso molecular (Broad Range, Bio-Rad[®] 6,5 – 200 kD) juntamente com 27µL de tampão de amostra. O preparado foi centrifugado em rotação de 2000rpm. Uma alíquota de 10µL de cada preparado foi depositado em uma determinada cavidade do gel, além da amostra de soro controle e o padrão de peso molecular como referência, colocada em cavidades pré-estabelecidas em cada gel.

Depois de colocadas as amostras, o conjunto da cuba foi submetido à corrente elétrica inicial de 100V, fornecido por uma fonte de energia apropriada. Após 1 hora (as amostras do gel já migram para o gel de separação), a corrente elétrica foi aumentada em 50% do valor

inicial (150V), e após mais 1 hora foi aumentada para 200 V, permanecendo assim até o término da corrida. Terminada a corrida, o gel foi retirado da placa e corado durante 30 min em solução de azul de Coomassie ® R-250 0,2% sob agitação horizontal constante, para uma coloração uniforme e em seguida, submerso em solução descorante à base de metanol e ácido acético para retirar excesso de corante até obtenção da nitidez das bandas proteicas no gel.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (LabImage 1D, Locus ®), a partir do escaneamento das bandas nos géis. Para o cálculo do peso molecular, foram utilizados marcadores de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24 e 20 kDa, além de um soro controle espécie específico cujas proteínas presentes foram previamente identificadas por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF). Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas foram usadas curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

2.9.2 Dosagem de Progesterona

A concentração de P4 na amostra sérica foi mensurada por meio da técnica de eletroquimioluminescência (Cobas 8000®, Roche Diagnóstica Brasil Ltda.; São Paulo, SP, Brasil) utilizando-se kit comercial para dosagem de progesterona (kit de progesterona e602/ Cobas 8000 e801 Reagente, Roche Diagnóstica Brasil Ltda.; São Paulo, SP, Brasil).

2.10 Diagnóstico de gestação (DG)

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 14 dias pós-ovulação, por meio de exame ultrassonográfico uterino, sendo considerado positivo quando visualizado a vesícula embrionária. Em caso de diagnóstico negativo, o exame foi repetido após 2 dias, para confirmação.

2.11 Análises Estatísticas

O modelo estatístico de base foi: $Y_{ijk} = \mu + E_i + T_j + (E * T)_{ij} + e_{ijk}$; em que Y é a variável avaliada; μ é a constante; E é o efeito fixo de espécie, T é o efeito fixo de tempo de coleta e (E*T) é o efeito fixo da interação espécie e tempo e e é o erro aleatório. A remoção dos outliers foi baseada no resíduo estudentizado fora do intervalo de $\pm 1,5$ de acordo com Shwertman *et al.* (2004). Os dados foram avaliados quanto a normalidade dos resíduos pelo

teste de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificar a homocedasticidade. Para as variáveis que não apresentaram normalidade foram realizadas transformações (logarítmicas e BoxCox) previamente a análise de variância (ANOVA).

Os parâmetros foram analisados como medida repetida no tempo, considerando efeito aleatório de animal no tempo. Foram testadas as estruturas de covariância autorregressivo, simetria composta, geral e autorregressão de primeira ordem, sendo o modelo escolhido através do critério de informação de Akaike. Após escolha do modelo, os efeitos de tratamento, tempo e interação tratamento tempo foram analisados pelo teste F. Quando pertinente, as médias foram avaliadas pelo teste Tukey. As variáveis que não atenderam os pressupostos após a transformação foram analisadas por teste não-paramétrico de Kruskal- Wallis e comparadas pelo teste Wilcoxon. As análises de correlação foram realizadas considerando a correlação de Pearson. Para todas as análises valores de $P < 0,05$ foram considerados para indicar diferenças significativas e valores $P < 0,10$ foram considerados tendência estatística. Todos os procedimentos foram realizados no software R.

3. Resultados

Edema endometrial e líquido intrauterino

As classificações do escore de edema uterino diferiram entre éguas e jumentas, sobretudo nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas após IA, quando as éguas apresentaram maior grau de edema endometrial. Nos tempos 0 e 6, as éguas apresentaram edema moderado (escore 2), enquanto as jumentas apresentaram edema de discreto a moderado (escore 1,5). A classificação dos escores também diferiu entre as espécies no tempo 24 e 48, quando as éguas exibiram edema de discreto a moderado (escore 1,5) e as jumentas apenas edema discreto (escore 1). Não houve diferença estatística entre as espécies nos tempos 12, 72 e 120. Para as éguas, o edema foi maior nos tempos 0 e 6 (edema moderado), apresentando diferença estatística, comparado ao T48 e T72 (edema discreto a moderado). Já na espécie asinina, o edema foi maior nos tempos 0, 6 e 12 (edema discreto a moderado), reduzindo nos tempos 24, 48 e 72 horas após a IA, quando o edema diminuiu a discreto. Nas jumentas o edema voltou a se elevar no T120, retornando ao escore de discreto a moderado.

Tabela 1. Medianas e intervalos interquartis dos escores de edema uterino das éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado.

Escore de edema uterino			
Espécie			
Tempo (h)	Égua	Jumenta	p-valor
0	2 ^{aA} (1,5-3)	1,5 ^{bA} (1-2)	0,001
6	2 ^{aA} (1,5-3)	1,5 ^{bA} (1-2)	0,008
12	1,5 ^{AB} (1,5-2)	1,5 ^A (1-2)	0,1557
24	1,5 ^{aAB} (1,5-2)	1 ^{bB} (0,5-1,5)	0,005
48	1,5 ^{aB} (1-2)	1 ^{bB} (0,37-1,5)	0,006
72	1,5 ^B (1-,1,5)	1 ^B (0,375-1,625)	0,1832
120	1,75 ^{AB} (1)	1,5 ^A (1-2,25)	0,59
p-valor Tempo	>0,001	0,0055	

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma linha ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma coluna ($p < 0,05$).

As éguas também exibiram valores maiores na classificação dos escores de líquido intra-uterino (LIU) em relação às jumentas em todos os tempos avaliados, exceto no T120, no qual não houve diferença entre as espécies. Nas éguas, o LIU foi maior do tempo 6 até 72 horas após IA, em comparação ao T120. Nesse intervalo, o líquido escasso reduziu até se tornar ausente no último tempo de avaliação. No T12 as éguas apresentaram maior presença de líquido intrauterino do que no tempo controle (T0), quando o líquido era ausente. No T120 as éguas apresentaram escore de líquido intrauterino similar ao grupo controle, denotando a normalização deste parâmetro neste tempo de avaliação. A espécie asinina apresentou LIU classificado em escore 1 em todo o período avaliado, caracterizando ausência do acúmulo de líquido no útero.

Tabela 2. Medianas e intervalos interquartis dos escores de líquido intra-uterino das éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado.

Escore de líquido intra-uterino			
Espécie			
Tempo (h)	Égua	Jumenta	p-valor
0	1 ^{aBC} (1-2)	1 ^b (1)	0,0001
6	2 ^{aAB} (1-3)	1 ^b (1)	<0,001
12	2 ^{aA} (1-3)	1 ^b (1)	<0,001
24	2 ^{aAB} (1-2)	1 ^b (1)	<0,001

48	1 ^{aAB} (1-2)	1 ^b (1)	<0,001
72	1,5 ^{aAB} (1-2)	1 ^b (1)	0,1109
120	1 ^c (1)	1 (1-2,25)	0,2876
p-valor Tempo	>0,001	0,7769	

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma linha ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma coluna ($p < 0,05$).

Área de pixels totais (mm²) e Porcentagem de pixels coloridos no útero

Não foram observadas diferenças estatísticas quando comparadas as áreas de pixels totais (escala de cinza) entre o corpo uterino, corno inseminado e corno não inseminado dentro da mesma espécie; também não diferiram as porcentagens de pixels coloridos entre os locais avaliados (corpo uterino, corno inseminado e corno não inseminado), bem como ao longo do tempo dentro cada mesma espécie.

Quando comparado a área de pixels totais no corno inseminado entre éguas e jumentas, houve uma tendência de diferença estatística nos resultados, retratando na égua maior número pixels em relação às jumentas em todos os tempos avaliados. Além disso, essa variável foi maior no tempo 6 em relação aos demais tempos avaliados para a espécie equina. Este parâmetro não diferiu ao longo do tempo de avaliação na espécie asinina.

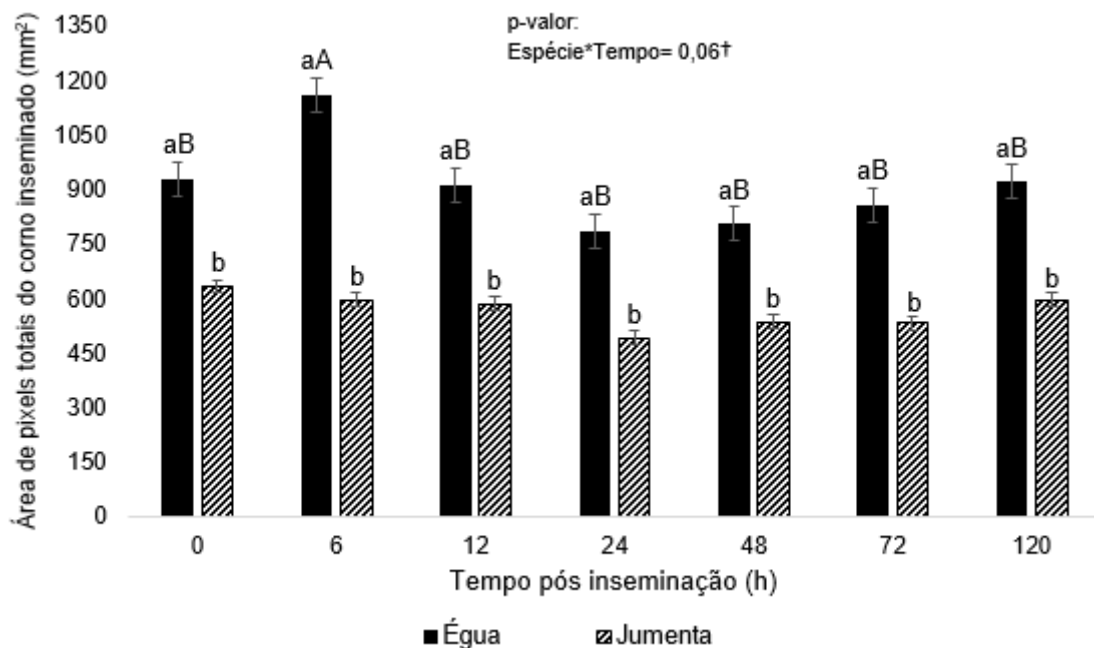


Figura 4. Médias e erros-padrão da área de pixels totais do corno inseminado das éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as espécies, no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$); Letras maiúsculas

diferentes indicam diferença estatística dentro da mesma espécie, ao longo do tempo avaliado ($p < 0,05$).

O mesmo comportamento foi observado para o corno não inseminado. A área de pixels totais do corno não inseminado também foi maior na espécie equina em relação à espécie asinina ao longo do período de avaliação. Além disso, também houve maior área de pixels totais no corno não inseminado na espécie equina 6 horas após IA em relação aos demais tempos avaliados para esta espécie. Na espécie asinina esse parâmetro não se alterou ao longo do tempo avaliado.

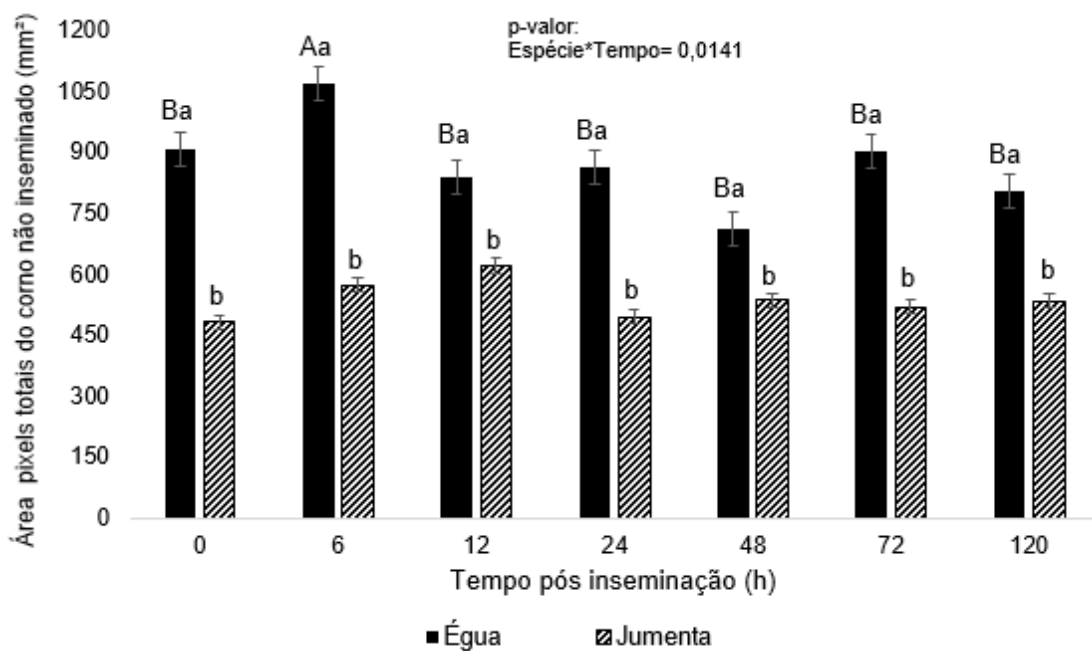


Figura 5. Médias e erros-padrão da área de pixels totais do corno não inseminado das éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as espécies, no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística dentro da mesma espécie, ao longo do tempo avaliado ($p < 0,05$).

