ELENA CAROLINA SERRANO RECALDE

**Influência da qualidade do sêmen criopreservado equino sobre a taxa
de prenhez, hemodinâmica uterina e endometrite pós-cobertura**

São Paulo
2014

ELENA CAROLINA SERRANO RECALDE

Influência da qualidade do sêmen criopreservado equino sobre a taxa de prenhez, hemodinâmica uterina e endometrite pós-cobertura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestrado em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientadora:
Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

Co-orientador:
Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

De acordo: _____

Orientadora

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2980
FMVZ

Recalde, Elena Carolina Serrano
Influência da qualidade do sêmen criopreservado equino sobre a taxa de prenhez, hemodinâmica uterina e endometrite pós-cobertura / Elena Carolina Serrano Recalde. -- 2014.
104 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

Co-orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

1. Espermatozoides. 2. Citologia endometrial. 3. Sondas fluorescentes. 4. Endometrite.
5. Doppler. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência da qualidade do sêmen criopreservado equino sobre a taxa de prenhez, hemodinâmica uterina e endometrite pós-cobertura", protocolado sob o nº 4854290414, utilizando 27 (vinte e sete) equinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Influence of equine cryopreserved semen quality on pregnancy rate, uterine hemodynamic and post breeding endometritis", protocol number 4854290414, utilizing 27 (twenty seven) equine, under the responsibility Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum".

São Paulo, 3 de junho de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SERRANO-RECALDE, Elena Carolina

Título: Influência da qualidade do sêmen criopreservado equino sobre a taxa de prenhez, hemodinâmica uterina e endometrite pós-cobertura

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 30/06/2014

Banca Examinadora

Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

Instituição: FMVZ-USP

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva

Instituição: FZEA-USP

Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Juliana Nascimento Bittar

Instituição: Membro externo

Julgamento: Aprovada

*Dedico à Deus, por iluminar sempre o meu caminho.
Aos meus pais, com imenso amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a **Deus**, por estar sempre comigo em todas horas e me dar a força para superar os obstáculos.*

*À minha mãe, **Elena Recalde**, pelo amor imenso e o carinho que me das. Pelos ensinamentos e os exemplos de vida, e que apesar da distância, nunca deixou de me apoiar e estar sempre presente em cada passo dado durante esta jornada.*

*Ao meu pai, **Edgar Serrano**, pelo apoio e força para continuar em frente e pelo carinho de sempre.*

*À **minha família**, obrigada pelo incentivo e apoio no decorrer da conquista de um sonho.*

*Ao meu namorado, **Marcelo Santos**, obrigada pela paciência, por me escutar e me acalmar sempre que precisei, pela amizade incondicional, e por estar sempre disposto a me ajudar.*

*A minha orientadora, professora **Eneiva Carla Carvalho Celeghini**, obrigada por tudo! Pela confiança, carinho, paciência e incentivo. Você, além dos ensinamentos acadêmicos me permitiu também crescer como pessoa. Foi um prazer trabalhar com a senhora.*

*Ao meu co-orientador, professor **Rubens Paes de Arruda**, por ter disponibilizado o Laboratório de Andrologia para os experimentos, e por ter sempre acrescentado cada vez mais ao meu conhecimento. Eu sei que todo puxão de orelha, é para nosso próprio bem.*

*Ao **Pedro Risolia** e **José Ricardo Ceravolo Risolia** pela colaboração e ter aberto as portas do seu haras para a realização do experimento, muito obrigada.*

À Bruna Marcelle Oliveira, por ter colaborado no desenvolvimento do experimento e ter aguentado meu estresse e criancices, aprendi muito com você. Obrigada por sempre se disponibilizar a me ajudar, você é uma pessoa muito especial.

Ao Leonardo Batissaco "Bati", obrigada pela amizade, as risadas, por me escutar e me aconselhar, e pelo companheirismo em momentos felizes e de tensão. Também obrigada pelo apoio moral, já que embora você não entendia nada sobre cavalos, também esteve presente.

À Maíra Bianchi "Doci", pela amizade, e embora na correria, por me ajudar sempre que precisei.

À Shirley Andrea Florez Rodriguez "Shir", pela colaboração no experimento, pela amizade e companheirismo a todas horas.

Ao Kleber Menegon Lemes, obrigada pela colaboração com a análise estatística, gráficos, e tabelas. Pela amizade, discussões sobre equinos, pela paciência e por aguentar meu estresse, e tirar minhas dúvidas.

À minha amiga Sofia Miles "Stria" obrigada pela sua amizade, por me acalmar e me sustentar nos momentos mais difíceis, e por sempre torcer por mim.

À Renata Lançoni, pela colaboração nas análises de sêmen no laboratório de andrologia, muito obrigada.

Ao Helder Thomé, por se disponibilizar à leitura das citologias, muito obrigada.

Ao professor Luciano Silva, pela disponibilidade para me orientar na utilização da tecnologia Doppler.

Ao Fabio Pinaffi "Maku", pela ajuda no meu entendimento do Doppler.

A todos os Pós-graduandos do Departamento de Reprodução Animal, obrigada pelas risadas, as conversas e o apoio, sem vocês não seria igual, tenho um carinho enorme por vocês.

A todos os Professores do Departamento de Reprodução Animal, pelo incentivo e os ensinamentos.

Aos secretários Clayton, Harumi, Roberta, e Thais, muito obrigada pela ajuda e colaboração em todos os momentos.

A todos os funcionários, Alexandra, Sandra, João, Marcio, José Maria, Hilton, Roberley, Coel, Donizete e Miguel, obrigada pela atenção, e ajuda proporcionada, foi um prazer conhecê-los.

Agradeço a FAPESP, pela bolsa e o Auxílio concedidos para o desenvolvimento do projeto (processo nº 2012/11353-9 e 2012/15736-0)

E a todos aqueles que não mencionei, mas que colaboraram nessa pesquisa e me acompanharam durante o meu mestrado. Meus mais sinceros agradecimentos!

*“Por muito comprida que seja a tormenta,
o sol sempre volta a brilhar entre as nuvens.”*

Khalil Gibran

*“A grandeza de uma pessoa pode se manifestar nos grandes
momentos, porém se forma nos instantes cotidianos.”*

Phillips Brooks

*“Não basta em saber, se deve também aplicar,
não é suficiente querer, se deve também fazer.”*

Johann Wolfgang von Goethe

RESUMO

SERRANO-RECALDE, E. C. **Influência da qualidade do sêmen criopreservado equino sobre a taxa de prenhez, hemodinâmica uterina e endometrite pós-cobertura.** [Influence of equine cryopreserved semen quality on pregnancy rate, uterine hemodynamic and post breeding endometritis]. 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As condições do trato reprodutivo da fêmea, assim como a qualidade do sêmen são fatores que interferem na fertilidade. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a resposta inflamatória uterina e a taxa de prenhez em éguas, considerando hemodinâmica uterina e citologia endometrial após a inseminação artificial (IA) com sêmen congelado de alta e baixa qualidade. Para o presente estudo foram realizados dois experimentos. No Experimento 1 foram utilizadas 15 éguas distribuídas de forma aleatória em quatro grupos: CT - controle: mimetização do procedimento de IA (n=7), DIL: infusão intrauterina de diluidor a base de leite desnatado (n=7), ALTA: IA com sêmen de alta qualidade (n=7), e BAIXA: IA com sêmen de baixa qualidade (n=7). A avaliação uterina foi realizada por ultrassonografia transretal com Doppler nos modos Espectral e Color-flow em sete momentos: prévio à indução da ovulação (TIO), imediatamente antes da IA (TIA), 2 (T2), 6 (T6), 12 (T12), 24 (T24) e 48 horas (T48) após a IA. Foram considerados os valores de índice de resistência (RI) da artéria uterina e de escore de vascularização (EV) uterino. A citologia uterina foi realizada 6 h após a IA. No Experimento 2 foram utilizadas 12 éguas, e seus ciclos foram distribuídos nos tratamentos: CT - controle: mimetização do procedimento de IA (n=8), DIL: infusão intrauterina de diluidor (n=8), ALTA: IA com sêmen de alta qualidade (n=8), e BAIXA: IA com sêmen de baixa qualidade (n=8). O delineamento experimental foi em Quadrado Latino 4X4. A avaliação uterina foi realizada por ultrassonografia transretal com Doppler modos Espectral e Color-flow em três momentos: prévio à indução da ovulação (TIO), imediatamente antes da IA (TIA) e 6 horas (T6) após a IA. A citologia uterina foi realizada 6 h após a IA. Neste experimento foi considerada a taxa de prenhez comparando-se os ciclos utilizados para os grupos ALTA e BAIXA. O diagnóstico de gestação foi realizado 14 dias após a ovulação. Foi utilizado o procedimento misto (PROC MIXED) do SAS (Versão 9.3) para a análise estatística e foi considerada diferença significativa quando $p \leq 0,05$. No Experimento 1, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos para os valores de hemodinâmica uterina RI e EV. Houve aumento significativo de células inflamatórias no endométrio de éguas inseminadas com sêmen de baixa qualidade, porém não diferiu do grupo

de éguas inseminadas com sêmen de alta qualidade. No Experimento 2, não houve diferença estatística entre os grupos para os valores de RI, mas se observou maior EV uterino nos grupos inseminados com sêmen de alta e de baixa qualidade quando comparados com o grupo controle. Na citologia uterina não foi encontrada diferença estatística. A taxa de prenhez para os grupos ALTA (81,82%) e BAIXA (54,55%) não foi estatisticamente diferente. Conclui-se que a deposição de sêmen no útero, leva a um processo inflamatório do endométrio, e esta pode alterar a hemodinâmica uterina detectável por ultrassonografia Doppler em éguas. Não existe diferença significativa na resposta inflamatória entre as qualidades de sêmen. A inseminação com sêmen congelado de menor qualidade não altera a taxa de prenhez, mas são necessários mais estudos para verificar esta diferença.

Palavras-chave: Espermatozoides. Citologia endometrial. Sondas fluorescentes. Endometrite. Doppler.

ABSTRACT

SERRANO-RECALDE, E. C. **Influence of equine cryopreserved semen quality on pregnancy rate, uterine hemodynamic and post breeding endometritis** [Influência da qualidade do sêmen criopreservado equino sobre a taxa de prenhez, hemodinâmica uterina e endometrite pós-cobertura]. 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The female reproductive tract soundness, as well as semen quality are factors that interfere in fertility. The aims of this study were to evaluate inflammatory uterine response and pregnancy rate in mares, considering uterine hemodynamics and endometrial cytology after artificial insemination (IA) with frozen semen of high and low quality. Two experiments were executed for the present study. For Experiment 1, fifteen mares were randomly distributed between four groups: CT - control: mimic of the procedure of IA (n=7), DIL: intrauterine infusion of skim milk semen extender (n=7), ALTA: IA with high quality semen (n=7), and BAIXA: IA with low quality semen (n=7). Uterine evaluation was done using transrectal Doppler ultrasonography by Spectral and Color-flow modes on seven moments: immediately before ovulation induction (TIO), immediately before AI (TIA), 2 (T2), 6 (T6), 12 (T12), 24 (T24) and 48 (T48) hours after IA. There were considered the numerical values of resistance index (RI) of uterine arteries and vascularity scores (EV) of uterine horns. Endometrial cytology was done at 6 h after IA. On Experiment 2, were used 12 mares which their cycles were distributed between the treatments: CT - control: only mimic of IA procedure (n=8), DIL: intrauterine infusion of semen extender (n=8), ALTA: IA with high quality semen (n=8), and BAIXA: IA with low quality semen (n=8). The experimental design was a Latin Square. Uterine evaluation was done using transrectal Doppler ultrasonography by Spectral and Color-flow modes on three moments: before ovulation induction (TIO), immediately before AI (TIA) and 6 hours (T6) after IA. Endometrial cytology was done at 6 h after IA. In this experiment it was considered the pregnancy rate comparing the cycles for groups ALTA e BAIXA. The pregnancy diagnosis was done 14 days after ovulation. It was used the Mixed Procedure (PROC MIXED) from SAS (Version 9.3) for statistical analysis and significant difference was considered when $p \leq 0.05$. On Experiment 1, no statistical difference was found between the groups for uterine hemodynamic values RI and EV. There was a significant increase of inflammatory cells on the mares inseminated with low quality semen, however it wasn't different from the group if mares inseminated with high quality semen. On Experiment 2, there was no statistical difference between the groups for RI values, but the uterine EV was

higher for the groups inseminated with high and low quality when compared with the control group. There was no statistical difference on endometrial cytology. There was no statistical difference on pregnancy rate for the groups ALTA (81,82%) and BAIXA (54,55%). As a conclusion, the deposition of semen in the uterus causes an inflammatory process on the endometrium, and it could alter uterine dynamics detected by Doppler ultrasonography in mares. It does not exist significant difference on the inflammatory response between semen qualities. Low quality frozen-semen insemination does not alter pregnancy rate, but more studies are necessary in order to verify this difference.

