

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
UFSM**

**TESE DE DOUTORADO**

**LIMPEZA UTERINA APÓS INFUSÃO DE CARVÃO E  
NÍVEIS DE METABÓLITOS PLASMÁTICOS DE  
PROSTAGLANDINA (PGFM) PÓS-INFECÇÃO NA ÉGUA**

**CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA**

**PPGMV**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2001**

**LIMPEZA UTERINA APÓS INFUSÃO DE CARVÃO E NÍVEIS DE  
METABÓLITOS PLASMÁTICOS DE PROSTAGLANDINA (PGFM)  
PÓS-INFECÇÃO NA ÉGUA**

**Por**

**Carlos Eduardo Wayne Nogueira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de

**Doutor em Medicina Veterinária**

**PPGMV**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2001**

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Centro de Ciências Rurais**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**LIMPEZA UTERINA APÓS INFUSÃO DE CARVÃO E  
NÍVEIS DE METABÓLITOS PLASMÁTICOS DE  
PROSTAGLANDINA (PGFM) PÓS-INFECÇÃO NA ÉGUA**

Elaborada por  
**Carlos Eduardo Wayne Nogueira**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Dr. Carlos Antonio Mondino Silva**  
(Presidente/ Orientador)

---

**Dr. Rodrigo Costa Mattos**

---

**Dra. Karin Erica Brass**

---

**Dr. Eduardo Brum Médice**

---

**Dra. Dominguita Lühers Graça**

Santa Maria, 05 de outubro de 2001

Com Amor!  
Ofereço ao  
Vinícius e ao Rodrigo  
Parte Importante do Meu Ser

## AGRADECIMENTOS

DEUS - FÉ, uma força maior que aponta e suporta nossos caminhos;

VIDA, representada por Eduardo e Ester e seus Pais, que este passo represente mais uma vitória vossa;

AMOR, Charli, sinônimo de paixão, carinho e companheirismo;

FAMÍLIA, Titi, Nica, Tissi, Tininha e a todos que representam este sentimento, mesmo sem laços de sangue;

ORIENTADORES, Tonho e a todos que auxiliaram e acreditaram na realização deste projeto;

AMIGOS, aquelas pessoas que sempre estiveram junto, incentivando, auxiliando, torcendo, ouvindo, agüentando ....

COMPANHEIROS, aos colegas de trabalho, profissão e alunos, que entenderam a importância deste momento;

CAVALOS, motivo de estudo e paixão, vocês que partilham silenciosos o nosso humanismo às vezes irracional;

INSTITUIÇÕES, que mesmo com suas limitações e vícios atávicos, conseguiram me incentivar a prosseguir;

FINANCIADORES, que permitiram materialmente a realização deste trabalho;

Muito Obrigado !

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 – ENDOMETRITE.....	3
2.2 – MECANISMOS DE DEFESA UTERINA.....	6
2.3 – MECANISMOS FÍSICOS.....	6
2.3.1- Fechamento e Posicionamento Vulvar.....	7
2.3.2 – Cérvix.....	8
2.3.3 – Contratilidade Miometrial.....	8
2.3.4 – Muco Uterino.....	13
2.3.5 – Circulação Sangüínea e Drenagem Linfática.....	14
2.4 – MECANISMOHUMORAL.....	15
2.5 – MECANISMO CELULAR.....	17
2.6 – PLASMA SEMINAL.....	18
2.7 – INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL.....	20
3. CAPITULO 1 – Avaliação da Limpeza Uterina na Égua 24 e 48 horas após a Infusão de 250 e 500 mg de Carvão.....	22
Resumo.....	22
Summary.....	22
Introdução.....	23
Material e Métodos.....	26
Resultados.....	28
Discussão e Conclusões.....	33
Referências Bibliográficas.....	36

4. CAPITULO 2 - Secreção de Prostaglandina e seus Metabólitos após Infecção Uterina Experimental na Égua.....	38
Resumo.....	38
Summary.....	39
Introdução.....	40
Material e Métodos.....	42
Resultados.....	50
Discussão e Conclusões.....	52
Referências Bibliográficas.....	60
5. DISCUSSÃO GERAL.....	55
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classificação dos resíduos na lavagem do lume uterino de éguas Capítulo 1 após a infusão de 250 e 500 mg de carvão.	29
TABELA 2 - Características da lavagem uterina na égua colhida após 24 e 48 Capítulo 1 horas da infusão de carvão em 76 procedimentos.	29
TABELA 3 - Relação entre a infusão intra-uterina da dose de 250 mg de carvão e Capítulo 1 a classificação visual da lavagem uterina realizada 24 e 48 horas após.	30
TABELA 4 - Relação entre a infusão da dose de 500 mg de carvão e a Capítulo 1 classificação visual da lavagem uterina realizada 24 e 48 horas após.	30
TABELA 5 - Descrição das classificações clínica e histológica das éguas em Capítulo 1 relação ao aspecto do lavado uterino 24 e 48 horas após a infusão de 250 e 500 mg de carvão.	31
TABELA 1 - Resultados da resposta clínica à infecção experimental, nos três Capítulo 2 grupos de éguas.	44

## LISTA DE FIGURAS

- QUADRO 1 Relação da dose de 250 e 500 mg de carvão, com o intervalo da lavagem uterina 24 e 48 horas após a infusão e a classificação visual do lavado uterino das éguas nos grupos: G1- Controle, G2 e G3. 28
- QUADRO 2 Comparação entre a classificação das biópsias imediatamente antes e após o Experimento 1, com a classificação das biópsias colhidas 30 dias após as infusões. 31
- QUADRO 3 Relação entre a classificação clínico-histológica e a média da quantidade de carvão nas alíquotas do lavado uterino 24 e 48 horas após a infusão de 250 e 500 mg de carvão. 32
- GRÁFICO 1 Curva dos níveis de PGFM das éguas do grupo controle, no período de 24 horas, após a infecção experimental com *Streptococcus sp.* 46
- GRÁFICO 2 Curva dos níveis de PGFM das éguas do grupo 2, no período de 24 horas, após a infecção experimental com *Streptococcus sp.* 47
- GRÁFICO 3 Curva dos níveis de PGFM das éguas do grupo 3, no período de 24 horas, após a Infecção experimental com *Streptococcus sp.* 48

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

# LIMPEZA UTERINA APÓS INFUSÃO DE CARVÃO E NÍVEIS DE METABÓLITOS PLASMÁTICOS DE PROSTAGLANDINA (PGFM) PÓS-INFECÇÃO NA ÉGUA

Autor: Carlos Eduardo Wayne Nogueira  
Orientador: Carlos Antonio Mondino Silva  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 5 de outubro de 2001

Dois experimentos foram conduzidos com o objetivo de melhor entender a patogenia da endometrite que parece ser a maior causa de infertilidade na égua. O primeiro, para aferir a limpeza uterina após a infusão de 250 e 500mg de carvão através da lavagem uterina realizada 24 e 48 horas após a infusão. As éguas com maior alteração histológica no endométrio se limpam mais tarde do carvão infundido. As éguas necessitaram mais de 24 horas para eliminar/drenar o carvão do útero. Verificou-se que o período de 48 horas entre a infusão e a lavagem foi melhor que o de 24 horas para se avaliar a limpeza uterina. No segundo, foram avaliados os níveis plasmáticos PGFM nas primeiras 24 horas após a infecção experimental em vinte e duas éguas, já utilizadas no primeiro trabalho. As éguas foram divididas em três grupos: No Grupo Controle (Grupo1) as que eliminaram a infecção e no Grupo 2 e 3 (Gr.II e Gr.III segundo KENNEY, 1978 e SILVA et al., 1987), as que não conseguiram eliminar a infecção após 96 horas. As éguas do Grupo Controle apresentaram um nível plasmático de PGFM mais homogêneo nas 24 horas com média de 478pmol/L (210 – 668pmol/L). No Grupo 2, observou-se até a 4ª hora uma elevação dos níveis de PGFM; após observou-se um decréscimo até a 9ª hora; a partir daí níveis intermediários, homogêneos e praticamente constantes foram observados até o final das 24 horas de coleta ( $X=273\text{pmol/L}$ ; 112 – 706pmol/L). No grupo 3, as éguas apresentaram um valor médio de PGFM de 1700pmol/L na primeira coleta. Esses altos níveis se mantiveram nas primeiras 3 horas, caindo progressivamente até a 16ª hora, quando recomeçaram a se elevar ( $X=293\text{pmol/L}$ ; 102 – 1689pmol/L). Os níveis médios de PGFM foram diferentes entre os três grupos, entretanto, esta diferença não foi significativa. Isso pode ser explicado pela grande variação dos níveis plasmáticos de PGFM entre as éguas, independentemente do grupo. A interação entre os níveis plasmáticos de PGFM e a limpeza uterina na égua sadia pode estar relacionada com a frequência da secreção de prostaglandina uterina e sua intensidade que, por sua vez, se relacionam com a integridade do endométrio. Esses resultados, apesar de não indicarem de forma absoluta uma relação entre a eliminação de carvão do útero e os níveis plasmáticos de PGFM, sugerem que um padrão de secreção mais homogêneo, regular e constante seja mais importante do que a intensidade da secreção.

## ABSTRACT

Doctoral Thesis in Veterinary Medicine  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

# UTERINE CLEARANCE AFTER CHARCOAL INFUSION AND PLASMA PROSTAGLANDIN LEVELS IN EXPERIMENTALLY INFECTED MARE

Autor: Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Orientador: Carlos Antonio Mondino Silva

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 5 de outubro de 2001

Persistent endometritis is a major cause of infertility in the mare. Two experiments were conducted aiming a better understanding of endometritis pathogenesis in the mare. In the first experiment uterine clearance after 250 e 500mg of charcoal infusion through uterine lavage 24 and 48hours thereafter was evaluated. Mares with major endometrial histological changes performed a delayed clearance of the charcoal infusion. It was observed that the 48 hours period was better than the 24 hours period to evaluated uterine clearance. The second experiment was designed to evaluate the plasma PGFM levels during the first 24 hours after an experimental infection with *Streptococcus zooepidemicus*. Twenty-two mares, previously used in the first experiment were infected. The mares were allocated in three groups: the control group consisted of the mares that cleared the infection whereas group 2 and 3 (Groups II and III of KENNEY, 1978 and SILVA et al., 1987) were composed of the mares that did not clear the infection after 96 hours. The control group showed more homogeneous PGFM plasma levels during the 24hours after the infection, with an average of 478pmol/L (210-668pmol/L). For Group 2, rising levels of PGFM were observed up to 4hours and then a fall until 9 hours and stable levels up to 24 hours after infection ( $X=273\text{pmol/L}$ ; 112-706pmol/L). In Group 3, all mares had an average level of PGFM 1700pmol/L in the first blood sample. Those high levels were stable during the first three hours, following by a progressive fall up to the 16<sup>th</sup> hour, when they began to rise ( $X=283\text{pmol/L}$ ; 102-1689pmol/L). Although the average PGFM levels were different among three groups, the difference was not statistically significant. This could be explained by the marked variations of individual values, independently of the groups considered. The relationship between uterine clearance and prostaglandin secretion in the healthy mare could be ascribed to the intensity and frequency of uterine prostaglandin secretion which is related to endometrial integrity. These results although do not point to any tight correlation between uterine charcoal clearance and plasmatic levels of PGFM may suggest that a regular/homogenous and constant pattern of prostaglandin secretion is more important than secretion intensity.

## 1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da idade a égua apresenta diminuição na fertilidade. A endometrite persistente parece ser a maior causa da redução da fertilidade nas éguas, podendo ser considerada uma das enfermidades importantes na clínica médica de eqüinos, ficando apenas atrás das cólicas e doenças do trato respiratório (TRAUB-DARGATZ et al. 1991), sem considerar a alta incidência de lesões do aparelho locomotor no cavalo atleta. Algumas, aparentemente, não conseguem resolver a endometrite aguda provocada pela introdução de detritos e bactérias oportunistas no útero através da cópula, desenvolvendo uma endometrite crônica. Outras possibilidades de agressão ao útero podem ser representadas pelo parto ou por qualquer manipulação que se relacione com esta víscera. Aquelas que não conseguem eliminar a endometrite induzida são denominadas de éguas susceptíveis. Ao contrário, as que eliminam a infecção, ou fazem a limpeza uterina, são chamadas de sadias ou resistentes (PETERSON et al. 1969; HUGHES e LOY, 1969; TROEDSSON, 1995). Certas características de conformação predispõem à irritação vaginal e, conseqüentemente, à endometrite. Uma forma ou fechamento defeituoso ou a angulação excessiva da vulva, que são comuns nas raças de esporte de grande porte, podem levar a pneumovagina, o que é um fator predisponente à endometrite. Todos esses fatores caracterizam um enorme prejuízo financeiro para a criação (DIMMNOCK, 1939; DAY, 1939).

Como complementação ao exame clínico ginecológico, muitos métodos de exame, como a ultra-sonografia, a palpação vaginal da cérvix, a citologia da secreção uterina, a bacteriologia e a histopatologia do útero, além da palpação retal e a inspeção vaginal, vêm sendo utilizados para auxiliar na avaliação da saúde genital. Esses métodos têm como objetivo estudar a saúde ginecológica ou, por outro lado, o seu grau de comprometimento. Nenhum deles, no entanto, permite verificar a função imune da mucosa, nem a capacidade de limpeza

mecânica do útero. WATSON, (1988 e 2000) e TROEDSSON, (1999) revisaram e discutiram resultados e conceitos, esclarecendo parte das dúvidas sobre a função imune do útero da égua.

A partir dos resultados dos trabalhos citados, observou-se ponto importante a ser investigado na tentativa de definir o modelo válido para diferenciar as éguas susceptíveis à infecção uterina daquelas resistentes. A questão da defesa mecânica do útero parece, também, ser crucial para o bom desempenho reprodutivo. LeBLANC et al. (1994a) sugeriram que o miométrio e os vasos linfáticos possam desempenhar papel importante nesse mecanismo.

A limpeza uterina teria uma relação com a secreção de ocitocina e da prostaglandina e seus metabólitos. Isto foi documentado por CADARIO et al. (1995 e 1999), quando avaliaram a eliminação uterina de um colide radioativo, por cintilografia em éguas no cio e a função da ocitocina na secreção de prostaglandina em éguas consideradas saudáveis e com retardo na eliminação da infecção uterina.

Como forma de estudar a capacidade mecânica de limpeza uterina, utilizou-se a infusão de carvão no útero, em duas diferentes concentrações, fazendo-se, posteriormente, a lavagem uterina, analisando-se a presença do carvão no útero como um meio diagnóstico para se avaliar a função endometriometrial e a drenagem linfática de animais susceptíveis ou não à endometrite. Procurou-se, também, observar a curva de secreção uterina de prostaglandina e seus metabólitos nas primeiras 24 horas após infecção experimental, relacionando-se estes dados com os de éguas que apresentaram um histórico clínico de no mínimo dois anos sem produzir um produto vivo.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 - ENDOMETRITE

Endometrite é a alteração inflamatória, aguda ou crônica, que ocorre no endométrio, algumas vezes de natureza infecciosa (KENNEY, 1993). A endometrite bacteriana ocorre em decorrência da contaminação do trato reprodutivo, sendo considerada a principal causa de infertilidade na égua (VOSS, 1984; SILVA 1989). O processo inflamatório que se desenvolve a partir dessa contaminação torna, muitas vezes, o ambiente uterino incompatível com a vida embrionária e fetal.

A introdução de bactérias no trato genital da égua ocorre, principalmente, em quatro situações: monta natural, exame ginecológico, parto e perda ou comprometimento das barreiras físicas de proteção do trato genital (RICKETTS & MACINTOSH, 1987; SILVA, 1989; CASTILHO, 1994; TROEDSSON, 1995). Com base nos conhecimentos sobre a etiologia e a fisiopatologia da endometrite é possível considerá-la como uma doença multifatorial com, no mínimo, três distintas classificações:

- Doença transmitida sexualmente,
- Endometrite infecciosa crônica,
- Endometrite persistente induzida pela cópula e

As doenças sexualmente transmitidas e a endometrite infecciosa crônica são, freqüentemente, diagnosticadas logo após a invasão dos microrganismos que, neste momento, estão aderidos ao epitélio endometrial e iniciaram sua multiplicação no útero. Isto ocorre da mesma forma que nos outros sistemas. As infecções do trato reprodutivo feminino são, seguidamente, tratadas com antimicrobianos apropriados. Entretanto, para se obter melhores resultados no tratamento da endometrite induzida pela cópula, torna-se necessário o início do

tratamento antes mesmo que se estabeleça o processo inflamatório/infeccioso no endométrio (TROEDSSON, 1997).

Durante a cópula, o pênis do garanhão introduz no aparelho genital feminino, além de espermatozóides, bactérias e debris celular que são depositados diretamente no lúmen uterino. Também ocorre uma contaminação como decorrência natural do trabalho de parto, que persiste durante a involução uterina (RICKETTS & MACINTOSH, 1987). Nos primeiros dias após o parto a contaminação bacteriana no útero ainda permanece, mesmo havendo involução uterina fisiológica e “a termo” (GYGAX et. al., 1978).

Éguas classificadas como resistentes à endometrite conseguem facilmente eliminar a contaminação, o que não ocorre com éguas susceptíveis. FARRELY & MULLANEY, em 1964, foram os primeiros a propor o termo “éguas susceptíveis”, para definir éguas que desenvolviam endometrite persistente, afirmando que a endometrite devia-se à falha da égua em eliminar o agente. Também foi proposto que, para classificar uma égua como susceptível à endometrite, seria mais acurado combinar o histórico reprodutivo, os sinais clínicos e a histopatologia endometrial. Além disso, as éguas deveriam sofrer uma agressão bacteriana ao útero para determinar sua resistência ou susceptibilidade à infecção (LIU, 1993).

TROEDSSON et al. (1995) propuseram que égua susceptível seria aquela que, submetida à infecção experimental com *Streptococcus zooepidemicus*, não pudesse livrar-se da infecção em um prazo de 96 horas.

A idade e o número de partos se relacionariam diretamente com a probabilidade de ocorrência de infecção persistente (HUGHES & LOY, 1969). Na avaliação da fertilidade de 90.000 éguas Puro Sangue de Corrida, BAKER et al. (1992) encontraram decréscimo progressivo da fertilidade a partir dos 8 anos.

O agente encontrado com maior freqüência nas endometrites foi o *Streptococcus zooepidemicus* (MERKT & VON LEPPEL 1970; LANGONI et al., 1994). Esta bactéria é um coco gram-positivo, que cresce em cadeias de variados tamanhos, dependendo do meio de cultivo. Quando cultivado em ágar-sangue produz colônias esféricas de aspecto úmido (mucóides) rodeado por uma larga

zona de hemólise tipo *B*, daí ser também chamado de *Streptococcus B-hemolítico* (FARROW & COLLINS, 1984). Esta bactéria é considerada habitante normal da pele e do trato respiratório superior dos eqüinos, da região perivulvar da égua e do trato genital de garanhões. MERKT & VON LEPPEL (1970), assim como SILVA (1989), descrevem o *Streptococcus B-hemolítico* como um germe facultativamente patogênico. Qualquer fator que porventura comprometa a função do sistema imune pode permitir a instalação da infecção.

A presença do agente etiológico é apenas um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento de uma infecção bacteriana no útero das éguas susceptíveis. A adesão bacteriana é considerada como pré-requisito básico para que ocorra a infecção. As bactérias usam várias estratégias de aderência. O *Streptococcus equi zooepidemicus* utiliza estruturas chamadas de *adesinas*, na superfície da bactéria, que se unem a *receptores* na célula do hospedeiro. O *Streptococcus zooepidemicus* liga-se à fibronectina, encontrada nas membranas celulares de mamíferos, mas ainda não está estabelecido o quanto isso contribui para a patogenia da endometrite eqüina (WITTENBRINK et al., 1997). FERREIRA-DIAS et al. (1994), comparando a adesão de *Streptococcus zooepidemicus* a tecidos de biópsia endometrial de éguas de todas as categorias histológicas, demonstraram que, durante o estro, a adesão do *Streptococcus* é maior ao endométrio classificado como da categoria III, por KENNEY & DOIG (1986). Quando avaliaram em separado a classificação endometrial e a fase do ciclo estral, não verificaram diferença significativa nesta capacidade de adesão.

A adesão bacteriana a superfícies naturais e sintéticas também se realiza através de biofilmes, cuja formação depende de um glicocálix produzido pela bactéria (KHADORI & YASSIEN, 1995). Durante o processo de adesão, as bactérias se justapõem umas às outras e produzem uma matriz de polissacarídeos, que é um polímero extracelular chamado glicocálix. As bactérias assim organizadas são pelos menos 500 vezes mais resistentes a agentes antibacterianos e à fagocitose (COSTERTON et al., 1995).

## 2.2- MECANISMOS DE DEFESA UTERINA

Através da cópula, da manipulação do trato reprodutivo ou da perda das barreiras físicas de proteção do útero – lábios vulvares, anel himenal e cérvix -, ocorre a invasão do endométrio por material estranho introduzido junto com o ejaculado, com o material ginecológico/obstétrico ou com o ar, iniciando-se um processo de resposta inflamatória ao agente agressor, fazendo com que a maioria das éguas o elimine (HUGHES & LOY, 1969; RICKETTS & MACINTOSH, 1987; TROEDSSON et al., 1995). Isso se deve à ação dos chamados mecanismos de defesa uterina. Eles se dividem em: mecanismos físicos, celulares e humorais. Além destes, também o plasma seminal poderia colaborar com esses mecanismos de defesa.