Para a área de pixels totais do corpo uterino, houve diferença estatística entre as espécies nos tempos 6, 72 e 120, sendo maior para espécie equina em relação à asinina.

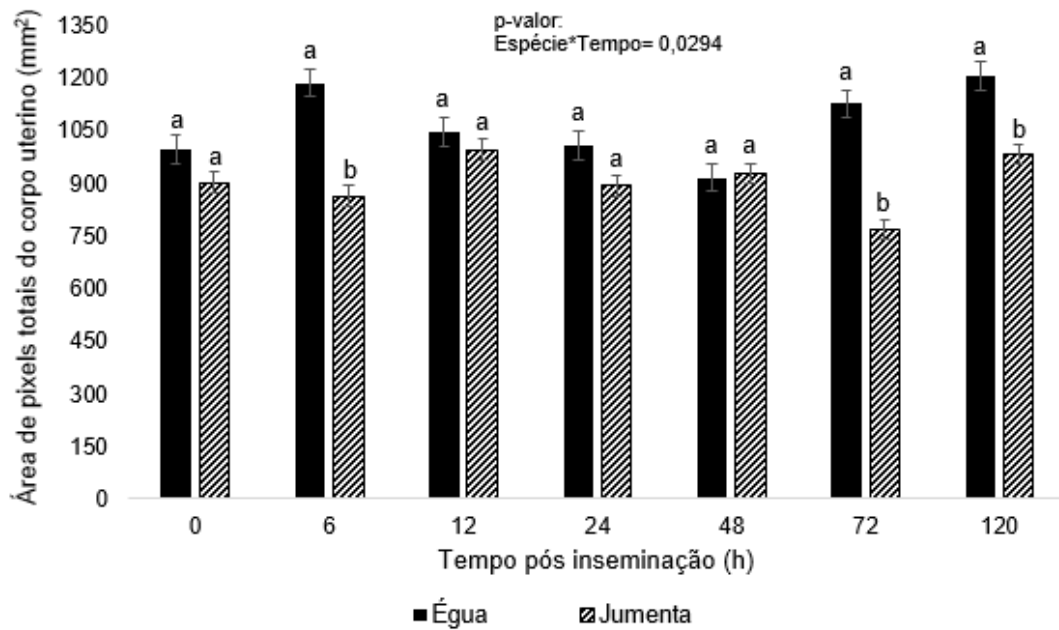


Figura 6. Médias e erros-padrão da área de pixels totais do corpo uterino das éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as espécies, no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística dentro da mesma espécie, ao longo do tempo avaliado ($p < 0,05$).

Não houve diferença na porcentagem de pixels coloridos entre o corno inseminado e o corno não inseminado entre éguas e jumentas, e nem entre os tempos avaliados dentro de cada espécie. No entanto, houve uma tendência de diferença estatística na porcentagem de pixels coloridos no corpo uterino entre as espécies, sendo maior no tempo 6 nas jumentas, comparado às éguas.

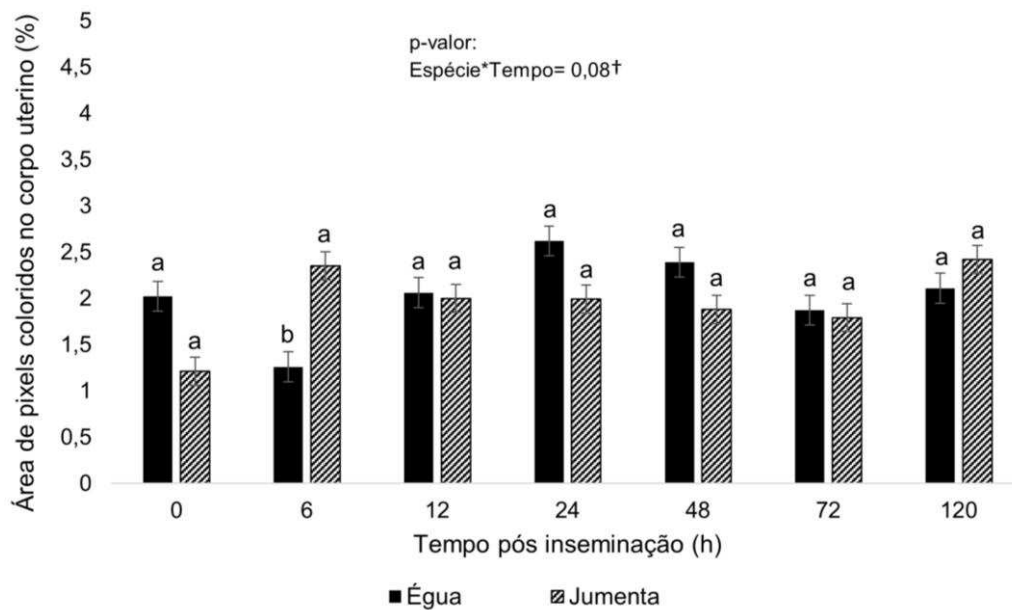


Figura 7. Médias e erros-padrão da porcentagem de pixels coloridos no corpo uterino das éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as espécies, no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística dentro da mesma espécie, ao longo do tempo avaliado ($p < 0,05$).

Citologia uterina

Para ambas as espécies estudadas, a citologia endometrial no tempo 0 (pré IA), demonstrou uma predominância de células endometriais na avaliação. Já no T6 (momento do pico inflamatório) a citologia endometrial revelou uma redução acentuada na porcentagem de células endometriais e uma elevação significativa da porcentagem de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos.

A quantidade de células inflamatórias nas horas seguintes avaliadas decresceu e a proporção de células endometriais aumentou gradativamente, reestabelecendo-se até 48 horas na espécie equina. No entanto, nas jumentas, o pico inflamatório se manteve de 6 a 12 horas após a IA e a resposta inflamatória nessa espécie mostrou-se mais tardia, comparado às éguas, e apesar de haver o reestabelecimento completo nas 48 horas, comparado ao momento 0 desta espécie, a porcentagem de células inflamatórias se manteve superior quando comparado às éguas.

A porcentagem de células inflamatórias foi superior na espécie asinina no T12 e T48 em comparação às éguas.

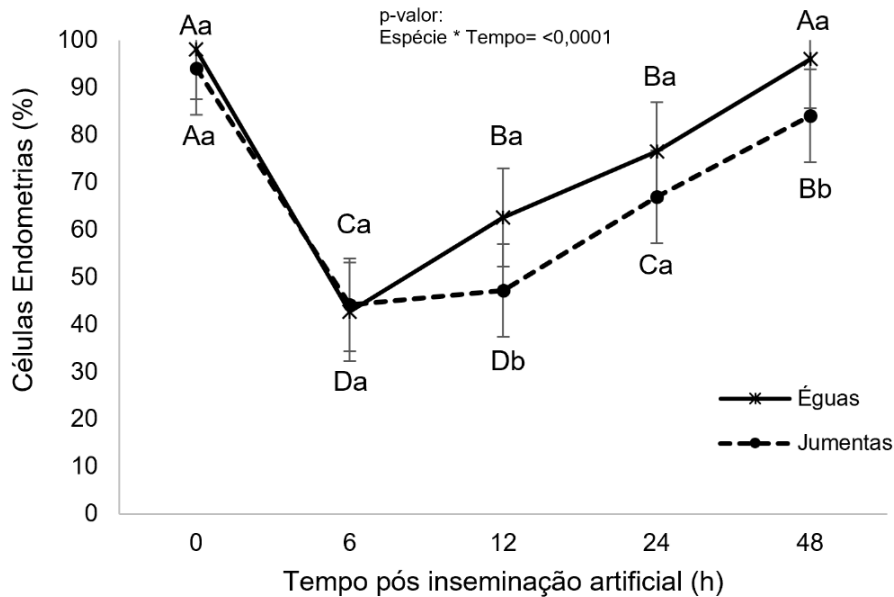


Figura 8. Médias e erros padrão da porcentagem de células endometriais em esfregaços de citologia uterina de éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 48 horas da inseminação com sêmen asinino congelado. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as espécies, no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística dentro da mesma espécie, ao longo do tempo avaliado ($p < 0,05$).

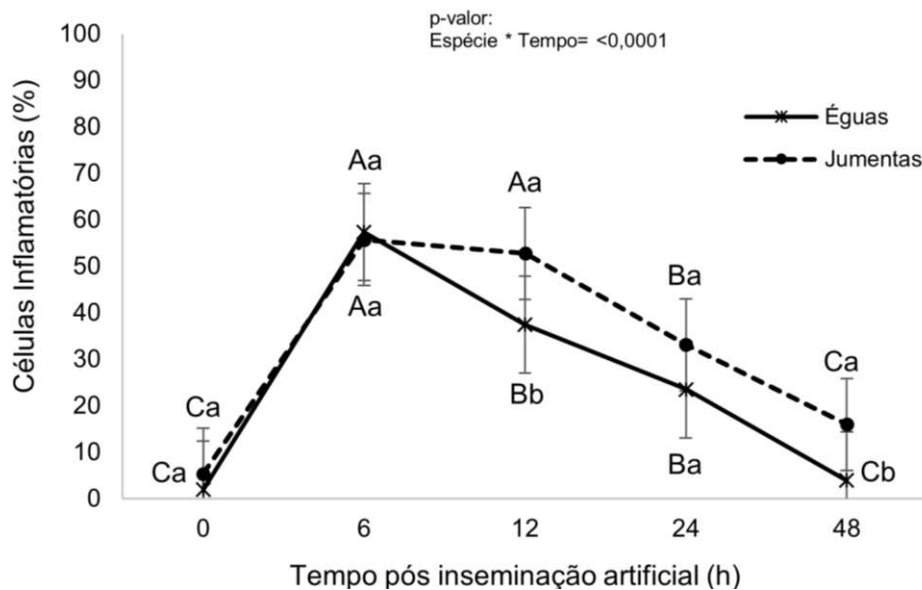


Figura 9. Médias e erros padrão da porcentagem de células inflamatórias em esfregaços de citologia uterina de éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 48 horas da inseminação com sêmen asinino congelado. Letras minúsculas diferentes indicam

diferença estatística entre as espécies, no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística dentro da mesma espécie, ao longo do tempo avaliado ($p < 0,05$).

Quando avaliado o perfil individual de células inflamatórias, os neutrófilos apresentaram comportamento similar ao parâmetro anterior em citologias uterinas de éguas e jumentas ao longo do tempo avaliado. A porcentagem dessas células diferiu nos tempos 12 e 48 h entre as espécies. Para a espécie equina, a porcentagem de neutrófilos se elevou no tempo 6 em comparação ao T0. Nos tempos 12, 24 e 48, a porcentagem de neutrófilos reduziu em comparação ao tempo 6, mas não ao nível do tempo controle (T0). Para a espécie asinina, a porcentagem de neutrófilos se elevou no tempo 6 e se manteve elevada no tempo 12 em comparação ao T0. Nos tempos 24 e 48, a porcentagem de neutrófilos reduziu em comparação aos tempos 6 e 12, mas não ao nível do tempo controle.