Keywords: Spermatozoa. Endometrial cytology. Fluorescent probes. Endometritis. Doppler.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema experimental simplificado do Experimento 1	51
Figura 2 -	Imagem ultrassonográfica Doppler modo Espectral (M5Vet, Mindray – 6,5 mHz) da artéria uterina de égua para obtenção do índice de resistência (RI).	60
Figura 3 -	Ultrassonografia Doppler modo Color-flow (M5Vet, Mindray – 6,5 mHz) do corte transversal do corno uterino de égua.....	61
Figura 4 -	Citologia endometrial de égua realizado por meio da utilização de aparelho de citologia com escova ginecológica. Coloração com Panótico Rápido.....	62
Figura 5 -	Esquema experimental simplificado do Experimento 2	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Média e erro padrão da média das porcentagens de células inflamatórias (neutrófilos) endometriais dos grupos: Controle (CT) (n=7), Diluidor (DIL) (n=7), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) (n=7) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA) (n=7), realizada seis horas após a infusão – Piedade - SP - 2013.....	75
Gráfico 2 -	Média e erro padrão da média (EPM) dos valores de escore de vascularização (EV, 1-4) dos cornos uterinos ipsi e contralateral dos animais (n = 8) dos grupos: Controle (CT), Diluidor (DIL), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA), avaliados no momento T6 (6 horas após a IA) – Pirassununga - SP - 2014.....	78
Gráfico 3 -	Média e erro padrão da média (EPM) das porcentagens de células inflamatórias (neutrófilos) endometriais dos grupos: Controle (CT) (n = 8), Diluidor (DIL) (n = 8), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) (n = 8) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA) (n = 8), realizada seis horas após a infusão – Pirassununga-SP-2014.....	79
Gráfico 4 -	Taxa de prenhez (%) de acordo com a qualidade de sêmen utilizado para a inseminação artificial: Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) (n = 11) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA) (n = 11) – Pirassununga-SP-2014.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação das células espermáticas de equino de acordo com a fluorescência emitida pelas sondas PI-H342, FITC-PSA e JC-1.....	56
Tabela 2 -	Valores de integridade de membrana plasmática (MPI, %), integridade de membrana acrossomal (MAI, %), alto potencial mitocondrial (APM, %), células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial (PIAIA, %), motilidade total (TMOT,%), motilidade progressiva (PMOT, %) e total de defeitos (%) das 10 partidas analisadas – Pirassununga – SP – 2013.....	57
Tabela 3 -	Valores de integridade de membrana plasmática (MPI, %), integridade de membrana acrossomal (MAI, %), alto potencial mitocondrial (APM, %), células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial (PIAIA, %), motilidade total (TMOT,%), motilidade progressiva (PMOT, %) e total de defeitos (%) da partida analisada – Pirassununga – SP - 2014.....	67
Tabela 4 -	Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos valores de índice de resistência (RI, 0-1) das artérias uterinas dos animais dos grupos: Controle (CT) (n=7), Diluidor (DIL) (n=7), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) (n=7) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA) (n=7), avaliados nos diferentes tempos em relação à inseminação artificial (imediatamente antes da IO, imediatamente antes da IA, 2, 6, 12, 24, e, 48 horas após a IA) – Piedade - SP – 2013.....	73
Tabela 5 -	Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos valores de escores de vascularização (EV, 1 -4) dos cornos uterinos dos animais dos grupos: Controle (CT) (n=7), Diluidor (DIL) (n=7), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) (n=7) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA) (n=7), avaliados nos diferentes tempos em relação à inseminação artificial (imediatamente antes da IO, imediatamente antes da IA, 2, 6, 12, 24, e, 48 horas após a IA) – Piedade - SP – 2013.....	74
Tabela 6 -	Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos valores de índice de resistência (RI, 0-1) das artérias uterinas dos animais (n = 8) dos grupos: Controle (CT), Diluidor (DIL), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA), avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (TIA: imediatamente antes da IA; T6: 6 horas após a IA) – Pirassununga - SP - 2014.....	76
Tabela 7-	Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos valores da avaliação subjetiva de escore de vascularização (EV, 1-4) dos cornos uterinos dos animais (n = 8) dos grupos: Controle (CT), Diluidor (DIL), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA), avaliados nos diferentes tempos em relação à inseminação artificial (TIA: imediatamente antes da IA; T6: 6 horas após a IA) – Pirassununga - SP - 2014.....	76

Tabela 8 - Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos valores de índice de resistência (RI, 0-1) das artérias uterinas ipsi e contralateral dos animais (n=8) dos grupos: Controle (CT), Diluidor (DIL), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA), avaliados no momento T6 (6 horas após a IA) – Pirassununga - SP - 2014.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μm	micrômetro
ALH	deslocamento lateral da cabeça
APM	alto potencial mitrocondrial
BCF	frequência de batimento
cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
C3	componente do sistema complemento
C5	componente do sistema complemento
CASA	computer-assisted sperm analysis
DNA	ácido desoxirribonucleico
EV	Escore de vascularização
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FITC-PSA	aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada ao isotiocianato de fluoresceína
g	grama
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
H342	hoechst 33342
hCG	gonadotrofina coriônica humana
Hz	hertz
IA	inseminação artificial
IO	indução da ovulação
IU	unidade internacional
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'- tetracoloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimidazol carbocianina
LIN	linearidade
MAI	membrana acrossomal intacta
mHz	Mega-herzt
mL	mililitro
MPI	membrana plasmática intacta
PGF _{2α}	prostaglandina f2 alfa
PI	índice de pulsatilidade
PI	iodeto de propídio

PIAIA	Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial
PIAIB	Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial
PIALA	Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e alto potencial mitocondrial
PIALB	Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e baixo potencial mitocondrial
PLAIA	Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial
PLAIB	Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial mitocondrial
PLALA	Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial mitocondrial
PLALB	Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial mitocondrial
PMI	plasmatic membrane integrity
PMN	polimorfonucleares
PMOT	motilidade progressiva
RI	índice de resistência
rpm	rotações por minuto
s	segundo
TALP	meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato
TMOT	motilidade total
VAP	velocidade de trajeto
VCL	velocidade curvilínea
VRAP	porcentagem de células rápidas
VSL	velocidade progressiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1 ENDOMETRITE PÓS-COBERTURA.....	26
2.1.1 Resposta inflamatória uterina à infusão de sêmen	27
2.1.2 Técnicas de avaliação da resposta inflamatória uterina	28
2.1.3 Impacto da endometrite pós-cobertura na fertilidade	29
2.1.4 O sêmen criopreservado e a endometrite pós-cobertura	30
2.2 SÊMEN CRIOPRESERVADO.....	31
2.2.1 Criopreservação e congelabilidade do sêmen	33
2.2.2 Avaliação da qualidade do sêmen por meio de sondas fluorescentes	35
2.2.2.1 Integridade de membrana plasmática	36
2.2.2.2 Integridade de membrana acrossomal	37
2.2.2.3 Potencial de função mitocondrial	38
2.2.3 Dose inseminante para sêmen criopreservado.....	38
2.2.4 Taxa de prenhez com sêmen congelado.....	40
2.3 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER	41
2.3.1 Produção da imagem ultrassonográfica colorida	42
2.3.2 Aplicação da ultrassonografia Doppler na reprodução.....	43
2.3.3 Avaliação da perfusão uterina por meio da ultrassonografia Doppler	44
3 HIPÓTESES	47
4 OBJETIVOS	49
5 MATERIAL E MÉTODO	51
5.1 EXPERIMENTO 1	51
5.1.1 Esquema experimental.....	51
5.1.2 Local e período experimental	52
5.1.3 Manejo e seleção dos animais	52
5.1.4 Coleta e criopreservação de sêmen	53
5.1.5 Análise do sêmen criopreservado.....	54
5.1.5.1 Avaliação computadorizada das características de motilidade espermática (CASA - Computer-Assisted Sperm Analysis)	54
5.1.5.2 Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial	55
5.1.5.3 Morfologia espermática.....	56

5.1.5.4. Determinação da qualidade do sêmen	57
5.1.6 Acompanhamento do desenvolvimento folicular e inseminação artificial	58
5.1.7 Avaliação da hemodinâmica uterina: perfusão vascular do endométrio	59
5.1.8 Avaliação do processo inflamatório uterino: citologia endometrial	61
5.2 EXPERIMENTO 2	63
5.2.1 Esquema experimental	63
5.2.2 Local e período experimental	64
5.2.3 Manejo e seleção dos animais	64
5.2.4 Coleta e criopreservação de sêmen	64
5.2.5 Análise do sêmen criopreservado	65
5.2.5.1 Avaliação computadorizada das características de motilidade espermática (CASA - Computer-Assisted Sperm Analysis)	66
5.2.5.2 Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial	66
5.2.5.3 Morfologia espermática	66
5.2.5.4 Determinação da qualidade do sêmen	67
5.2.6 Acompanhamento do desenvolvimento folicular e inseminação artificial	68
5.2.7 Avaliação da hemodinâmica uterina: perfusão vascular do endométrio	69
5.2.8 Avaliação do processo inflamatório uterino: citologia endometrial	70
5.2.9 Análise do potencial de fertilidade do sêmen de diferentes qualidades	70
5.2.9 Diagnóstico de gestação	71
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
6 RESULTADOS	73
6.1 EXPERIMENTO 1	73
6.1.1 Hemondinâmica uterina	73
6.1.2 Citologia endometrial	74
6.2 EXPERIMENTO 2	75
6.2.1 Hemondinâmica uterina	75
6.2.2 Citologia endometrial	78
6.2.3 Taxa de prenhez	79
7 DISCUSSÃO	82
8 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE A	103
APÊNDICE B	104

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A fertilidade é um dos parâmetros mais importantes na produtividade de um haras. As condições do trato reprodutivo da fêmea, a qualidade do sêmen e os diversos eventos físicos e bioquímicos que os gametas passam até a fecundação são alguns dos fatores que influenciam esse parâmetro. Ainda são necessários muitos estudos para conseguir reconhecer esses fatores, e todos com o mesmo objetivo de aumentar a taxa de fertilidade da criação.