Durante a década de 70 e parte dos anos 80 foi dada mais ênfase ao aspecto imunológico dos mecanismos de defesa uterina; seu comprometimento seria a principal causa de endometrite. Atualmente valoriza-se mais uma falha dos mecanismos físicos de defesa uterina, relacionando a limpeza mecânica e drenagem linfática como os maiores responsáveis pelo estabelecimento da endometrite persistente induzida pela cópula em éguas velhas e susceptíveis à endometrite.

Os resultados de ZENT & TROEDSSON (1998) que observaram 15% de uma população de reprodutoras da raça puro sangue de corrida com endometrite persistente pós-cobertura, reforçam a relevância desta enfermidade.

## 2.3 – MECANISMOS FÍSICOS

Nas fêmeas sadias, o útero é bem protegido da contaminação externa por barreiras físicas constituídas pela vulva, vestibulo, anel himenal, vagina e cérvix; o comprometimento destas barreiras predispõe à infecção (MATTOS, 1989; TROEDSSON et. al., 1993). O posicionamento da vulva e o fechamento dos lábios vulvares (CASLICK, 1937; SILVA, 1983), a eficiência da cérvix, a contratilidade do miométrio, a produção de muco pelo endométrio, a circulação sangüínea, a drenagem linfática, assim como a drenagem mecânica, têm sido considerados fatores importantes para a eliminação de bactérias e produtos inflamatórios do útero, constituindo-se em importantes linhas de defesa do trato genital (TROEDSSON, 1999).

### 2.3.1- Fechamento e Posicionamento Vulvar

Os lábios vulvares são formados pelo músculo constritor vulvar, que se funde ao esfíncter anal após circunscrever, como uma espécie de anel, o perímetro dos lábios vulvares. Este músculo é o responsável pelo fechamento da vulva. O músculo constritor vulvar ao unir-se ao ligamento suspensório do ânus, dorsalmente à comissura superior da vulva, promove o posicionamento vertical da vulva (SISSON & GROSSMAN, 1996). Os nervos pudendos e retais caudais, derivados do 3º e 4º nervos sacrais, inervam os músculos do vestibulo, vulva e pele vulvar. Ambos contribuem para a formação dos nervos perineais superficiais, que emergem ventro-lateralmente do ânus e inervam o lábio vulvar (KAINER, 1993).

A conformação vulvar ideal é aquela onde os lábios estão perfeitamente coaptados e em posicionamento vertical. Sua comissura superior deve encontrar-se, aproximadamente, ao mesmo nível do assoalho da pelve (CASLICK, 1937; ROSDALLE & RICKETTS, 1980; SILVA, 1983). Outra barreira adicional contra infecções ascendentes é formada pelo anel vulvo-vestibular ou himenal e o colapso da vagina. Alterações em qualquer dessas estruturas podem levar a falhas reprodutivas decorrentes da entrada de ar e conseqüente irritação e

contaminação do trato genital. PASCOE (1993) relatou que, de 502 éguas cobertas no cio do potro, 66% conceberam após a realização de vulvoplastia, ao passo que, das éguas não suturadas, apenas 34% conceberam.

Éguas mais velhas tendem a ter menos tônus muscular no músculo constritor vulvar e afrouxamento do ligamento suspensório do ânus, fazendo com que, além de haver fechamento insuficiente, o ânus tracione a vulva cranialmente. Isso induzirá a contaminação fecal e a entrada de ar no trato genital levando a irritação provocada pela pneumovagina que causa, finalmente, uma vaginite e, comumente, cervicite e endometrite ascendentes. Durante a gestação, essa condição pode também ocorrer devido ao peso do feto, fazendo com que sobrevenha placentite, septicemia fetal e muitas vezes aborto (EASLEY, 1993).

### 2.3.2 - Cérvix

A cérvix, na égua, é formada por duas camadas de musculatura lisa, contendo uma maior quantidade de fibras colágenas conjuntivas e um esfíncter de musculatura lisa derivado da camada interna do miométrio. Apresenta pregas longitudinais contínuas de mucosa no canal cervical, como as do endométrio do corpo uterino. O endométrio cervical é pálido, possuindo glândulas tubulares, células mucígenas e ciliadas (SISSON & GROSSMANN, 1996). Os principais fatores que interferem na função cervical e conseqüentemente, na introdução de agentes patogênicos, são as lacerações e traumas no momento do parto que podem impedir, total ou parcialmente, o seu fechamento (MATTOS, 1989). A drenagem cervical também é crítica para o acúmulo de secreção uterina, principalmente nas éguas que apresentam o útero pendular, “pendurado” na cavidade abdominal, dificultando a drenagem por ação da gravidade (LeBLANC et al., 1994b). Recomenda-se uma dilatação manual da cérvix associada à administração de ocitocina, por via intramuscular, e tratamentos na forma de lavagens uterinas em éguas susceptíveis à endometrite, para facilitar a eliminação de conteúdo existente no útero (PYCOCK, 1994).

### 2.3.3 - Contratilidade Miometrial

A contratilidade miometrial é considerada um potente mecanismo de limpeza uterina (LeBLANC et al., 1989), drenando os agentes contaminantes depositados no lume uterino por ocasião da cobertura, no que é auxiliada pelo relaxamento da cérvix (BLACK et al., 1953; MATTOS, 1989). Éguas mais velhas têm essa capacidade de limpeza diminuída. Após a cobertura, há maior acúmulo de líquidos, podendo ser este um meio ideal para o desenvolvimento bacteriano. Aparentemente, este mecanismo de limpeza também estaria, controlado pelo sistema nervoso (LeBLANC et. al., 1989; ALLEN & PYCOCK, 1989).

É necessário avaliar a ação do sistema nervoso em nível uterino para discutir possíveis causas da inabilidade contrátil. A inervação do útero é feita a partir dos plexos renal, aórtico, uterino e pélvico, que suprem de fibras simpáticas também os ovários, as tubas uterinas e a vagina. Este complexo é responsável pelo estímulo às terminações nervosas que estimulam a ação contrátil das fibras musculares lisas do útero (KAINER, 1993).

O mecanismo e as causas relacionadas com a habilidade reduzida do útero para realizar a contração coordenada da sua musculatura não é bem definido. Porém, pode-se considerar que a função dos canais de comunicação intercelulares (gap-junctions), responsáveis pela modulação síncrona das contrações uterinas, é essencial para a eliminação de antígenos que agridem o útero assim como para auxiliar no transporte dos gametas para o oviduto depois da cópula (THILANDER et al., 1993).

Os canais de comunicação intercelulares são representados por hiatos na parede celular, através dos quais podem passar correntes elétricas, íons e moléculas pequenas. Conseqüentemente, esses hiatos permitem a atividade metabólica e as respostas elétricas das células que conectam. Também permitem a passagem de moléculas de sinalização intracelular, como AMPc e  $Ca^{2+}$ , entre

células adjacentes, potencialmente coordenando as respostas celulares nos tecidos (LEHNINGER et al., 1995).

Segundo THILANDER et al. (1993), existem duas razões possíveis para a disfunção do miométrio: a primeira seria a diminuição do número de canais de comunicação no miométrio e, a segunda, a falha no miométrio para receber os sinais do endométrio para produzir esses hiatos. Estas conexões da musculatura lisa uterina possuem uma proteína, a Conexina 43 (CX 43), como seu componente antigênico mais importante. No miométrio, esta proteína foi encontrada em maior quantidade durante o cio do que durante o diestro, o que sugere uma relação hormônio-dependente na formação dos hiatos intercelulares do miométrio eqüino. No oviduto, não foi encontrada diferença significativa na concentração desta proteína entre as fases do ciclo (LEEUWEN et al., 1994).

TROEDSSON & LIU (1991) analisaram a atividade miometrial de éguas susceptíveis e resistentes à endometrite após a inoculação com *Streptococcus zooepidemicus* durante o estro. Nas primeiras oito horas, a atividade miometrial em ambos grupos era idêntica. Porém, no grupo de éguas susceptíveis, esta atividade diminuiu sensivelmente após este intervalo de tempo. Usando eletromiografia para registrar a atividade do miométrio, TROEDSSON et al. (1993) observaram que a dificuldade de eliminar a infecção uterina nas éguas susceptíveis estava associada à atividade miometrial reduzida em resposta à inflamação.

Para avaliar a função miometrial, LeBLANC et al. (1994a), inicialmente, utilizaram de forma experimental microesferas e carvão infundidos no útero para estudar o tempo de eliminação. Posteriormente, avaliando a eliminação de um radiocolóide do útero por cintilografia, demonstraram que, enquanto éguas resistentes drenam quase todo o conteúdo em trinta minutos, as susceptíveis não eliminam quase nada neste espaço de tempo. Porém nem todas as éguas classificadas como susceptíveis retiveram o material infundido e nem todas as consideradas resistentes eliminaram mais de 50% do mesmo. Após uma injeção

de ocitocina, tanto éguas susceptíveis como resistentes, eliminaram quase 90% do material (LeBLANC et al., 1994a e 1994b).

A prostaglandina  $F_2\alpha$  é um dos mediadores do processo inflamatório. Ela é secretada permanentemente durante a inflamação ou após a cópula pela ação direta do ejaculado sobre o endométrio causando contração miometrial, levando a uma rápida limpeza mecânica do conteúdo uterino (SCHALM, 1986; TROEDSSON, 1995). Quando aplicados inibidores da prostaglandina, como por exemplo, a indometacina, nas éguas sensíveis e resistentes à endometrite foi observado que elas não conseguiram realizar a eliminação de um colóide radioativo colocado no útero, caracterizando a importância da prostaglandina na drenagem mecânica do conteúdo uterino (LeBLANC et al., 1994b).

A contração uterina na égua pode ser induzida pela ocitocina independente da prostaglandina ou por sinergismo de ação de ambas (LeBLANC, 1997).

NIKOLAKOPOULOS et al. (1998), analisaram os níveis de ocitocina endógena liberada após a inseminação artificial com sêmen resfriado e diluído, não encontrando diferença significativa entre éguas resistentes e susceptíveis. No entanto, na avaliação dos níveis de prostaglandina  $F_2\alpha$  foram observados valores maiores nas éguas resistentes do que nas susceptíveis.

Foi avaliada nas éguas sensíveis e resistentes à endometrite, a pressão intra-uterina, depois da administração de ocitocina em diferentes doses (CADARIO, et al. 1999). Com a hipótese de que as éguas sensíveis à endometrite apresentassem menor amplitude nas ondas de contração uterina, assim como um tempo menor de contração, quando tratadas com baixas doses de ocitocina. Foi demonstrado um aumento dose-dependente na atividade uterina - a ocitocina na dose de 10UI promoveu nos dois grupos maior número e maior duração das contrações uterinas. A primeira onda contrátil uterina após a aplicação da ocitocina ocorre da ponta do corno, passando pelo corpo dirigindo-se até a cérvix, causando eliminação da maioria do conteúdo uterino. A ocitocina estimula alterações na pressão intra-uterina 30 a 65 segundos após sua aplicação e o pique de resposta ocorre 5 a 10 minutos após. A propagação da

pressão uterina e a força de contração parecem diminuir depois da primeira onda. Acredita-se que isto poderia ocorrer porque o útero diminuiria sua capacidade de resposta à ocitocina exógena por degradação hormonal, por retro-regulação dos receptores ou gasto dos “pós-receptores” e diminuição dos mediadores.

CADARIO et al. (1999a), avaliaram, ainda, a dinâmica da secreção da prostaglandina, presença de secreção intra-uterina e a limpeza uterina nas éguas sensíveis e resistentes à endometrite. Procuraram avaliar e entender a interação da ocitocina com a prostaglandina na presença de inflamação e acúmulo de secreção uterina. Nos primeiros 120 minutos, a prostaglandina plasmática não diferiu nas duas situações e a concentração de prostaglandina após a aplicação de ocitocina aumentou nas éguas sensíveis, o mesmo não ocorrendo nas resistentes. Este resultado não tem relação com a presença de secreção intra-uterina. Os autores sugeriram que nas éguas resistentes, durante o cio, a limpeza uterina depois da aplicação de ocitocina pode ser independente das liberações de  $\text{PGF}_2 \alpha$ .

Utilizando o clenbuterol, um  $\beta_2$  agonista, para avaliar a redução da atividade do miométrio e determinar o comprometimento da limpeza uterina após a infecção experimental, em éguas consideradas saudáveis, NIKOLAKOPOULOS & WATSON (1999) infectaram e avaliaram por ultra-sonografia éguas com conteúdo após lavagem uterina. Todas as éguas que receberam clenbuterol acumularam secreção intra-uterina e 40% tiveram grande crescimento bacteriano na cultura do lavado uterino. Nenhuma égua do grupo controle reteve secreção nem houve desenvolvimento bacteriano importante na cultura do lavado uterino. Desta forma, concluíram que a contratilidade uterina é importante na limpeza mecânica da secreção uterina, mas não, necessariamente, para a eliminação das bactérias.

Como a contratilidade e a limpeza uterina são menos eficientes nas éguas susceptíveis, se poderia deduzir que o estiramento do miométrio causado por repetidas gestações ocasionaria algum dano às terminações nervosas do miométrio, interferindo assim com a limpeza uterina (DeLILLE et al., 1998).

Observa-se que nem toda égua susceptível tem infecção bacteriana após uma agressão intra-uterina (NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 1997).

Considera-se que a endometrite persistente induzida pela cópula é causada mais por um defeito na contratilidade uterina do que por uma ineficiência dos outros mecanismos de defesa antibacteriana. Demonstrou-se que não é necessária uma grande motilidade uterina para a eliminação das bactérias do útero e que a secreção intra-uterina pode acumular-se na ausência de infecção. A rápida (48 horas) eliminação das bactérias sugere que os mecanismos de defesa não específicos do fluido uterino e a fagocitose realizada pelos neutrófilos são mais efetivos que os mecanismos imunológicos (TROEDSSON, 1999; NIKOLAKO-POULOS & WATSON, 1999).

#### 2.3.4 - Muco Uterino

O muco uterino é uma mistura complexa de glicoproteínas, proteoglicanos, lipídios, DNA, células e debris. Seu papel na defesa uterina ainda não foi estabelecido. A ação do muco no mecanismo de prevenção da infecção bacteriana ocorreria através da prevenção da adesão bacteriana ao epitélio luminal. O muco é secretado pelo epitélio e levado pelas contrações miométriais e células ciliadas até a cérvix. Acredita-se que sua ação ocorre principalmente através de suas propriedades biofísicas e pela neutralização das adesinas bacterianas por intermédio da IgA. Além disso a lactoferrina, presente no muco, reduziria a disponibilidade de ferro para a bactéria e a lisozima destruiria as paredes celulares (CAUSEY et al., 1997).

MORRESEY (1997) estudou o papel do aparelho mucociliar na eliminação de debris celulares do lume uterino comparando a percentagem de células ciliadas e não-ciliadas no endométrio de éguas susceptíveis e resistentes a endometrite. Observou que a percentagem de células ciliadas anormais é maior nas éguas com limpeza uterina retardada. CAUSEY et al. (1997) verificaram

alterações na produção de muco entre éguas susceptíveis e resistentes nas diferentes fases do ciclo estral. Observaram que o tapete de muco é maior nas éguas susceptíveis, possivelmente caracterizando maior inflamação uterina. Também constataram que na periferia de ninhos glandulares a produção de muco e o número de células ciliadas estão aumentados.

### 2.3.5 - Circulação Sangüínea e Drenagem Linfática

A artéria uterina, um ramo descendente da artéria ilíaca externa, se anastomosa em seu ramo caudal com um ramo da artéria vaginal originada da pudenda interna e irriga a porção caudal dos cornos e o corpo uterino (SISSON & GROSSMANN, 1996).

O fluxo linfático parte dos ovários, tubas e útero para os linfonodos aórticos lombares. Os vasos linfáticos do útero, vagina e vulva são aferentes dos linfonodos ilíacos mediais. Ocasionalmente, encontram-se linfonodos no ligamento largo do útero (KAINER, 1993).

Uma resposta inflamatória aguda normalmente ocorre a partir da deposição de sêmen no útero. Os achados clássicos incluem aumento da permeabilidade vascular, edema intersticial e aumento do fluxo linfático. Éguas pluríparas que se tornaram inférteis apresentam lacunas linfáticas no endométrio, o que sugere que a drenagem linfática pode estar prejudicada nestas éguas. De acordo com LeBLANC et al. (1994a), os vasos linfáticos e linfonodos, drenam o excesso de secreção e partículas da submucosa e do lume uterino, durante o diestro. As éguas susceptíveis demonstram lacunas linfáticas com estase linfática, na biopsia endometrial. Os vasos linfáticos não possuem musculatura lisa e precisam das contrações uterinas para movimentar a linfa dorsalmente. Éguas com drenagem linfática deficiente tendem a acumular conteúdo no útero, apresentar cistos linfáticos visíveis à ultra-sonografia e são, freqüentemente, inférteis (LeBLANC, 1997).

Os vasos linfáticos drenam partículas do lume uterino e reabsorvem o

fluido intramural que se acumula na parede uterina durante o estro. Os vasos linfáticos do útero drenam dorsalmente para os vasos linfáticos do ligamento largo, que desembocam nos linfonodos aórticos localizados lateralmente à aorta (GUYTON, 1991). Éguas com lacunas linfáticas e cistos uterinos têm capacidade de absorver tinta nanquim ou carvão, durante o diestro, que são partículas com afinidade pelos linfáticos, visualizando-se desta forma o trânsito até os linfonodos regionais (LeBLANC et al., 1995).

O padrão vascular de uma biopsia endometrial de éguas susceptíveis geralmente apresenta angiose de moderada a severa, seguidamente associada a endometrose. A angiose está relacionada à idade e ao número de partições. As angiopatias têm um papel importante na redução da perfusão endometrial e na diminuição da drenagem linfática (SCHOON et al., 1997).

#### 2.4 - MECANISMO HUMORAL

Após uma contaminação bacteriana no útero ocorre um rápido afluxo de secreções, que pode ser caracterizado como exsudato por envolver saída de proteínas e células sangüíneas do sistema vascular para o tecido intersticial ou cavidades. O exsudato uterino é rico em proteínas plasmáticas, fatores de opsonização e células inflamatórias (WATSON, 1988a).

KENNEY & KHALEEL, em 1975, isolaram pela primeira vez, as imunoglobulinas de secreções uterinas de eqüinos, IgGa, IgGc, IgT, IgM e IgA, por imunodifusão e imunofluorescência. MITCHELL et al. (1982), concluíram que a IgA é produzida e secretada localmente pela mucosa uterina. WIDDERS et al. (1985), através de eletroforese, demonstraram que a IgG é secretada no endométrio da égua.

O endométrio foi considerado por WIDDERS et al. (1985), como parte do sistema imune de mucosas, devido à sua capacidade de produzir e secretar

diferentes classes de imunoglobulinas. Foi observado que nas secreções uterinas de éguas susceptíveis à endometrite, encontraram-se mais imunoglobulinas que nas éguas resistentes (ASBURY et al., 1980; WILLIAMSON et al., 1983). Quando avaliadas diferentes classes de Ig nos dois grupos de éguas foram encontradas maiores concentrações de IgA e IgG nos lavados uterinos de éguas susceptíveis (ASBURY et al., 1980; WAELCHI & WINDER, 1991). Em contra-partida, TROEDSSON et al. (1993c) observaram experimentalmente as mesmas concentrações de IgA, quando examinaram éguas susceptíveis e resistentes. Já a concentração de IgG, e o complemento estavam diminuídos nas éguas susceptíveis. Concluíram, desta forma, que, provavelmente, a deficiência da defesa uterina em éguas susceptíveis não se deve à imunodeficiência local. Isto foi confirmado por JOHNSON et al. (1994) ao comparar as concentrações de opsoninas na secreção uterina de éguas ovariectomizadas tratadas com estrógeno ou progestágeno. A concentração de imunoglobulinas nestas secreções não teve efeito direto na fagocitose do *Streptococcus zooepidemicus*, sugerindo que outros fatores no ambiente uterino podem ser importantes na ativação das defesas uterinas.

LeBLANC et al. (1991) acreditam que os altos níveis de IgA seriam prejudiciais, pois poderiam diminuir a capacidade da IgM e da IgG de opsonizar, bloqueando os sítios antigênicos nas bactérias.

Segundo LIU & CHEUNG (1986) as imunoglobulinas, aparentemente, são componentes importantes da defesa uterina, mas seu papel na susceptibilidade à endometrite bacteriana ainda não está bem esclarecido. É possível que a interação entre Ig e neutrófilos seja mais importante que a concentração das Ig. Estudos imuno-histoquímicos do endométrio, realizados mais recentemente, sugerem que a concentração de Ig livres e o número de Ig ligadas a células permanecem constantes durante as fases do ciclo estral. Contudo, éguas com endometrite persistente têm um aumento do número de imunoglobulinas ligadas a células quando comparadas com as éguas sadias. TROEDSSON (1999) considera, assim, que a eficiência da defesa uterina na égua não é

exclusivamente dependente dos fatores humorais.

A concentração de proteínas no lavado uterino foi estudada por muitos autores. Os resultados são desconhecidos quanto à relação da concentração de proteínas com a susceptibilidade (ASBURY et al., 1980; PYCOCK & ALLEN, 1990). Através de eletroforese, BADER et al. (1997), detectaram os tipos de proteínas existentes no lavado uterino de éguas. Nas éguas resistentes a endometrite, durante a fase lútea, foram detectadas três bandas típicas de proteínas (22kDa, 17kDa e <6,5kDa). Quando foram observadas 10 éguas susceptíveis, apenas uma apresentou o mesmo padrão descrito anteriormente, as demais tiveram ausência nas bandas 17 e 22kDa. Quando se avaliou a fertilidade verificou-se que estas éguas não ficaram prenhes.