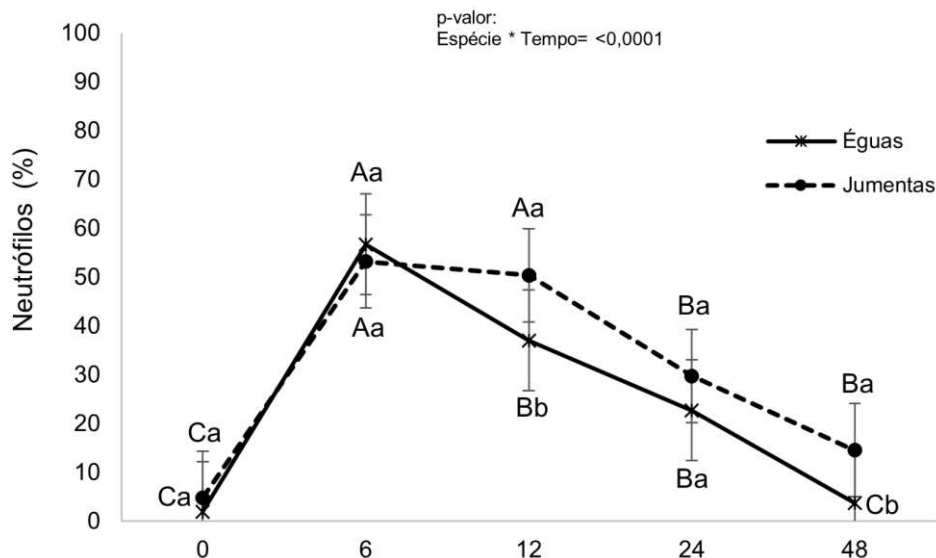


Figura 10. Médias e erros padrão da porcentagem de células polimorfonucleares (neutrófilos) em esfregaços de citologia uterina de éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 48 horas da inseminação com sêmen asinino congelado. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as espécies, no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística dentro da mesma espécie, ao longo do tempo avaliado ($p < 0,05$).

A porcentagem de monócito não diferiu entre as espécies ao longo do tempo avaliado. No entanto, nas jumentas houve um aumento significativo no tempo 12, comparado aos demais tempos. Nas éguas, os monócitos aumentaram a partir do tempo 0, se mantendo ao longo do tempo.

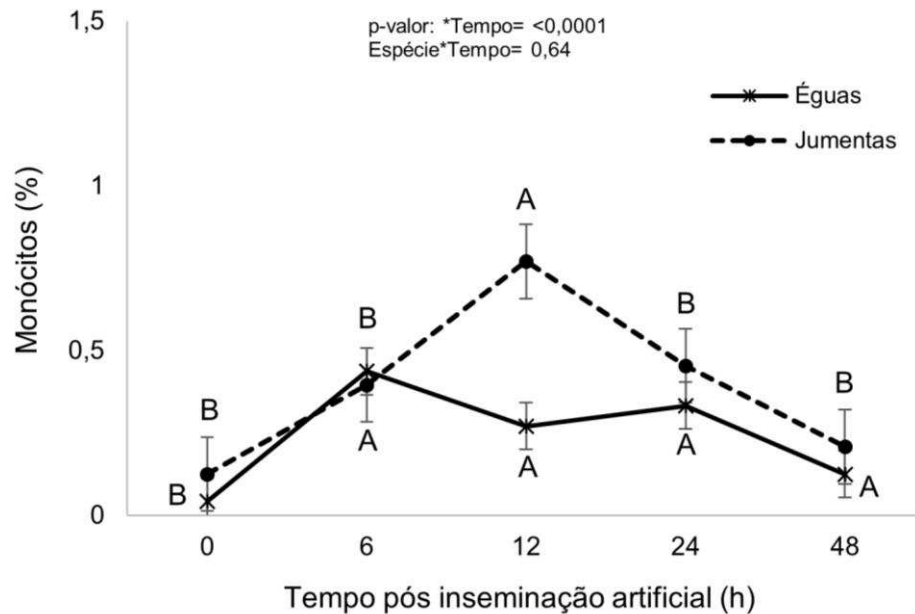


Figura 11. Médias e erros padrão da porcentagem de células mononucleares (monócitos) em esfregaços de citologia uterina de éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 48 horas da inseminação com sêmen asinino congelado. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as espécies, no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística dentro da mesma espécie, ao longo do tempo avaliado ($p < 0,05$).

O infiltrado eosinofílico esteve presente na resposta de defesa uterina nas jumentas, enquanto não foi observado na espécie equina. No entanto, não houve diferença nas porcentagens médias de linfócitos e basófilos entre as espécies.

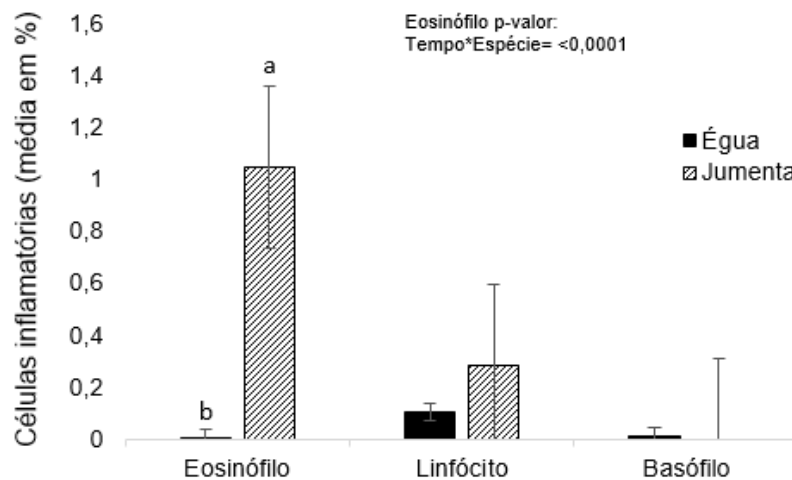
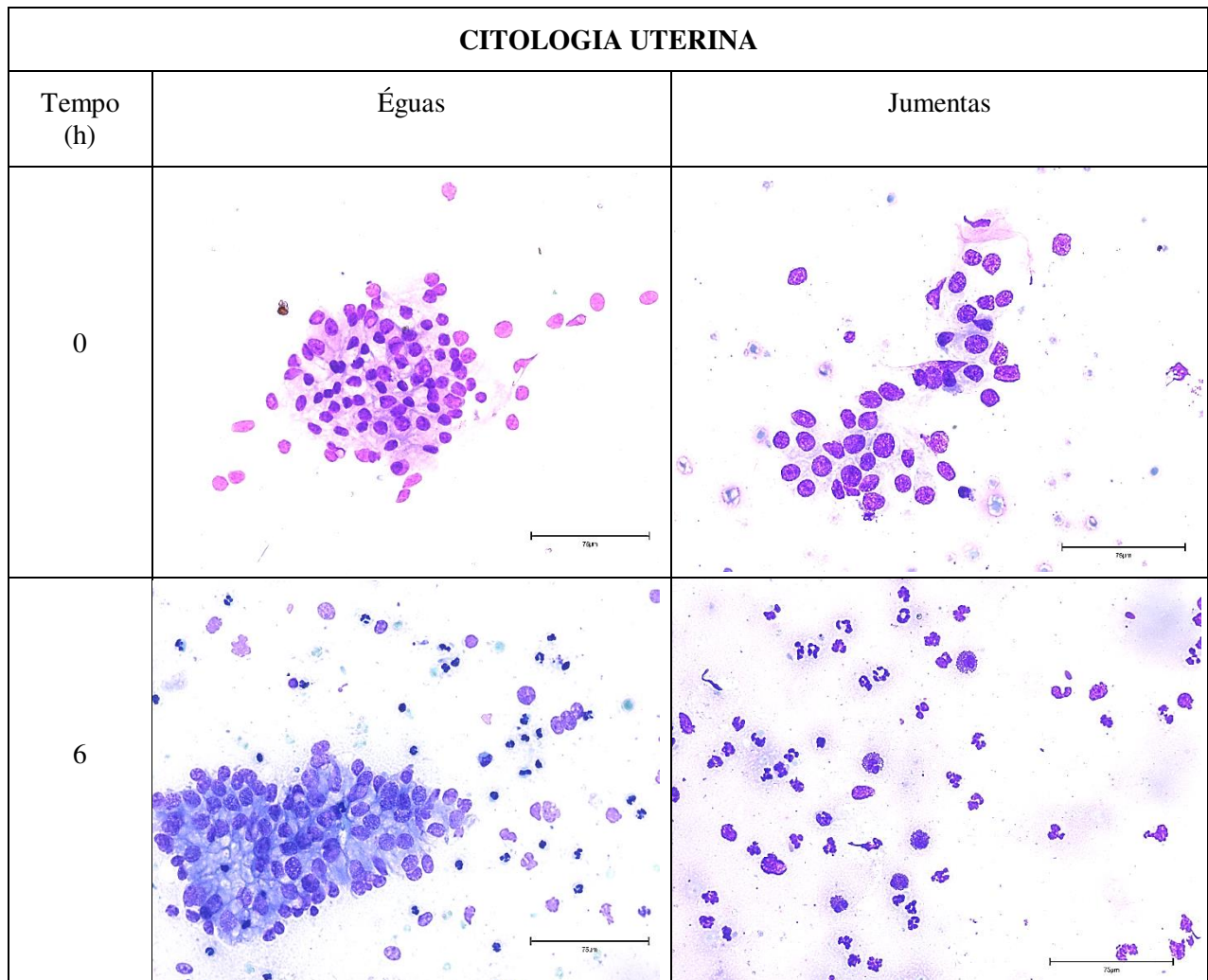


Figura 12. Médias e erros-padrão da porcentagem de células inflamatórias (eosinófilos, linfócitos e basófilos) em esfregaços de citologia uterina de éguas e jumentas, avaliadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 48 horas da inseminação com sêmen asinino congelado. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre as espécies, no mesmo tempo de avaliação ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística dentro da mesma espécie, ao longo do tempo avaliado ($p < 0,05$).

A Figura 13, apresenta imagens citológicas representativas de éguas e jumentas em ordem cronológica dos tempos de avaliação em relação ao momento de inseminação com sêmen asinino congelado.



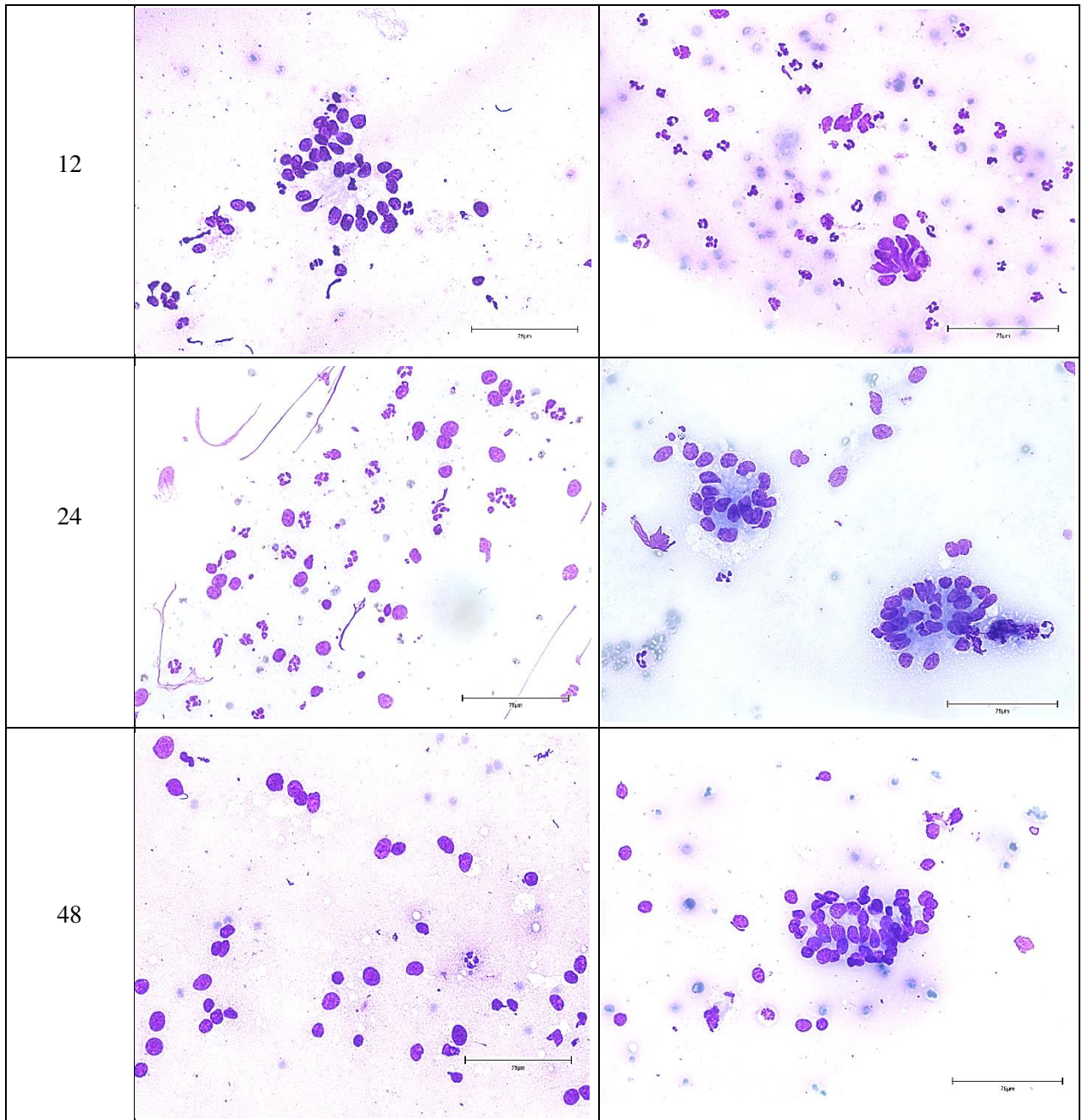


Figura 13. Comparação de imagens de citologia uterina de éguas e jumentas (objetiva 40X) em coletas realizadas imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24 e 48 horas da inseminação com sêmen asinino congelado.