A técnica de inseminação artificial utilizando sêmen refrigerado tem sido amplamente utilizada na reprodução equina, e o uso de sêmen congelado tem aumentado de forma substancial nos últimos anos devido à maior aprovação pela maioria das associações de raça (REGER et al., 2003), melhora dos índices de fertilidade e simplificação dos protocolos de inseminação (CROWE et al., 2008). Após a deposição de sêmen pela cobertura ou inseminação artificial (IA) no trato reprodutivo da fêmea, ocorre uma resposta inflamatória fisiológica (TROEDSSON, 2014) e transitória (WATSON, 2000a), na qual há liberação de mediadores quimiotáticos, resultando na rápida migração de células polimorfonucleares (PMN) ao lúmen uterino, com o propósito de eliminar o excesso de espermatozoides mortos e outros contaminantes uterinos (TROEDSSON, 1999). Tal processo é desencadeado pelos espermatozoides (TROEDSSON, 1995; KOTILAINEN et al., 1994) pelos microrganismos presentes no sêmen (TROEDSSON et al., 2001), e também pelos componentes dos diluidores utilizados para a criopreservação de sêmen, como é por exemplo a gema de ovo e o glicerol (TROEDSSON et al., 1997).

Devido aos indícios de que a resposta inflamatória persistente e uma limpeza uterina ineficiente são importantes causas de subfertilidade em éguas, existem inúmeros estudos sobre o acúmulo de fluido intrauterino (CADARIO et al., 1999; LEBLANC et al., 1994) e do mecanismo de defesa humoral e celular na resposta inflamatória após a inseminação em éguas (TUNÓN et al., 2000; WAELECHLI et al., 1987; ASBURY et al., 1980). Apesar de que em grande parte dos estudos sobre a patogenia da endometrite o foco foi em bactérias, atualmente, o espermatozoide é considerado o principal causador da inflamação que ocorre sempre após a cobertura (KOTILAINEN et al., 1994). Além disso, foi demonstrado que os resíduos da inflamação são prejudiciais ao espermatozoide e afetam sua motilidade (LEBLANC, 1999; ALGHAMDI et al., 2001).

Por estes e outros fatores, verifica-se a importância de estabelecer as interações entre a qualidade do sêmen e a resposta inflamatória uterina em éguas, com o intuito de reconhecer

seus efeitos sobre a fertilidade. Para o desenvolvimento adequado do embrião, é necessário que a égua restabeleça as condições uterinas normais após a inseminação, portanto, é fundamental que exista o controle desse processo inflamatório.

O espermatozoide é composto por membrana plasmática, flagelo, mitocôndrias, acrossomo e cromatina. A qualidade do sêmen depende da integridade e função de todas estas estruturas. Recentemente, foram desenvolvidas técnicas para avaliar diferentes estruturas espermáticas simultaneamente, como integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial (CELEGHINI et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008; CELEGHINI et al., 2010), correspondendo de forma mais precisa com a capacidade fecundante do sêmen.

Para uma eficiência reprodutiva máxima, 500×10^6 espermatozoides com motilidade progressiva devem ser depositados no trato reprodutivo da égua quando da utilização de sêmen fresco (AMANN; PICKETT, 1987), embora números menores sejam suficientes quando se usa garanhões altamente férteis e o local de deposição se aproxima mais da junção útero-tubárica ipsilateral ao ovário contendo o folículo ovulatório. Estudos mais recentes tem utilizado doses com menor número de espermatozoides entre 25×10^6 até 2×10^5 utilizando sêmen fresco, obtendo taxas de prenhez aceitáveis (MORRIS, 2004; SAMPER, 2010). A maioria dos trabalhos utilizando sêmen criopreservado relatam de doses variando entre 250×10^6 a 800×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva (LEIPOLD et al. 1998; SQUIRES et al. 2003, LINDSEY, 2005).

Já foi observado que a quantidade de neutrófilos na luz uterina é maior em éguas inseminadas com 1 bilhão de espermatozoides do que naquelas inseminadas com menor número de espermatozoides duas e quatro horas após a inseminação (FIALA et al. 2007). Assim, se sugere que a deposição de sêmen com um maior número de espermatozoides lesados, promova maior resposta inflamatória uterina com aumento de PMN e do fluxo sanguíneo uterino, podendo ocasionar subfertilidade.

A maioria das técnicas utilizadas para avaliar a resposta inflamatória uterina tem caráter invasivo e podem mascarar a real resposta inflamatória. A ultrassonografia colorida Doppler é uma técnica não invasiva recentemente utilizada para a avaliação transretal do fluxo sanguíneo do trato reprodutivo de animais de grande porte e é considerada como sendo uma das melhores técnicas disponíveis para o estudo *in vivo* da hemodinâmica uterina em éguas (GINTHER, 2007).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para o melhor entendimento do que acontece no endométrio da égua após a inseminação artificial e dos possíveis efeitos sobre a fertilidade, é importante ressaltar temas sobre a interação entre o sêmen e a resposta inflamatória uterina em éguas, sobre a qualidade de sêmen a ser utilizado, assim como das possíveis técnicas a serem utilizadas para o diagnóstico de endometrite.

2.1 ENDOMETRITE PÓS-COBERTURA

A endometrite pode ser considerada uma doença multifatorial de acordo com a sua etiologia e fisiopatologia, e esta pode ser classificada em pelo menos quatro fatores diferentes, tais como: as doenças sexualmente transmissíveis, a endometrite infecciosa crônica, a endometrite persistente induzida por cobertura e a endometriose (endometrite crônica degenerativa) (TROEDSSON, 1997).

A resposta inflamatória uterina após cobertura tem sido descrita em diversas espécies domésticas, e o mecanismo do processo inflamatório de certa forma difere entre as espécies, e os fundamentos parecem ser consistentes (TROEDSSON et al., 2001; ROBERTSON, 2007; ENGLAND et al., 2013). Esta endometrite pós-cobertura é uma das causas de maior prejuízo para o mercado equino (CAUSEY, 2006), sendo considerada a principal causa de subfertilidade (WATSON, 2000a; HURTGEN, 2006) e infertilidade na égua (CAUSEY, 2007). Depois dos casos de síndrome cólica e de desordens do trato respiratório, a endometrite tem sido considerada como a terceira doença mais comum na clínica de equinos (CARD, 2005). Em torno de 16% das éguas sadias apresentam acúmulo de líquido intrauterino após a inseminação artificial ou monta natural (BARBACINI et al, 2003; WATSON et al., 2001).

2.1.1 Resposta inflamatória uterina à infusão de sêmen

Em equinos, a deposição de sêmen é realizada diretamente no útero. Os espermatozoides são rapidamente transportados até a tuba uterina, porém, somente uma pequena porcentagem deles atinge o local da fertilização (SCOTT, 1995). Após a deposição de sêmen pela cobertura natural ou inseminação artificial (IA) no trato reprodutivo da fêmea, ocorre uma resposta inflamatória fisiológica e transitória (WATSON, 2000a), na qual há liberação de mediadores quimiotáticos, resultando na rápida migração de células polimorfonucleares (PMN) ao lúmen uterino, com o propósito de eliminar o excesso de espermatozoides mortos e outros contaminantes uterinos (TROEDSSON, 1999). Tal processo é desencadeado tanto pelos microrganismos presentes no sêmen (TROEDSSON et al., 2001), como pelos espermatozoides (TROEDSSON, 1995; KOTILAINEN et al., 1994). Ainda se desconhece que parte do espermatozoide desencadeia esta reação e se existe algum efeito do ganhão (LEBLANC, 2003).

A resposta inflamatória uterina ao espermatozoide inicia-se pela ativação dos componentes C5 e C3 do sistema complemento, promovendo uma quimiotaxia de células PMN para o lúmen uterino em até uma hora após a inseminação (KOTILAINEN et al., 1994; KATILA, 1995; TROEDSSON, 1999). A cascata do sistema complemento origina uma série de reações biológicas com objetivo de defender o organismo de agentes exógenos. Como resultado ocorre o aumento da permeabilidade vascular local, quimiotaxia, opsonização para fagocitose, ativação de lipases de membrana e lise do agente alvo (TROEDSSON et al., 2001).

No trato genital feminino proteínas aderidas à membrana espermática seriam responsáveis pela opsonização seletiva e pelo reconhecimento de diferentes populações de espermatozoides (TROEDSSON et al., 2006, KAWANO et al., 2014), assim como da diferenciação entre os patógenos (SCHUBERTH et al, 2008)

Um mecanismo importante para a eliminação rápida do agente agressor e dos componentes e subprodutos inflamatórios é a contratilidade miometrial, que é imprescindível para a limpeza física da luz uterina (EVANS et al., 1987; LEBLANC et al., 1994; TROEDSSON et al., 1993). O influxo de PMNs para o lúmen uterino resulta em fagocitose de espermatozoides e bactérias, assim como na liberação de prostaglandina (PGF₂α), que causa a

contração do miométrio, necessária para a remoção do resíduo uterino via cérvix ou sistema linfático (CLAUS et al., 1992; O'BERT et al., 2004; TROEDSSON., 1999).

2.1.2 Técnicas de avaliação da resposta inflamatória uterina

A técnica que permite rotineiramente o exame do trato reprodutivo da égua, para a avaliação da presença do processo inflamatório pós-cobertura, é o exame ultrassonográfico, com o intuito de verificar a presença de líquido no lúmen intrauterino (BARBACINI et al., 2003). Previamente a esta técnica, era bastante difícil determinar a presença, severidade e a característica do líquido intrauterino de éguas. Embora ainda não foi identificada uma correlação direta entre a ecogenicidade do fluído uterino e a severidade desta alteração, a ecogenicidade do fluido uterino está diretamente relacionada com a concentração de células inflamatórias e detritos (SERTICH et al., 2007).

Assim, a ultrassonografia tem permitido uma maior sensibilidade e observação da endometrite, mesmo até em fases iniciais de infecção uterina ou de limpeza uterina comprometida (LIU; TROEDSSON, 2008).

O exame por meio da citologia endometrial tem sido utilizado ao longo do tempo como um procedimento diagnóstico para endometrite (CRICKMAN; PUGH, 1986; BROOK, 1993; CARMONA, 2011), tanto pela utilização do swab endometrial (AGUILAR et al., 2006) como pela técnica de lavado uterino com pouco volume (BALL et al., 1988; CARD et al., 2004). Porém, existe uma dificuldade em determinar qual metodologia é a mais adequada para interpretar o exame citológico, já que de acordo com diversos autores, alguns dos métodos incluem a utilização do número de neutrófilos por campo examinado ou por número de campos examinados por lâmina, a relação entre neutrófilos e células endometriais, ou percentual de neutrófilos em relação ao total de células contadas (CARD, 2005).

A cultura endometrial consegue proporcionar informações de alta importância no diagnóstico de infecções uterinas quando associada à citologia endometrial (CAUSEY, 2006). A realização de culturas uterinas isoladas, sem o acompanhamento da citologia podem resultar em falso positivo (WINGFIELD-DIGBY; RICKETTS, 1982, WILLIAMS et al., 1987), por isso a necessidade do procedimento de citologia e cultura serem executados com todos os cuidados de antissepsia para diminuir a contaminação (BLANCHARD et al., 1981).