## 2.5 - MECANISMO CELULAR

No útero, os neutrófilos são os principais responsáveis pela fagocitose. Eles estão presentes no útero de éguas saudáveis trinta minutos após uma infecção experimental (ALLEN & PYCOCK, 1989). Eles são formados na medula óssea, de onde migram para os tecidos. São células arredondadas, com cerca de 12µm de diâmetro, com núcleo segmentado ou em forma de bastão contendo grânulos citoplasmáticos (SCHALM, 1986; TIZARD, 1996).

Após a cópula, os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) estão presentes no lume uterino em trinta minutos, atingindo a maior concentração oito horas depois. Permanecem no lume por um período prolongado, sendo que na endometrite a degranulação pode ser exacerbada o que pode causar migração de mais neutrófilos, IgG e proteínas para o local (KATILA, 1995 e 1997).

Os neutrófilos obtidos do útero de éguas com histórico de infertilidade, mantêm sua capacidade de deformação na diapedese inalterada, até doze horas após o início do processo inflamatório, tornando-se posteriormente inativos, o que não ocorre nas éguas saudáveis. Porém, os mesmos autores não encontraram diferenças quanto à fagocitose e quimiotaxia dos neutrófilos sanguíneos entre

éguas susceptíveis e resistentes (LIU et al., 1985; BARROS, 1997). Para WATSON et al. (1987), os neutrófilos sangüíneos e uterinos de éguas susceptíveis têm menor capacidade migratória e fagocítica, respectivamente, que os de éguas resistentes. Os produtos tóxicos da atividade bactericida poderiam estar deprimindo a função dos neutrófilos uterinos, assim como defeitos na quimiotaxia e na fagocitose podem resultar em capacidade bactericida menor (ALLEN & PYCOCK, 1989). Contrariando estes dados, TROEDSSON et al. (1993b), em vários experimentos, comparando fagocitose e quimiotaxia de leucócitos uterinos e sangüíneos de éguas susceptíveis e resistentes, verificaram que os leucócitos uterinos de éguas susceptíveis apresentaram maior fagocitose e quimiotaxia do que os de éguas resistentes, quando incubados com plasma homólogo ou heterólogo. As secreções uterinas, entretanto tiveram poder opsonizante reduzido. Estes autores concluíram que a fagocitose defeituosa dos neutrófilos uterinos em éguas susceptíveis seria resultado de disfunção na opsonização, ao invés de uma disfunção primária dos neutrófilos. A fagocitose e a quimiotaxia de neutrófilos polimorfonucleares uterinos e sangüíneos de éguas susceptíveis foram maiores que as de éguas resistentes, quando a secreção uterina foi utilizada como quimioatrativo.

Através de quimiluminescência ZALAVARY et al. (1996), observaram a importante interação das plaquetas com os neutrófilos no processo inflamatório. Neste experimento foi medida a fagocitose e a respiração dos neutrófilos, que foram potencializadas na presença das plaquetas. Também ficou demonstrado que elas potencializam a fagocitose mediada por IgG através de um mecanismo ATP-dependente.

A apoptose, que também está associada à perda de função dos neutrófilos, foi impedida quando os neutrófilos foram separados do sangue total utilizando a dextrose como gradiente de separação. Quando plaquetas foram cultivadas “in vitro” junto com neutrófilos separados do sangue total com auxílio da dextrose, também se evitou a apoptose dos neutrófilos e sua vida funcional foi prolongada (ANDONEGUI et al., 1997).

Propriedades quimioatrativas da secreção uterina de eqüinos têm sido descritas *in vitro*. O útero responde rapidamente ao antígeno com a liberação de mediadores quimiotáticos para neutrófilos polimorfonucleares. Isto leva a uma rápida migração destes para o lume uterino. Produtos do complemento, como os leucotrienos B<sub>4</sub>, prostaglandina E e prostaglandina F<sub>2</sub>α, também podem ser quimioatrativos para neutrófilos no útero. A cascata de complemento medeia os processos biológicos que servem de defesa contra o agente, incluindo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, opsonização, fagocitose, ativação das lipases de membrana e lise do agente (TROEDSSON, 1999).

## 2.6 - PLASMA SEMINAL

O plasma seminal induz as contrações vaginal e uterina (CRANE & MARTIN, 1991) e facilita o transporte dos espermatozóides até o oviduto. No coelho, os espermatozóides sem a presença de plasma seminal, morrem e não chegam ao oviduto. Quando se adiciona solução salina podem-se observar espermatozóides móveis no oviduto (OVERSTREET & TOM, 1982).

No garanhão, o plasma seminal é composto das secreções do epidídimo, da ampola do canal deferente, da próstata, das vesículas seminais e das glândulas bulbo-uretrais (TISCHNER et al., 1975). Seus componentes têm a função de proteger os espermatozóides contra agentes oxidantes e peroxidantes (MANN, 1975), além de atuar no metabolismo dos espermatozóides (MAGISTRINI et al., 1995).

O plasma seminal eqüino é considerado como um fator extrínseco de defesa uterina da égua. O plasma seminal inibe a quimiotaxia dos neutrófilos *in vitro*. Como os espermatozóides são capazes de induzi-la através da ativação do complemento, a remoção do plasma seminal do sêmen congelado poderia explicar a maior reação inflamatória verificada após a inseminação artificial com sêmen congelado (TROEDSSON et al., 1997).

KATILA (1997) também demonstrou que o plasma seminal induz as contrações vaginais e uterinas, facilitando assim a limpeza física e o transporte dos gametas até o oviduto. TROEDSSON et al. (1997) verificaram que praticamente nenhum neutrófilo migrou em direção ao plasma seminal, quando avaliaram em câmara quimiotáxica o comportamento dos neutrófilos frente a diferentes amostras de sêmen associado ou não à presença de plasma seminal. Por isso deduzem que o plasma seminal tem papel importante no controle da endometrite após a cópula. O sêmen, fresco e congelado, provocou a quimiotaxia dos leucócitos em grande escala. Provavelmente a modulação da inflamação após a cópula pelo plasma seminal ocorra através da inibição do complemento. A retirada do plasma seminal dos ejaculados antes da inseminação artificial pode alterar a regulação normal da inflamação (TROEDSSON et al. 1998).

## 2.7 - INFLUÊNCIA DO CICLO ESTRAL

Vários estudos avaliaram a influência do ciclo estral na susceptibilidade às endometrites na égua, comparando essa influência aos demais mecanismos de defesa uterina.

Medindo as concentrações de imunoglobulinas, ASBURY et al. (1980) e MITCHEL et al. (1982), encontraram maiores concentrações de imunoglobulinas em lavados uterinos obtidos na fase de diestro, quando comparado com o estro. Já WATSON & STOKES (1988) não encontraram diferença nas concentrações de imunoglobulinas nos lavados obtidos de éguas ovariectomizadas tratadas com estrógeno ou progesterona.

Para testar a influência da fase do ciclo estral sobre a quimiotaxia dos neutrófilos testou-se a secreção uterina de éguas em estro ou diestro como quimioatraente (STRZEMIENSKI & KENNEY, 1984). A capacidade de atrair leucócitos foi a mesma para a secreção uterina de estro e diestro. Em contrapartida WATSON (1988a), encontrou em éguas ovariectomizadas, elevada quimiotaxia sob influência da progesterona e reduzida na presença de estradiol.

A adesão de *Streptococcus zooepidemicus* às células epiteliais do endométrio, *in vitro*, também foi maior nas éguas tratadas com progesterona (WATSON et al., 1988).

O estrógeno tem importante ação na limpeza física do útero: promove a abertura da cérvix, essencial para a eliminação de secreção uterina, bem como favorece a contratilidade miometrial, como foi demonstrado através da eletromiografia por TROEDSSON et al. (1993c).

Os hormônios esteróides atuam na contratilidade do miométrio, através da polarização da membrana e excitabilidade miometrial. A impregnação estrogênica em ratos, no final da gestação ou durante o estro está associada com a diminuição do potencial de repouso da fibra miometrial, que diminui de -70 mV aos 15 dias de gestação, para -55mV a termo. Isto ocorre por diminuição do potencial de excitabilidade do miométrio. Ao mesmo tempo o miométrio de ratos, sob impregnação estrogênica, apresenta aumento de 60% dos canais ocludentes de cálcio e sua afinidade pode também aumentar. A consequência deste efeito estrogênico é um aumento do suprimento de  $Ca^{++}$  causando um influxo maciço de íons de  $Ca^{++}$  para a fibra miometrial. A formação do complexo  $Ca^{++}$  calmodulina ativa a cadeia leve de miosina-quinase (MLCK) como resultado da fosforilação da cadeia leve de miosina (LC 20), necessária para a interação actina-miosina no processo de contração muscular. Este mecanismo pode ser melhorado em 40% no coelho, por ação do estradiol com aumento da calmodulina miometrial. A progesterona também aumenta o seqüestro de íons de  $Ca^{++}$  na cisterna do retículo sarcoplasmático (MALTIER et al., 1993).

O estradiol ativa o sistema actomiosina-ATPase, liberando a energia necessária para a contração. A conexão elétrico-metabólica das células miometriais é carregada através das junções de comunicação. Estas permitem a propagação dos sinais elétricos e a sincronização das ondas contráteis, através do útero. Em todas as espécies estudadas, o número e a superfície das junções de comunicação no miométrio são limitados durante a prenhez, aumentando drasticamente com a proximidade do parto. Esta mudança está correlacionada

com a relação progesterona-estrógeno. Isto nos leva a crer que a redução da relação progesterona-estrógeno favorece a contração uterina (MALTIER et al., 1993).

### 3. CAPITULO 1

## **Avaliação da Limpeza Uterina na Égua 24 e 48 horas após Infusão de 250 e 500 mg de Carvão**

### **RESUMO**

A endometrite persistente após cobertura é uma das causas mais comuns de infertilidade na égua relacionada com a falha nos mecanismos físicos de defesa uterina – limpeza mecânica e drenagem linfática. Com o objetivo de se aferir a capacidade de limpeza uterina na égua, foram realizadas infusões uterinas de 250 e 500mg de carvão seguidas de lavagem uterina realizada 24 e 48 horas após. O lavado uterino foi avaliado conforme o aspecto imediatamente após a lavagem e, posteriormente, verificada a quantidade de carvão na matéria seca. Quarenta éguas, entre 4 e 23 anos, com histórico de infertilidade de, no mínimo, dois anos e com sinais clínicos/histológicos de endometrite/endometrose e falha na eliminação do conteúdo uterino após a cópula. Independentemente da dose, as éguas com alterações mais severas do endométrio não limpam o carvão infundido tão rápido quanto as éguas controle. Aparentemente, o período de 48 horas após a infusão é melhor que o de 24 horas, para avaliar a capacidade de limpeza uterina do carvão.

Palavras-chave: Égua, endometrite, carvão, drenagem linfática, limpeza uterina

### **SUMMARY**

The persistent mating-induced endometritis consists in one of the common causes of infertility in the mare related to a failure in the uterine physical clearance mechanisms (lymphatic drainage and mechanic clearance). In order to evaluate the uterine clearance in the mare uterine infusions were performed with 250 and 500mg of charcoal followed by uterine lavage 24 and 48 hours after the infusions. The uterine fluid was evaluated according to color immediately after the lavage and later the amount of charcoal was determined by dry weight. Forty mares, from 4-23 years of age, with a two-year history of infertility and clinical/histological signs of endometritis/endrometrosis and uterine clearance failure were used in this study. Independently of the dose, mares with more severe endometrial histological changes did not clear the infused charcoal as fast as the control mares. It seems that a period of 48 hours after infusion is better than 24 hours to perform an evaluation of the uterine clearance capacity.

Key words: Mare, endometritis, charcoal, lymphatic drainage, uterine clearance

## INTRODUÇÃO

Endometrite é a alteração inflamatória aguda ou crônica que ocorre no endométrio, geralmente de natureza infecciosa (KENNEY, 1993). O processo inflamatório que se desenvolve a partir da contaminação, torna muitas vezes o ambiente uterino incompatível com a vida embrionária e fetal.

Os mecanismos de defesa uterina dividem-se em mecanismos físicos, celulares e humorais. Além destes, também o plasma seminal poderia colaborar com esses mecanismos de defesa.

Durante a década de 70 e parte dos anos 80 foi dada mais ênfase ao aspecto imunológico dos mecanismos de defesa uterina; seu comprometimento seria a principal causa de endometrite. Atualmente, valoriza-se mais uma falha dos mecanismos físicos de defesa uterina – limpeza mecânica e drenagem linfática – como os maiores responsáveis pelo estabelecimento da endometrite persistente induzida pela cópula em éguas velhas e susceptíveis a endometrite.

Demonstrou-se que não é necessária uma grande motilidade uterina para a eliminação das bactérias do útero e que a secreção intra-uterina pode acumular-se na ausência de infecção. A rápida (48 horas) eliminação das bactérias sugere que os mecanismos de defesa não específicos do fluido uterino e a fagocitose realizada pelos neutrófilos são mais efetivos que os mecanismos imunológicos (TROEDSSON, 1999; NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 1999).

A contratilidade miometrial é considerada um potente mecanismo de limpeza uterina (LeBLANC et al., 1989), drenando os agentes contaminantes depositados no lume uterino por ocasião da cobertura, no que é auxiliada pelo relaxamento da cérvix (BLACK et al., 1953; MATTOS, 1989). Éguas mais velhas têm essa capacidade de limpeza diminuída. Após a cobertura, há maior acúmulo de líquidos, podendo ser este um meio ideal para o desenvolvimento bacteriano. Aparentemente, este mecanismo de limpeza também estaria, controlado pelo sistema nervoso (LeBLANC et al., 1989 ; ALLEN & PYCOCK, 1989).

EVANS et al. (1986 e 1987) utilizaram a inoculação de microesferas e carvão no útero de éguas de diferentes idades e sob a influência exógena de hormônios esteróides, para avaliar a relação do mecanismo de limpeza físico com a permanência da infecção uterina. Observaram a eficácia dos inócuos para esta avaliação e concluíram que as éguas mais velhas têm maior dificuldade de eliminar o conteúdo uterino, principalmente, sob a influência da progesterona.

Avaliando os mecanismos de limpeza uterina no período pós-ovulatório LeBLANC et al. (1989), também utilizaram inócuos como os descritos por EVANS et al. (1986) e observaram que existe uma disfunção nos mecanismos celular e bactericida no período pós-ovulatório, mas acreditam que estes mecanismos não tenham relação com o mecanismo de limpeza uterina do material inoculado.

Novamente, LeBLANC et al. (1994a) utilizaram a infusão de microesferas e carvão no útero para estudar o tempo de limpeza uterina e a função miometrial. Posteriormente, avaliando a eliminação de um radiocolóide do útero por

cintilografia demonstraram que, enquanto éguas resistentes drenam quase todo o conteúdo em trinta minutos, as susceptíveis não eliminam praticamente nada neste espaço de tempo. Porém, nem todas as éguas classificadas como susceptíveis retiveram o material infundido e nem todas as consideradas resistentes eliminaram mais de 50% do mesmo. Após uma injeção de ocitocina, tanto éguas susceptíveis como resistentes eliminaram quase 90% do material (LeBLANC et al., 1994a e 1994b).

As éguas que apresentam um útero pendular, “pendurado” na cavidade abdominal, tem a drenagem cervical diminuída, acumulando secreção uterina, demonstrando dificuldade na drenagem por ação da gravidade (LeBLANC et al., 1994b).

Como a contratilidade e a limpeza uterina são menos eficientes nas éguas susceptíveis, poderia-se deduzir que o estiramento do miométrio causado por repetidas gestações ocasionaria algum dano às terminações nervosas do miométrio, interferindo assim com a limpeza uterina (De LILLE et al., 1998).

A limpeza uterina teria uma relação com a secreção de ocitocina, prostaglandina e seus metabólitos, isto foi documentado por CADARIO et al. (1995 e 1999), quando avaliaram a eliminação uterina de radiocolóide, por cintilografia, em éguas no cio, e a função da ocitocina na secreção de prostaglandina em éguas consideradas saudáveis e com retardo na eliminação da infecção uterina.

Éguas pluríparas que se tornaram inférteis apresentam lacunas linfáticas no endométrio, o que sugere que a drenagem linfática pode estar prejudicada nesses animais. De acordo com LeBLANC et al. (1994a), os vasos linfáticos e linfonodos, drenam o excesso de secreção e partículas da submucosa e do lume uterino, durante o diestro. As éguas susceptíveis demonstram lacunas linfáticas com estase linfática, na biopsia endometrial. Os vasos linfáticos não possuem musculatura lisa e precisam das contrações uterinas para movimentar a linfa dorsalmente. Éguas com drenagem linfática deficiente tendem a acumular conteúdo no útero, apresentar cistos linfáticos visíveis à ultra-sonografia e são, freqüentemente, inférteis (LeBLANC, 1997).

Os vasos linfáticos drenam partículas do lume uterino e reabsorvem o fluido intramural que se acumula na parede uterina durante o estro. Os vasos linfáticos do útero drenam dorsalmente para os vasos linfáticos do ligamento largo, que desembocam nos linfonodos aórticos localizados lateralmente à aorta (GUYTON, 1991). Éguas com lacunas linfáticas e cistos uterinos têm capacidade de absorver tinta nanquim ou carvão, durante o diestro, que são partículas com afinidade pelos linfáticos, visualizando-se desta forma o trânsito até os linfonodos regionais (LeBLANC et al., 1995).

O padrão vascular de uma biopsia endometrial de éguas susceptíveis geralmente apresenta angiose de moderada a severa, seguidamente, associada a endometrose. A angiose está relacionada à idade e ao número de partições. As angiopatias têm um papel importante na redução da perfusão endometrial e na diminuição da drenagem linfática (SCHOON et al., 1997).

Como uma forma de se avaliar a capacidade mecânica de limpeza uterina utilizou-se a infusão de carvão no útero da égua em duas diferentes concentrações, fazendo-se, posteriormente, a lavagem uterina em intervalos diferentes, avaliando-se a presença do carvão no útero como um meio diagnóstico para se avaliar a função endo-miometrial e a drenagem linfática de animais susceptíveis ou não a endometrite. Procurou-se também definir a dose de carvão mais apropriada para a infusão e o intervalo ideal entre a infusão e a lavagem uterina, que melhor se adaptem para a avaliação da limpeza uterina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 40 éguas, sem raça definida, com idade entre 4 a 23 anos, peso entre 420 e 580 kg, do município de Bagé -RS.

A seleção das éguas foi feita levando-se em conta o histórico clínico ginecológico de no mínimo dois anos vazia, buscando-se animais com ou sem sinais clínicos e histológicos de endometriose ou endometrite crônica e falha na eliminação do conteúdo uterino após a cópula.

Estas éguas foram avaliadas quanto à sua capacidade reprodutiva por um estudo do histórico clínico e exame ginecológico que constou de exame clínico e como métodos complementares: vaginoscopia, ultra-sonografia, citologia, bacteriologia e histologia.

Só foram usados animais em bom estado nutricional e sanitário e todos foram mantidos sob as mesmas condições de manejo.

Para efeito experimental as éguas foram divididas em três grupos conforme seu histórico clínico, anamnese e exame ginecológico:

- Grupo 1: Éguas clinicamente sadias, sem histórico de sub-fertilidade e com classificação histológica do endométrio do Gr.I, segundo KENNEY (1978) ou sem alteração e do Gr.I, segundo SILVA et al. (1987), com uma média de idade de 11 anos (4-18);
- Grupo 2: Éguas com histórico de endometrite crônica, com retardo na eliminação do conteúdo uterino após a cobertura e com classificação histológica do endométrio do Gr.II, segundo KENNEY (1978) e SILVA et al. (1987), com uma média de idade de 16 anos (8-23), e,
- Grupo 3: Éguas com histórico de endometriose, endometrite crônica e/ou retardo na eliminação do conteúdo uterino após a cobertura e com classificação histológica do endométrio no grupo II e III, segundo KENNEY (1978) e SILVA et al. (1987), com uma média de idade de 17 anos (16-21).

Das quarenta éguas, trinta e oito receberam infusão de carvão<sup>1</sup> no segundo dia do estro (n = 38), quando se observava um folículo igual ou maior que 30mm. As doses de carvão foram de 250 e 500mg, utilizadas em ciclos subsequentes para cada égua. A cada infusão o carvão foi diluído em 20ml de água destilada. As 38 éguas, tiveram o útero lavado com 500ml de uma solução de NaCl a 0,9% após 24 e 48 horas da infusão. Este procedimento foi definido aleatoriamente, com isso todas as éguas receberam as duas doses de carvão e tiveram seu útero lavado nos dois períodos de tempo, como: 500mgX24hs e 250mgX48hs. Desta forma as 38 éguas receberam a infusão de carvão na dose de 250mg e 500mg, assim como foram realizadas 38 lavagens 24 horas após a infusão e 38 lavagens 48 horas após, respectivamente para cada égua.

Das 40 éguas descritas inicialmente, duas foram descartadas do trabalho por razões de saúde geral.

---

1 – Carvão Ativado: VIDAPURA – Industria Farmacêutica Basa Ltda. - Av. Rossetti, 695, Caxias do Sul –RS. Brasil.