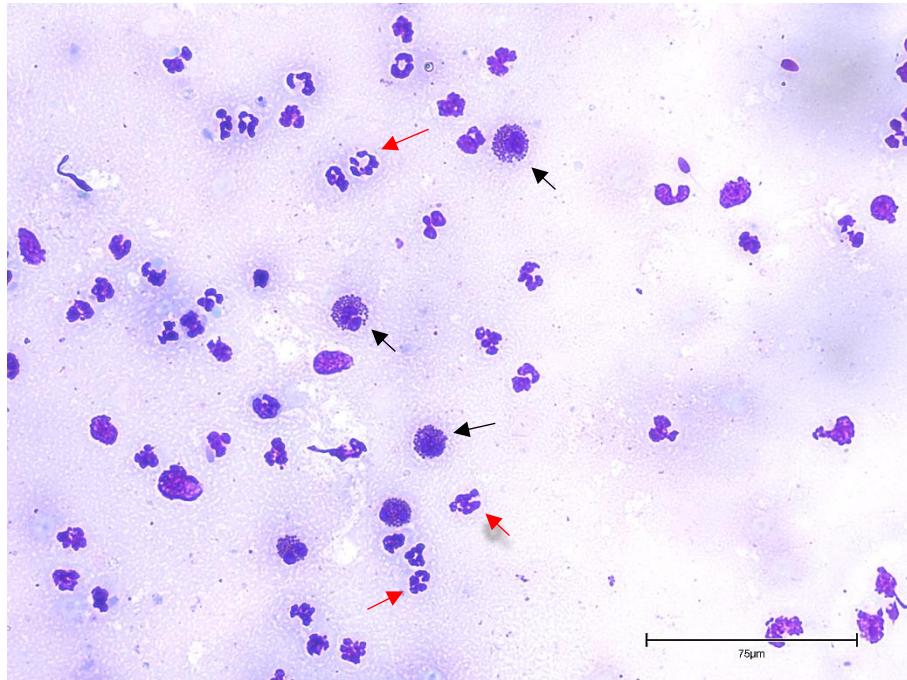


Figura 14. Imagem de citologia uterina (objetiva 40X) evidenciando eosinófilos (seta preta) e neutrófilos (seta vermelha) na inflamação endometrial de jumentas, 6 horas após inseminação artificial com sêmen asinino congelado.

Histopatologia uterina

O escore total de inflamação aguda, observado por histopatologia da biópsia uterina, foi superior na espécie asinina 12 horas pós IA, quando comparada com a espécie equina, mas foi similar entre as espécies no T48. As éguas demonstram ausência de resposta inflamatória aguda no tecido uterino, na avaliação histopatológica das biópsias realizadas 12 e 48 horas após a IA com sêmen asinino congelado. Já para as jumentas, o escore total de inflamação aguda alcançou mediana 3, em uma escala de 0 (ausente) a 6 (grau máximo de inflamação), após 12 horas da IA com sêmen asinino congelado. No tempo 48, ocorreu diminuição da reação inflamatória aguda uterina nas jumentas, chegando ao escore 0 (ausente). Em ambas as espécies, não foram observados animais com escore máximo de inflamação aguda em nenhum tempo de avaliação.

Tabela 3. Medianas e intervalos interquartis do escore total de inflamação uterina aguda, avaliadas por histopatologia da biópsia uterina, 12 e 48 horas após a inseminação com sêmen asinino congelado.

Tempo (h)	Escore Total Agudo		p-valor
	Égua	Jumenta	

12	0 ^b	3 ^{aA} (1,5-4,25)	>0,001
48	0 (0 -0,5)	0 ^B (0-2)	0,3966
p-valor tempo	0,2835	0,01167	

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma linha ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma coluna ($p < 0,05$).

Não houve diferença estatística quanto ao escore de inflamação uterina crônica entre as espécies estudadas no T12. Nesse tempo, ambas as espécies apresentaram baixo escore, com medianas variando de 1 a 2, em uma escala de inflamação crônica que vai de 0 (ausente) a 12 (grau máximo). Já no T48, observou-se elevação no escore de inflamação uterina crônica para as éguas em relação ao seu T12 e também quando essa espécie foi comparada à espécie asinina.

Tabela 4. Medianas e intervalos interquartis do escore total de inflamação uterina crônica, avaliadas por histopatologia da biópsia uterina, 12 e 48 horas após a inseminação com sêmen asinino congelado.

Escore Total Crônico			
Espécie			
Tempo (h)	Égua	Jumenta	p-valor
12	1 ^B (1 - 2,25)	2 (1,75 - 4)	0,3739
48	3,5 ^{aA} (2-5)	1,5 ^b (1-3,25)	0,0609
p-valor tempo	0,0387	0,5167	

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma linha ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma coluna ($p < 0,05$).

Quando os parâmetros de inflamação aguda e crônica foram somados (Escore Total), observou-se diferença entre as espécies no T12, onde as jumentas apresentaram maior inflamação uterina (6,5) em comparação às éguas (1) em uma escala de 0 (ausente) a 13 (grau máximo) de inflamação. No T48, o escore total da inflamação uterina se elevou na espécie equina, tornando-se estatisticamente igual ao apresentado pela espécie asinina no T12 e no T48. Nas jumentas, não houve diferença estatística entre os tempos.

Tabela 5. Medianas e intervalos interquartis do escore total de inflamação (aguda + crônica), avaliadas por histopatologia da biópsia uterina, 12 e 48 horas após a inseminação com sêmen asinino congelado.

Escore Total (Agudo + Crônico)			
Espécie			
Tempo (h)	Égua	Jumenta	p-valor
12	1 ^{bB} (1 - 3,25)	6,5 ^a (3,5-7,25)	0,0139
48	4 ^A (3-5,25)	3 (2-3,25)	0,0845

p-valor tempo 0,0361 0,0315

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma linha ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma coluna ($p < 0,05$).

Proteínas de Fase Aguda

Não houve diferença quanto a concentração de as proteínas de fase aguda entre as espécies em nenhum tempo avaliado. Também não se observou alterações na concentração desses marcadores inflamatórios, dentro da mesma espécie ao longo do período avaliado ($p > 0,05$).

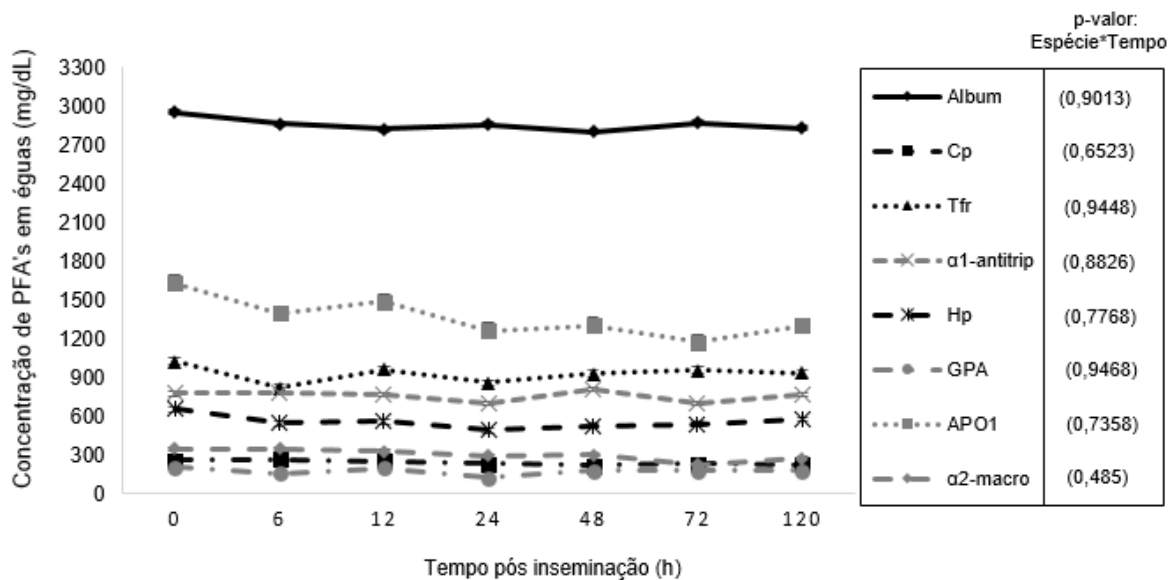


Figura 15. Médias da concentração (mg/dL) de proteínas de fase aguda presentes no soro sanguíneo das éguas, avaliados imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado.

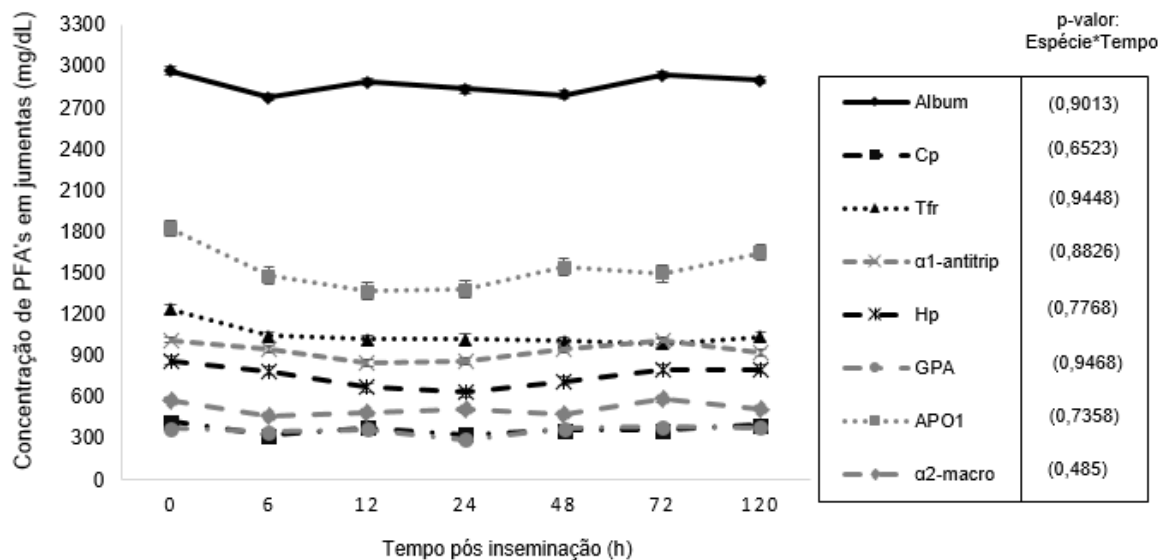


Figura 16. Médias da concentração (mg/dL) de proteínas de fase aguda presentes no soro sanguíneo das jumentas, avaliados imediatamente antes (tempo 0) e após 6, 12, 24, 48, 72 e 120 horas da inseminação com sêmen asinino congelado.

Diagnóstico de Gestação

A taxa de concepção foi maior nas éguas do que nas jumentas, atingindo taxa de 54,55% (6/11) versus taxa nula de concepção nas jumentas (0/12), aos 14 dias após IA com sêmen asinino congelado.

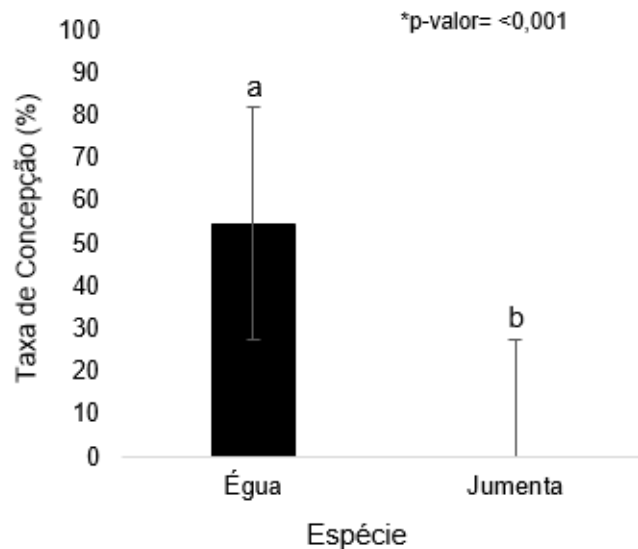


Figura 17. Médias e erros-padrão da taxa de concepção (%) aos 14 dias após inseminação com sêmen asinino congelado, em éguas e jumentas. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma linha ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma coluna ($p < 0,05$).

Progesterona

Houve diferença entre as espécies quanto ao nível sérico de progesterona no quinto dia pós ovulação e IA com sêmen asinino congelado. A espécie asinina apresentou maior valor médio de P4 (13 ng/ml), em comparação com a espécie equina (6 ng/ml).