O processo inflamatório uterino persistente faz com que éguas susceptíveis apresentem um infiltrado mononuclear no endométrio, o qual pode facilmente ser percebido com a utilização da biopsia uterina, que ajuda a determinar susceptibilidade a infecções e proporciona informações importantes de éguas inférteis (RICKETTS; BARRELET, 1997; TROEDSSON et al., 1993). Nielsen (2005) comparou e avaliou os procedimentos de citologia endometrial e de biopsia endometrial, e observou que aparentemente o procedimento de biopsia endometrial é mais sensível e específico para o diagnóstico de endometrite. Porém, não foi verificada a diferença entre éguas com endometrite aguda ou persistente.

2.1.3 Impacto da endometrite pós-cobertura na fertilidade

O conjunto de mecanismos da reação inflamatória durante a endometrite pós-cobertura aparentemente são benéficos e fisiológicos, mas que por várias razões podem se tornar uma condição clínica, com efeitos negativos na fertilidade (TROEDSSON, 2014).

A chegada do embrião ao lúmen uterino ocorre em torno de 5 a 6 dias após a fertilização, e para que o embrião sobreviva, é necessário que a égua elimine as bactérias e os produtos inflamatórios uterinos resultantes da cobertura antes desse tempo (OGURI; TSUTSUMI, 1972). Durante o estro, pelo efeito estrogênico, o processo inflamatório em éguas sadias geralmente é completamente resolvido em 24-36 horas após a cobertura. Porém, se houver uma falha nos mecanismos de defesa, devido a um *clearance* insuficiente, ocorre o desenvolvimento de uma condição patológica, denominada endometrite persistente, na qual há liberação constante de PGF2 α , devido à inflamação, resultando em uma luteólise prematura e perda embrionária com diminuição da progesterona circulante (LEBLANC, 2003).

De 10 a 15% das éguas cobertas geralmente desenvolve uma inflamação endometrial persistente (TROEDSSON et al., 2006). Trinta minutos após a inseminação, já são detectados os primeiros neutrófilos no lúmen uterino, sendo os maiores níveis atingidos entre 4 a 24 horas após a introdução do sêmen (KATILA, 1995). A inflamação persistente causada pelo sêmen pode ser a causa mais importantes de infertilidade em éguas susceptíveis, mais do que a endometrite infecciosa (TROEDSSON, 1999).

2.1.4 O sêmen criopreservado e a endometrite pós-cobertura

Durante o processo de criopreservação do sêmen equino, o plasma seminal é removido para concentrar os espermatozoides. A motilidade espermática é maior quando a proporção do plasma seminal é reduzida para 5% em comparação de quando reduzido somente na proporção de 10 a 30% previamente ao processo de criopreservação (ALGHAMDI et al. 2002).

Porém, aparentemente o mecanismo da inflamação pós-cobertura é regulado pelos componentes seminais. De acordo com Troedsson et al. (2005), o plasma seminal possui na sua composição substâncias que modulam a eliminação dos espermatozoides, o processo inflamatório e o *clearance* uterino na égua. Os espermatozoides e o plasma seminal demonstram exercer papéis ativos, mas diferentes, na regulação da endometrite induzida pós-cobertura. Sabe-se que a secreção de PGF2 α endometrial aumenta significativamente na presença de plasma seminal, sugerindo que o plasma seminal atua como um modulador da inflamação (NASH et al., 2010).

Foi demonstrado que a infusão uterina de plasma seminal em éguas estimula o influxo de neutrófilos para o lúmen uterino, o que não acontece na presença do diluidor de sêmen (BOWLLEIN et al., 2003b; PORTUS; REILAS; KATILA, 2005). Por outro lado, estudos *in vitro* demonstraram que o plasma seminal atua como anti-inflamatório para espermatozoides vivos (mas não mortos), prevenindo, por via de um componente proteico, a ligação e fagocitose destes por neutrófilos, inibindo a quimiotaxia de neutrófilos e atividade dos componentes do sistema complemento (TROEDSSON et al., 2000, 2001, 2006; ALGHAMDI et al., 2004; ALGHAMDI; FOSTER 2005).

Kotilainen et. al. (1994) analisaram o fluido intrauterino de éguas 6 horas após a inseminação artificial com sêmen congelado, sêmen fresco diluído e infusão de diluidor, observaram uma reação inflamatória mais pronunciada, com maior quantidade de neutrófilos em éguas inseminadas com sêmen congelado. Antes acreditava-se que o procedimento de inseminação profunda no corno uterino levava a uma reação inflamatória mais severa do que o procedimento de inseminação no corpo do útero, porém, Güvenc et al. (2005), verificaram que a manipulação e introdução da pipeta de inseminação até a ponta do corno uterino, não tem efeito irritante a mais em comparação com a outra técnica.

Alguns dos fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de um processo inflamatório persistente incluem: o *clearance* uterino reduzido observado em éguas susceptíveis à endometrite, mais comumente observado em éguas mais velhas; a reação de hipersensibilidade a alguns componentes do diluidor (WATSON, 2000b; TROEDSSON et al., 2001), já que o diluidor de sêmen congelado contém gema de ovo e glicerol; a remoção do plasma seminal durante o processo de criopreservação levando a uso de pequenos volumes com altas concentrações espermáticas ou por causa da liberação enzimática de células espermáticas danificadas durante a criopreservação (KOTILAINEN, 1994).

Foi sugerido que, a redução na taxa de prenhez após a inseminação com sêmen congelado, seja causada pela maior reação inflamatória, isso porque a inseminação é realizada próximo ao momento da ovulação, sendo assim o período de tempo de fechamento da cérvix é mais curto, o que impediria que éguas suscetíveis eliminassem o material inflamatório em tempo adequado (REILAS, 2001).

A quantidade de neutrófilos na luz uterina, vinte e quatro horas após a inseminação, é maior nas éguas inseminadas com 1 bilhão de espermatozoides do que naquelas inseminadas com dose menor de 100 ou 500 x 10⁶ de espermatozoides (FIALA et al., 2007). Assim, se sugere que a deposição de sêmen com maior número de espermatozoides lesados, promova maior resposta inflamatória uterina com aumento de PMN e do fluxo sanguíneo uterino, podendo ocasionar subfertilidade.

2.2 SÊMEN CRIOPRESERVADO

Durante muito tempo, a criopreservação de sêmen não foi de grande interesse entre os criadores de equinos, por causa dos resultados de fertilidade insatisfatórios (AMANN; PICKETT, 1987). Nos últimos anos houve notório crescimento do interesse pelo uso do sêmen congelado na indústria do cavalo. Raças importantes como a do cavalo Árabe e Quarto de Milha, assim como várias raças de hipismo, tiveram uma recente inclusão, o que levou as associações de raças a aprovar a utilização desta técnica para a reprodução. O desenvolvimento da técnica de comercialização de sêmen refrigerado transportado, tem as suas vantagens, porém, devido as dificuldades encontradas relacionadas ao tempo, distâncias

durante o transporte do mesmo, o sêmen congelado tem se tornado uma necessidade (BEDFORD-GUAUS, 2007; LOOMIS, 2008)

Ultimamente a utilização do sêmen congelado tem sido vista como um meio de beneficiar a produção animal por aumentar a propagação de material genético de animais de alto valor em curto espaço de tempo, tem sido reconhecida como importante contribuinte para a conservação de espécies e tem ajudado a superar aspectos da infertilidade masculina em humanos (SALAZAR et al., 2011; SILVA; GUERRA, 2011).

Alguns dos benefícios da criopreservação do sêmen são menor custo, pela facilidade do transporte do botijão criogênico, evitando assim o transporte da fêmea até o garanhão, sem correr o risco de perda embrionária ou fetal de éguas prenhes devido ao estresse; diminuição e controle da transmissão de doenças, e a fácil acessibilidade a um “pool” genético mais amplo (BEDFORD-GUAUS, 2007).

Também a utilização de sêmen criopreservado permite que a estação de monta continue sem se preocupar com o garanhão, caso este esteja se preparando e participando de eventos, ou se recuperando de alguma enfermidade. Além disso, é possível a utilização do sêmen durante anos, mesmo após a morte do animal. Esta técnica torna possível o planejamento do manejo das éguas, muitas vezes limitado devido as diferenças dos hemisférios norte e sul na estação de monta (AMANN; PICKETT, 1987).

Porém, existem alguns fatores limitantes para o uso rotineiro do sêmen congelado em criatórios de equinos, sendo que o principal fator está relacionado à própria espécie, já que ocorre uma alta variação individual entre garanhões, sendo que uma grande parcela deles apresenta características de sêmen pós-descongelamento inadequadas para o uso (VIDAMENT et al., 1997; BORG et al., 1997).

Outra limitação ao uso em larga escala do sêmen criopreservado de garanhões, é o pequeno número de doses possíveis a serem processadas e armazenadas por ejaculado, devido à perda de aproximadamente 50% de espermatozoides nesse processo (WATSON, 2000b), diferente de touros, no qual um único ejaculado é possível congelar-se entre 300 a 500 doses (ALVARENGA; PAPA, 2011). Embora com a utilização de alta tecnologia, é difícil obter mais do que 50 doses inseminantes de sêmen congelado de um garanhão por semana, e essa quantidade diminui mais ainda fora da estação de monta (AMANN; PICKETT, 1987).

Na bovinocultura, os touros tem sido selecionados para a indústria da inseminação artificial durante anos, baseando-se na habilidade do sêmen suportar os processos da criopreservação. Esta seleção tem levado então ao aumento uniforme de resultados positivos na obtenção de animais aptos para criopreservação com índices de produção conhecidos.

Todavia, este tipo de seleção não tem sido aplicada para garanhões, e portanto existe tão grande variabilidade na criopreservação dos indivíduos equinos (LOOMIS, 2008).

Em equinos, de acordo com Varner et al. (2008), existe maior dificuldade na seleção de garanhões com índices de congelabilidade aceitável, justamente pelo fato de que a escolha do garanhão geralmente não é realizada de acordo com a sua capacidade reprodutiva, mas sim pelo seu desempenho atlético na sua carreira esportiva, pedigree, conformação ou pela sua aptidão. É por isso que tem aumentado as pesquisas voltadas a solucionar os problemas relacionados a utilização de sêmen congelado em equinos.

2.2.1 Criopreservação e congelabilidade do sêmen

Previamente à criopreservação, o sêmen equino deve ser centrifugado para realizar a retirada do plasma seminal com o objetivo de aumentar o tempo de vida do espermatozoide e melhorar a sua preservação, além de aumentar a concentração espermática entre 100 a 400 $\times 10^6$ /mL essencial para o armazenamento (JASKO et al. 1992). Devido à grande variação entre garanhões, possíveis danos deletérios nos espermatozoides podem ser causados pelas forças físicas no procedimento de centrifugação (COCHRAN et al., 1984).

Durante o processo de congelação do sêmen, a partir de 0°C começa a formação de cristais de gelo no meio extracelular. Ocorre então um aumento da concentração de sais do meio extracelular, levando a saída de água do meio intracelular dos espermatozoides para o meio extracelular, levando então estes a uma desidratação progressiva. Quando o processo de congelação é muito rápido ocorre a formação, de cristais intracelulares, os quais podem causar ruptura das membranas espermáticas. Por outro lado, se a curva de congelação é lenta demais, ocorre uma desidratação excessiva do espermatozoide, levando a uma concentração maior de sais no meio intracelular os quais são responsáveis por causar danos as células (AMANN; PICKETT, 1987; PETRUNKINA, 2007).