As lavagens uterinas, após a infusão do carvão, foram realizadas utilizando-se uma sonda tipo bivona®, que foi introduzida no útero por via vaginal, sendo posicionada logo após a passagem pela cérvix, tendo seu balão inflado com 10 a 30cm<sup>3</sup> de ar conforme o lume do corpo do útero e, através dela, foram introduzidos 500ml da solução de NaCl 0,9%. Este conteúdo foi mantido no útero por 5 minutos enquanto foi realizada massagem uterina por via retal. Logo após foi retirado por sifonagem o conteúdo e o mesmo armazenado em uma garrafa plástica transparente para avaliação imediata e posterior exame do conteúdo. Este material foi homogeneizado, separado e retiradas alíquotas de 20ml, colocando-as em tubos de ensaio do mesmo volume, fechados, identificados e congelados a -5°C para análise. Cada amostra foi submetida à desidratação e pesagem, para determinação da quantidade de carvão em cada alíquota, segundo a técnica descrita por EVANS et al. (1986).

Para avaliação clínica da secreção colhida, após a lavagem uterina, utilizou-se um padrão subjetivo de avaliação da coloração da amostra da lavagem, conforme a observação visual, com índices de 1 a 3, onde:

- C1 representa o conteúdo límpido e transparente, aparentemente sem a presença de carvão; onde C1 tem o mesmo aspecto visual da solução de NaCl 0,9%;
- C2 conteúdo gris, caracterizando a presença moderada de carvão; onde C2 tem o aspecto da coloração de uma solução contendo de 0,020g até 0,141g de carvão em 500ml de NaCl 0,9%, e,
- C3 conteúdo gris, caracterizando a presença acentuada de carvão; onde C3 tem o aspecto da coloração de uma solução contendo 0,231g de carvão ou mais, em 500ml de NaCl 0,9%.

Foram realizadas biopsias endometriais no período de 15 dias antes da infusão de carvão, 48 horas após a lavagem uterina e trinta dias após, para avaliação da condição endometrial por histologia e verificação de possíveis danos causados pelo carvão no endométrio.

#### Desenho Estatístico:

Utilizou-se delineamento fatorial 2 x 2, inteiramente casualizado com 38 repetições. Avaliando-se as doses de 250 e 500 mg carvão (n =76), com dois períodos, 24 e 48 horas, para lavagem uterina após a infusão (n =38), relacionando-se infusão nas diferentes doses e tempo de lavagem após a infusão. O teste estatístico Qui quadrado (X<sup>2</sup>), foi realizado considerando o resultado da lavagem uterina, tempo, dose e peso do carvão nas alíquotas.

Foi realizado delineamento fatorial 3 x 2 x 2, inteiramente casualizado, avaliando-se os grupos, dose de carvão e período para lavagem uterina. O teste estatístico Qui quadrado (X<sup>2</sup>), análise de variância e desvio padrão, foram realizados considerando o resultado da lavagem uterina, tempo, dose e peso do carvão nas alíquotas.

Nas duas avaliações foi feito teste Tukey.

Os testes estatísticos foram realizados através do Pacote Estatístico SAS-General Linear Models Procedure,(1997).

## RESULTADOS

Observa-se a relação das doses e a classificação visual das lavagens uterinas, no Quadro 1, analisando-se em separado o tempo de 24 e 48 horas para realização da lavagem uterina, após a infusão de 250 e 500 mg de carvão, nos diferentes grupos de éguas, separados conforme a avaliação clínica e histológica. Obteve-se no grupo controle, uma maior incidência de C1, sendo que as duas únicas amostras consideradas C2 foram obtidas quando se fez a lavagem 24 horas após a infusão. No grupo 2, vê-se também uma maior incidência de C1 e C2, com evidente aumento de amostras classificadas como C3 quando se fez a lavagem uterina 24 horas após a infusão de carvão. Na avaliação das éguas do grupo 3, das quatorze lavagens realizadas 12 tiveram aspecto de C2 e C3, neste grupo não ficou caracterizado grande variação, quando comparou-se o intervalo de tempo entre a infusão e as lavagens.

Quadro 1 – Relação da dose de 250 e 500 mg de carvão, com o intervalo da lavagem uterina 24 e 48 horas após a infusão e a classificação visual do lavado uterino das éguas nos grupos: G1- Controle, G2 e G3.

Grupos	Dose	Lavado	n	C1	C2	C3
G1	500 mg	24hs	4	3	1	0
		48hs	4	4	0	0
	250 mg	24hs	4	3	1	0
		48hs	4	4	0	0
Sub-total			16	14	2	-
G2	500 mg	24hs	14	4	9	1
		48hs	9	7	2	0
	250 mg	24hs	9	2	6	1
		48hs	14	8	6	0
Sub-total			46	21	23	2
G3	500 mg	24hs	5	1	3	1
		48hs	2	0	1	1
	250 mg	24hs	2	0	1	1
		48hs	5	1	2	2
Sub-total			14	2	7	5
Total			76	37	32	7

Na comparação do efeito da dose de carvão utilizada, com o aspecto da lavagem uterina, nota-se uma característica semelhante entre o lavado uterino

colhido após a infusão de 250 e 500 mg de carvão. Depois do exame visual para definir a classificação dos diferentes resíduos na lavagem uterina foi realizado teste estatístico, não sendo possível encontrar diferença estatisticamente significativa, apesar de parecer existir um discreto aumento dos lavados na classificação C3, com a utilização da dose de 500 mg de carvão (Tabela 1).

Tabela 1- Classificação dos resíduos na lavagem do lume uterino de éguas após a infusão de 250 e 500 mg de carvão.

Dose (mg)	Classificação Visual							
	C 1		C 2		C3		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
250	19	50,0	12	42,1	7	7,9	38	100
500	18	48,7	9	40,8	11	10,5	38	100
Total	37		21		18		76	

$p > 0,1$

Quando se avalia o lavado uterino, distinguindo o tempo de lavagem uterina após a infusão de carvão (tabela 2), deduz-se que existe diferença, entre as lavagens realizadas 24 e 48 horas após a infusão. Percebe-se que existe uma maior incidência de C1 quando a lavagem é realizada 48 horas após a infusão ( $p < 0,06$ ).

Comparando-se os lavados uterinos nas classificações C2 e C3 com o efeito do tempo, verifica-se que também existe diferença entre os tratamentos. Provavelmente as amostras que lavadas após 24 horas resultaram no escore C2 realmente estariam em C1 caso houvesse tempo hábil para que o carvão fosse eliminado/drenado do útero.

Conclui-se que quando a lavagem é realizada 24 horas após a infusão de carvão as éguas levam mais tempo para realizar a limpeza do útero.

Tabela 2- Características da lavagem uterina na égua colhida após 24 e 48 horas da infusão de carvão em 76 procedimentos.

Tempo (h)	Classificação Visual							
	C 1		C 2		C3		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
24	13	34,2 <sup>a</sup>	21	55,3 <sup>a</sup>	4	10,5	38	100
48	24	63,2 <sup>b</sup>	11	28,9 <sup>b</sup>	3	7,9	38	100
Total	37		32		7		76	

$X^2 = 6,565$ ;  $p < 0,06$

a e b;  $p < 0,001$

Quando foi avaliada a dose de 250 mg de carvão comparando-se com o efeito dos intervalos para a lavagem uterina de 24 e 48 horas, observa-se diferença significativa entre tratamentos ( $p > 0,001$ ). Portanto quando avalia-se em

separado os valores absolutos e percentuais dos escores de lavagem C1 obtêm-se a diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ), demonstrando que mesmo com a dose 250 mg de carvão, a lavagem 24 horas após não permite que as éguas tenham tempo para eliminar/drenar o carvão, com isto tem-se uma maior incidência de amostras no escore C2 e algumas C3 em relação as lavadas 48 horas após a infusão.

Isto fica muito evidente quando observa-se as éguas que têm o útero lavado 48 horas após a infusão e 73,3% delas conseguem eliminar/drenar o carvão, apresentando escore C1 (Tabela 3).

Tabela 3 - Relação entre a infusão intra-uterina da dose de 250 mg de carvão e a classificação visual da lavagem uterina realizada 24 e 48 horas após.

Tempo (h)	Classificação com infusão de 250 mg de carvão							
	C 1		C 2		C3		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
24	8	34,8 <sup>a</sup>	13	56,5 <sup>a</sup>	2	8,7	23	100
48	11	73,3 <sup>b</sup>	3	20,3 <sup>b</sup>	1	6,7	15	100
Total	19		16		3		38	

a e b;  $p < 0,001$

Quando foi avaliada a dose de 500 mg de carvão comparando-se com o efeito dos intervalos para a lavagem uterina de 24 e 48 horas, nota-se situação parecida com a descrita anteriormente. As éguas com o aumento da dose de carvão demonstraram que necessitam mais tempo para limpar o útero, evidenciando que quando utiliza-se a lavagem 48 horas após a infusão de 500 mg de carvão as éguas conseguem em tempo hábil eliminar/drenar o carvão, também ocorrendo um número crescente de éguas para o escore C1, quando comparado com as éguas lavadas com 24 horas, que apresentam uma distribuição mais homogênea, mantendo um acréscimo da incidência em direção ao escore C1 (Tabela 4).

Tabela 4 - Relação entre a infusão da dose de 500 mg de carvão e a classificação visual da lavagem uterina realizada 24 e 48 horas após.

Tempo (h)	Classificação com infusão de 500 mg de carvão							
	C 1		C 2		C3		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
24	5	33,4 <sup>a</sup>	8	53,3 <sup>a</sup>	2	13,3	15	100
48	13	56,5 <sup>b</sup>	8	34,8 <sup>b</sup>	2	8,7	23	100
Total	18		16		4		38	

a e b;  $p < 0,05$

Comparando-se a classificação do aspecto da lavagem uterina com a da clínica e histológica, na Tabela 5, percebe-se que no Grupo 1, mais de 2/3 das

éguas eliminaram todo o carvão infundido (C1) e o terço restante, também, apresentou uma acentuada eliminação (C2). No Grupo 2, a maioria das éguas conseguiu eliminar o carvão. Verifica-se que na classificação C1 e C2 colocaram-se em torno de 91% das éguas e os 9% restantes na classificação C3. No Grupo 3, apenas 14,3% das éguas eliminaram todo o carvão (C1), outras 50% expeliram de forma intermediária (C2), e 35,7% tiveram dificuldade em expulsar o carvão (C3).

Pode-se ver uma diferença significativa entre as éguas, quando se relacionam os grupos teste com o aspecto do lavado uterino. Quanto maior a alteração clínico-histológica maior é o número de éguas que demonstram dificuldades de eliminar/drenar o carvão infundido ( $p < 0,001$ ).

Tabela 5 – Descrição da classificação clínica e histológica das éguas comparada ao aspecto do lavado uterino 24 e 48 horas após a infusão de 250 e 500 mg de carvão.

Classificação	Aspecto do lavado uterino após infusão de carvão							
	C 1		C 2		C3		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Grupo 1	14	87,5	2	12,5	0	-	16	21,05
Grupo 2	21	45,7	23	50,0	2	4,3	46	60,53
Grupo 3	2	14,3	7	50,0	5	35,7	14	18,42
Total	37		32		7		76	100,0

$X^2=37.948$   $p.<0,001$

Quando se compara o quadro histológico das biópsias endometriais colhidas antes da infusão de carvão, qualquer que fosse a dose utilizada, com as colhidas 48 horas depois da lavagem uterina, observa-se que 18,42% ( $n = 7/38$ ) delas apresentaram infiltrado celular, caracterizando o agravamento no quadro histológico. Isto ocorre imediatamente após a infusão. Essa alteração só foi confirmada em uma (2,63%) das 38 biópsias realizadas um mês após a infusão (Quadro 2).

Quadro 2 - Comparação entre a classificação das biópsias imediatamente antes e após o Experimento 1, com a classificação das biópsias colhidas 30 dias após as infusões.

Avaliação da biópsia endometrial	Amostras (n)	%
Sem modificação	30	78,95
Com modificação	7	18,42
Mantendo a modificação	1	2,63
Total de éguas examinadas	38	100,0

$p. <0,001$

Observando o peso do carvão nas alíquotas colhidas da lavagem uterina nos diferentes grupos de éguas conforme a classificação clínica e histológica, fica evidente que as éguas do grupo controle tem a menor quantidade de carvão, 4mg, enquanto as éguas do grupo 2 tem 13mg, que é três vezes mais que no grupo anterior e 25mg no grupo 3, que é praticamente o dobro do peso encontrado no grupo 2 (Quadro3).

Quadro 3 – Relação entre a classificação clínico-histológica e a média da quantidade (mg) de carvão nas alíquotas do lavado uterino 24 e 48 horas após a infusão de 250 e 500mg de carvão.

Classificação	n	Tempo Lavado		Dose		Média Tempo/Dose
		24hs	48hs	250mg	500mg	
Grupo 1	16	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4 <sup>a</sup>
Grupo 2	46	1,7	0,9	1,6	1,1	1,3 <sup>b</sup>
Grupo 3	14	3,2	1,4	2,6	3,0	2,5 <sup>c</sup>
Média		1,8 <sup>a</sup>	0,8 <sup>b</sup>	1,5	1,5	

p.<0,001 Letras diferentes, médias com diferença estatisticamente significativas

Quando avalia-se a média da quantidade de carvão nas alíquotas das lavagens uterinas realizadas 24 e 48 horas após a infusão de 250 e 500mg, percebe-se que a média de peso do carvão entre as lavagens uterinas feitas 24 e 48 horas após a infusão é diferente (p.<0,001), demonstrando maior peso nas lavagens feitas com intervalo de 24 horas. Na comparação do peso de carvão nas alíquotas considerando-se a infusão de diferentes doses, nota-se um peso médio praticamente idêntico (Quadro3).

O peso específico do carvão e a sensibilidade da técnica utilizada para medir as alíquotas foi de 1mg. A relação da classificação visual do lavado uterino após a infusão, a quantidade média de carvão obtida nas alíquotas foi de 1,1mg para o escore C1, de 1,6mg para os escores C2 e de 2,9mg para o escore C3.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Observa-se uma diferença na eliminação uterina do carvão infundido, quando foram comparados os três grupos de éguas. As éguas que apresentaram maior alteração endometrial, levaram mais tempo para eliminar o carvão. Constatou-se que as éguas que apresentaram mais dificuldade de eliminar o carvão apresentaram alterações uterinas que foram avaliadas pelo exame clínico, pelo histológico e pelo histórico clínico. Isto pode ser corroborado pelos trabalhos de EVANS et al. (1986 e 1987) e LeBLANC et al. (1989 e 1994a), que demonstraram ser a infusão de carvão e o exame da lavagem uterina após a infusão, meios eficazes, para se avaliar a capacidade da égua de eliminar o conteúdo uterino. Notaram, também, que as éguas mais velhas e com dano endometrial têm maior dificuldade em eliminar/drenar este inócuo.

As éguas com maior alteração uterina necessitaram de mais tempo para eliminar o carvão. Verifica-se, nas éguas cuja classificação histológica é grupos 2 e 3, uma incidência mais alta de lavados com maior concentração de carvão, lavados esses classificados como C3. Aparentemente quanto mais velhas são as éguas e quanto mais acentuadas as alterações endometriais mais tempo elas necessitam para eliminar o conteúdo uterino. Quando o útero foi lavado 24 horas após a infusão, as éguas eliminaram menos carvão. As éguas do Grupo 3, apresentaram praticamente a mesma eliminação, quando se fez a comparação entre a lavagem 24 e 48 horas após a infusão. Tudo leva a crer que os animais com lesão uterina acentuada tem dificuldade de eliminar o conteúdo uterino apresentando de uma maneira geral alta concentração de carvão no lavado. LeBLANC et al. (1994) e CADARIO et al. (1995) após a infusão de microesferas e carvão também obtiveram a eliminação a partir de 48 horas após a infusão.

Se a lavagem uterina após a infusão de carvão for usada como teste para avaliação da capacidade de limpeza uterina de éguas susceptíveis ou não a endometrite ou que não se limpam após contaminação pela cobertura, deve-se levar em consideração que o tempo para a lavagem uterina após a infusão tem influência na interpretação dos resultados do teste, pois ficou demonstrado que as éguas no período de 24 horas após a infusão não conseguem eliminar todo o carvão, ocorrendo várias amostras com aspecto classificado como intermediários (C2) confundindo o resultado da visualização do conteúdo colhido na lavagem uterina. Aparentemente são necessárias 48 horas para que o útero responda à infusão do carvão com drenagem linfática, contração miométrial e drenagem cervical, completando, assim, a limpeza uterina. TROEDSSON, (1999) e NIKOLAKOPOULOS & WATSON, (1999) observaram que a eliminação de bactérias ocorre 48 horas após a contaminação uterina induzida sugerindo que é necessária, conjuntamente com a limpeza mecânica, a atuação dos mecanismos de defesa não específicos da secreção uterina e da fagocitose realizada pelos neutrófilos.

Constata-se que diferentes doses de carvão não influenciam o resultado do teste. Utilizando-se uma infusão de 250 ou 500 mg de carvão, percebe-se que a quantidade de carvão eliminada no lavado uterino é similar. Isso significa que

pode ser utilizada a infusão de menor quantidade de carvão (250 mg) para a realização do teste.

O carvão foi inócuo ao endométrio, provocando discreta alteração do quadro histológico, o que foi verificado por biopsia endometrial realizada 48 horas e 30 dias após a infusão. EVANS et al.(1986) observaram um comportamento endometrial semelhante após agressão uterina através da infusão com microesferas, carvão ou *Streptococcus zooepidemicus*..

Os resultados demonstram que os pesos das alíquotas aumentam paralelamente à classificação visual estabelecida. O peso médio das alíquotas colhidas 24 e 48 horas após a infusão praticamente não varia entre as doses de 250 e 500 mg, isto demonstra que em tempo hábil, as éguas saudáveis conseguem fazer a limpeza uterina, e que a dose de 250 mg de carvão pode ser usada para testar a capacidade de limpeza mecânica nas éguas com suspeita de retardo na eliminação do conteúdo uterino.

Se este teste vier a ser utilizado, deve-se ter o cuidado de realizar todo o processo desde a infusão até a lavagem 48 horas após, dentro do período de cio e antes da ovulação. Das quatro éguas, com cio curto, que ovularam antes das lavagens – 1 do grupo 1 e 3 do grupo 3 -, e que por isso foram descartadas do experimento, apresentaram um atraso na limpeza uterina e um aumento na classificação visual e no peso das alíquotas de carvão em cada amostra colhida nas 48 horas após a infusão. A modificação no balanço endócrino, o que de fato ocorre entre o fim do cio e o início do diestro, parece ser a causa deste comportamento uterino, de acordo com o que foi descrito por EVANS et al. (1986 e 1987).

A incapacidade de algumas éguas em eliminar/drenar o carvão pode estar relacionada com a presença de lacunas linfáticas no endométrio. LeBLANC et al. (1994a) descrevem que a drenagem do excesso de secreção uterina, partículas da submucosa e do lume uterino, é realizada pelos vasos linfáticos e linfonodos regionais. Portanto, éguas com alteração endometrial tenderiam a acumular conteúdo uterino após a infusão de um inócuo. LeBLANC et al. (1995) confirmaram que as éguas com lacunas linfáticas e cistos uterinos têm capacidade de absorver tinta nanquim ou carvão durante o diestro; estas partículas têm afinidade pelos linfáticos, visualizando-se desta forma o trânsito até os linfonodos regionais, podendo-se afirmar que as éguas que acumulam carvão no útero após a infusão apresentam dificuldade na drenagem linfática.

No padrão vascular de uma biopsia endometrial de éguas susceptíveis, geralmente, observa-se angiose de moderada a severa, freqüentemente associada a endometrose, como já foi descrito por SCHOON et al. (1997). As angiopatias têm um papel importante na redução da perfusão endometrial e na diminuição da drenagem linfática. A angiose está relacionada à idade e ao número de partições, porém não foi observada nas avaliações histológicas realizadas neste estudo.

O miométrio desenvolve importante função na drenagem do conteúdo uterino, tanto na contração para eliminação via cervical como descreveram BLACK et al. (1953) e MATTOS (1989) como através dos vasos linfáticos que

necessitam desta contração para movimentar a linfa, conforme observou LeBLANC (1997), que também relacionou a presença de lacunas linfáticas e cistos com a infertilidade na égua. Entretanto, algumas éguas, apesar de possuírem função miometrial adequada, não conseguem drenar o conteúdo uterino, apresentando o útero pendular, abaixo do nível da pelve precipitando-se na cavidade abdominal, prejudicando com isso a drenagem cervical, acumulando secreção uterina, por ação da gravidade (LeBLANC et al., 1994b). Outras éguas podem ter sofrido lesões nas fibras nervosas, por gestações repetidas, comprometendo a função miometrial, como descreveu DeLILLE et al. (1998).

Das trinta e oito éguas utilizadas neste experimento, seis, uma do grupo 3 e cinco do grupo 2, eliminaram completamente o carvão infundido no útero, independentemente da dose e do tempo de lavagem uterina após a infusão. Observa-se desta forma que algumas éguas, mesmo apresentando lesões endometriais severas, podem eliminar o carvão em resposta à infusão intra-uterina, demonstrando uma resposta positiva do mecanismo físico de defesa uterina. Isso indica que a etiopatogenia e a susceptibilidade à endometrite podem ter caráter multifatorial.

A endometrite persistente após cobertura é uma alteração inflamatória, muitas vezes não infecciosa, e torna-se importante a sua detecção precoce, como sugerem ZENT & TROEDSSON, (1998) e LeBLANC, (1997). É necessário que considere-se, além da avaliação clínica e ultrassonográfica, o teste de eliminação do carvão, observando-se os três níveis de classificação visual (C1- transparente; C2- grisáceo; C3- carvão).