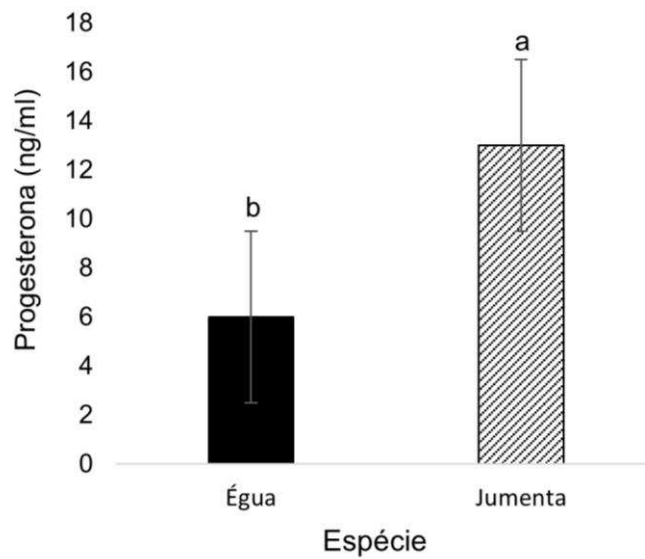


Figura 18. Nível sérico de progesterona (ng/ml) de éguas e jumentas no D5 (5 dias pós ovulação e IA com sêmen asinino congelado). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma linha ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma coluna ($p < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Ecotextura uterina, edema endometrial e líquido intrauterino

De acordo com os resultados obtidos, as éguas parecem apresentar maiores alterações vasculares no endométrio quando comparadas às jumentas, já que apresentaram maior grau de edema endometrial e líquido intrauterino desde o momento prévio à IA (T0) até 48 e 72 horas pós IA, respectivamente. Nessa espécie, a presença de edema endometrial moderado no tempo 0 pode ser justificada pela ainda presença de estrógeno circulante, mesmo que em decréscimo, levando a uma maior permeabilidade vascular fisiológica. Já no tempo 6, o edema moderado pode ter ocorrido em decorrência ao pico inflamatório pós IA, pois nesse momento há grande liberação de citocinas pró inflamatórias na tentativa de promover a quimiotaxia de células de defesa para combater micro-organismos que adentram o útero junto com o sêmen e também para fagocitar espermatozoides. As citocinas pró inflamatórias, que promovem quimiotaxia das células imunes, também alteram a permeabilidade vascular tecidual por meio da constrição das arteríolas e dilatação das vênulas. O aumento da permeabilidade vascular proporciona o extravasamento de exsudato para os espaços intersticiais, formando o edema endometrial. Quando o exsudato ultrapassa o limite do interstício, ele passa a se acumular no lúmen uterino

(COLLINS *et al.*, 2000). Na espécie equina, esse fenômeno foi observado durante o pico inflamatório e perdurou até as 72 horas pós IA retornando à normalidade somente no T120.

Em contrapartida, as alterações vasculares no ambiente uterino das jumentas parecem menos amplas e evidentes, já que o edema endometrial se manteve de discreto a moderado do T0 ao T12, chegando a discreto no T24 e T48. Além disso, a espécie não apresentou líquido intrauterino em nenhum momento avaliado. Esse resultado corrobora com o trabalho de Climent *et al.* (2012), que demonstram que as jumentas apresentam menor edema e menor acúmulo de líquido, comparado às éguas, denotando diferenças fisiológicas e de resposta inflamatória entre as duas espécies.

O aumento do escore de edema endometrial na espécie asinina no T120 em relação aos tempos anteriores pode estar relacionado à descida do embrião para o útero no D5 (120 horas pós ovulação). O embrião equino sintetiza estrogênios, PGE (prostaglandina E), PGF2 α e relaxina, que são substâncias vasoativas que podem estimular o aumento do fluxo sanguíneo uterino (HEAP *et al.*, 1982; STOUT e ALLEN, 2002). Nieto-Olmedo *et al.* (2020) observou na avaliação uterina por meio da ultrassonografia modo Doppler um aumento significativo no fluxo sanguíneo 7 e 8 dias pós ovulação. Diante disso, a elevação da vascularização fisiológica a partir do dia da descida do embrião pode ocasionar esse edema. Outra hipótese que pode justificar esse edema é a ação do estrógeno, liberado a partir da presença de folículos ovarianos nesse período, associado ao fato da produção da progesterona não ter alcançado níveis consideráveis. Além disso, a preparação uterina para a decida do embrião requer modificações estruturais e fisiológicas do útero e das glândulas uterinas, importantes para o reconhecimento materno. Esse aumento da vascularização pode ocorrer em decorrência dessas modificações do tecido uterino, justificando esse achado no T120. Apesar da espécie equina não ter apresentado diferença no escore de edema endometrial no T120 em relação ao tempo anterior, as éguas apresentaram mediana 1,75 (valor intermédio entre edema de discreto-moderado a edema moderado), no último tempo, enquanto que no T72 a mediana foi 1,5 (edema moderado), demonstrando também uma tendência na elevação deste parâmetro no D5.

Área de pixels totais (mm²) e Porcentagem de pixels coloridos no útero

A tendência observada para maior área de pixels nos cornos uterinos (inseminado e não inseminado) da égua em relação aos das jumentas em todos os momentos avaliados, foi um achado esperado, uma vez que o aparelho reprodutor da espécie asinina possui menor tamanho anatômico do que o aparelho reprodutor da espécie equina. Dessa forma, o escaneamento

ultrassonográfico com transdutor linear gerou imagem de cortes transversais dos cornos uterinos com maiores áreas de pixels na espécie equina em todos os tempos avaliados, dado às maiores medidas de diâmetro e circunferência dessas regiões nessa espécie em relação à espécie asinina. Além disso, o aumento da quantidade de pixels no T6 na espécie equina quando comparado aos demais tempos nesta espécie, pode ter ocorrido devido ao pico inflamatório, que gera maior edema intersticial e influxo de células inflamatórias, aumentando, provavelmente a área de pixels do corno inseminado. Embora o sêmen seja depositado na extremidade do corno ipsilateral à ovulação, Fiala *et al.* (2010) demonstrou que, as células espermáticas percorrem toda a extensão do útero, chegando ao corno contralateral. Isso explica, a diferença de quantidade de pixels também encontrada no T6, momento do pico inflamatório, no corno não inseminado na espécie equina em relação aos demais tempos de avaliação.

Em relação ao fluxo sanguíneo uterino não foram observadas grandes alterações na perfusão uterina em éguas e jumentas inseminadas com sêmen asinino criopreservado. Houve apenas uma tendência da porcentagem de pixels coloridos ser maior no corpo uterino no T6 nas jumentas quando comparadas às éguas. Esse resultado pode indicar que houve maior fluxo sanguíneo no corpo uterino das jumentas em relação às éguas durante o pico inflamatório no T6. No entanto, a porcentagem de pixels coloridos se trata de uma proporção entre a área de pixels coloridos e área de pixels totais em escala de cinza. Dessa forma, a explicação mais provável para este resultado se deve ao fato de a espécie equina apresentar maior área de pixels totais no corpo do útero em relação à asinina, tendendo a gerar uma menor proporção de pixels coloridos por área. Apesar de aparentemente não constituir uma ferramenta diagnóstica tão sensível às alterações vasculares em útero de éguas e jumentas pós IA em nosso trabalho, Pereira *et al.* (2014) utilizaram a ultrassonografia modo Doppler como diagnóstico auxiliar da endometrite em éguas e foi possível identificar a elevação da perfusão vascular em todas as éguas avaliadas, refletidas por aumento no número de pixels coloridos no tecido uterino, caracterizando maior perfusão sanguínea tecidual. Nesse trabalho, as éguas foram diagnosticadas com endometrite bacteriana, isso pode explicar uma maior perfusão uterina encontrada nesse trabalho em relação ao grupo controle (saúdável).

Citologia Uterina

No T0, foram encontrados 2% de células inflamatórias na citologia das éguas e 5,33% nas jumentas. O resultado citológico encontrado para éguas corrobora com a classificação de Overbeck *et al.* (2011). Já a porcentagem pouco mais elevada para as jumentas ultrapassa o

valor máximo de células inflamatórias em citologia negativa adotado para égua. No entanto, esse resultado pode ser justificado pela contagem de eosinófilos (que são ausentes em citologia de éguas com útero saudável), elevando um pouco a contagem de células inflamatórias nesse tempo (0), podendo ser um valor aceito para citologia negativa em jumentas. É comum que haja certa resposta inflamatória no tempo 0 devido à ação do estrógeno na fase de estro que promove o relaxamento da musculatura lisa do útero permitindo a abertura da cérvix, além do aumento da vascularização uterina, que disponibiliza ao endométrio células inflamatórias para defesa nessa fase (KOZDROWSKI *et al.*, 2015). Diante disso, nas jumentas o achado de células inflamatórias também é considerado normal e compatível com um endométrio saudável (QUARTUCCIO *et al.*, 2020).

O pico inflamatório no presente estudo foi alcançado no T6 em ambas as espécies, sendo evidenciado por uma maior porcentagem de células inflamatórias nesse tempo em relação aos demais. Na espécie asinina o pico inflamatório alcançado no T6 se manteve no T12, vindo a reduzir somente no T24. Esses achados corroboram com o que foi descrito por Troedsson (1999) para a espécie equina e Rota *et al.* (2008) para a espécie asinina, em que demonstraram que o pico inflamatório ocorre entre 6 a 12 horas após a IA. Cerca de 2 horas após estímulo inflamatório há um aumento de citocinas pró-inflamatórias, com as interleucinas (IL) IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) (CANISSO *et al.*, 2020), justificando esse grande influxo de células inflamatórias para o útero.

No T12 é notável a presença do infiltrado, sobretudo neutrofílico, no entanto, é uma fase marcada pelo decréscimo do pico inflamatório na espécie equina. Nessa espécie, a resolução da inflamação se iniciou em 12 horas pós estímulo, possivelmente em decorrência à síntese de mediadores anti-inflamatórios, como relatado por Woodward e Troedsson (2013). No entanto, no presente trabalho essa resposta aconteceu de forma mais tardia na espécie asinina já que a porcentagem de células inflamatórias (representadas por maior porcentagem de neutrófilos e monócitos) se mantiveram superiores no T12 nas jumentas em relação aos demais tempos avaliados, demonstrando que o pico inflamatório nessa espécie é mais prolongado, reduzindo apenas em 24 após IA. Além disso, a porcentagem de polimorfonucleares é superior no T12 e T48 na espécie asinina em comparação à equina. Isso confirma a hipótese que as jumentas apresentam resolução da inflamação mais tardia, quando comparadas às éguas.

Semelhante ao encontrado na espécie equina por Card (2005), Fiala *et al.* (2007) e Santos (2012), houve no presente trabalho, em ambas espécies, uma redução significativa de PMNs 24 horas após IA, que demonstra uma resolução, ao menos parcial do processo inflamatório. No T48, a homeostase uterina retornou na égua, como descrito por Katila *et al.*

(1996) e Katila (2001). Cerca de 6 horas após estímulo inflamatório, há expressão de citocinas anti-inflamatórias (IL10, ILRN) e IL6 em níveis mais elevados, culminando em resolução inicial da inflamação após 12 horas. A partir de 24 horas a maioria das citocinas (pró e anti-inflamatórias) retornam à níveis basais (CANISSO *et al.*, 2020). Porém, as jumentas, embora tenham apresentado similaridade na porcentagem de células inflamatórias no T48 em relação ao T0, apresentam porcentagem considerável (16%) de células inflamatórias no T48.

Segundo Katila (2016), nas éguas a endometrite persistente pós cobertura ocorre quando a inflamação não é solucionada em até 48 horas do acasalamento. Essa característica de resposta inflamatória prolongada também foi encontrada em estudos que analisaram a reação uterina ao sêmen congelado (KOTILAINEN *et al.*, 1994; TROEDSSON *et al.*, 2001; KAZIM, *et al.* 2004) e outros que avaliaram éguas susceptíveis à endometrite, no qual a predisposição à essa patologia está ligada às condições anatômicas e fisiológicas, que proporcionam uma depuração uterina ineficiente e consequentemente tardia (MALOUFI *et al.*, 2002; WOODWARD *et al.*, 2012). Em um estudo que também avaliou a resposta inflamatória uterina em éguas inseminadas com sêmen congelado de jumento (SANTOS, 2012), a análise citológica revelou 66,1% e 21,5% de células inflamatórias (PMNs em maior frequência), 4 e 24 horas após IA, respectivamente. Esse resultado foi superior ao encontrado nesse estudo, o qual apresentou 57,31% de células inflamatórias 6 horas pós IA e 23,54% em 24 horas pós IA.