A curva ótima de congelação é um acerto entre estes dois fatores, já que em ambas as situações ocorrem alterações importantes que podem causar graves danos às células espermáticas. O sucesso final da congelação também está limitado ao processo de descongelação. Quando a curva de congelação é lenta, pela desidratação mais intensa ocorrida na célula, torna-se necessária a descongelação também de forma lenta, para que a célula ao ser

reidratada não sofra rompimento das membranas biológicas pela rápida reconstituição do volume intracelular (AMANN; PICKETT, 1987; SIEME, 2008; SILVA; GUERRA, 2011).

Da mesma forma, quando a curva de congelação é rápida, a descongelação deve ser rápida, para que durante a reidratação da célula não ocorra rompimento das membranas biológicas, desta vez pela formação de pequenos cristais de gelo os quais podem se agrupar e formar grandes cristais lesando a membrana (PEGG, 2002; SILVA; GUERRA, 2011).

O choque térmico e osmótico são os principais fatores que causam sensibilidade do espermatozoide ao procedimento de congelação. No entanto, há comprometimento das células espermáticas, como danos de membrana, danos oxidativos, comprometimento da integridade de estrutura nuclear, danos morfológicos e funcionais das células (WATSON, 2000b; SIEME; HARRISON; PETRUNKINA, 2008).

A alta variabilidade dos espermatozoides de diferentes garanhões em tolerar o processo de criopreservação e descongelação ainda é um enigma (SAMPER, 1998), o que faz com que a utilização de sêmen congelado seja limitada. O sêmen de equinos em geral possui baixa crio resistência, e existe além disso uma variação entre raças, ejaculados e dentro de um mesmo ejaculado, variações entre subpopulações espermáticas (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003), existindo assim respostas diversificadas à criopreservação de sêmen de um mesmo reprodutor (PETRUNKINA, 2007).

O termo “congelabilidade” é geralmente utilizado para representar os índices de populações espermáticas que sobrevivem a testes do processo de congelação e descongelação do sêmen (VIDAMENT et al., 1997). A congelabilidade é uma característica reprodutiva de cada animal e independe da técnica utilizada. Indivíduos podem ser classificados como bons congeladores ou maus congeladores, e isso implica maior ou menor resistência ao processo de criopreservação (WATSON, 2000b).

Resultados de alguns estudos sugerem que aproximadamente de 20 a 50% dos garanhões possuem congelabilidade inaceitável. Foi estimado que aproximadamente 20% de garanhões produzem sêmen que congela bem, 60% que congelam razoavelmente e 20% que congelam mal. Tais diferenças podem ser de origem genética (VIDAMENT et al., 1997).

Existe um fator racial relacionado à resistência do sêmen ao processo de criopreservação. Cavalos da raça Mangalarga Marchador e Mangalarga Paulista apresentam índices de congelabilidade mais baixos, quando comparados com raças de hipismo (Hannoveriano, Holstein e Trackenner) e Quarto-de-milha, sendo que estes últimos apresentaram sêmen com bons padrões de motilidade pós-descongelação (GOMES et al., 2002).

2.2.2 Avaliação da qualidade do sêmen por meio de sondas fluorescentes

Espermatozoides móveis não são sempre férteis de acordo com Pickett et al. (1975). Até mesmo espermatozoides que consigam manter a motilidade após o processo de criopreservação, podem ter sofrido danos sub-letais que podem afetar diretamente a fertilidade (BRINSKO, 2006). Para que um espermatozoide tenha a capacidade de fertilizar o ovócito, é preciso que ele mantenha pelo menos as quatro características principais após a congelação e a descongelação, como são: a) o metabolismo para a produção de energia, b) motilidade progressiva, c) enzimas essenciais para a penetração do espermatozoide no oócito localizadas dentro do acrossomo e d) proteínas da membrana plasmática importantes para a sobrevivência do espermatozoide dentro do trato reprodutivo da égua e ligação com a membrana plasmática do oócito durante a fertilização. A destruição de qualquer componente associado a estas funções interferirá diretamente na fertilidade (AMANN; PICKETT, 1987).

Há a presença de fatores potencialmente prejudiciais ao espermatozoide no processo de criopreservação do sêmen, as lesões ocorridas durante a criopreservação do sêmen podem ser ultra estruturais, físicas, bioquímicas ou funcionais, podendo ocorrer mudanças na fluidez das membranas com aumento do volume causando a ruptura das membranas plasmática e acrossomal (PICKETT et al., 1987; WATSON, 1995). A criopreservação de sêmen induz danos celulares, além disso, leva a ocorrência de processos de pré-capacitação, aumentando a quantidade de células com reação acrossomal (NEILD et al., 2003).

Todas as estruturas do espermatozoide devem estar íntegras e funcionais para alcançar o local da fertilização, e assim conseguir atravessar a zona pelúcida, se ligar à membrana plasmática do ovócito e promover o desenvolvimento embrionário (BRAUNDMIEIER; MILLER, 2001).

Hoje existem técnicas laboratoriais mais precisas que auxiliam no estudo da célula espermática, como a avaliação das características do movimento espermático computadorizado (CASA), a qual apresenta dados de cinética espermática não mensuráveis ao olho humano (ARRUDA, 2000). Parâmetros de motilidade espermática tendem a ser maiores quando da diluição de sêmen congelado após a descongelação em meio que não contenha glicerol (SALAZAR et al., 2011).

Porém, a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e da função mitocondrial aumenta a acurácia da análise do sêmen, por fornecer maior número de dados

para a determinação da porcentagem de células espermáticas na amostra com capacidade para fertilizar o ovócito (CELEGHINI et al., 2010).

A associação de sondas fluorescentes permite fazer uma avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, e está sendo realizada por protocolos de simples execução e leitura, sendo, portanto aplicada na rotina da avaliação seminal (CELEGHINI, 2005; ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007; CELEGHINI et al., 2010). A associação das sondas PI, FITC-PSA e JC-1, que avaliam a membrana plasmática, membrana acrossomal e membrana mitocondrial, respectivamente, é a mais utilizada, já que permite separar duas populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial de maneira mais clara (CELEGHINI et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008).

Resultados bastante satisfatórios da avaliação das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial dos espermatozoides equinos (CELEGHINI et al., 2004, 2010) e bovinos (CELEGHINI et al., 2007) tem sido obtidos com as técnicas já validadas. A técnica é prática e permite a aplicação em grande número de amostras. Nascimento et al. (2008) avaliaram espermatozoides equinos por esta associação de sondas fluorescentes. Porém, para determinar o número mínimo de espermatozoides viáveis necessários em uma dose inseminante para obter fertilização, determinado por esta técnica, é necessário ainda o teste de fertilidade.

2.2.2.1 Integridade de membrana plasmática

A membrana plasmática de espermatozoides equinos é similar à de outras espécies, como bovinos e ovinos. É principalmente constituída por lipídios (com predominância dos fosfolipídios, glicolipídios e lipídios neutros), proteínas e colesterol. Esta recobre todas as estruturas espermáticas e sua função principal é se ligar ao oolema do oócito após a sua transformação durante a capacitação espermática (FLESCHE; GADELLA, 2000; PARKS; LYNCH, 1992).

O Iodeto de Propídio (PI) é uma sonda fluorescente com afinidade ao ácido nucleico de células, corando-o. O PI não consegue atravessar a membrana intacta de uma célula, assim este só cora as células de vermelho quando a membrana plasmática está lesada, ao permitir o acesso do PI ao DNA nuclear para se ligar, e assim então emitir fluorescência em resposta à excitação (GARNER et al., 1986; MAXWELL et al., 1997).

Existe outra sonda fluorescente denominada Hoechst 33342 (H342), a qual também apresenta especificidade ao DNA. Esta também é utilizada para determinar a integridade de membrana plasmática, já que quando associada ao PI, atua como marcador de membrana plasmática intacta emitindo fluorescência azul (CELEGHINI et al., 2007).

2.2.2.2 Integridade de membrana acrossomal

O acrossomo é uma vesícula especializada formada por uma membrana dupla, que recobre os dois terços anteriores da cabeça do espermatozoide e contém enzimas hidrolíticas essenciais para a penetração do espermatozoide no ovócito (BRITO, 2007).

Durante a capacitação espermática, a membrana acrossomal externa se funde com a membrana plasmática em múltiplos pontos na cabeça do espermatozoide, o que leva à liberação de enzimas que promovem a interação, digestão e penetração da zona pelúcida do ovócito (YANAGIMACHI, 1994). Para tanto, ocorre a entrada de cálcio na célula espermática (PARRISH et al., 1999), e aumento dos níveis de cAMP (VISCANTI; KOPF, 1998). Aumenta a fluidez da membrana devido às alterações na composição e arquitetura dos lipídios (FLESCH; GADELLA, 2000; HARRISON; GADELLA, 2005) e há mudanças de atividade metabólica levando à aquisição da hiperativação da motilidade (YANAGIMACHI, 1994).

Células espermáticas vivas que sofreram reação acrossomal, durante o processo de criopreservação, provavelmente tem menor capacidade de suportar o estresse osmótico e possuem motilidade alterada em comparação às células íntegras (FLESCH; GADELLA, 2000).

A aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC), é utilizada para determinar a integridade do acrossomo de espermatozoides equinos, em sêmen fresco, refrigerado e sêmen congelado após descongelamento. Assim, quando o acrossomo se encontra intacto, o espermatozoide se apresenta sem fluorescência, porém quando o acrossomo está lesado, uma fluorescência na porção cranial e equatorial do espermatozoide é observada (FARLIN, 1992; CELEGHINI et al., 2004; CELEGHINI et al., 2010).

2.2.2.3 Potencial da função mitocondrial

A peça intermediária é caracterizada pela presença de numerosas mitocôndrias sobrepostas às fibras densas e ao axonema. As mitocôndrias se encontram arranjadas de forma helicoidal contínua. O espermatozoide equino possui ao redor de 40-50 voltas. Elas são as responsáveis pela produção de ATP necessário pelo espermatozoide para a sua função e motilidade (VARNER; JOHNSON, 2007).

A carbocianina catiônica lipofílica, JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) é uma sonda fluorescente de baixa toxicidade com boa solubilidade (SMILEY et al., 1991). Este corante consegue detectar mudanças no potencial de membrana de espermatozoides equinos (GRAVANCE et al., 2000; NASCIMENTO et al. 2008) e bovinos (CELEGHINI et al., 2008).

O JC-1 permite diferenciar o potencial de membrana mitocondrial em alto e baixo por distinta coloração. O corante quando ligado a mitocôndrias em alta atividade apresenta-se na forma de J-agregados e emite coloração vermelha e quando em mitocôndrias com atividade reduzida se liga na forma de monômero e emite coloração verde (REERS et al., 1991).

2.2.3 Dose inseminante para sêmen criopreservado

Quando se trata da utilização de sêmen criopreservado, o volume não é uma questão muito discutida, já que geralmente são utilizados pequenos volumes entre 1 e 5 mL com altas concentrações espermáticas na dose inseminante (BEDFORD-GUAUS, 2007). O número de palhetas a ser utilizado na dose inseminante depende da concentração espermática utilizada durante o processo de congelamento e da motilidade espermática obtida após a descongelamento do sêmen.

Por outro lado, o número de espermatozoides necessário para uma dose inseminante de sêmen congelado ainda não tem sido estabelecida, diferente da dose já determinada para sêmen refrigerado. A maioria dos trabalhos relata a utilização de doses de sêmen criopreservado variando entre 250×10^6 a 800×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva (LEIPOLD et al., 1998; SQUIRES et al., 2003). De acordo com Pickett et

al.(1999), são necessários $>200 \times 10^6$ de espermatozoides com motilidade progressiva após descongelação, para obter taxa de prenhez satisfatória. No entanto, estudos utilizando doses menores vem sendo realizados, e taxa de prenhez aceitável tem sido conseguida (MORRIS, 2004; SAMPER, 2010).