O teste compreendido pela infusão de carvão e a lavagem uterina após 48 horas, pode ser indicado como um método alternativo e eficaz para a avaliação da função de limpeza mecânica do útero.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, W.E. e PYCOCK, J.F. Current views on the pathogenesis of bacterial endometritis in mares. **The Veterinary Record**, v. 125, n. 9, p. 298-301, 1989
- BLACK, W.G.; SIMON, J.; McNUTT, S.H.; CASIDA, L.E. Investigations on the physiological basis for the differential response of oestrus a pseudopregnant rabbit uteri to induced infection. **American Journal Veterinary Research**, v.14, p. 318-323, 1953.
- CADARIO, M.E.; THATCHER, M.J.; LeBLANC, M.M. Relationship between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. **Biol. Reprod. Mono.** n.1, p. 495-500, 1995.
- CADARIO, M.E.; THATCHER, W.W.; KLAPSTEIN, E.; MERRIT, A.M.; ARCHBALD, L. F.; TATCHER, M.J.; LeBLANC, M.M. Dynamics of prostaglandin secretion, intrauterine fluid and uterine clearance in reproductive normal mares and mares with delayed uterine clearance. **Theriogenology**, n.52, p.1181-1192, 1999.
- DeLILLE, A.J.A.E.; SILVERS, M.L.; CADARIO, M.E. ; TRAN, T.Q. ; CAGE, C.L. ; LeBLANC, M. M. Interaction of xylazine, acepromazine and oxytocin on intrauterine pressure in normal mares and those exhibiting a delay in uterine clearance. **7 th Int. Symposium on Equine Reproduction**, p.99-100, 1998
- EVANS, M.J.; HAMER, J.M.; GASON, L.M.; GRAHAM, C.S.; ASBURY, A.C.; IRVINE, C.H.G. Clearance of bacteria and non antigenic markers following intra uterine inoculation into maiden mares: effect of steroid hormone environment. **Theriogenology** , v.26, p.37-50, 1986.
- EVANS, M.J.; HAMER, J.M.; GASON, L.M.; IRVINE, C.H.G. Factors affecting uterine of inoculated materials in mares. **Journal Reprod. Fert.** v.35, p.327-334, 1987.
- GUYTON, A.C. The Lymphatic System. In: **Textbook of Medical Physiology**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.180-184, 1991
- HUGHES, J.P.; LOY, R.G. Investigations on the effect of intrauterine inoculation of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. **Proc. Am. Ass. of Equine Practitioners**, p. 269, 1969.
- KENNEY, R.M. Cyclic and Pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **Journal Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 172, n.3, p.241-262, 1978.
- KENNEY, R.M. The etiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis (CDE). J.P. Hughes Int. Workshop on Equine Endometritis. **Equine Veterinary Journal**. v. 25, n. 3, p. 185-186, 1993.

- LeBLANC, M.M.; ASBURY, A.C.; LYLE, S.K. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. **Am Journal Vet. Research.** v.50, n.6, p.864-867, 1989
- LeBLANC, M.M.; NEUWIRTH, L.; ASBURY, A.C.; TRAN, T.; MAURAGIS, D.; KLAPSTEIN, E. Scintigraphic Measurement of Uterine Clearance in Normal Mares and Mares with Recurrent Endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 2, p.109-113, 1994a.
- LeBLANC, M.M.; NEUWIRTH, L.; MAURAGIS, D.; KLAPSTEIN, E.; TRAN, T.; Oxytocin Enhances Clearance of Radiocolloid from the Uterine Lumen of Reproductively Normal Mares and Mares Susceptible to Endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v.26, n. 4, p.279-282, 1994b.
- LeBLANC, M.M. ; JOHNSON, R.D. ; CALDERWOOD MAYS, M.B. ; VALDERRAMA, C. Lymphatic clearance of india ink in reproductively normal mares and susceptible to endometritis. **Biol. Reprod. – Eq. Reprod.** , v. 1, p. 279-282, 1995.
- LeBLANC, M.M. Effects of oxytocin, prostaglandin and phenylbutazone on uterine clearance of radiocolloid. I. Intl. Konferenz über Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde.** v.13, n.5, p. 483-485, 1997.
- MATTOS, R.C. Manejo Reprodutivo da Égua. In: TARANTO, J. R. **Sangue e Raça.** Rio de Janeiro, RJ, Ed. Index Ltda. 1989, p. 69-81
- NIKOLAKOPOULOS, E. & WATSON, E.D. Uterine Contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after infusion in the mare. **Theriogenology**, n.52, p.413-423, 1999
- RICKETTS, S.W. & MACINTOSH, M.E. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis **Journal Reprod. Fert.**, v.35, p.343-351, 1987.
- SAS/STAT, General Linear Models Procedure of Statistical Analysis System. In: **User's Guide Release 6.03 Cary, NC** : SAS Institute Inc. p.9-640, 1997.
- SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Vascular lesions in the equine endometrium. I. Intl. Konferenz über Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde.** v.13, n.5, p.546, 1997.
- SILVA, C.A.M; BARROS, S.S.; ESQUERRE, R.A.; DA SILVA, J.H.S, A Biopsia endometrial na avaliação da fertilidade na égua. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, n.4, p.131-133, 1987
- TROEDSSON, M.H.T.; SCOTT, M.A.; LIU, I.K.M. Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection. **American Journal Veterinary Research**, v.56, n.4, p. 468-472, 1995.
- TROEDSSON, M.T.H. Uterine Clearance and Resistance to Persistent Endometritis in the Mare. **Theriogenology**, v. 52, p. 461-471, 1999.
- ZENT, W.W. & TROEDSSON, M. H. T. Postbreeding uterine fluid accumulation in a normal population of thoroughbred mares: A field study. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.** , n.44, p.64-65, 1998.

## 4. CAPITULO 2

# Secreção de Prostaglandina e seus Metabólitos após Infecção Uterina Experimental na Égua

### RESUMO

O perfil de PGFM foi avaliado durante 24 horas em 22 éguas com histórico clínico de falha no mecanismo de limpeza uterina, com sinais clínicos e histológicos de endometrite/endometrose, depois da infecção experimental. Após classificação pela biópsia endometrial (KENNEY, 1978; SILVA et al, 1987) as éguas foram divididas em três grupos. No Grupo Controle foram incluídas as éguas que eliminaram a infecção experimental e nos Grupos 2 e 3 aquelas que não conseguiram eliminar a infecção no período de 96 horas. As éguas do Grupo Controle apresentaram um nível mais homogêneo de PGFM durante todo o experimento, com média de 478pmol/L. (210–668pmol/L). No Grupo 2, observa-se até a 4ª hora uma elevação dos níveis de PGFM, uma queda até a 9ª hora e níveis intermediários, homogêneos e praticamente constantes até a 24ª hora, com média de 273pmol/L. (112–706pmol/L). No grupo 3, as éguas demonstraram um valor médio de PGFM de 1700pmol/L. na primeira coleta. Esses níveis se mantiveram nas primeiras 3 horas, caindo progressivamente até a 16ª hora, quando recomeçam a se elevar, com média de 293pmol/L (102–1.689pmol/L). Os níveis médios de PGFM foram diferentes entre os três grupos, entretanto, sem diferença significativa. Isso poderia ser explicado pela variação individual muito grande nos valores de PGFM entre as éguas, independentemente do grupo. A interação entre a secreção de prostaglandinas e a eliminação de infecção na égua sadia pode estar relacionada com a frequência da secreção de prostaglandina uterina e sua intensidade que, por sua vez, se relacionam com a integridade endometrial.

Palavras-chave: Égua, Endometrite, Prostaglandina, Limpeza uterina

## SUMMARY

Profile of PGFM during 24 hours were evaluated in 22 mares with history of failure in the uterine clearance mechanisms, clinical signs and histology indicative of endometritis/endometrosis, after experimental infection; these mares were previously used in the first experiment. Upon evaluation of the uterine biopsy score (KENNEY, 1978 and SILVA et al., 1987) all mares were divided into three groups: In the Control group were included all mares that cleared the infection and in Group 2 and 3 those that did not cleared the infection after 96hours. The control group had a more homogenous secretion of prostaglandin during the experiment, with an average of 478pmol/L (210-668pmol/L). In Group 2, an elevation of PGFM was observed up to the 4<sup>th</sup> hour, a drop until the 9<sup>th</sup> hour followed by intermediate, homogeneous and constant levels until the 24<sup>th</sup> hour (X=273pmol/L; 112-706pmol/L). In Group 3, the mares showed an average level of PGFM 1700pmol/L in the first blood sample. These high levels were maintained during the first three hours, dropping progressively until the 16<sup>th</sup>hour, when they restarted to increase (X=283pmol/L; 102-1689pmol/L). Even though, the average PGFM levels were different between groups, this difference was not significant. This could be explained by the huge variation of the individual values of PGFM levels in plasma, between mares, independent of their groups. The interaction between prostaglandin secretion and uterine clearance in the healthy mare could be related to intensity and frequency of uterine prostaglandin secretion, which is also related to endometrial integrity.

Key words: Mare, Endometritis, Prostaglandin, Uterine clearance

## INTRODUÇÃO

Alterações nos mecanismos físicos de limpeza uterina representam o principal fator na susceptibilidade à endometrite persistente induzida pela cobertura.

TROEDSSON et al. (1995) propuseram que égua susceptível seria aquela que, submetida à infecção experimental com *Streptococcus zooepidemicus*, não pudesse livrar-se da infecção em um prazo de 96 horas.

O agente encontrado com mais frequência nas endometrites espontâneas foi o *Streptococcus zooepidemicus* (MERKT & VONLEPPEL, 1970; SILVA, 1989 e LANGONI et al. 1994). Qualquer fator que porventura comprometa a função do sistema imune pode facilitar a instalação da infecção. A presença de microrganismos é apenas um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento de uma infecção bacteriana no útero das éguas susceptíveis.

TROEDSSON e LIU (1991) avaliaram a atividade miometrial de éguas susceptíveis e resistentes à endometrite após a inoculação com *Streptococcus zooepidemicus* durante o estro. Nas éguas susceptíveis, a atividade miometrial diminuiu sensivelmente após 8 horas. Usando eletromiografia, TROEDSSON et al. (1993) observaram atividade miometrial reduzida nas éguas susceptíveis, dificultando a eliminação da infecção uterina. DeLILLE et al. (1998) propuseram que o estiramento do miométrio causado por repetidas gestações, ocasionaria algum dano às suas terminações nervosas, interferindo assim com a limpeza uterina.

A  $PGF_{2\alpha}$  é um dos mediadores do processo inflamatório. Ela é secretada permanentemente durante a inflamação e após a cópula pela ação direta do ejaculado sobre o endométrio causando contração miometrial, levando a uma rápida limpeza mecânica do conteúdo uterino (SCHALM, 1986; TROEDSSON, 1995). Quando aplicados inibidores da prostaglandina, como a indometacina, nas éguas sensíveis e resistentes a endometrite foi observado que elas não conseguiram realizar a eliminação de um rádiocolóide colocado no útero, caracterizando a importância da prostaglandina na drenagem mecânica do conteúdo uterino (LeBLANC et al., 1994). Éguas com endometrite demonstraram secreção de  $PGF_{2\alpha}$ ; isto também ocorreu após a estimulação da cérvix e do endométrio, (ROBERTS et al., 1975 e NEELY et al., 1979). Entretanto algumas éguas não reagiram, este fato pode ser explicado como cita WILDE et al. (1989) pela menor inervação ou redução na capacidade para a síntese de  $PGF_{2\alpha}$ . Na degeneração endometrial e na piometra, ocorre perda excessiva do tecido endometrial com redução na liberação de  $PGF_{2\alpha}$ . (NEELY et al., 1979).

WATSON et al. (1987) observaram que éguas com endometrite aguda tiveram maior secreção de prostaglandina comparado com as éguas com endometrite crônica. Não foi notada diferença significativa entre os grupos. Os autores demonstraram que a  $PGF_{2\alpha}$  aumenta a quimiotaxia e a atividade bactericida dos PMN.

CADARIO, et al. (1999), verificaram que a inflamação uterina pré-existente, no momento da administração de ocitocina pode influenciar a liberação de  $PGF_{2\alpha}$ .

endometrial. Os macrófagos ativados, os linfócitos e os neutrófilos potencializam a liberação de Prostaglandinas e Citoquinas (Interleucina -1, Fator de Necrose Tumoral alfa). As éguas com grande número de linfócitos, neutrófilos e células plasmáticas no endométrio respondem a ocitocina liberando grandes quantidades de prostaglandina.

A contração uterina na égua pode ser induzida pela ocitocina independente da prostaglandina ou por sinergismo de ambas (LeBLANC, 1997). Analisando os níveis de ocitocina endógena liberada após a inseminação artificial com sêmen resfriado e diluído, NIKOLAKOPOULOS et al. (1998) não encontraram diferença significativa entre éguas resistentes e susceptíveis. No entanto, na avaliação dos níveis de  $PGF_{2\alpha}$  foram observados valores maiores nas éguas resistentes do que nas susceptíveis. CADARIO et al. (1999a) analisaram, a dinâmica da secreção da prostaglandina, presença de secreção intra-uterina e a limpeza uterina nas éguas sensíveis e resistentes a endometrite. A concentração de prostaglandina após a aplicação de ocitocina aumentou nas éguas sensíveis, o que não ocorreu nas resistentes. Este resultado não tem relação com a presença de secreção intra-uterina.

NIKOLAKOPOULOS & WATSON, (1999) demonstraram que a contratilidade uterina é importante na limpeza mecânica da secreção uterina, mas pode não ter a mesma importância na eliminação das bactérias. Observa-se que as éguas susceptíveis, nem sempre têm infecção bacteriana após uma agressão intra-uterina (NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 1997). Considera-se que a endometrite persistente induzida pela cópula é causada mais por um defeito na contratilidade uterina do que por uma ineficiência dos outros mecanismos de defesa antibacteriana. Não é necessária uma grande motilidade uterina para a eliminação das bactérias do útero e a secreção intra-uterina pode acumular-se na ausência de infecção. A rápida (48 horas) eliminação das bactérias sugere que os mecanismos de defesa não específicos do fluido uterino e a fagocitose realizada pelos neutrófilos são mais efetivos que os mecanismos imunológicos (TROEDSSON, 1999; NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 1999).

A questão da defesa mecânica do útero parece, também, ser crucial para um bom desempenho reprodutivo. LeBLANC et al. (1994) sugerem que o miométrio e os vasos linfáticos possam desempenhar um papel crucial nesse mecanismo. A limpeza uterina teria uma relação com a secreção de ocitocina, prostaglandina e seus metabólitos, isto foi documentado por CADARIO et al. (1995 e 1999), quando avaliaram a eliminação uterina de radiocolóide, por cintilografia, em éguas no cio, e a função da ocitocina na secreção de prostaglandina em éguas consideradas saudáveis e com retardo na eliminação da infecção uterina.

Procurou-se avaliar a curva de secreção uterina de prostaglandina e seus metabólitos nas primeiras 24 horas após infecção experimental, em éguas sadias e naquelas que apresentaram um histórico clínico de falha na capacidade reprodutiva na tentativa de melhor entender a resposta da égua à infecção uterina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 22 reprodutoras, sem raça definida, com idade variando de 4 a 23 anos, pesando entre 420 e 580 kg, mantidas no município de Bagé -RS.

A seleção das éguas foi feita levando-se em conta o histórico clínico ginecológico de no mínimo dois anos vazia, buscando-se animais com ou sem sinais clínicos e histológicos de endometrose ou endometrite crônica e falha na eliminação do conteúdo uterino após a cópula.

Só foram usados animais em bom estado nutricional e sanitário. Todos foram mantidos sob as mesmas condições de manejo e não tiveram manipulação genital pelo período mínimo de 45 dias. Essas éguas foram utilizadas em outro experimento, onde se avaliou a capacidade da eliminação de carvão infundido no útero. Elas foram avaliadas quanto à sua capacidade reprodutiva pelo histórico clínico e pelo exame clínico ginecológico utilizando-se como métodos complementares a ultrassonografia, a citologia, a bacteriologia e a biópsia endometrial. Com base nesses exames e na resposta à infecção experimental as éguas foram classificadas nos seguintes grupos:

- Grupo 1 (Controle; n = 4): Composto por uma égua clinicamente sadia, ingressando na reprodução, com classificação histológica do endométrio do Gr.I, segundo KENNEY (1978) ou sem alteração, segundo SILVA et al. (1987), com 4 anos de idade, e três éguas clinicamente sadias que eliminaram a infecção experimental até 96 horas após a infusão, com classificação histológica do endométrio como do Gr.II, segundo KENNEY (1978) e SILVA et al. (1987). A média de idade das éguas controle foi de 14 anos (4-19).
- Grupo 2 (n = 11): Representado por aquelas éguas com histórico de 2 anos vazia, apresentando endometrite crônica, com classificação histológica do endométrio do Gr.II, segundo KENNEY (1978) e SILVA et al. (1987), e atraso na eliminação do conteúdo uterino após infecção experimental. A média de idade dessas éguas foi de 16 anos (8-23);
- Grupo 3 (n = 7): Éguas com endometrose ou endometrite crônica, com classificação histológica do endométrio no Gr. II e III, segundo KENNEY (1978) e SILVA et al. (1987), e com atraso na eliminação do conteúdo uterino após infecção experimental. A média de idade dessas éguas foi de 17 anos (16-21);

Todas as éguas foram infundidas (infecção experimental) com  $1 \times 10^8$  *Streptococcus equi zooepidemicus* obtidos do útero de éguas abatidas em Pelotas - RS. As bactérias foram cultivadas, purificadas e mantidas congeladas a  $-5^{\circ}\text{C}$ , usando-se glicerol a 10% como crioprotetor. Para a infusão foi realizada uma suspensão das bactérias em 10ml de uma solução de NaCl a 0,9%. Esta suspensão foi colocada no útero através de uma pipeta de inseminação artificial descartável.

No final das 24 horas de coleta, as éguas foram examinadas e todas demonstraram sinais clínicos de endometrite/cervicite/vaginite; cérvix edematosa ou frouxa, hiperêmica, acompanhada de vaginite com ou sem presença de

secreção. Para a avaliação do exame citológico era levada em consideração a presença ou não de leucócitos polimorfonucleares (PMN), segundo MATTOS et al (1984). Para a avaliação ultrassonográfica da falha na eliminação do conteúdo observou-se a ecogenicidade da imagem, como descrito por GINTHER (1986), RASCH et al (1996) e NIKOLAKOPOULOS & WATSON, (1997).

Para a análise da secreção de prostaglandina pela avaliação da presença dos seus metabólitos no plasma, foi realizada coleta de sangue na veia jugular esquerda das éguas dos 3 grupos, imediatamente após a infusão dos *Streptococci*. Na coleta, utilizaram-se tubos heparinizados Vacutainer®<sup>1</sup>. As coletas aconteceram realizadas a cada trinta minutos, sendo que na quarta, oitava, décima segunda, décima sexta e vigésima hora, foram realizadas com intervalo de quinze minutos, totalizando 59 coletas em 24 horas. As amostras de sangue foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos; o plasma foi retirado e congelado a -5°C em tubos de ensaio de 7ml.

A análise dos metabólitos da prostaglandina<sup>2</sup> (14, 15-dihidro-ceto-PGF<sub>2α</sub>) foi realizada através de Radio Imuno Ensaio (RIE) obtendo-se a concentração de PGFM, conforme a técnica descrita por GRANSTRÖM & KINDAHL (1976) e KINDAHL et al (1984).

Noventa e seis horas após a infecção experimental foi efetuado novo exame clínico ginecológico utilizando-se novamente, como exames complementares, a citologia, a bacteriologia e a ultrassonografia. As lâminas para citologia foram preparadas, coradas com Panótico Pappenheim<sup>3</sup> e avaliadas no local. O material para bacteriologia foi coletado em hastes com algodão prensado nas extremidades (Cultilab®<sup>4</sup>) introduzido em meio para transporte, resfriado e enviado ao laboratório.

#### Desenho Estatístico:

Utilizou-se uma análise descritiva com os dados originais da curva formada pelos valores da concentração de prostaglandina e seus metabólitos, obtidos no período compreendido entre imediatamente e 24h após a infecção experimental. Os dados absolutos foram usados para a confecção das médias, curvas e desvio padrão e os valores <60 pmol/Lit foram equiparados a 60 pmol/L, que representa o nível mínimo de sensibilidade do teste.

A secreção de PGFM, a eliminação da infecção e os dados clínicos foram classificados a partir da comparação da freqüência, análise de variância, desvio padrão, teste X<sup>2</sup> e o teste de Tukey.

Os dados foram transformados utilizando-se o percentual do maior valor de secreção de PGFM (100%=8450); deste valor foi extraída a raiz quadrada. Este procedimento foi realizado para diminuir o erro experimental e possibilitar a análise estatística.

Os testes estatísticos se efetuaram através do Pacote Estatístico SAS (General Linear Models Procedure), 1997.

<sup>1</sup> Vacutainer – BD: Rua Ciro Correia Pereira, 550, Curitiba -PR –Brasil.

<sup>2</sup> Universidade de Minnesota – EUA e Universidade de Ciências Agrárias de Uppsala – Suécia.

<sup>3</sup> Panótico Rápido- Laborclin Prod. Laboratório Ltda., Pinhais –PR – Brasil.

<sup>4</sup> Cultilab – CRAL LTDA: Av. Tiradentes, 1348, São Paulo - SP - Brasil.

## RESULTADOS

Observa-se na Tabela 1 a distribuição das éguas nos três grupos formados a partir da análise do exame clínico ginecológico e exames complementares, assim como da observação do comportamento frente à infusão com *Streptococcus*. No Grupo 1 estão as éguas que eliminaram a infecção experimental. Nos Grupos 2 e 3, observa-se as reprodutoras que não conseguiram eliminar o conteúdo uterino resultante da infecção experimental em 96h.