A maior contagem de monócitos foi observada nas jumentas no T12 em relação aos demais momentos de avaliação. Nesse contexto, deve-se ressaltar que na inflamação, os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígeno (APC's), potencializando a ativação de linfócitos T e B pela expressão de moléculas co-estimuladoras, liberando ainda mais citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e quimiocinas, além de produzirem quantidades consideráveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), cujo principal representante é o óxido nítrico (NO) (CRUVINEL *et al.*, 2010), o que pode justificar uma possível hiperatividade do sistema imunológico das jumentas nesse momento.

A presença de eosinófilos na citologia uterina das jumentas é um grande diferencial comparado à espécie equina, em que somente são encontrados em casos de pneumovagina, urovagina e infecções fúngicas (SLUSHER *et al.*, 1992; LEY *et al.*, 2002; SNIDER *et al.*, 2011). Miró *et al.* (2011) também observou a presença dos eosinófilos e relatou que essas células são um achado fisiológico no endométrio das jumentas durante a fase de estro e comum na reação inflamatória pós IA. No entanto, essa reação eosinofílica pode contribuir para o ambiente uterino inadequado à descida do embrião, uma vez que quando ativados, os eosinófilos secretam muitos grânulos contendo proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica,

neurotoxina derivada de eosinófilos, peroxidase eosinofílica, hidrolases lisossômicas e histaminases que têm grande potencial citotóxico sobre parasitas, mas também podem causar lesão tecidual. Essas células se ligam ao antígeno alvo (espermatozoide) revestidos com anticorpos IgE (ou IgA) para realizar a degranulação. De forma geral, os componentes desses grânulos apresentam toxicidade para parasitas, induz a degranulação de mastócitos e basófilos, ativa a síntese de fatores de remodelação por células epiteliais, cria poros na membrana da célula-alvo, permitindo a entrada de outras moléculas citotóxicas, além de estimular a secreção de glicosaminoglicanos por fibroblastos (CRUVINEL *et al.*, 2010). Por isso, a indução da inflamação por eosinófilos pode representar uma grande diferença na resposta fisiologia uterina de jumentas e dificultar a sobrevivência espermática ou embrionária.

Apesar das proteínas constituintes do plasma seminal de jumento não exercerem o mesmo efeito sobre a viabilidade, sobrevivência dos espermatozoides e interação dos PMNs com as células espermáticas, sabe-se que as proteínas, com massa molecular de 30 – 100 Kda, participam efetivamente em funções moduladoras, incluindo a interação dos PMNs com os espermatozoides (MIRÓ *et al.*, 2021). Avaliando o efeito do PS na ligação entre espermatozoides e PMN, foi observado que as proteínas do PS com peso molecular maior que 10 KDa induzem uma rápida interação entre essas células. Além disso, proteínas entre 50-100 KDa induziram à uma maior porcentagem de espermatozoides ligados aos PMN, e essas células apresentaram menor viabilidade, comparado às células espermáticas associadas às frações de proteínas de 30 -50 KDa (MIRÓ *et al.*, 2021). Por sua vez, as proteínas de baixo peso molecular, < 10 KDa, em contato com as células espermáticas, reduzem a motilidade e danificam a integridade da membrana plasmática (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011; BUBENKOVA *et al.*, 2020).

Nesse contexto, essas proteínas do plasma seminal dos jumentos podem também estar ligadas à modulação dos eosinófilos no endométrio e sua interação com as células espermáticas. Segundo Talluri *et al.* (2017) e Papas *et al.* (2019), o total de proteína do plasma seminal do jumento é 4 a 10 vezes maior do que o PS de equino e suas proteínas são capazes de regular a expressão de genes da COX-2 (no epitélio luminal e no estrato compacto) 6 horas após a IA (VILÉS *et al.*, 2013). Dessa forma, diminuição da expressão da COX-2 inibiria, em parte, a síntese das prostaglandinas inflamatórias e conseqüentemente a quimiotaxia dos neutrófilos e eosinófilos, reduzindo a amplitude dos sinais primários da inflamação. Por sua vez, na inseminação com sêmen criopreservado, não há modulação alguma da inflamação, dado à ausência de plasma seminal, predispondo a condição de grande infiltrado neutrofílico e eosinofílico nas horas subseqüentes à IA.

Histopatologia

Os aspectos que caracterizam a inflamação aguda, como a presença de grande infiltrado de células inflamatórias no estrato compacto e esponjoso do endométrio, foram mínimos nas éguas nos tempos 12 e 48, demonstrando que, nessa espécie, já no tempo 12 o pico inflamatório já tinha passado e que houve um rápido reestabelecimento da resposta imune ao sêmen. No T48, isso se confirmou com todos os animais apresentando ausência de inflamação aguda. Já nas jumentas, no tempo 12, esses aspectos inflamatórios ainda estavam presentes de forma moderada, reafirmando uma reação inflamatória mais prolongada e intensa, estendendo além do período do pico inflamatório (T6). No T48, houve o reestabelecimento da normalidade, demonstrando que houve a resolução do processo inflamatório agudo até às 48 horas pós IA.

Os aspectos que caracterizam a inflamação crônica, como a presença de fibrose periglandular, congestão, ninhos fibróticos e infiltrado mononuclear, foram mínimos no T12, porém ligeiramente superiores no T48 nas éguas. Além disso, a reação inflamatória crônica foi superior nas éguas em relação às jumentas no T48. Uma explicação para esse resultado, pode ser o fato de ter sido coletado amostras de biópsias em regiões do útero comprometidas focalmente, de animais com idade superior e com maior número de parto por animal (histórico das éguas), comparado às jumentas. Éguas de maior idade estão associadas aos maiores graus dentro da classificação histopatológica apresentada por Kenney e Doig (1986), devido ao comprometimento do tecido por fibrose, com predominância de características intrínseca de cronicidade da inflamação (SNIDER *et al.*, 2011).

A somatização das características agudas e crônicas, mostram novamente, maior grau de inflamação nas jumentas no T12, bem superior ao encontrado nas éguas, afirmando as condições de uma reação do sistema imune mais prolongada e intensa da espécie asinina. No T48, o escore total da inflamação uterina se elevou na espécie equina, confirmando a hipótese anteriormente colocada, em relação a maior grau de cronicidade observadas nas éguas. Nesse tempo (T48) a totalização das características agudas e crônicas foram similares nas duas espécies.

Segundo Snider *et al.* (2011) as avaliações da endometrite de amostras histopatológicas incluem a percepção do tipo da inflamação (agudo ou crônico), do grau (leve, moderado ou intenso), dos tipos celulares presentes (linfócito, neutrófilos, etc) e os padrões da inflamação (multifocal ou difuso/perivasculares ou intersticiais). A presença de grande infiltrado de linfócitos e macrófagos, estão ligados à processos crônicos, assim como a presença marcada de

neutrófilos retrata processos agudos. A presença de células plasmáticas (como linfócito B) indica cronicidade, ligada a provável produção de imunoglobulinas específicas. Os eosinófilos estão ligados à processos inflamatórios específicos, como por exemplo a pneumovagina e em resposta à agentes fúngivos. Segundo Rothenberg e Hogan (2006), os eosinófilos são células que contribuem para a remodelação tecidual nas reações inflamatórias e são estimulados diretamente pela interleucina 33 (IL-33) (GERVASI *et al.*, 2011). Foi relatado que essa interleucina pode exacerbar a resposta inflamatória em casos de artrite processos alérgicos (LIEW, 2012; CHAN *et al.*, 2019). Miró *et al.* (2020), observou transcritos da IL-33 em todas as amostras de biópsias endometriais de jumentas e nas diferentes variações de classificação histopatológica (inflamação mais leve até de maior degeneração tecidual). Dessa maneira, correlacionaram de forma direta a expressão tecidual da IL-33 com o infiltrado eosinofílico e sugeriram que na endometrite nas jumentas, os eosinófilos são mediados por essa interleucina. Além disso, os resultados indicaram uma tendência para correlação positiva entre a contagem de eosinófilos e IL-33 na categoria IIA. Resta, estabelecer melhor o papel dos eosinófilos na inflamação do endométrio das jumentas, sua ligação ao processo degenerativo do tecido e buscar associação desses fatores à quantidade elevada de eosinófilos e PMN's, no período que as condições do endométrio já deveriam estar reestabelecidas.

Sokkar *et al.* (2001) avaliou a endometrite em jumentas, analisando biópsias endometriais, classificando-as de acordo com as categorias apresentadas por Kenney e Doig (1986) observando as características de inflamação aguda e crônica. Em conclusão, esse trabalho indicou que há uma semelhança nos achados das biópsias endometriais, com o que já foi relatado nas categorias, em éguas. Papas *et al.* (2017), realizou biópsias endometriais em jumentas e demonstrou que um grande infiltrado neutrofílico está presente nos endométrios altamente degenerativo (19-26%), enquanto que, nos animais com endometrite aguda pós IA, esse infiltrado chega à 87,74%. Em adição, a quantidade de eosinófilo foram significamente maiores na endometrite e se manteve alto nos casos em que já havia um estágio inicial de endometriose.

Em estudo realizado por De Holanda *et al.* (2019) com éguas, 66,6% foram classificadas em escores descritos por Keney e Doig (1986) como IIB (inflamação e fibrose moderadas com formação de aglomerações glandulares, presença moderada de PMN's e hiperplasia ou cistos glandulares) e 33,3 % na categoria III (à inflamação e fibrose graves com grande presença de PMNs e aglomerações, cistos e hiperplasias glandulares) e a maioria apresentou grande infiltrado neutrofílico no estrato compacto e no esponjoso, no lúmen das glândulas e vênulas. Além disso, todas essas éguas apresentaram grande infiltrado de células mononucleares, que

caracterizam cronicidade e muita fibrose periglandular e na lâmina própria, ninhos fibróticos, grande quantidade de colágeno e artérias hipertrofiadas de forma extensa e multifocal. Essas lesões caracterizam a endometriose, de condições degenerativas e progressivas no endométrio. Essas alterações são compatíveis com a susceptibilidade à endometrite persistente e estão também associados a maior idade e alterações da conformação do trato reprodutivo ao longo dos anos, que levam a disfunção do miométrio, além das alterações vasculares de perfusão e drenagem do que levam esses animais à infertilidade (SNIDER *et al.*, 2011).

Proteína de Fase Aguda (PFA)

De forma geral, durante processos inflamatórios no organismo, há uma resposta aguda proteica induzida pela ação das interleucinas, provocando aumento da síntese hepática das proteínas de fase aguda (PFA's) e liberação das mesmas para a corrente sanguínea. No entanto, as concentrações das PFA's tanto nas éguas, quanto nas jumentas não se alteraram durante os tempos avaliados após IA, fortalecendo a hipótese de que a inflamação do útero seja um processo local, que não induz uma resposta sistêmica em condições inflamatórias, como demonstrado por outros autores. Tuppits *et al.* (2014), também não obteve elevação das concentrações séricas da amilóide sérica A (ASA), haptoglobina (Hp) e o fibrinogênio (Fb) antes e após IA com sêmen congelado, durante 7 dias de avaliação. Adicionalmente, Nash *et al.* (2009) também não encontraram aumento da ASA sistêmica em éguas inseminadas com sêmen congelado, observando inflamação apenas no tecido uterino de forma local.

No entanto, foi relatado um aumento da ASA na circulação sistêmica periférica após indução da endometrite no período de diestro, após a inoculação de cultura de *Escherichia coli* (CHRISTOFFERSEN *et al.* 2010). Neste contexto, o aumento da ASA se deu pela presença de bactéria. Pelo conhecimento dos autores, este trabalho foi pioneiro na avaliação das PFA's em jumentas e, de forma similar ao encontrado para éguas, não houve alteração dessas proteínas de forma sistêmica na espécie asinina na reação inflamatória uterina pós IA.

Diagnóstico de Gestação

Assim como foi observado por diversos autores (TRIMECHE *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006; VIDAMENT *et al.*, 2009) a fertilidade resultante da IA com sêmen congelado de asinino encontrada no presente trabalho foi decepcionante nas jumentas (0%, 0/12), porém satisfatória nas éguas (54,55%, 6/11). Esse resultado reforça a hipótese que a baixa fertilidade

do sêmen asinino congelado é fruto de uma interação negativa com o aparelho reprodutor da jumenta.