Sieme et al. (2004) observaram que concentrações de 67 e 200×10^6 espermatozoides/mL para sêmen congelado não afetaram as taxas de prenhez. Provavelmente a dose inseminante mínima também varia entre os garanhões, e portanto seria interessante determinar o número de espermatozoides mínimo necessário para produzir comercialmente taxas de prenhez aceitáveis na maioria dos garanhões além de avaliar qualquer interação entre a dose inseminante e o estado reprodutivo da égua. A porcentagem de células com integridade de membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial alta (PIAIA), as quais são as células com capacidade de fertilização, não é alterada pela concentração espermática entre 100 a 400×10^6 espermatozoide/mL (NASCIMENTO et al., 2008). O número crítico de espermatozoides a ser utilizado depende do garanhão, da qualidade do sêmen após a descongelação, do diluidor e a sua concentração de glicerol, e certamente também do tempo entre o momento da inseminação e da ovulação, além do local da inseminação (VIDAMENT, 2005).

A utilização da técnica de inseminação profunda na ponta do corno uterino, vem sendo bastante utilizada, devido a necessidade de menor número de espermatozoides por dose (MORRIS, 2004). Sieme et al. (2004) não encontraram diferenças nos índices de prenhez comparando as técnicas de inseminação no corpo do útero, na ponta do corno e a inseminação histeroscópica, porém, observaram que éguas suscetíveis tem maior índice de prenhez quando inseminadas no corpo do útero. Por outro lado, menor recuperação de embriões foi obtida após a utilização da técnica de inseminação profunda, sendo realizadas duas inseminações por ciclo, provavelmente devido ao excesso de manipulação e assim irritação endometrial, com liberação de prostaglandina (REGER et al., 2003),

2.2.4 Taxa de prenhez com sêmen congelado

A qualidade do sêmen, a condição da égua a ser inseminada e o manejo da égua durante o período de estro, são os três fatores de maior impacto nos índices de prenhez de um programa com utilização de sêmen congelado (VIDAMENT et. al., 1997).

A utilização de sêmen criopreservado leva geralmente a obtenção de taxas de prenhez menores em comparação ao sêmen diluído ou refrigerado na espécie equina (WATSON, 2000b), mesmo com mesma porcentagem de espermatozoides móveis (BRINSKO, 2006). A diminuição da fertilidade observada na utilização de sêmen criopreservado para a inseminação artificial, tem sido associada às lesões induzidas pelo próprio processo de criopreservação (CELEGHINI et al., 2008).

Woods et al. (1990), conseguiram taxas de 63 e 55% em éguas inseminadas antes da ovulação ou no dia da ovulação, respectivamente, com sêmen congelado. Resultados retrospectivos obtidos a campo resultam em torno de 38% de prenhez por ciclo e 76% de prenhez por estação reprodutiva (BARBACINI et al., 2000; VIDAMENT et al., 1997). Já em um trabalho realizado por Barbacini et al. (1999) foram obtidos 49% de prenhez por ciclo e 86% de prenhez por estação reprodutiva. Essa diferença pode se dever à melhor qualidade do sêmen e a seleção maior das éguas a serem inseminadas. Por outro lado, Reger et al. (2003) reportaram taxa de prenhez da estação de monta de 86,6%, e taxa de prenhez por ciclo de 76,4% utilizando sêmen congelado, porém, esses resultados foram obtidos de um total de 30 éguas.

A avaliação reprodutiva de um garanhão visa predizer a fertilidade do mesmo mediante a verificação da capacidade de produção espermática, a qual mostra a quantidade de éguas que o animal consegue cobrir ou quantidade de doses inseminantes que ele consegue produzir por dia, porém este dado não se correlaciona diretamente com fertilidade (PARLEVLIET; COLENBRANDER, 1999). Vidament (2005) afirma que existe uma correlação da motilidade total pós-descongelação, assim como da velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$) com a fertilidade do sêmen congelado. Quanto maiores os valores destas variáveis, maiores as taxas de prenhez obtidas.

Embora haja correlação entre a porcentagem de motilidade total, motilidade progressiva, e morfologia espermática com a fertilidade, Jasko et al. (1992) verificaram que

essa variação influencia somente 20% na fertilidade. Dessa forma, a avaliação reprodutiva de um garanhão somente detecta indivíduos não aptos para reprodução.

De acordo com Amann e Pickett (1987) a máxima fertilidade de um garanhão é obtida em função de um número de espermatozoides utilizados para a inseminação, até atingir um número crítico no qual a fertilidade não irá aumentar mais. Mesmo assim, há ainda uma grande variação dos índices de prenhez entre éguas inseminadas com sêmen criopreservado de ejaculados previamente selecionados (SAMPER, 1991).

Acredita-se que somente 25% dos garanhões conseguem taxas de prenhez próximas as de sêmen diluído ou refrigerado quando utilizado em éguas sadias e no momento apropriado para inseminação. Por outro lado, 30% dos garanhões obtêm taxas de prenhez extremamente baixas (variando entre 8 e 61% por ciclo) mesmo com ejaculados com motilidade progressiva $\geq 35\%$ após descongelação (AMANN; PICKETT, 1987).

2.3 ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER

O aparelho de ultrassonografia emite uma onda sonora com frequência (>20.000 Hz) superior à percebida pelo ouvido humano, denominada de ultrassom. Estas ondas são emitidas a uma velocidade constante até encontrarem uma superfície que as reflita, e dependendo da densidade da mesma, parte dessas ondas emitidas serão refletidas e captadas pelo transdutor. O transdutor contém cristais piezelétricos, com a capacidade de transformar a energia mecânica em elétrica. Esta transformação aparece no aparelho na tela conversora de varredura em forma de pontos de luz, assim a imagem de um órgão ou tecido pode ser reconstituída (NEVES et al., 2001).

A ultrassonografia transretal modo-B (escala de cinza), tem revolucionado o diagnóstico e monitoramento de eventos biológicos e patológicos em equinos, assim como em bovinos, tanto na área clínica como na área de pesquisa. O modo-B é utilizado para identificar e medir estruturas, além disso para verificar o status fisiológico de determinado órgão. (GINTHER, 1995).

A ultrassonografia Doppler colorida, é uma técnica que se estabeleceu como o melhor método para estudar o fluxo sanguíneo uterino em mulheres nos últimos anos. A técnica

consiste em sobrepor uma imagem colorida de vasos sanguíneos sobre a imagem em escala de cinza do ultrassom convencional, utilizando-a para medir mudanças patológicas e fisiológicas no fluxo sanguíneo uterino (STEER et al., 1990; BOLLWEIN et al., 2002; 2003).

2.3.1 Produção da imagem ultrassonográfica colorida

A produção da imagem ultrassonográfica colorida é baseada no princípio do efeito Doppler, o qual propõe a alteração da frequência de uma onda emitida ou refletida por um objeto em movimento em relação a um observador (GINTHER; UTT, 2004). A frequência emitida pelo transdutor é constante, já a frequência de retorno dos ecos refletidos varia. Em caso de movimento de aproximação ou afastamento entre os mesmos, a frequência de ecos refletidos pelo objeto aumenta ou diminui, respectivamente. Por outro lado, a frequência de onda é constante quando tanto observador como o objeto estão estáticos.

Uma frequência Doppler positiva pode ser observada quando o fluxo sanguíneo move-se em direção ao transdutor, onde a frequência de retorno é maior do que a transmitida. Assim, quando as hemácias movem-se em sentido oposto, afastando-se do transdutor, é produzido um sinal Doppler negativo, nesse caso a frequência de retorno é menor do que a frequência transmitida (GINTHER, 2007).

Os sinais Doppler positivos e negativos são representados por pontos nas cores vermelha e azul, respectivamente. Desta forma, alterações na velocidade e direção das hemácias são representadas por imagens ultrassonográficas com cores específicas e diferentes tonalidades (FERREIRA et al., 2011). O fluxo em direção ao transdutor é vermelho e o fluxo na direção contrária é azul. Os fluxos de maior velocidade são expressos por tonalidades mais claras da mesma cor (YANIK, 2002)

Existem três modos distintos de ação da técnica de ultrassonografia Doppler: O modo-B, o modo-Doppler o qual pode ser subdividido em funções Color e Power-flow, e o modo-Espectral. O modo-B utiliza escalas de cinza, e é principalmente utilizado para identificar as estruturas anatômicas a serem avaliadas posteriormente pelos modos coloridos. O modo Color-flow realiza uma avaliação qualitativa e em tempo real do fluxo sanguíneo de diferentes

órgãos, sendo estimado subjetivamente, considerando a porcentagem de pixels coloridos sobrepostos sobre uma imagem em modo-B do tecido examinado (FERREIRA; MEIRA, 2011). Esta avaliação subjetiva é diretamente proporcional ao fluxo sanguíneo do órgão avaliado, já que quanto maior o escore, maior é a vascularização do órgão em questão (SILVA et al., 2005)

O modo-espectral, por sua vez, permite uma avaliação quantitativa do fluxo sanguíneo de um determinado órgão, pois fornece valores exatos de velocidades de fluxo sanguíneo e índices Doppler vasculares e teciduais (GINTHER; UTT, 2004). O exame espectral requer uma correta angulação entre o transdutor e o vaso sanguíneo avaliado para obter uma adequada mensuração das velocidades de fluxo sanguíneo, as mesmas são representadas na forma de um gráfico de velocidade denominado espectro (GINTHER, 2007).

Porém, os índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI), obtidos a partir dos valores de velocidade de fluxo sanguíneo não sofrem influência dessa angulação, portanto são indicados para a avaliação espectral do trato reprodutivo de éguas (SILVA et al., 2005; FERREIRA et al., 2010). Há uma correlação negativa entre RI e PI com a perfusão vascular do tecido irrigado pela artéria em questão, o que significa que quanto menores RI e PI maior será a perfusão vascular no tecido suprido por aquele vaso (GINTHER et al., 2007).

2.3.2 Aplicação da ultrassonografia Doppler na reprodução

Esta tecnologia consegue fornecer informações imediatas sobre o fluxo sanguíneo de tecidos e órgãos, permitindo a avaliação de folículos, corpo lúteo, útero e verificar a presença e localização do conceito durante a fase de mobilidade embrionária, além de ser uma técnica auxiliar para o diagnóstico de distúrbios na hemodinâmica do sistema reprodutivo (FERREIRA et al., 2012).

Há diversos estudos relacionados à vascularização do folículo pré-ovulatório, visando a detecção do momento da ovulação (SILVA et al., 2006; GINTHER et al., 2007). Acosta et al. (2004) constataram por meio da ultrassonografia Doppler, que a diminuição da vascularização de folículos em desenvolvimento, leva à parada de crescimento e atresia dos mesmos. Ferreira

et al. (2008), por outro lado, constataram que há uma diminuição da vascularização uterina na presença de cistos endometriais. Já, na presença da vesícula embrionária (SILVA et al., 2005), e durante a gestação a vascularização uterina aumenta significativamente (BOLLWEIN et al., 2003a). Aparentemente, éguas que acumulam fluído intrauterino nos quatro dias subsequentes à cobertura apresentam maior perfusão sanguínea uterina e menores valores de RI e PI mesometrial (FERREIRA et al., 2012).