Tabela 1 - Resultados da resposta clínica à infecção experimental, nos três grupos de éguas.

	Resposta à infusão de $1 \times 10^8$ <i>S. zooepidemicus</i>				
	Éguas (n)	S/ conteúdo S/bactéria (n)	%	C/contéudo C/bactéria (n)	%
Grupo 1 (Controle)	4	4	100	0	0
Grupo 2	11	0	0	11	100
Grupo 3	7	0	0	7	100
Total	22	4	-	18	-

A curva dos níveis de PGFM, pode ser visualizada no Gráfico 1, onde estão relacionadas as éguas que eliminaram as bactérias e o conteúdo uterino, observando-se um padrão mais homogêneo. Duas éguas demonstraram níveis contínuos e homogêneos após a infecção, com uma média de 152pmol/L tendo como valores máximo 357 e mínimo 60pmol/L. As outras duas que eliminaram a infecção, tiveram valores de PGFM com média de 940pmol/L.

No Gráfico 2, observa-se a variação dos níveis de PGFM nas éguas do Grupo 2, onde se verifica numa égua a elevação acentuada do nível plasmático dos metabólitos (2600-3800pmol/L) até a quinta hora pós infusão. Percebe-se diferença significativa entre as curvas dos níveis de PGFM entre éguas e entre os intervalos de coleta ( $p < 0,001$ ). Uma das éguas apresenta um padrão mais constante, tendo níveis semelhantes ao de 2 éguas do Grupo 1, durante as 24 horas de avaliação.

No Gráfico 3 pode-se ver a variação dos níveis de PGFM das éguas do Grupo 3, onde se percebe uma elevação inicial da mesma (2100-8400pmol/L), logo a seguir com um período de estabilidade; nota-se um novo pico em algumas éguas (2100-5700pmol/L) durante o início do terço final do período de observação, com a manutenção dos níveis de PGFM até o final das 24 horas. Nota-se diferença significativa entre as éguas e entre os intervalos de coleta ( $p < 0,05$ ). Quatro das éguas do Grupo 3 apresentaram níveis plasmáticos de PGFM acima de 2000pmol/L; três delas até a quarta hora de avaliação e outra entre a 16<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> hora. Uma delas já na primeira coleta apresentou o maior nível (8400pmol/L) de PGFM de todo o experimento; o segundo maior nível também é observado neste grupo, no período da 18<sup>a</sup> hora (5700pmol/L).

Não se percebe qualquer diferença significativa ( $p>0,01$ ), nos níveis de PGFM entre os três grupos.

Quando se visualiza, em separado, as éguas do grupo 2 e grupo 3 (Gráfico 2 e 3), que demonstraram maiores níveis de PGFM, após a infecção, observa-se uma curva com maior oscilação no início do período de coletas e uma égua com maior nível de PGFM no período final. Observa-se diferença significativa entre os intervalos de coleta e uma correlação positiva entre as éguas do Grupo 1 (Controle) e as éguas do Grupo 2 e 3, que apresentaram maiores níveis de PGFM ( $p<0,001$ ).







## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A resposta às bactérias colocadas no útero pode estar relacionada com a capacidade individual de cada égua de reagir à infecção através da secreção de prostaglandina. As éguas que reagiram à infecção (Grupo 1 - Sadias) apresentam todas, apesar de em níveis diferentes, um padrão de secreção e absorção de prostaglandinas homogêneo intermitente, o que se verifica pelos níveis plasmáticos de PGFM (Gráfico 1). Nas éguas que não se livraram da infecção (Grupos 2 e 3 – Doentes) dentro de 96h, observa-se poucas éguas com padrão de absorção semelhante ao das sadias (Grupo 1); no entanto, naquelas éguas dos Grupos 2 e 3 (Doentes) que, apresentavam maiores alterações endometriais, aparecem distintos padrões de absorção, com grande oscilação, (2 éguas no Grupo 2 e 4 no Grupo 3, Gráfico 2 e 3) que podem estar relacionados com o grau de alteração endometrial e sua dificuldade de absorver as prostaglandinas. Isso pode estar relacionado com as descrições de KINDAHL et al. (1984) e WATSON et al. (1987), de que as éguas com lesão endometrial, apesar da infecção causar intensa secreção local, não podem absorver as prostaglandinas prejudicando, com isso, a detecção dos PGFM. Portanto, os níveis plasmáticos de PGFM, nas éguas com acentuada lesão endometrial, devem ser enfocados com muito cuidado como indicadores da resposta inflamatória e da conseqüente secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ; primeiro, porque não se pode garantir a quantidade de prostaglandinas que foi secretada no lume uterino e, segundo, o quanto desta secreção chegou à circulação.

Outra possibilidade foi levantada por BETTERIDGE et al. (1985), WATSON et al. (1987), TROEDSSON et al. (1993a) e KASK et al. (1997) que observaram uma variação individual na capacidade de secretar  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , em resposta a um estímulo aplicado no trato genital, reforçando o indício de que as éguas com profundas lesões endometriais podem ter níveis variados de PGFM na circulação.

Os níveis de PGFM muito baixos ou intermitentes podem estar relacionados com o que descreveram TROEDSSON et al. (1993), que demonstraram o aumento da atividade mioelétrica no período após a infusão intra-uterina de bactérias, nas éguas saudáveis, relacionando este aumento da atividade uterina com a secreção local de prostaglandinas, liberadas pelo endométrio inflamado, contudo somente detectada através do conteúdo colhido por lavagem uterina.

No entanto, a interação entre a secreção de prostaglandinas e a eliminação de infecção na égua sadia parece estar relacionada com a frequência da secreção de prostaglandina uterina e sua intensidade que, por sua vez, se relacionam com a integridade da mucosa. O que se assemelha entre as quatro éguas que eliminaram a infecção é a secreção homogênea e intermitente de PGFM, sem a presença de níveis excepcionalmente altos e baixos de PGFM plasmáticos. Os níveis plasmáticos de PGFM descritos por WATSON et al. (1987), CADARIO et al. (1999) e NIKOLAKOPOULOS et al. (2000), foram determinados a intervalos maiores, não permitindo uma comparação acurada com os aqui determinados.

A síntese de prostaglandina ocorre em todos os tecidos como resposta a um estímulo local. No útero da égua também ocorre a ativação da síntese de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , tanto pela presença de *Streptococci* como pela de toxinas bacterianas (ROBERTS et al., 1975; NEELY et al., 1979; SCHALM, 1986; WATSON, et al., 1987 e TROEDSSON, 1995).

No endométrio da mulher e da ovelha a síntese de prostaglandina é estimulada por citocinas (IL-1 e  $\text{TNF}\alpha$ ), aparentemente, pelo aumento da expressão genética da enzima ciclo oxigenase<sub>2</sub> -  $\text{COX}_2$  (RISTIMAKI et al., 1994; MOLNAR & HERTELENDY, 1995). Três éguas do Grupo 3 e uma do Grupo 2 (Gráfico 2 e 3) apresentaram uma absorção intensa de PGFM após a infusão de bactérias no útero, que pode estar relacionada com a alta secreção de prostaglandinas no lume uterino. Segundo CADARIO et al. (1999) os macrófagos ativados, linfócitos e neutrófilos estimulam, na égua, a liberação de prostaglandinas e citocininas. Não está estabelecido se a inflamação endometrial induz a produção de  $\text{COX}_2$  na égua (SEIBERT et al., 1994), entretanto, se isto ocorre, pode explicar a extensa transformação do ácido aracônico em prostaglandina observada em alguns intervalos da coleta.

No Gráfico 3 observa-se o nível extremamente alto de absorção de PGFM de uma égua na primeira coleta, imediatamente após a infusão das bactérias. Este padrão de absorção pode ser explicado pela presença de lesões ou processo inflamatório anteriores, que com a manipulação genital, favoreceu a secreção, conforme descrito por NEELY et al. (1979), CADARIO et al. (1999) e NIKOLAKOPOULOS et al. (2000).

Considerando-se que a endometrite persistente induzida pela cópula é causada mais por um defeito na contratilidade uterina do que por uma ineficiência dos outros mecanismos de defesa antibacteriana, como descreveram TROEDSSON (1999) e NIKOLAKOPOULOS & WATSON (1999), e que a limpeza uterina teria uma relação com a secreção de ocitocina, prostaglandina e seus metabólitos, como demonstraram CADARIO et al. (1995 e 1999), conclui-se que a secreção de prostaglandinas é importante, devendo ser avaliada também no lume uterino para um melhor entendimento da patogenia da endometrite persistente, principalmente, naquelas éguas que têm grave lesão endometrial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BETTERIDGE, K.J.; RENARD, A.; GOFF, A.K. Uterine prostaglandin release relative to embryo collection, transfer procedures and maintenance of the corpus luteum. **Equine Vet. Journal**. v.3, p.25-33, 1985.
- CADARIO, M.E. ; MERRIT, A.M.; ARCHBALD, L. F.; THATCHER, W.W.; LeBLANC, M.M. Changes in Intrauterine Pressure After Oxytocin Administration in reproductively Normal Mares and in Those With a delay in Uterine Clearance. **Theriogenology** , n.51, p.1017-1025, 1999a.
- CADARIO, M.E. ; THATCHER, M.J.; LeBLANC, M.M. Relationship between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. **Biol. Reprod. Mono.** n.1, p. 495-500, 1995.
- CADARIO, M.E. ; THATCHER, W.W.; KLAPSTEIN, E.; MERRIT, A.M.; ARCHBALD, L. F.; TATCHER, M. J.; LeBLANC, M.M. Dynamics of prostaglandin secretion, intrauterine fluid and uterine clearance in reproductive normal mares and mares with delayed uterine clearance. **Theriogenoly**, n.52, p.1181-1192, 1999.
- DeLILLE, A. J. A. E.; SILVERS, M. L.; CADARIO, M. E. ; TRAN, T. Q. ; CAGE, C. L. ; LeBLANC, M. M. Interaction of xylazine, acepromazine and oxytocin on intrauterine pressure in normal mares and those exhibiting a delay in uterine clearance. **7 th Int. Symposium on Equine Reproduction**, p.99-100, 1998.
- GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the mare: Basic and Applied Aspects**. Cross Plains, WI , Equiserves, 1992, 230p.
- GRAMSTRÖM, E. & KINDAHL, H. Radioimmunoassay for prostaglandins metabolites. In: **Advances in Prostaglandins and Thromboxanes Research**. B. Samuelsson & R. Paoletti. New York, Raven Press, 1976, p. 81-92.
- KASK, K.; ODENSVIK, K.; KINDAHL, H. Prostaglandin F<sub>2</sub> alfa release associated with an embryo transfer procedure in the mare. **Equine Vet. Journal** v. 29, p.286-289, 1997.
- KENNEY, R. M. Cyclic and pathological changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 172, p. 241-262, 1978.
- KINDAHL, H.; BASU, S.; FREDRIKSON, G.; GOFF, A. Levels of Prostaglandin F<sub>2α</sub> metabolites in blood and urine during early pregnancy. **Anim. Reprod. Sci.** v.7, p. 133-148, 1984.
- LANGONI, H. ; ALVARENGA, M. A. ; PAPA, F. O. ; SAKAMOTO, C. ; SIMON, J. J. ; LISTONI, F. J. P. ; CARREIRA, E. L. C. Estudo microbiológico e citológico do trato genital de éguas. **Arquivo Brasileiro de Med. Vet. e Zoot.**, v. 46, n. 6, p.623-636, 1994.
- LeBLANC, M M. Effects of oxytocin, prostaglandin and phenylbutazone on uterine clearance of radiocolloid. I. Intl. Konferenz über Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde**. v.13, n.5, p. 483-485, 1997.
- LeBLANC, M M., NEUWIRTH, L., MAURAGIS, D., KLAPSTEIN, E., TRAN, T. Oxytocin Enhances Clearance of Radiocolloid from the Uterine Lumen of

- Reproductively Normal Mares and Mares Susceptible to Endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v.26, n.4, p.279-282, 1994.
- MATTOS,R.C.; MATTOS, A.L.G.; GUNZEL,A.R.; KLUG, E. Citologia endometrial na égua como método de diagnóstico auxiliar e complementar. **Rev. Bras. Reprod. Animal**. v.8, n.2, p. 83-90, 1984.
- MERKT, H. & VONLEPPEL, J. F. Die Entnahme von proben für die bakteriologische Untersuchung des Genitalsekretes der Stute, ihre Beurteilung sowie behandlungshinweise. **Deutsch Tierärztliche Wochenschrift**, v.77, n.19, p.489-528, 1970.
- MOLNAR, M. & HERTELENDY, F. Signal transduction in rat myometrial cells: comparison of the actions of endothelin-1, oxytocin and prostaglandin. **Eur. Endocrinol.**, v.133, p.467-474, 1995.
- NEELY,D.P; KINDAHL,H; STABENFELDT,G.H; EDQVIST, L. E; HUGHES,J.P. Prostaglandin Release Patterns in the Mare: Physiological, Pathophysiological, and Therapeutic Responses. **Journal Reprod. Fert.**, v.27, p.181-189, 1979.
- NIKOLAKOPOULOS, E. & WATSON, E. D. Does artificial insemination with chilled extended semen reduce the antigenic challenge to the mare's uterus compared with natural service ? **Theriogenology**, n.45, p.583-590, 1997.
- NIKOLAKOPOULOS, E. & WATSON, E. D. Uterine Contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after infusion in the mare. **Theriogenology**, n.52, p.413-423, 1999.
- NIKOLAKOPOULOS, E.; KINDAHL, H. ; WATSON, E. D. Oxytocin and PGF-2 alpha release in mares resistant and susceptible to persistent mating induced endometritis. **7th. Int. Symposium on Equine Reproduction**, p. 95-96, 1998.
- NIKOLAKOPOULOS, E; KINDAHL, H; GILBERT,C.L; GOODE,J; WATSON, E.D. Release of oxytocin and prostaglandin F (2 alfa) around teasing,natural service and associated events in the mare. **Anim. Reprod. Sci.**, v.2, n.1-2, p.89-99, 2000.
- RASCH,K..;SCHOON,H.A.;SIEME,H.;KLUG,E. Histomorphological endometrial status and influence of oxytocin on the uterine drainage and pregnancy rate in mares. **Equine Veterinary Journal** v.28, n.6, p.455-460, 1996.
- RISTIMAKI, A.; GARFINKEL, S.; WESSENDORF, J.; MACING, T.; HLA, T. Induction of cyclooxygenase 2 by interleucin 1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation. **Journal Biol. Chem.** v.269, p.11769-1775, 1994.
- ROBERTS, J.S.; BARCIKOWSKI, B.; WILSON, L.; SKARNES, R.C.; McRACKEN, J.A. Hormonal and related factors affecting the release of prostaglandin F<sub>2α</sub> from the uterus. **J. Steroid Bioc.** v.6, p.1091-1097, 1975
- SCHALM, O.W. **Veterinary Hematology**, Lea & Febegr, Philadelphia, 714p., 1986.
- SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclo-oxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.91, p. 12013-12017, 1994.

- SILVA., C. A. M. Infecções Uterinas na éguas. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, v.8, 1989, Belo Horizonte, MG.
- SILVA., C. A. M; BARROS, S.S.; ESQUERRE,R.A.; DA SILVA, J.H.S, A Biopsia endometrial na avaliação da fertilidade na égua. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7, n.4, p.131-133, 1987.
- TROEDSSON, M. T. H. Uterine response to semen deposition in the mare. **Proc. Society for Theriogenology**, p.130-135, 1995.
- TROEDSSON, M. T. H. Uterine Clearance and Resistance to Persistent Endometritis in the Mare. **Theriogenology**, v.52, p.461-471, 1999.
- TROEDSSON, M. H. T ; LIU, I. K. M Uterine clearance of non-antigenic markers(<sup>51</sup>Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. **Journal Reprod. Fert.** v.44, p. 283-288, 1991.
- TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M. ; ING, M. ; PASCOE, J. ; THURMOND, Multiple-Site Electromyography Recordings of Uterine Activity Following an Intrauterine Bacterial Challenge in Mares Susceptible and Resistant to Chronic Uterine Infection.**Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, n. 2, p.307-313,1993.
- TROEDSSON, M. T. H. ; De MORAES, M. J. ; LIU, I. K. M. Correlations between histologic endometrial lesions in mares and clinical responses to exposure to Streptococcus zooepidemicus. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, p. 570-572, 1993a.
- TROEDSSON,M. H. T. ; SCOTT, M. A. ; LIU, I. K. M. Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection. **American Journal Veterinary Research**, v.56, n.4, p. 468-472, 1995.
- WATSON, E.D.; STOKES, C.R.; DAVID, J.S.E.; BOURNE, F.J. Concentration of uterine luminal prostaglandins in mares with acute and persistent endometritis **Equine Vet. Journal** n.19, v.1, p.31-37, 1987.
- WILDE, M.H.; DINGER, J.E.; HOAGLAND, T. A.; GRAVES-HOAGLAND, R.L.; WOODY, C.O. The effects of cervical dilatation on plasma PGFM, Progesterone and the duration of luteal function in diestrous mares **Theriogenology**, v.15, p.34-41, 1989.

## 5. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados obtidos no primeiro capítulo (Experimento 1), demonstram que as éguas que apresentaram maior alteração endometrial, levaram mais tempo para eliminar o carvão. Observa-se correlação entre o histórico clínico, exame clínico ginecológico, histologia endometrial e o resultado da eliminação do carvão infundido no útero. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por EVANS et al. (1986 e 1987) e LeBLANC et al. (1989 e 1994), permitindo indicar a utilização deste método para a avaliação da função miometrial e da drenagem linfática na égua.

A comparação entre as doses de carvão demonstra que não existe diferença entre o uso de 250 e 500 mg, portanto indica-se o uso da menor dose (250 mg).

Não constata-se efeito deletério ao endométrio após a infusão de carvão, confirmando-se o que o carvão é inócuo como descreveram EVANS et al. (1986) e LeBLANC et al. (1994).

A classificação segundo o aspecto visual do lavado uterino, após a infusão de carvão é um bom referencial para a avaliação da capacidade de limpeza mecânica uterina. Como proposto no primeiro capítulo, devem ser utilizados três valores para classificação (C1, C2 e C3). O peso das alíquotas foi diferente entre os grupos, demonstrando eliminações diferenciadas do carvão conforme as condições clínica e histológica.

Algumas éguas, mesmo com exame clínico ginecológico e histologia endometrial demonstrando alterações, conseguiram eliminar o carvão, chamando a atenção para a possibilidade de uma interação de diferentes fatores no mecanismo de eliminação do conteúdo uterino.

No segundo capítulo (Experimento 2) onde são avaliados a secreção de prostaglandinas e os níveis plasmáticos de PGFM, observam-se níveis de PGFM diferentes entre as éguas em estudo. Todas as éguas utilizadas no segundo experimento já tinham sido utilizadas no experimento anterior, por isso, para avaliação dos níveis de PGFM elas foram agrupadas conforme sua resposta à infecção experimental. Verifica-se que as éguas que eliminaram a infecção experimental (Grupo Controle) demonstraram níveis de PGFM homogêneos e intermitentes, o que significa uma absorção adequada de prostaglandinas através do endométrio, entretanto, as éguas que não conseguiram eliminar a infecção (Grupo 2 e 3), apresentaram um padrão de absorção de PGFM com grandes oscilações, intercalando momentos de alta e baixa absorção. Este comportamento pode estar relacionado com o que foi descrito por KINDAHL et al. (1984) e WATSON et al. (1987), que sugeriram haver uma grande secreção local de prostaglandinas em resposta à infecção, essas éguas dos Grupos 2 e 3, com lesão endometrial acentuada, não conseguiram absorver adequadamente a prostaglandina aí secretada, prejudicando a detecção de PGFM na circulação.

Levando-se em consideração os teores de PGFM no plasma para a avaliação da capacidade de limpeza uterina na égua, deve-se ter o cuidado de não superestimar os valores observados, porque mesmo sendo indicadores do

processo inflamatório e da secreção de prostaglandinas no endométrio, os PGFM plasmáticos não definem, principalmente nas éguas com lesão endometrial severa, o quanto foi secretado, porque não se pode quantificar de forma segura o quanto foi secretado e absorvido. No entanto, a interação entre a secreção de prostaglandina no endométrio e a eliminação da infecção na égua sadia pode estar vinculada com a frequência e o grau de secreção de prostaglandina uterina que, por sua vez, se relacionam com a integridade da mucosa. O que se assemelha entre as quatro éguas que eliminaram, a infecção é a secreção homogênea e intermitente de PGFM, sem a presença de níveis excepcionalmente altos e baixos de PGFM plasmáticos. O fato de não se ter encontrado diferença significativa entre os grupos de éguas que eliminaram ou não a infecção experimental poderia ser explicado pela variação individual muito grande nos valores de PGFM entre as éguas, independentemente do grupo. A interação entre a secreção de prostaglandinas e a eliminação de infecção na égua sadia pode estar ligada à frequência da secreção de prostaglandina uterina e sua intensidade que, por sua vez, se relacionam com a integridade endometrial.

Os níveis plasmáticos de PGFM descritos por WATSON et al. (1987), CADARIO et al. (1999) e NIKOLAKOPOULOS et al. (2000), por terem utilizado metodologia diferente e usado intervalos de coleta maior, não permitem uma comparação acurada com os que aqui se descrevem e que não foram encontrados na bibliografia consultada.