A taxa de concepção de 54,55% nas éguas corrobora com os índices de fertilidade de 33-53% obtidos por Oliveira *et al.* (2016) e que, no entanto, foi superior aos 36% taxa de prenhez encontrado por Vidament *et al.* (2009), que utilizou 2,2% de glicerol como crioprotetor. Também corrobora com os resultados de Canisso *et al.* (2011) que atingiu 50 – 53% de gestação em éguas com sêmen congelado usando extensores a base de gema de ovo. Com taxas consideravelmente boas, Jepsen *et al.* (2010) atingiu taxas de prenhez em éguas de 46,5% e 58,3%, utilizando diferentes concentrações de gema de ovo e β – ciclodextrinas. Além disso, em outro estudo, 4 gestações em 10 ciclos (40%) foram obtidas em éguas inseminadas com sêmen congelado de asinino contendo 3% de glicerol + 2% de Dimetilformamida (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Semelhante aos resultados apresentados por Oliveira *et al.* (2006), a taxa de prenhez na espécie asinina foi de 0%, testando diferentes concentrações e combinações de crioprotetores. Esta porcentagem nula também foi observada por Trimeche *et al.* (1998) quando se utilizou o glicerol como crioprotetor. Em outro estudo Oliveira *et al.* (2016) obteve 0% (0/12) quando a inseminação foi feita em corpo uterino, em contrapartida que foi alcançado taxa de 28,26% (13/46) de prenhez quando a IA foi realizado no corno uterino ipsilateral à ovulação. No entanto, no mesmo estudo, após a remoção prévia do glicerol antes da IA, o autor obteve 61,5% de prenhez nas jumentas (8/13), resultado esse que não foi mais repetido por outro estudo. Quando foi realizado tratamento intrauterino das jumentas, adicionando-se plasma seminal ao sêmen asinino descongelado e lavando o útero das jumentas 4 horas após a IA, Rota *et al.* (2012) obtiveram taxa satisfatória de 36% de prenhez. Em nosso estudo nenhuma terapia uterina foi realizada, e o diluidor utilizado para o congelamento possui associação de metilformamida com glicerol.

Progesterona (P4)

Apesar da média da concentração plasmática de P4 na espécie equina (6 ng/ml) ter sido inferior à da espécie asinina (13 ng/ml), a taxa de gestação nas éguas foi claramente maior contraposta a taxa nula de prenhez observado nas jumentas. Ambas concentrações de P4 são compatíveis para a manutenção da gestação, confirmando que as taxas negativas nas jumentas não se deram pela insuficiência de P4 no dia da descida do embrião ao útero (D5) e que a inflamação uterina não influenciou a luteólise precoce nessa espécie. Além disso, fatores

importantes como a capacidade secretória do corpo lúteo, assim como a taxa de catabolismo da progesterona devem ser considerados, pois podem diferir entre as espécies equina e asinina (NAGY *et al.*, 2004), justificando a diferença nos valores encontrados entre elas.

Embora as concentrações periféricas de progesterona sejam muito variáveis entre as éguas (CARNEVALE *et al.*, 1988) as concentrações encontradas nesse estudo, tanto para jumentas quanto para éguas, estiveram dentro dos valores encontrados na literatura para espécie equina e asinina. Segundo Dawson (1977), as concentrações plasmáticas de P4 atingem um pico de 8-15 ng/mL entre 6 a 14 dias após a ovulação das éguas e reduzem até os 35 dias para 4 – 6 ng/ml. Shirazi *et al.* (2003) observaram aumento significativo na concentração plasmática de P4, 24 horas após ovulação de éguas, alcançando valor >8ng/ml do D4 e uma média de 9.8 ± 0.67 ng/ml entre os dias 3 e 10 pós ovulação. Guinther *et al.* (1980) obtiveram valores por volta de 5 ng/ml no quinto dia pós ovulação na espécie equina.

Apesar da perda embrionária precoce estar associada a deficiência de progesterona circulante e sua ação no útero, Knowles *et al.* (1993), na tentativa de definir a função da progesterona, utilizaram éguas receptoras ovariectomizadas e observaram que não houve associação entre suplementação com baixos níveis de progesterona (1,5 ng/mL) e baixas taxas de prenhez, e que a suplementação com altos níveis de P4 (25,2 ng/mL) não aumentaram as taxas de prenhez acima do encontrado em éguas normais (8,8 ng/mL). Esses autores concluíram que a concentração de P4 próximos à 2,5 ng/ml é necessária para a manutenção da gestação até o D25 na égua. Lopes *et al.* (1993) avaliaram os níveis de progesterona em éguas prenhas até o 30º dia de gestação e observaram que algumas éguas com elevadas concentrações de P4 também estavam sujeitas a absorção embrionária (Lopes *et al.*, 1993). Um estudo que correlacionou vascularização do CL e luteólise com concentrações circulantes de progesterona em jumentas, observou elevado valor de P4 circulante (> 20 ng/ml) no dia 10 pós ovulação (MIRÓ *et al.*, 2015). Em suas análises, Meira *et al.* (1998) obteve um valor aproximado de 12 ng/ml no D5 em jumentas, em uma curva crescente de concentração de P4 entre o D0 e o D9, de 0,9 e 19,9 ng/ml, respectivamente. Por fim, em estudo feito por Segabinazzi *et al.* (2022), avaliando concentração de P4 de jumentas prenhas e não prenhas, os valores alcançados foram de aproximadamente 20 ng/ml e >20 ng/ml, respectivamente, no D5. De forma similar, Panzani *et al.* (2018) relatou o valor próximo a 25 ng/ml no D5 em jumentas do grupo controle. Em suma, os valores encontrados no presente trabalho para concentração sérica de P4 encontram-se dentro dos valores encontrados na literatura para ambas as espécies, e não justificam o baixo índice de fertilidade encontrado na espécie asinina.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados, podemos concluir que a resposta inflamatória celular à presença do sêmen congelado de asininino difere entre a espécie asinina e equina. O grande infiltrado eosinofílico é a principal diferença relacionado a fisiologia da resposta inflamatória uterina da jumenta. Não houve um padrão de resposta inflamatória sistêmica em ambas espécies. O índice de fertilidade foi superior na espécie equina em detrimento às taxas nulas observadas na espécie asinina.

Referências

- Alvarenga, M. A., Mattos, M. C. F. Eficiência da escova ginecológica "Cytobrush" na colheita de material endometrial de éguas. *Arq. bras. med. vet. zotec*, p. 67-8, 1990.
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim - Alvarenga, F. C., Medeiros, A. S. L. Utilization of amides as cryoprotectors for freezing stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* 89, 105–113, 2005.
- Ball, B.A., Vo, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.* 72, 1061–1069, 2001.
- Bubenkova, F.; Postlerova, P.; Simonik, O.; Sirohi, J.; Sichtar, J. Effects of seminal plasma protein fractions on stallion sperm cryopreservation. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 6415, 2020.
- Canisso, I., Souza, F., Ortigoza, J. Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*). *Rev. Investig. Vet.* 19, 113–125, 2008.
- Canisso I. F., Carvalho G. R., Morel M. D., Ker P. G., Rodrigues A. L., Silva E. C., et al. Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey jack semen after insemination of horse mares. *Equine Vet J*, 43:183, 2011.
- Canisso, I. F.; Segabinazzi, L. G. T. M.; Fedorka, C. E. Persistent Breeding-Induced Endometritis in mares—A multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1432, 2020.
- Card, C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*, 64:580-588, 2005.
- Carnevale, E. M., McKinnon A. O., Squires E. L., Voxx J. L. Ultrasonographic characteristics of the preovulatory follicle preceding and during ovulation in mares. *J Equine Vet Sci*, 8(6):428-31, 1988. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0737080688800923>.

Colégio brasileiro de reprodução animal - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ed. Belo Horizonte, Brasil: CBRA, 2013.

Chan, B. C. L., Lam C. W. K., Tam L. S., Wong C. K. IL33: roles in allergic inflammation and therapeutic perspectives. *Front Immunol*, 10:364, 2019. Disponível em: [https://doi:10.3389/fimmu.2019.00364](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00364).

Christoffersen, M., Baagoe, C. D., Jacobsen, S., Bojesen, A. M., Petersen, M. R., Lehn-Jensen, H. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 138, 95–105, 2010.

Climent, F., Vilés K., Miró J. Vaginoplastia in two young infertile Catalan jennies. A clinical case. *Reprod Dom Anim*, 47(3):113, 2012.

Collins, T., Cotran K., Robbins C., Abbas A. K., Kumar V., Fausto N. *Inflamação aguda e crônica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.44-78, 2000.

Cruvinel, W. D. M., Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Souza, A. W. S. D., Silva, N. P. D., & Andrade, L. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 50, 434-447, 2010.

Dawson, F. L. M. Recent Advances in Equine Reproduction. *Equine Veterinary Journal*, 9(1), 4–11, 1977. Disponível em: [https://doi:10.1111/j.2042-3306.1977.tb03960.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1977.tb03960.x).

De Holanda, A. G. B., da Silva Leite, J., Consalter, A., da Silva, K. V. G. C., dos Santos Batista, B. P., Fonseca, A. B. M., Ferreira, A. M. R. Expression of interleukins 6 and 10 and population of inflammatory cells in the equine endometrium: diagnostic implications. *Molecular Biology Reports*, 2019. Disponível em: [https://doi:10.1007/s11033-018-04579-5](https://doi.org/10.1007/s11033-018-04579-5).

Fiala S. M., Pimentel C. A., Mattos A. L. G., Gregory R. M. & Mattos R.C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*, 67:556-562, 2007.

Fiala, S. M., Cruz L. A., Rodrigues R., Jobim M. I. M., Gregory R. M., Mattos R. C. Sperm cells in the reproductive tract of the mare: where can we find them? *Pferdeheilkunde*, v.26, p.19-21, 2010.

Fiala, S. M. Endométrio da égua pós-cobertura – ênfase na resposta inflamatória. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.326-329, jan./mar. 2017. Disponível em www.cbra.org.br.

Gastal, E., Gastal, M., & Ginther, O. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. *Theriogenology*, 50(7), 1025–1038, 1998. Disponível em: [https://doi:10.1016/s0093-691x\(98\)00205-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00205-2)

Gervasi, M. G., Osycka-Salut C., Caballero J., Vazquez-Levin M., Pereyra E., Billi S. Anandamide capacitates bull spermatozoa through CB1 and TRPV1 activation. PLoS ONE, v.6, 2011. Disponível em: <https://doi: 10.1371/journal.pone.0016993>.

Guinther, J. D., Foley, C. W., Gaverick, H. A., & Plotka, E. D. Comparison of Milk and Blood Plasma Progesterone Concentrations in Cycling and Pregnant Mares. Journal of Animal Science, 51(5), 1131–1138, 1980. Disponível em: <https://doi:10.2527/jas1980.5151131x>.

Ginther, O. J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 1992.

Heap, R. B., Hamon M., Allen W.R. Studies on oestrogen synthesis by the preimplantation equine conceptus. J Reprod Fertil Suppl, 32:343- 352, 1982.

Jepsen, R. J., Evans, L. E., & Youngs, C. R. Use of direct thaw insemination to establish pregnancies with frozen–thawed semen from a standard jack. Journal of Equine Veterinary Science, 30(11), 651-656, 2010.

Katila, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. Biol. Reprod, 52, 515–517, 1995.

Katila, T., Celebi, M., & Koskinen, E. Effect of timing of frozen semen insemination on pregnancy rate in mares. Acta Veterinaria Scandinavica, 37(3), 361-365, 1996.

Katila, T. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. Acta veterinaria scandinavica, 42(2), 1-17, 2001.

Katila, T. Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. Reproductive biology, 16(3), 189-196, 2016.

Kazim G., Reilas T., Katila T. Effect of frozen semen on the uterus of mares with pathological uterine changes. Reprod Nutr Dev, 44: 243–50, 2004.

Kenney, R. M.; Doig, P. A. Equine endometrial biopsy. In Current Therapy in Theriogenology; Morrow, D.A., Ed; W.B. Saunders Company: Philadelphia, PA, USA, pp. 723–729, 1986.

Knowles, J. E., Squires, E. L., Shideler, R. K., Tarr, S. F., & Nett, T. M. Relationship of progesterone to early pregnancy loss in mares. Journal of Equine Veterinary Science, 13(9), 528–533, 1993. Disponível em: [https://doi:10.1016/s0737-0806\(07\)80271-1](https://doi:10.1016/s0737-0806(07)80271-1).

Kotilainen T., Huhtinen M., Katila T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. Theriogenology, 41:629–36, 1994.

Kozdrowski, R.; Sikora, M.; Buczkowska, J.; Nowak, M.; Ra´s, A.; Dzi ęcioł, M. Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. Anim Reprod Sci, 154, 56–62, 2015.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.277, p.680-685, 1970.

Ley, W. B.; Digraessie, W. A.; Holyoak, G. R.; Slusher, S. H. Endometrium. In *Diagnostic Cytology and Hematology in the Horse* Cowell; Cowel, R. D., Tyler, R. L., Eds.; Mosby: St. Louis, MO, USA, pp. 180–186, 2002.

Liew, F. Y. IL-33: a janus cytokine. *Ann Rheum Dis*, 71:101–4, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200589>.

Lopes, M. D.; Papa, F. O; Prestes, N. C. Morte embrionária precoce em éguas: aspectos clínicos e hormonais. In: *X Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1993, Belo Horizonte, Anais...* Belo Horizonte: CBRA, v2, p 231-380, 1993.