A tecnologia Doppler é uma ferramenta que auxilia no entendimento das mudanças fisiológicas do ciclo estral. Porém, mais estudos são necessários para determinar as aplicações dessa tecnologia, com o intuito de permitir a utilização da mesma por veterinários para aumentar os índices de fertilidade e melhorar a eficiência de biotecnologias como a inseminação artificial (ULIANI et al., 2011).

2.3.3 Avaliação da perfusão uterina por meio da ultrassonografia Doppler

A ultrassonografia colorida Doppler é uma técnica não invasiva recentemente utilizada para a avaliação transretal do fluxo sanguíneo do trato reprodutivo de animais de grande porte e é considerada como sendo uma das melhores técnicas disponíveis para o estudo *in vivo* da hemodinâmica uterina em éguas (GINTHER, 2007).

A perfusão vascular uterina pode ser alterada por vários fatores. Um deles é a influência hormonal durante o ciclo estral (WAITE et al., 1990). A concentração sérica de estrógeno apresenta correlação negativa com o PI durante o estro. Entretanto, no diestro, não há relação entre a concentração sérica de estrógeno e a perfusão sanguínea uterina. Também não há correlação entre diferentes valores de PI entre ciclos e entre éguas e a concentração sérica de estrógeno, fato que sugere a ação de outros fatores além da progesterona na regulação do fluxo sanguíneo uterino (BOLLWEIN et al., 2002).

Existe aparentemente certo padrão no fluxo sanguíneo da artéria uterina. Esse padrão é similar ao descrito para bovinos (FORD et al., 1979), assim como para mulheres (STEER et al., 1990). Em um estudo, Bollwein et al. (1998) mostraram aumento do RI da artéria uterina no início de um ciclo estral no D0. Por outro lado, houve a queda desse valor no início da fase

luteal no D5, indicando um aumento da perfusão sanguínea uterina, o que foi associado com o período em que ocorre a passagem do embrião da tuba uterina para o útero. Verificou-se aumento do RI no D10, enquanto que no D20 observaram-se baixos valores desse índice. Essa mudança nos valores de RI no período do dia 20 ao início do outro ciclo coincide com a queda na concentração sérica de estrógeno, de alta para baixa concentração.

Outro fator que influencia a perfusão vascular do útero, é a presença de sêmen. Foi determinado que há mudanças na velocidade do fluxo sanguíneo após a infusão de plasma seminal ou sêmen, e não na infusão de diluidor. Aumento significativo da perfusão uterina pode ser observado aproximadamente 1 hora após esta infusão (BOLLWEIN et al., 2003b). Existe uma interação imediata e de curta duração entre o útero e o sêmen durante o período pós-inseminação artificial. Ocorre um aumento na perfusão sanguínea do útero duas horas, e logo depois uma diminuição da mesma a partir de três horas após a infusão de sêmen (FERREIRA et al., 2012).

3 HIPÓTESES

Com base na revisão de literatura, foram definidos dois experimentos com o intuito de testar as seguintes hipóteses:

Experimento 1

1. A deposição de sêmen descongelado no trato reprodutivo da égua resulta no aumento do fluxo sanguíneo uterino, assim como de células inflamatórias, provocados pela resposta inflamatória uterina ao sêmen.
2. A inseminação artificial no corpo do útero com sêmen de baixa qualidade (ou seja, com maior número de espermatozoides lesados) resulta em aumento do fluxo sanguíneo uterino e do número de células inflamatórias quando comparada com a inseminação artificial com sêmen de alta qualidade.

Experimento 2

1. A deposição de sêmen no corno uterino ipsilateral ao lado da ovulação da égua resulta em aumento do fluxo sanguíneo uterino, assim como de células inflamatórias, provocados pela resposta inflamatória uterina ao sêmen.
2. A inseminação artificial no corno uterino ipsilateral ao lado da ovulação com sêmen de baixa qualidade (ou seja, com maior número de espermatozoides lesados) resulta em aumento do fluxo sanguíneo uterino e do número de células inflamatórias quando comparada com a inseminação artificial com sêmen de alta qualidade.
3. A inseminação artificial com sêmen de baixa qualidade (ou seja, com maior número de espermatozoides lesados) resulta em redução da taxa de prenhez, quando comparada com a inseminação artificial com sêmen de alta qualidade.

4 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

Experimento 1

1. Estudar a hemodinâmica uterina em equinos por meio da ultrassonografia Doppler colorida e espectral, e a citologia endometrial após a inseminação artificial no corpo do útero com sêmen congelado.
2. Verificar o efeito da inseminação artificial no corpo do útero com sêmen congelado de diferente qualidade espermática, ou seja, apresentando diferentes quantidades de espermatozoides viáveis, sobre o processo inflamatório uterino pós-cobertura.

Experimento 2

1. Estudar a hemodinâmica uterina em equinos por meio da ultrassonografia Doppler colorida e espectral, e comparar com a citologia endometrial após a inseminação artificial na ponta do corno uterino ipsilateral ao lado da ovulação com sêmen congelado.
2. Verificar o efeito da inseminação artificial no corno uterino ipsilateral ao lado da ovulação com sêmen congelado de diferente qualidade espermática, ou seja, apresentando diferentes quantidades de espermatozoides viáveis, sobre o processo inflamatório uterino pós-cobertura.
3. Avaliar a taxa de fertilidade após a inseminação artificial com sêmen congelado de diferente qualidade espermática.

5 MATERIAL E MÉTODO

5 MATERIAL E MÉTODO

As metodologias utilizadas nos Experimentos 1 e 2 estão descritas de forma separada.

5.1 EXPERIMENTO 1

5.1.1 Esquema experimental

Na Figura 1, está esquematizado, como foi procedido o Experimento 1.

Figura 1 - Esquema experimental simplificado do Experimento 1

Legenda: CASA: Computer-Assisted Sperm Analysis; PIAIA: membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial; IA: inseminação artificial no corpo do útero; TIO: ultrassonografia Doppler imediatamente antes da indução da ovulação; TIA: imediatamente antes da IA; T2: duas horas após a IA; T6: seis horas após a IA; T12: doze horas após a IA; T24: vinte e quatro horas após a IA e T48: quarenta e oito horas após a IA. T6 momento da citologia endometrial.

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

5.1.2 Local e período experimental

O presente estudo foi realizado em dois lugares diferentes no estado de São Paulo, Brasil. A coleta, processamento e criopreservação do sêmen foram realizados no Haras "Estância Sonho Meu" localizado na cidade de Piedade-SP. O descongelamento e a análise espermática foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP. Após a análise espermática, foi dada continuação ao experimento no Haras "Estância Sonho Meu" mediante o acompanhamento folicular, inseminação artificial e exames citológico e ultrassonográfico Doppler. Este estudo foi realizado no período de Outubro 2012 a Fevereiro de 2013.

5.1.3 Manejo e seleção dos animais

Foi utilizado um garanhão da raça Mangalarga Marchador com sete anos de idade, com o intuito de minimizar a variabilidade individual, este animal foi selecionado após a avaliação da congelabilidade do sêmen de oito garanhões. Para a seleção do garanhão foi levado em consideração o histórico reprodutivo e o exame andrológico completo, no qual foi avaliado o comportamento sexual, medida do perímetro escrotal, palpação da consistência testicular e espermograma completo, verificando assim sua capacidade reprodutiva.

Quinze éguas da raça Mangalarga, com idade entre quatro e doze anos, foram utilizadas para este experimento previamente submetidas a exame ginecológico. No exame foram verificados os achados de inspeção da região perineal, principalmente considerando a conformação vulvar, palpação e exame ultrassonográfico transretal, inspeção vaginal e cervical por meio da utilização do espéculo e citologia endometrial.

As éguas foram aleatoriamente distribuídas nos piquetes da propriedade e o garanhão era mantido em baia individual. Os animais eram alimentados duas vezes ao dia, com feno de Azevém (*Lolium multiflorum*) e recebiam suplementação mineral e água *ad libidum*.

5.1.4 Coleta e criopreservação de sêmen

Antes de cada coleta, foi realizada cuidadosamente a higienização do pênis e prepúcio com a utilização de algodão e água aquecida a 35°C. A coleta de sêmen foi realizada em manequim por meio da utilização de vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma® – SP – Brasil). Para estímulo do garanhão foi apresentada uma égua no estro frente ao manequim. As coletas ocorreram duas vezes por semana com intervalo de 3 a 4 dias.

Um total de dez ejaculados foram obtidos, cada ejaculado foi filtrado com filtro de nylon (nacional, específico para sêmen equino) em um Becker pré-aquecido, e diluído 1:1 com diluidor a base de leite desnatado (Botu-semen®, Botupharma, Botucatu, SP–Brasil). O sêmen foi analisado brevemente quanto ao volume total do ejaculado (mL), concentração, motilidade e morfologia espermática.

A motilidade foi estimada de forma subjetiva, foi analisada colocando-se dez microlitros de sêmen diluído em uma lâmina pré-aquecida e cobrindo com lamínula para observação sob microscopia em aumento de 100x. Para a determinação da concentração espermática, dez microlitros do sêmen diluído foram depositados em 990 microlitros de formol salino para uma diluição de 1:100, e foi utilizada a câmara de Neubauer para realizar a contagem, e obter o número de espermatozoides/mL (em aumento de 400x).

Para a análise morfológica, uma alíquota do sêmen foi diluída em formol salino tamponado pré-aquecido, e uma gota foi colocada entre lâmina e lamínula. Foi considerada a morfologia de duzentas células espermáticas, e a leitura foi realizada sob microscopia de contraste de interferência diferencial (Nikon, modelo Eclipse 80i) com aumento de 1.000 x. A classificação das células seguiu conforme as definições descritas por Brito (2007).

O sêmen foi centrifugado em tubos cônicos de 15 mL a 500 g durante 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o sedimento foi resuspendido com diluidor à base de gema de ovo contendo crioprotetor (Botucurio®, Botupharma, Botucatu, SP – Brasil) na concentração de 200×10^6 espermatozoides/ml. Posteriormente palhetas de 0,5 mL devidamente identificadas, foram preenchidas com uma concentração de 100×10^6 espermatozoides/palheta, e devidamente lacradas com álcool polivinílico.

O sêmen foi criopreservado em sistema automatizado (TK 3000; Tetakon®, Uberaba, Brazil). A curva positiva foi de -0,25°C/minuto a partir da temperatura ambiente até atingir 5°C. Após o porta palhetas foi retirado do tubo de refrigeração e rapidamente colocado dentro

da caixa térmica contendo nitrogênio líquido (7 cm de altura), onde a velocidade da queda de temperatura da curva negativa foi de $-15^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até atingir -80°C , e continuando $-10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até chegar a -120°C . Finalmente as palhetas foram retiradas do porta-palhetas e imergidas em nitrogênio líquido (-196°C). Depois foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido até a sua utilização.

5.1.5 Análise do sêmen criopreservado

Para a análise após o processo de criopreservação, duas palhetas de sêmen de cada partida foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos em banho-Maria e o sêmen foi depositado e um tubo de microcentrífuga aquecido a 37°C em banho-Maria seco, e foi analisado quanto a motilidade e morfologia espermática, além da integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial. Após esta avaliação, o sêmen foi considerado sendo de alta qualidade.