A síntese de prostaglandina ocorre em todos os tecidos como resposta a um estímulo local, a partir da metabolização do ácido aracdônico através da enzima ciclo oxigenase (COX). No útero da égua ocorre a ativação da síntese de  $PGF_{2\alpha}$ , tanto pela presença de *Streptococci* como pela de toxinas bacterianas (ROBERTS et al., 1975; NEELY et al., 1979; SCHALM, 1986; WATSON, et al., 1987 e TROEDSSON, 1995). No endométrio da mulher e da ovelha a síntese de prostaglandina é estimulada por citocinas (IL-1 e  $TNF\alpha$ ), aparentemente, pelo aumento da expressão genética da  $COX_2$  (RISTIMAKI et al., 1994; MOLNAR & HERTELENDY, 1995). Na égua, mais recentemente, CADARIO et al. (1999) descreveram que os macrófagos ativados, linfócitos e neutrófilos estimulam a liberação de prostaglandinas e citocininas. Não está estabelecido se a inflamação endometrial induz a produção de  $COX_2$  na égua (SEIBERT et al., 1994), entretanto, se isto ocorre, pode explicar os níveis elevados de PGFM observados em alguns intervalos de coleta. A partir da descoberta da  $COX_2$  abre-se uma nova fase na discussão do processo inflamatório, tornando-se importante a definição do envolvimento desta enzima na secreção de prostaglandinas e na resposta da égua à infecção uterina.

Deve-se considerar, que entre as éguas usadas como Controle, apenas uma era jovem e não apresentava alteração histológica no endométrio. Este fato pode interferir na avaliação da relação entre o padrão de secreção de prostaglandinas e os níveis de PGFM. Entretanto, é importante salientar que quando se utilizam no modelo experimental, éguas velhas e com histórico de falha ou atraso na eliminação do conteúdo uterino, a qualidade da avaliação dos mecanismos que estão envolvidos na etiopatogenia da endometrite persistente

pode estar comprometida. Porque, como descreveram WILLIAMSON et al. (1987); LIU, (1993) e TROEDSSON et al. (1995), só seria susceptível à endometrite, aquela égua que combinar: o histórico reprodutivo, o sinal clínico, a histologia endometrial e não conseguir eliminar a infecção experimental. Ainda, as éguas velhas podem apresentar várias disfunções: Endócrinas, como, secreção insuficiente e irregular de estrogênio, progesterona e gonadotrofinas; Endometriais, como, degeneração, diminuição da função e população glandular e fibroses; miometriais, como, estiramento das fibras, lesão nas terminações nervosas e vasculares; Linfáticas, como, lacunas linfáticas, estase e dificuldade no fluxo de linfa. Isto foi demonstrado por PETERSON et al. (1969); HUGHES & LOY (1969); KENNEY (1978); LeBLANC et al. (1994); FERREIRA-DIAS et al. (1994); TROEDSSON (1995); KATILA (1996); DeLILLE et al. (1998) e WATSON (2000). Neste trabalho optou-se por utilizar éguas com histórico clínico ginecológico de no mínimo dois anos vazias, buscando-se principalmente animais com sinais clínicos e histológicos de endometrose ou endometrite crônica e falha na eliminação do conteúdo uterino após a cópula.

Outro fator que deve ser observado é que algumas éguas podem apresentar alterações físicas, como: vulva com ângulo alterado, fechamento vulvar inadequado, lesões na cérvix, lacerações de períneo, útero pendular, condição nutricional e corporal insuficiente; momentaneamente, estarem susceptíveis à endometrite e outras éguas, de alguma forma, apresentarem distúrbios passageiros de origem endócrina, nervosa, vascular ou miometrial. Decorrido o período para sua recuperação, retornam à sua capacidade reprodutiva plena.

Provavelmente muitas das éguas utilizadas neste trabalho, principalmente as do Grupo 2, caso fossem avaliadas 120 a 144 horas após a infecção experimental poderiam ter eliminado o conteúdo e a infecção. Portanto se classificariam aquelas que têm atraso na capacidade de eliminação do conteúdo e infecção uterina.

Deve-se entender que a resposta da égua frente à agressão uterina é realizada por um complexo sistema de defesa. Este sistema está dividido, principalmente, em mecanismos de defesa físico, celular e humoral. Além destes, o plasma seminal desempenha papel importante. Isto foi descrito por HUGHES & LOY (1969); RICKETTS & MacINTOSH (1987); WATSON et al. (1988); LeBLANC et al. (1989) e TROEDSSON et al (1995). Entre os anos 70 e parte dos anos 80 foi dada uma maior ênfase ao aspecto imunológico dos mecanismos de defesa uterina; considerando-se seu comprometimento como a principal causa de endometrite. Nos anos 90 valorizou-se mais a falha dos mecanismos físicos de defesa uterina – limpeza mecânica e drenagem linfática – como os maiores responsáveis pelo estabelecimento da endometrite persistente induzida pela cópula. A questão da defesa mecânica do útero parece, também, ser crucial para um bom desempenho reprodutivo. LeBLANC et al. (1994a) sugeriram que o miométrio e os vasos linfáticos podem desempenhar um papel crucial nesse mecanismo.

A limpeza uterina teria uma relação com a secreção de ocitocina, prostaglandina e seus metabólitos, isto também foi documentado por CADARIO et al. (1995 e 1999). A contração uterina na égua pode ser induzida pela ocitocina independente da prostaglandina ou por sinergismo de ambas (LeBLANC, 1997). NIKOLAKOPOULOS et al. (1998) não encontraram diferença significativa entre éguas resistentes e susceptíveis. No entanto, na avaliação dos níveis de  $\text{PGF}_2\alpha$  foram observados valores maiores nas éguas resistentes do que nas susceptíveis. CADARIO et al. (1999a) avaliaram a dinâmica da secreção de prostaglandina na presença de secreção no útero nas éguas sensíveis e resistentes a endometrite. Nas éguas resistentes, durante o cio, a limpeza uterina depois da aplicação de ocitocina pode ser independente das liberações de  $\text{PGF}_2\alpha$ . A contratilidade uterina é importante na limpeza da secreção uterina, mas pode não ter a mesma importância na eliminação das bactérias. As éguas susceptíveis, nem sempre apresentam infecção bacteriana após uma agressão intra-uterina (NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 1997 e 1999). Considera-se que a endometrite persistente induzida pela cópula é causada mais por um defeito na contratilidade uterina do que por uma ineficiência dos outros mecanismos de defesa. Pouca motilidade uterina é suficiente para a eliminação de bactérias do útero e a secreção pode acumular-se na ausência de infecção. A rápida (48h) eliminação de bactérias sugere que os mecanismos de defesa não específicos do fluido uterino e a fagocitose realizada pelos neutrófilos são mais efetivos que o mecanismo imunológico (TROEDSSON, 1999; NIKOLAKOPOULOS & WATSON, 1999; WATSON, 2000).

Neste trabalho não se observa relação entre a eliminação do carvão infundido no útero e os níveis de PGFM ( $p>0,1$ ). Entretanto a quantidade de carvão das alíquotas nas éguas com maior alteração endometrial é maior e os níveis de PGFM nas mesmas tiveram grandes oscilações, enquanto nas éguas consideradas sadias ocorreu a eliminação do carvão e os níveis de PGFM foram homogêneos e intermitentes. É possível que as éguas com maior lesão endometrial realmente tenham uma secreção de prostaglandinas maior em resposta ao processo inflamatório, isto pode ser inferido pelos níveis de PGFM encontrado nos Grupos 2 e 3 (Gráfico 2 e 3), ficando esta discussão prejudicada pela falta dos valores de PGF e PGE local. Quanto à eliminação do carvão pode-se afirmar que tanto as éguas velhas como as com maior lesões endometriais têm dificuldade de eliminar o conteúdo uterino. E relacionando estes resultados observa-se que as éguas que têm maior lesão endometrial, tiveram dificuldade de eliminar o carvão e a infecção experimental.

Deve-se salientar a extrema importância da realização do exame clínico ginecológico, valorizando-se a utilização de métodos complementares, principalmente a citologia, histologia e ultrassonografia, para o correto diagnóstico, tratamento e manejo reprodutivo da égua. Indica-se o teste que consta da infusão intra-uterina de 250 mg de carvão e lavagem após 48 horas, para auxiliar o diagnóstico daquelas éguas que têm atraso na eliminação do conteúdo uterino, como forma de avaliar se a égua possui capacidade de eliminar o mesmo a tempo de permitir um ambiente saudável para o embrião. Esta indicação torna-se mais

importante quando não se tem acesso à ultrassonografia, que sem dúvida ainda é a realidade da maioria dos veterinários, de campo, no Brasil.

## 6. CONCLUSÕES

- A infusão intra-uterina de 250mg de carvão pode ser utilizada como um teste para avaliar a capacidade de limpeza uterina na égua, realizando-se a lavagem 48 horas após a infusão.
- Não se confirmou uma relação absoluta entre a eliminação de carvão do útero e os níveis plasmáticos de PGFM, porém, verificou-se que um padrão de secreção homogêneo, regular e constante é mais importante do que a intensidade da secreção.
- As éguas que apresentam lesão endometrial não têm condições de absorver toda a prostaglandina secretada, prejudicando a detecção dos PGFM pelo bloqueio parcial na sua absorção.
- Os níveis plasmáticos de PGFM, nas éguas com acentuada lesão endometrial, não devem ser enfocados como indicadores da resposta inflamatória e da consequente secreção de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, W. E. e PYCOCK, J. F. Current views on the pathogenesis of bacterial endometritis in mares. **The Veterinary Record**, v. 125, n. 9, p. 298-301, 1989.
- ANDONEGUI, G. ; TREVANI, A S. ; LÓPEZ, D. H. ; RAIDEN, S. ; GIORDANO, M. GEFNER, J. R. Inhibition of human neutrophil apoptosis by platelets. **The Journal of Immunology**. v. 158, p.3372-3377, 1997.
- ASBURY,A.C., HALLIWELL,R.E., FOSTER,G.W. e LONGINO,S.J., Immunoglobins in uterine secretion of mares with differing resistance to endometritis. **Theriogenology**, v. 4, p. 299-304, 1980.
- BADER, H. ; KREMER, H. ; VOGT, G. ; SCHOON, H. A.;BEIER-HELLWIG, K. Investigations on the protein patterns of the equine uterine secretions as functional parameter of the endometrium. I. Intl. Konferenz über Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde** v. 13, n. 5, p. 544, 1997.
- BAKER, C. B. ; LITTLE, T. V. ; McDOWELL, K. J. Normal reproductive success rates in Thoroughbreds. **Proc. Ann. Meet. Soc. for Theriogenology**, p. 71-78, 1992.
- BARROS, C. P. M. Avaliação da capacidade funcional dos neutrófilos pela técnica de quimiotaxia em éguas susceptíveis e resistentes às endometrites . **Dissertação** ( Mestrado Med. Vet.) Faculdade Med. Vet e Zootecnia da UNESP – Júlio de Mesquita, Campus de Botucatu, Botucatu – SP, 1997, 117p.
- BLACK, W. G. ; SIMON, J. ; McNUTT, S. H. ; CASIDA, L. E. Investigations on the physiological basis for the differential response of oestrus a pseudo pregnant rabbit uteri to induced infection. **American Journal Veterinary Research**, v.14, p. 318-323, 1953.
- CADARIO, M.E. ; THATCHER, M.J.; LeBLANC, M.M. Relationship between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. **Biol. Reprod. Mono.** n.1, p. 495-500, 1995.
- CADARIO, M.E. ; THATCHER, W.W.; Klapstein, E.; Merrit, A.M.; Archbald, L. F.; Thatcher, M. J.; LeBLANC, M.M. Dynamics of prostaglandin secretion, intrauterine fluid and uterine clearance in reproductive normal mares and mares with delayed uterine clearance. **Theriogenoly**, n.52, p.1181-1192, 1999.
- CADARIO, M.E. ; MERRIT, A.M.;ARCHBALD, L. F.; THATCHER, W.W.;LeBLANC, M.M. Changes in intrauterine pressure after oxytocin administration in reproductively normal mares and in those with a delay in uterine clearance. **Theriogenoly**, n.51, p.1017-1025,1999a.
- CASLICK, E. A. The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the Thoroughbred mare. **Cornell Vet.**, v.27, p. 178-187, 1937.

- CASTILHO, L. F. F. Endometrites na égua: plasma autólogo acrescido de leucócitos como forma de tratamento. **Dissertação** (Mestrado em ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, UFRGS, porto Alegre, RS, 1994. 92p.
- CAUSEY, R. C. ; GINN, P. S. ; LeBLANC, M. M. Mucus production of the equine endometrium: effect of cycle stage and susceptible to equine endometritis. I. Intl. Konferenz 6uber Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdeheinkunde**, v. 13, n.5, p. 543, 1997.
- CRANE,L.H.; MARTIN,L. Post-copulatory myometrial activity in the rat as seen by video-laparoscopy. **Reproduction, Fertility and Development**. v.3, p.685-698, 1991.
- COSTERTON, J. W. ; LEWANDOWSKI, Z. ; CALDWELL, D. E. ; KORBER, D. R. ; LAPPIN-SCOTT, H. Microbial Biofilms. **Ann. rev. Microbiol.** v.49, p.711-745, 1995.
- DAY,F.T. Some Observations on the Causes of Infertility in the horse **Breeding. Vet. Record**, v.51, p. 581-587, 1939.
- DeLILLE, A. J. A. E.; SILVERS, M. L.; CADARIO, M. E. ; TRAN, T. Q. ; CAGE, C. L. ; LeBLANC, M. M. Interaction of xylazine, acepromazine and oxytocin on intrauterine pressure in normal mares and those exhibiting a delay in uterine clearance.**7 th Int. Symposium on Equine Reproduction**, p.99-100, 1998.
- DIMMOCK,W., Equine breeding hygiene. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.94, p. 469-478, 1939.
- EASLEY, J. External perineal conformation. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993, p.20-24.
- FARRELY, B. T. e MULLANEY, M. A. Cervical and uterine infection in Thoroughbred mares. **Irish Vet. Journal**, n. 18, p. 201-212, 1964.
- FARROW, J. A. ; COLLINS, M. D. Taxonomic studies on streptococci of serological groups C, G, and L and possibly related taxa. **Syst. and Applied Microb.**, v. 5, p.483-493, 1984.
- FERREIRA-DIAS, G. ; NEQUIN, L. G. ; KING, S. S. Morphologic characteristics of equine endometrium classified as Kenney categories I, II and III, using light and scanning electron microscopy. **American Journal Veterinary Research**, v. 55, n.8, p.1060-1065, 1994.
- GYGAX, A. P. ; GANJAM, V. K. ; KENNEY, R. M. Clinical microbiological and histological changes associated with uterine involution in the mare. **Journal Reprod. Fert.**, v.27, p. 571-578, 1978.
- GUYTON, A. C. The Lymphatic System. In: **Textbook of Medical Physiology**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.180-184, 1991.
- HUGHES, J. P. ; LOY, R. G. Investigations on the effect of intrauterine inoculation of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. **Proc. Am. Ass. of Equine Practitioners**, p. 269, 1969.
- JOHNSON, J. U. ; OXENDER, W. D. ; BERKHOFF, H. A. Influence of estrogen on antibacterial and immunoglobulin secretory activities of uterine fluids from ovariectomized mares. **American Journal Veterinary Research**, v. 55, n.5, p. 643-649, 1994.

- KAINER, R. A. Relações Vasculares e Neurais do Trato Reprodutivo In: McKINNON, A. O. & VOSS, J. L.. **Equine Reproduction**, Lea & Febiger, Philadelphia, 1993, p.3-19.
- KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. **Biol. Reprod. Mono.** ,n.1,p. 515-517, 1995
- KATILA, T. Interactions of the uterus and semen. I Intl. Konferenz über Endometritis – Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde.** v.13, n.5, p.508-511, 1997.
- KENNEY, R. M. The etiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis (CDE). J.P. Hughes Int. Workshop on Equine Endometritis. **Equine Veterinary Journal.** v. 25, n. 3, p. 185-186, 1993.
- KENNEY, R. M. ; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW, D. A. **Current Therapy in Theriogenology 2**, p. 723-736, Philadelphia, WB Saunders, 1986.
- KENNEY, R. M. ; KHALEEL, S. A. Bacteriostatic activity of the mare uterus: a progress report on immunology. **Journal Reprod. Fert.** v.23, p. 357-358, 1975.
- KHADORI, N. e YASSIEN, M. Biofilms in device-related infections. **Journal Ind. Microbiology**, v. 15, p. 141-147, 1995.
- LANGONI, H. ; ALVARENGA, M. A. ; PAPA, F. O. ; SAKAMOTO, C. ; SIMON, J. J. ; LISTONI, F. J. P. ; CARREIRA, E. L. C. Estudo microbiológico e citológico do trato genital de éguas. **Arquivo Brasileiro de Med. Vet. e Zoot.**, v. 46, n. 6, p.623-636, 1994.
- LeBLANC, M M. Effects of oxytocin, prostaglandin and phenylbutazone on uterine clearance of radiocolloid. I. Intl. Konferenz über Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde.** v.13, n.5, p. 483-485, 1997.
- LeBLANC, M. M. ; ASBURY, A. C. ; LYLE, S. K. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. **Am Journal Vet. Research.** v.50, n.6, p.864-867, 1989
- LeBLANC, M. M. ; JOHNSON, R. D. ; CALDERWOOD MAYS, M. B. ; VALDERRAMA, C. Lymphatic clearance of india ink in reproductively normal mares and susceptible to endometritis. **Biol. Reprod. – Eq. Reprod.** , v. 1, p. 279-282, 1995.
- LeBLANC, M.M., NEUWIRTH, L., ASBURY, A.C., TRAN, T., MAURAGIS, D., KLAPSTEIN, E. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 2, p.109-113, 1994a.
- LeBLANC, M M., NEUWIRTH, L., MAURAGIS, D., KLAPSTEIN, E., TRAN, T. Oxytocin enhances clearance of radiocolloid from the uterine lumen of reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v.26, n. 4, p.279-282, 1994b.
- LeBLANC, M. M. ; WARD, L. ; TRAN, T. ; WIDDERS, P. Identification and opsonic activity of immunoglobulins recognizing *Streptococcus zooepidemicus* antigens in uterine fluids of mares. **Journal Reprod. Fert.**, v. 44, p. 289-296, 1991.
- LEEUEWEN, Van, E. M. G. ; LIU, I. K. M. ; LANTZ, K. C. ; SCHAFRE, S. ; ENDRES, A C. Connexin 43 aggregates in the myometrium and myosalpinx of the

cycling mare. **6º International Symposium on Equine Reproduction**, Caxambú, Minas Gerais – Brasil, p. 121-122, 1994.

- LEHNINGER, A. L. ; NELSON, D. L. ; COX, M.. M. **Princípios de Bioquímica**, São Paulo, Sarvier Ed., 1995, p. 36
- LIU, I. K. M. The causes and significance of fluid accumulation in the uterus. J. P. Hughes Int. Workshop on Equine Endometritis. **Equine Veterinary Journal**. v. 23, n.3, p. 190, 1993.
- LIU,I.K.M. e CHEUNG,A.T.W., Immunoglobulin and neutrophil defense against uterine infection in the mare resistant and susceptible to chronic endometritis: a review. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.189, n.6, p.700-7002,1986.
- LIU,I.K.M.; CHEUNG,A.T.W.; WALSH,E.M.; MILLER,M.E. e LINDENBURG,P.M.J. Comparison of peripheral blood and uterine-derived polymorphonuclear leukocytes from mares resistant and susceptible to chronic endometritis: Chemotactic and Cell Elastimetry Analysis. **American Journal Veterinary Research** v. 46, p.917-920, 1985.
- LIU,I.K.M., CHEUNG,A.T.W., WALSH,E.M. e AYIN,S. The functional competence of uterine-derived polymorphonuclear neutrophils from mares resistant and susceptible to chronic uterine infection: a sequential migration analysis. **Biol. Reprod.** v.35, p. 1168-1174, 1986.
- MAGISTRINI, M. ; SEGUIN, F.; BEAU, P. ; AKOKA, S. ;LE PAPE, A. ; PALMER, E. H-Nuclear magnetic resonance analysis of stallions genital tract fluids and seminal plasma: contribution of the accessory glands to the ejaculate. **Biology of Reproduction: Monograph series: Equine Reproduction IV.** v.1, p. 599-607,1995.
- MALTIER,J.P.; LEGRAND,C.; BREUILLER,M. Parturition. In: THIBAUT,C.; LEVASSEUR,M.C.; HUNTER,R.H.F.**Reproduction in Mammals and Man**, Paris, Ellipses, 1993, p.481-501.
- MANN, T. Biochemistry of stallion semen. **Journal of Reproduction. Fert. Suppl.** v.23, p.47-52, 1975.
- MATTOS, R. C. Manejo Reprodutivo da Égua. In: TARANTO, J. R. **Sangue e Raça**. Rio de Janeiro, RJ, Ed. Index Ltda. 1989, p. 69-81.
- MATTOS,R.C.; MATTOS, A.L.G.; GUNZEL,A.R.; KLUG, E. Citologia endometrial na égua como método de diagnóstico auxiliar e complementar. **Rev. Bras. Reprod. Animal.** v.8, n.2, p. 83-90, 1984.
- MERKT, H. ; VON LEPPEL, J. F. Die entnahme von proben für die bakteriologische untersuchung des genitalsekretes der stute, ihre beurteilung sowie behandlungshinweise. **Deutsch Tierärztliche Wochenschrift**, v.77, n.19, p.489-528, 1970.
- MITCHELL, G. ; LIU, I. K. M. ; PERRYMAN, L. E. ; STABENFELDT, G. H. ; HUGHES, J. P. Preferential production and secretion of immunoglobulins by the equine endometrium-a mucosal immune system. **Journal Reprod. Fert.** v. 32, p. 161-168, 1982.