Maloufi F., Pierson R., Otto S., Ball C., Card C. Mares susceptible or resistant to endometritis have similar endometrial echographic and inflammatory cell reactions at 96 hours after infusion with frozen semen and extender. In: *AAEP editor. Proceedings of the 48th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. Orlando, Florida, USA: IVIS. p. 51–7, 2002.

Mantovani, R., Rota, A., Falomo, M.E., Bailoni, L., Vincenti, L. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 217–226, 2002.

Meira, C., Ferreira, J. C., Papa, F., & Henry, M. Ovarian activity and plasma concentrations of progesterone and estradiol during pregnancy in jennies. *Theriogenology*, 49(8), 1465–1473, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00092-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00092-2).

Miró J., Vilés K., Fernández M., Fábregas N., Soares J., García W. Induced acute endometritis by frozen semen insemination in donkey. *Anim Reprod Sci*, 46(Suppl. 3):130, 2011.

Miró, J., Vilés K., García W., Jordana J., Yeste M. Effect of donkey seminal plasma on sperm movement and sperm-polimorphonuclear neutrophils attachment in vitro. *Animal Reproduction Science*, 140:164-172, 2013.

Miró, J., Vilés, K., Anglada, O., Marín, H., Jordana, J., & Crisci, A. Color Doppler provides a reliable and rapid means of monitoring luteolysis in female donkeys. *Theriogenology*, 83(4), 485–490, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.007>.

Miró, J., & Papas, M. Post–Artificial Insemination Endometrial Inflammation and Its Control in Donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 38-43, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.11.007>.

Miró, J.; Marín, H.; Catalán, J.; Papas, M.; Gacem, S.; Yeste, M. Seminal Plasma, Sperm Concentration, and Sperm-PMN Interaction in the Donkey: An In Vitro Model to Study

Endometrial Inflammation at Post-Insemination. *Internacional Journal of Molecular Science*, 21, 3478, 2020.

Miró, J., Catalán, J., Marín, H., Yáñez-Ortiz, I., & Yeste, M. Specific Seminal Plasma Fractions Are Responsible for the Modulation of Sperm-PMN Binding in the Donkey. *Animals*, 11(5), 1388, 2021.

Morelli, M. A. C.; Ostuni, A.; Giangaspero, B.; Cecchini, S.; Carluccio, A.; Boni, R. Relationships between Seminal Plasma Metabolites, Semen Characteristics and Sperm Kinetics in Donkey (*Equus asinus*). *Animals*, 11, 201, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani11010201>.

Nagy, P., Huszenicza G., Reiczigel J., Juhasz J., Kulcsar M., Abavary K. Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. *Theriogenology*, 61(2-3):20314, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X03002115>.

Nash, D. M., Sheldon, I. M., Herath, S., Lane, E. A. Markers of the uterine innate immune response of the mare. *Anim. Reprod. Sci.* 119, 31–39, 2009.

Nieto-Olmedo, P., Martín-Cano, F. E., Gaitskell-Phillips, G., Ortiz-Rodríguez, J. M., Peña, F. J., & Ortega-Ferrusola, C. Power Doppler can detect the presence of 7–8 day conceptuses prior to flushing in an equine embryo transfer program. *Theriogenology*, 2020. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2020>.

Oliveira, J. V. Estudo de metodologias para a criopreservação de sêmen de jumento (*equus asinus*) por meio de testes laboratoriais e fertilidade. Master of Science Thesis, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, 2005.

Oliveira J. V., Alvarenga M. A, Melo C. M., Macedo L. M., Dell'Aqua J. A. Jr., Papa, F. O. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility, In: *Equine Reproduction IX*, Evans MJ (Ed.), *Anim Reprod Sci*, 94, 82– 84, 2006.

Oliveira, J. V., Papa F. O., Melo Oña C. M., Monteiro G. A., Puoli-Filho J. N. P., Alvarenga M. A. New procedures to freeze donkey semen and its influence on mares and jennies fertility. *J Equine Vet Sci*, 32, 503-504, 2012.

Oliveira, J. V. de, Oliveira, P. V. de L. F., Melo e Oña, C. M., Guasti, P. N., Monteiro, G. A., Sancler da Silva, Y. F. R., ... Papa, F. O. Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen. *Theriogenology*, 85(7), 1267–1273, 2016; Disponível em <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2015.12.010>.

Overbeck, W.; Witte, T.S.; Heuwieser, W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*, 75, 1311–1318, 2011.

Pace, M. M., Sullivan, J. J. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. In: Rowland, I.W., Allen, W.R., Rossdale, P.D. (Eds.), *Equine Reproduction*. J. Reprod. Fert. Suppl. 23, 115–121, 1975.

Palmer, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: *Proceedings 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, vol. 3, Urbana (Abstract 377), 1984.

Panzani, D., Tardella, M., Govoni, N., Tesi, M., Fanelli, D., Rota, A., Camillo, F. Effect of the administration of alfaprostol 3 or 6 days after ovulation in jennies: ultrasonographic characteristic of corpora lutea and serum progesterone concentration. *Theriogenology*, 121, 175–180, 2018. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2018.08.014>.

Papa, F. O.; Melo, C. M.; Fioratti, E. G.; Dell’Aqua J. R., J. A.; Zahn, F. S.; Alvarenga, M. A. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, v.107, n.3/4, p.293–301, 2008.

Papas, M., Noto F., Bonilla S., Marín H., Miró J. Histological findings from endometrium biopsies in jennies. *Reprod Dom Anim*, 52(3):121, 2017.

Papas, M.; Arroyo, L.; Bassols, A.; Catalán, J.; Bonilla-Correal, S.; Gacem, S.; Yeste, M.; Miró, J. Activities of antioxidant seminal plasma enzymes (SOD, CAT, GPX and GSR) are higher in jackasses than in stallions and are correlated with sperm motility in jackasses. *Theriogenology*, 140, 180–187, 2019.

Pereira, R.; Silva, E.; Ignácio, F.; Lacerda, T.; Meira, C. Utilização de ultrassonografia modo doppler como diagnóstico complementar da endometrite em éguas: relato de caso. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.23, n.1, p. 1-14, 2014. Disponível em: <http://revistas.bvs?vet.org.br/rcemv/article/view/27695/29083>.

Quartuccio, M., Cristarella, S., Medica, P., Fazio, E., Mazzullo, G., Rifici, C., Satué, K. Endometrial Cytology During the Different Phases of the Estrous Cycle in Jennies: New Evidences. *Animals*, 10(6), 1062, 2020. Disponível em: <https://doi:10.3390/ani10061062>.

Reghini, M. F. S. Efeito do tratamento com plasma rico em plaquetas em éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente após inseminação artificial. 2013. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2013. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/98176>.

Rodríguez-Martínez H., Kvist U., Ernerudh J., Sanz L., Calvete J. J. Proteínas do plasma seminal: que papel desempenham? *Am J Reprod Immunol*, 66 (Supl. 1): 11–22, 2011.

Rota, A.; Magelli, C.; Panzani, D.; Camillo, F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiatina donkey spermatozoa. *Theriogenology*, 69, 176–185, 2008.

Rota, A., Panzani, D., Sabatini, C., & Camillo, F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*, 78(8), 1846-1854, 2012.

Rothenberg, M. E., Hogan S. P. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*, 24:147–74, 2006. Disponível em: [https://doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720](https://doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720).

Santos, C. S. Resposta inflamatória uterina em éguas inseminadas com sêmen fresco e congelado de jumento. 2012. 47 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

Segabinazzi, L. G. T. M.; Roberts, B. N.; Peterson, E. W.; Ambrosia, R.; Bergfelt, D.; Samper, J.; French, H.; Gilbert, R. O. Early Pregnancy in Jennies in the Caribbean: Corpus Luteum Development and Progesterone Production, Uterine and Embryo Dynamics, Conceptus Growth and Maturation. *Animals*, 12, 127, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani12020127>.

Shirazi, A., Gharagozloo, F., Niasari-Naslaji, A., & Bolourch, M. Plasma Estradiol-17b and Progesterone during Estrous Cycle in Caspian Mares. *Archives of Razi Institute*, 56(1), 81-92, 2003.

Schwertman, N. C., Owens, M. A. e Adnan, R. Um método boxplot simples e mais geral para identificar outliers. *Estatística Computacional e Análise de Dados*, 47(1), 165–174, 2004. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.csda.2003.10.012>.

Silva L. A.; Ginther O. J. An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. *Biology of Reproduction*, v.74, p. 337-343, 2006. Disponível em: [https://doi: 10.1095/biolreprod.105.047621](https://doi:10.1095/biolreprod.105.047621).

Slusher, S.H.; Cowell, R.L.; Tyler, R.D. The Endometrium. In *Cytology and hematology of the horse*; American Veterinary Publications; Cowell, R.L., Tyler, R.D., Eds.; Mosby Elsevier: Maryland Heights, MO, USA, pp. 173–180, 1992.

Snider, T. A., Sepoy C., Holyoak G. R. Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology*, 75(9):1567- 1581, 2011.

Sokkar, S. M., Hamouda, M. A., & El-Rahman, S. M. Endometritis in she donkeys in Egypt. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 48(7), 529-536, 2001.

Squires, E.L., Keith, S.L., Graham, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion sperma- tozoa. *Theriogenology* 62, 1056–1065, 2004.

Stout, T. A., Allen W. R. Prostaglandin E2 and F2-alpha production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Reproduction*, 123: 261, 2002.

- Talluri, T. R.; Mal, G., Ravi, S. K. Biochemical components of seminal plasma and their correlation to the fresh seminal characteristics in Marwari stallions and. Poitou jacks. *Vet. World*, 10, 214–220, 2017.
- Töpfer-Petersen, E.; Ekhlesi-Hundrieser, M.; Kirchhoff, C. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.159-170, 2005.
- Trimeche, A., Renard, P., Tainturier, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology*, 50:793– 806, 1998.
- Troedsson, M.H.T, Steiger, B.N., Ibrahim, N.M., Foster, D.N., Crabo, B.G. Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. *Biol. Reprod.* 52 (Suppl.), 307, (abstract), 1995.
- Troedsson, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, 52, 461–471, 1999.
- Troedsson, M. H. T., Loset K., Alghamdi A. M., Dahms B., Crabo B. G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Anim Reprod Sci*, 68: 273– 8, 2001.
- Troedsson, M. H. T., Desvouses, A.S., Alghamdi, A.S., Dahms, B., Dow, C. A., Hayna J. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, 89:171-86, 2005.
- Tuppits, U., Orro, T., Einarsson, S., Kask, K., & Kavak, A. Influence of the uterine inflammatory response after insemination with frozen–thawed semen on serum concentrations of acute phase proteins in mares. *Animal Reproduction Science*, 146(3-4), 182–186, 2014. Disponível em <https://doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.02.007>.
- Vendramini, O., Guintard C., Moreau J., Tainturier D. Cervix conformation: A first anatomical approach in baudet du poitou jenny asses. *Cambridge J*, 66:741-744, 1998.
- Vidament, M., Daire, C., Yvon, J. M., Doligez, P., Bruneau, B., Magistrini, M., Ecot, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. In: Evans, Margaret J. (Ed.), *Equine Reproduction VIII*. *Theriogenology* 58, 249–251, 2002.
- Vidament, M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. In: Edward Squires (Ed.), *Proceedings of the 4th International Symposium on Stallion Reproduction*. *Anim. Reprod. Sci.*, vol. 89, pp. 115–136, 2005.
- Vidament, M.; Vicent P.; Martin, F. X.; Magistrini, M.; Blesbois, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Animal Reproduction Science*, 2008.
- Vidament, M.; Vincent, P.; Martin, F. X.; Magistrini, M.; Blesbois, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Animal Reproduction Science* 112, p. 22–35, 2009.

Vilés, K.; Rabanal, R.; Rodríguez-Prado, M.; Miró, J. Effect of ketoprofen treatment on the uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen. *Theriogenology*, 79, 1019–1026, 2013.

Vilés, K.; Rabanal, R.; Rodríguez-Prado, M.; Miró, J. Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen-thawed semen. *Animal Reproduction Science* 143, p. 57-63. 2013.

Wildt D.E.; Pukazhenti B.; Brown J.; Monfort S.; Howard J.G.; Roth. *Spermatology for understanding, managing and conserving rare species*. *ReprodFertil Dev* 7, p. 811–824, 1995.

Woodward E. M., Christoffersen M., Campos J., Squires E. L, Troedsson M. H. T. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: Relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology*, 78(3):495-501, 2012.

Woodward, E. M., & Troedsson, M. H. T. Equine breeding-induced endometritis: A review. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(9), 673-682, 2013.

Woodward, E. M.; Christoffersen, M.; Campos, J.; Betancourt, A.; Horohov, D.; Scoggin, K. E.; Squires, E.L.; Troedsson, M. H. T. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Reproduction*, 145, 289–296, 2013.