- MORRESEY, P. R. Ciliated v. non-ciliated cells in the equine endometrium during estrus as determined by image analysis: preliminary data. **Havemeyer Foundation Int. Workshop. Uterine defense mechanisms in the mare: aspects of physical clearance.** 1997.
- NIKOLAKOPOULOS, E. & WATSON, E. D. Uterine motility in mares and susceptible to endometritis. **Journal Reprod. Fertil.** n.20, p.14, 1997a.
- NIKOLAKOPOULOS, E. & WATSON, E. D. Does artificial insemination with chilled extended semen reduce the antigenic challenge to the mare's uterus compared with natural service? **Theriogenology**, n.45, p.583-590, 1997.
- NIKOLAKOPOULOS, E. & WATSON, E. D. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after infusion in the mare. **Theriogenology**, n.52, p.413-423, 1999.
- NIKOLAKOPOULOS, E.; KINDAHL, H.; WATSON, E. D. Oxytocin and PGF-2 alpha release in mares resistant and susceptible to persistent mating induced endometritis. **7th. Int. Symposium on Equine Reproduction**, p. 95-96, 1998.
- OVERSTREET, J.W.; TOM, R.A. Experimental studies of rapid sperm transport in rabbits. **Journal Reprod. Fert.**, v.66, p.601-606, 1982.
- PASCOE, D. R. Incidence and significance of pneumovagina, foal heat mating and other management factors on the occurrence of uterine susceptibility. J. P. Hughes Int. Workshop on Equine Endometritis. **Equine Veterinary Journal**. v.23, n.3, p. 187, 1993.
- PETERSON, F. B.; McFEELY, R. D.; DAVID, J. S.. Studies on the pathogenesis of endometritis in the mare. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, n.15, p.279-285, 1969.
- PYCOCK, J. F. Assessment of oxytocin and intrauterine antibiotics on intrauterine fluid and pregnancy rates in the mare. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.**, v. 40, p. 19-20, 1994.
- PYCOCK, J.K. e ALLEN, W.E. Inflammatory components in uterine fluids from mares with experimentally induced bacterial endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v.22, p.422-425, 1990.
- RASCH, K.; SCHOON, H.A.; SIEME, H.; KLUG, E. Histomorphological endometrial status and influence of oxytocin on the uterine drainage and pregnancy rate in mares. **Equine Veterinary Journal** v.28, n.6, p.455-460, 1996.
- ROSSDALE, P. D. ; RICKETTS, S. W. **Equine Stud Farm Medicine.** Philadelphia, Lea & Febiger, 1980. p.52-53.
- RICKETTS, S. W. ; MACINTOSH, M. E. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis **Journal Reprod. Fert.**, v.35, p.343-351, 1987.
- SAS/STAT, General Linear Models Procedure of Statistical Analysis System. In: **User's Guide Release 6.03 Cary, NC** : SAS Institute Inc. p.9-640, 1988.
- SCHALM, O.W. **Veterinary Hematology**, Lea & Febiger, Philadelphia, 714p., 1986.
- SCHOON, H. A. ; SCHOON, D. ; KLUG, E. Vascular lesions in the equine endometrium. I. Intl. Konferenz über Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde**. v.13, n.5, p.546, 1997.

- SILVA,C.A. M. Uma nova técnica para correção cirúrgica de pneumovagina na égua. **Turf e Fomento**, v.23,n.4, p.247-248, 1983.
- SILVA., C. A. M; BARROS, S.S.; ESQUERRE,R.A.; DA SILVA, J.H.S, A Biopsia endometrial na avaliação da fertilidade na égua. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.7,n.4,p.131-133, 1987.
- SILVA., C. A. M. Infecções uterinas na éguas. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, v.8, 1989, Belo Horizonte, MG, **Anais**, p.43-53.
- SISSON , S. ; GROSSMAN, J. D. **Anatomia dos Animais Domésticos**. v.1, 13 Ed. Interamericana. Rio de Janeiro, RJ, p.512-514, 1996.
- STZEMIENSKI,P.J., DO,D. e KENNEY,R.M. Antibacterial activity of mare uterine fluid. **Biology Reprod.**, v.3, p. 1:303-311, 1984.
- THILANDER, G. ; KING, G. J. ; GARFIELD, R. E. Connexin 43 and gap junction content in the porcine myometrium during the estrous cycle. **Theriogenology** , v. 40, p 323-332, 1993.
- TISCHNER, M. ; KOSINIAK, K. ; BIELANSKI, W. Analysis of the pattern of ejaculation in Stallions. **Journal Reprod. Fert.**. v. 41, p.329-335, 1975.
- TIZARD, I. **Veterinary Immunology**. 5 ed. Philadelphia, W.B. Saunders Comp., 1996, p. 530.
- TRAUB-DRAGATZ,J.L.; SALMAN,M.D.; VVOSS,J.L. Medical problems of adults horses, as ranked by equine practitioners. **Journal American Veterinary Medicine Assoc.** n.198, p.1745-1747, 1991.
- TROEDSSON, M. T. H. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, p. 461-471, 1999.
- TROEDSSON, M. T. H. Uterine response to semen deposition in the mare. **Proc. Society for Theriogenology**, p. 130-135, 1995.
- TROEDSSON, M.T.H. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. I. Intl. Konferenz über Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdheilkunde**, v.13, n.5, p.516-520, 1997
- TROEDSSON,M. H. T. ; SCOTT, M. A. ; LIU, I. K. M. Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection. **American Journal Veterinary Research**, v.56, n.4, p. 468-472, 1995.
- TROEDSSON,M. H. T ; LIU, I. K. M Uterine clearance of non-antigenic markers(<sup>51</sup>Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. **Journal Reprod. Fert.** v.44, p. 283-288, 1991.
- TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M. ; ING, M. ; PASCOE, J. ; THURMOND, Multiple-site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, n. 2, p.307-313,1993.
- TROEDSSON, M. T. H. ; De MORAES, M. J. ; LIU, I. K. M. Correlations between histologic endometrial lesions in mares and clinical responses to exposure to *Streptococcus zooepidemicus*. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, p. 570-572, 1993b.

- TROEDSSON, M. H. T. ; LIU, I. K. M. ; THURMOND, M. Immunoglobulin (IgG and IgA) and complement (C3) concentrations in uterine secretion following an intrauterine challenge of *Streptococcus zooepidemicus* in mares susceptible versus resistant to chronic uterine infection. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 3, p. 502-506, 1993c.
- TROEDSSON, M.T.H.; IBRAH,N.M.; KING,V.L.; FOSTER,D.N.;CRABO,B.G. Post-breeding endometritis: the role of seminal components. I. Intl. Konferenz über Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdheilkunde**, v.13, n.5, p.545, 1997
- TROEDSSON, M.T.H.; IBRAH,N.M.; KING,V.L.; FOSTER,D.N.;CRABO,B.G. Post-TROEDSSON M.T.H.; LEE, C. S. ; FRANKLIN, R. D. ; CRABO, B. G. Post-breeding uterine inflammation: The role of seminal plasma., **7 Int. Symp. Equine Reproduction**, Pretoria, 12-17 July 1998. p.91.-92, 1998.
- VOSS, J. L. Intrauterine infections in mares. In: Symposium on Mare Infertility, 1984, Las Vegas, Nevada. **Proceedings**. Las Vegas, Western States Veterinary Conference, 1984, p. 5-7.
- WAELECHI, R. O. e WINDER, N. C. Mononuclear cell infiltration of the equine endometrium: immunohistochemical studies. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 6, p. 470-474, 1991.
- WATSON, E.D. Post-breeding endometritis in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 221-232, 2000.
- WATSON, E.D. Uterine defense mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: a review. **Equine Veterinary Journal**, v.20, n.6,p.397-400, 1988.
- WATSON, E.D, Eicosanoides and phagocytic and bacterial activity of equine neutrophils. **Equine Veterinary Journal** v.20, n.5,p.373-375, 1988b
- WATSON, E. D. Effect of ovarian steroids on migration of uterine luminal neutrophils and on chemokinetic factors in uterine secretions from mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 20, n. 5, p. 368-370, 1988a.
- WATSON,E.D. e STOKES,C.R. Macrophage Clearance of <sup>125</sup>I-labelled polyvinil pyrrolidone in the horse: Effect of ovarian steroids and persistent endometritis **Equine Veterinary Journal** v.20, n.6, p.421-423, 1988.
- WATSON, E. D. ; STOKES, C. R. ; BOURNE, F. J Uterine cellular and humoral defense mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 16, p. 107-121, 1987.
- WIDDERS, P. R. ; STOKES, C. R. ; DAVID, J. S. E. ; BOURNE, F. J. Immunohistological studies of the local immune system in the reproductive tract of the mare. **Research in Veterinary Science**, v. 38, n. 1, p. 88-95, 1985
- WILLIANSO, P. ; DUNNING, A. ; O'CONNOR, J. ; PENHALE, W. J Immunoglobulin levels, protein concentrations, and alkaline phosphatase activity in uterine flushings from mares with endometritis. **Theriogenology**, v. 19, p. 441-448, 1983.
- WITTENBRINK, M. M.; HÖLZLE, L. ; BAUMEISTER, A. K. Mechanisms of bacterial pathogenesis in equine endometritis. I. Intl. Konferenz über

- Endometritis-Endometrose beim Pferd. **Pferdeheilkunde**. v.13, n.5, p.450-452, 1997.
- ZALAVARY, S. ; GRENEGARD, M. ; STENDAHL, O ; BENGTSSON, T. Platelets enhance FC- $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 60, n. 7, p. 58-68, 1996.
- ZENT, W.W. & TROEDSSON, M. H. T. Post-breeding uterine fluid accumulation in a normal population of thoroughbred mares: A field study. **Proc. Am. Assoc. Equine Pract.** , n.44, p.64-65, 1998.

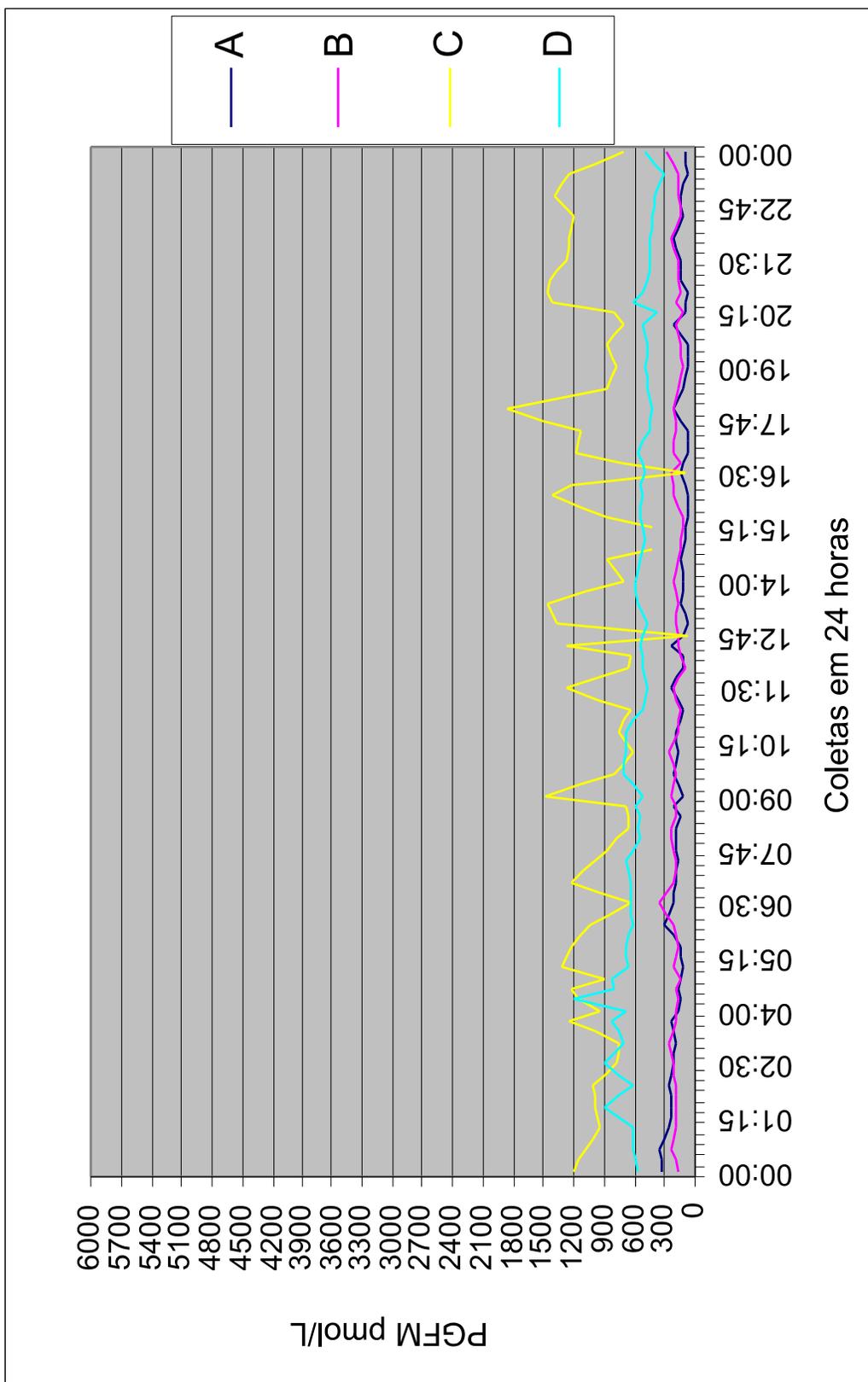


Gráfico 1- Curva dos Níveis de PGFM das Éguas do Grupo Controle, no período de 24 horas, após a infecção experimental com *Streptococcus*

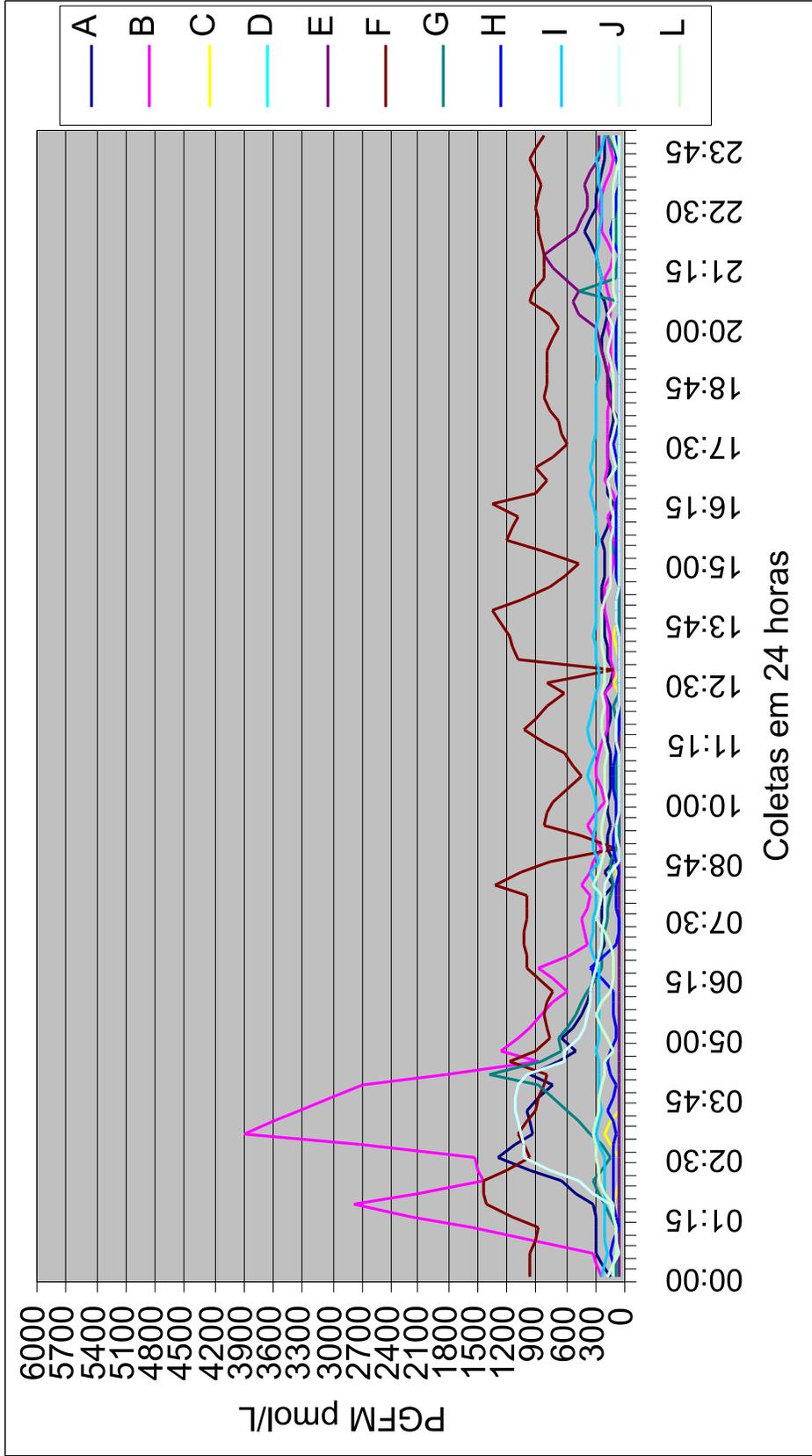


Gráfico 2 – Curva dos Níveis de PGFM das Éguas do Grupo 2, no período de 24 horas após a infecção experimental com *Streptococcus*.

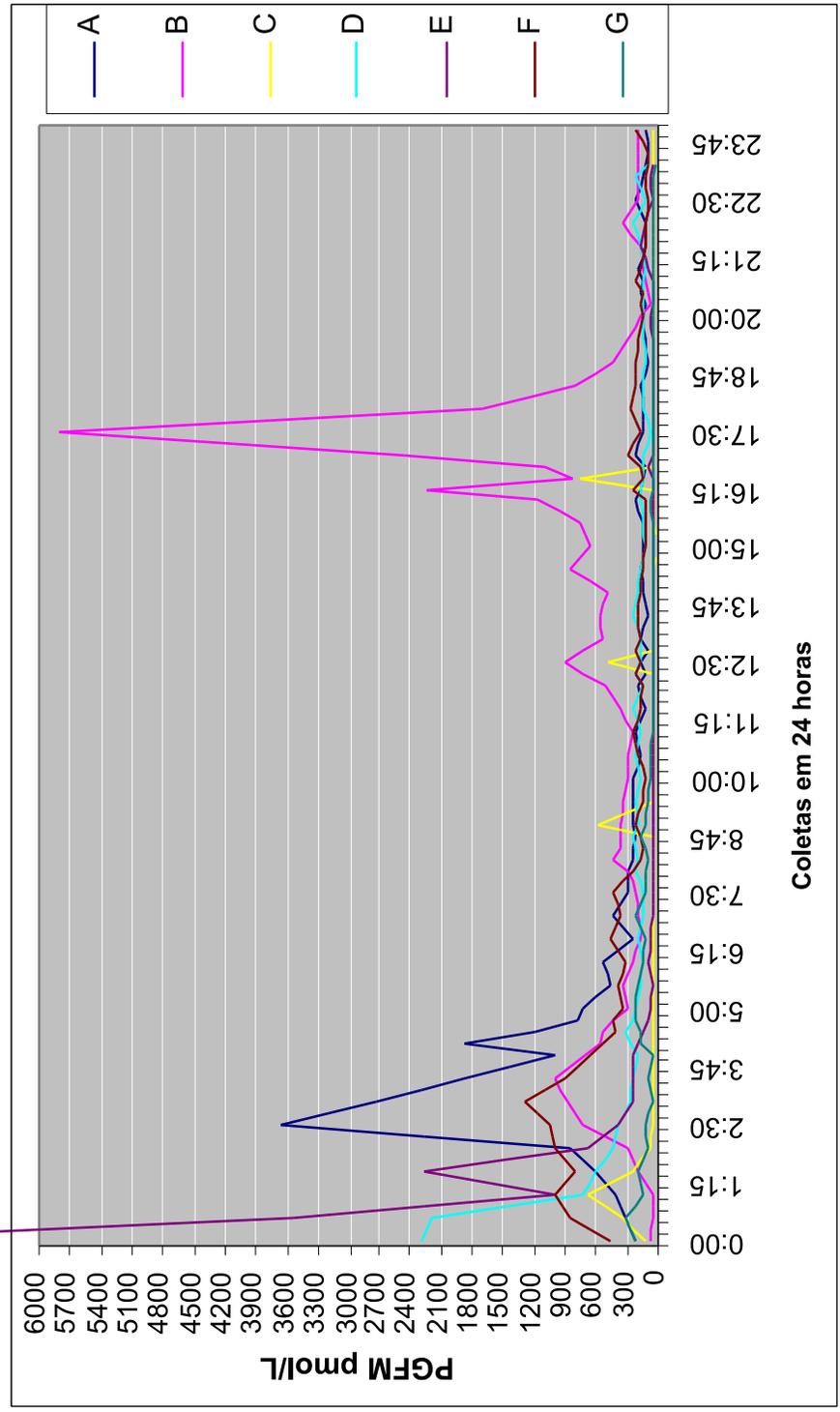


Gráfico 3- Curva dos Níveis de PGFM das Éguas do Grupo 3, no período de 24 horas após a Infecção Experimental com *Streptococcus*.

• Observação: Na primeira coleta o valor de E vai até 8450 e não está representado por inteiro para manter a escala dos Gráficos.