5.1.5.1 Avaliação computadorizada das características de motilidade espermática (CASA - Computer-Assisted Sperm Analysis)

A motilidade espermática foi avaliada utilizando uma alíquota do sêmen descongelado diluída em meio TALP *sperm* (BAVISTER et al., 1983), ajustando a concentração para 25×10^6 espermatozoides/mL. Dez microlitros da diluição foram colocados na câmara de Makler (Sefi Medical Instruments Ltd.). As configurações do sistema computadorizado de análise do sêmen (CASA, modelo HTM-Ivos da Hamilthon Thorne Biosciences, Version 12.3) foram previamente ajustadas para a análise de sêmen equino, a câmara foi inserida no aparelho e foram selecionados cinco campos para a leitura e análise.

As características analisadas foram: motilidade total (TMOT,%), motilidade progressiva (PMOT,%), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm),

frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %) e a porcentagem de células rápidas (VRAP, %).

5.1.5.2 Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial

A integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial foram avaliadas pela associação das sondas fluorescentes PI-H342, FITC-PSA e JC-1, descrito por Celeghini et al. (2007) e Celeghini et al. (2010). O protocolo utilizado consistiu em retirar uma alíquota de sêmen descongelado, aquecido a 37°C em banho-Maria seco e diluí-la em meio TALP *sperm*, ajustando a concentração para 25×10^6 espermatozoides/mL.

A partir disso foram retirados 150 µL dessa solução e colocado em um tubo para microcentrífuga de 600 µL. Neste tubo foram adicionadas as sondas fluorescentes: 3 µL de Iodeto de Propídio (PI - 0,5 mg/mL, P4170, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), 2 µL de Hoechst 33342 (H342 - 5mg/mL, Molecular probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), a seguir, 5 µL de JC-1 (153 µM, T-3168, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), e por fim 80 µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA-100 µg/mL, L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), modificado de Nascimento et al. (2008).

A amostra ficou incubada por oito minutos a 37°C em ambiente desprovido de luz. Após a incubação, uma alíquota de 3 µL foi colocada entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C e imediatamente avaliada em microscopia de epifluorescência (Microscópio Nikon, modelo Eclipse 80i, Melville, NY, USA), em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655) em aumento de 1.000x. Duzentas células de cada partida foram analisadas e classificadas em oito grupos diferentes de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação das células espermáticas de equino de acordo com a fluorescência emitida pelas sondas PI-H342, FITC-PSA e JC-1.

Categoria de célula espermática	PI¹	H342²	FITC-PSA³	JC-1⁴
Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial (PIAIA)	-	+	-	Vermelho
Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e baixo potencial mitocondrial (PIAIB)	-	+	-	Verde
Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e alto potencial mitocondrial (PIALA)	-	+	+	Vermelho
Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e baixo potencial mitocondrial (PIALB)	-	+	+	Verde
Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial (PLAIA)	+	-	-	Vermelho
Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial mitocondrial (PLAIB)	+	-	-	Verde
Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial mitocondrial (PLALA)	+	-	+	Vermelho
Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial mitocondrial (PLALB)	+	-	+	Verde

¹PI positivo (+) = núcleo corado de vermelho. ²H342 positivo (+) = núcleo corado de azul. ³FITC-PSA positivo (+) = região do acrossomo verde-amarelada. ⁴JC-1 positivo (Vermelho) = região da peça intermediária corada em vermelho. ⁴JC-1 negativo (Verde) = região da peça intermediária corada em verde.
Fonte: Modificado de Celeghini et al. (2007).

Após a classificação das oito categorias, foram considerados os percentuais de células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial (PIAIA, %), membrana plasmática intacta (MPI, %), membrana acrossomal intacta (MAI, %) e alto potencial mitocondrial (APM, %).

5.1.5.3 Morfologia espermática

Para avaliar as alterações morfológicas, uma alíquota do sêmen foi diluído em formol salino tamponado pré-aquecido a 37°C e uma gota foi colocada entre lâmina e lamínula. A leitura foi realizada sob microscopia de contraste de interferência diferencial (Nikon, modelo Eclipse 80i) com aumento de 1.000 x. Foram consideradas duzentas células por amostra. A classificação das células seguiu conforme as definições descritas por Brito (2007).

5.1.5.4. Determinação da qualidade do sêmen

Os resultados da avaliação computadorizada das características de motilidade espermática (CASA) e da análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial pela associação das sondas fluorescentes PI-H342, FITC-PSA e JC-1 das dez partidas de sêmen estão apresentados na tabela 2. Os resultados completos da avaliação espermática podem ser observados no Apêndice A.

Tabela 2 - Valores de integridade de membrana plasmática (MPI, %), integridade de membrana acrossomal (MAI, %), alto potencial mitocondrial (APM, %), células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial (PIAIA, %), motilidade total (TMOT,%), motilidade progressiva (PMOT, %) e total de defeitos (%) das 10 partidas analisadas – Pirassununga – SP - 2013

Partida	Características Espermáticas						Total de defeitos (%)
	MPI (%)	MAI (%)	APM (%)	PIAIA (%)	T MOT (%)	P MOT (%)	
1	44	64,5	44	29,5	41	19	9,50%
2	37	72	28	29,5	57	32	10,50%
3 *	42,5	72,5	28	26,5	45	20	12,00%
4	62	74,5	40	32	30	14	13,00%
5	65	66,5	37,5	33,5	31	13	16,50%
6	59,5	68,5	49,5	33	22	14	12,50%
7	33,5	72	36,5	29,5	47	24	17,00%
8 *	21	64	18,5	15	67	49	18,50%
9	33,5	80,5	35	32	35	11	14,00%
10	39,5	77,5	46,5	39	53	36	16,00%

* Partidas com < 30% de células PIAIA, desconsideradas para a IA.

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

Das oito categorias de células classificadas pelas sondas fluorescentes, somente o percentual das células que apresentaram membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial (PIAIA) foi considerado para a divisão dos grupos experimentais. Das dez partidas obtidas, somente oito apresentaram valores próximos ou maiores a 30% de espermatozoides PIAIA após criopreservação, e para o presente experimento, foi este sêmen o considerado de alta qualidade.

Para a obtenção do sêmen de baixa qualidade, metade das palhetas a ser utilizadas na dose inseminante (5/10) foram submetidas ao processo de *flash frozen* (técnica que consiste

de três ciclos de congelação rápida em nitrogênio líquido, seguida de descongelação lenta), no intuito de lesar os espermatozoides.

A dose inseminante utilizada foi de 1×10^9 de espermatozoides totais, portanto sendo utilizadas dez palhetas por inseminação. Foram utilizadas palhetas de diferentes partidas de forma aleatória para evitar efeito de partida. De acordo com o percentual de células PIAIA, foram divididos os grupos:

- ALTA = sêmen de alta qualidade, 30% de espermatozoides PIAIA (300×10^6 sptz PIAIA/dose).
- BAIXA = sêmen de baixa qualidade, 15% de espermatozoides PIAIA (150×10^6 sptz PIAIA/dose).

5.1.6 Acompanhamento do desenvolvimento folicular e inseminação artificial

Foram determinados quatro grupos: CT (controle): não inseminado, mas submetido a mimetização da técnica de inseminação artificial (n=7); DIL: no qual foi feita a infusão intrauterina somente com diluidor a base de leite desnatado (Botu-semen®) (n=7); ALTA: inseminado com sêmen de ALTA (n=7) e o BAIXA: inseminado com sêmen de Baixa qualidade (n=7). As 15 éguas foram divididas entre os grupos de forma aleatória, completando sete ciclos para cada tratamento, sendo assim considerado cada ciclo uma unidade experimental.

Foi realizado diariamente o acompanhamento do desenvolvimento folicular ovariano das éguas por meio de palpação e ultrassonografia transretal com a utilização do aparelho de ultrassonografia Doppler (modelo M5vet, marca Mindray®, China) com probe linear transretal (6,5 MHz). Na presença de um folículo ≥ 35 mm juntamente com a presença de edema uterino, foi administrada 2.500 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG)(Vetecor®, Caller Laboratories, Barcelona, Spain), por via intravenosa (IV), para a indução da ovulação. Após trinta horas do momento da indução, as éguas passaram a serem examinadas a cada seis horas.

A mimetização, infusão ou inseminação artificial ocorreu imediatamente após a detecção da ovulação, e foi realizada no corpo uterino por meio da utilização de pipeta rígida

para inseminação artificial (Provar[®], Provar Comercial, São Paulo, SP-Brasil), de 60 cm de comprimento. Para o grupo de alta qualidade de sêmen, foram descongeladas dez palhetas em banho-Maria a 37°C durante 30 segundos e logo foi diluído o sêmen em 25 mL de diluidor a base de leite desnatado, obtendo o volume final de 30 mL referente à dose inseminante.

Para o grupo de baixa qualidade de sêmen, cinco palhetas foram descongeladas em banho-Maria a 37°C durante 30 segundos e o sêmen foi depositado em um tubo de micro centrífuga para ser submetido ao processo de *flash frozen*. Outras cinco palhetas foram descongeladas em banho-Maria a 37°C durante 30 segundos e o sêmen foi acrescentado ao lesado, e após foi diluído com mais 25 mL de diluidor a base de leite desnatado, obtendo assim o volume final de 30 mL referente à dose inseminante.

5.1.7 Avaliação da hemodinâmica uterina: perfusão vascular do endométrio

A análise da hemodinâmica uterina foi realizada utilizando o aparelho de ultrassonografia Doppler (modelo M5vet, marca Mindray[®], China) com probe linear transretal (6,5 mHz), nos modos Espectral e color Doppler, com as seguintes configurações do aparelho: ganho de 62, IP4, filtro 100HZ, 5,4 cm/s de detecção de fluxo. Esta avaliação foi realizada em sete períodos: imediatamente antes da indução da ovulação (TIO), imediatamente antes da IA (TIA), 2 (T2), 6 (T6), 12 (T12), 24 (T24) e 48 horas (T48) após a IA.

O modo espectral foi utilizado para realizar a avaliação objetiva do fluxo sanguíneo das artérias uterinas, considerando a média do valor do índice de resistência (RI) (Figura 2).

Figura 2 – Imagem ultrassonográfica Doppler modo Espectral (M5Vet, Mindray – 6,5 mHz) da artéria uterina de égua para obtenção do índice de resistência (RI).

Legenda: Seta indica corte transversal da artéria uterina. Barras ponteadas indicam o intervalo de um ciclo cardíaco. PS: pico sistólico; ED: final diastólico; TAMAX: taxa de velocidade máxima; PI: índice de pulsatilidade; RI: Índice de resistência; S/D: relação entre sístole e diástole – Piedade, SP – 2013

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

A localização das artérias uterinas esquerda e direita foi realizada de acordo com Bollwein (1998). Foram obtidas no mínimo nove ondas consecutivas completas de ciclo cardíaco. Posteriormente para a avaliação, de cada três ondas similares foi selecionado o RI da onda do meio, e foi obtida a média dos três valores de RI. O valor final foi utilizado como dado a ser analisado pela estatística, como descrito em estudos anteriores (SILVA et al., 2005; FERREIRA et al., 2008).

Uma vez localizada a porção intermediária de cada corno, esquerdo e direito individualmente por meio da ultrassonografia modo-B, o modo Doppler foi ativado para a função Color-flow (Figura 3), foi analisada a perfusão local de forma subjetiva. Foi gravado um vídeo de no mínimo trinta segundos para a posterior avaliação. O grau de vascularização dos cornos uterinos foi determinado de acordo com os escores de 1, referente a vascularização mínima, a 4, referente à vascularização máxima (SILVA et al., 2005).

Figura 3 – Ultrassonografia Doppler modo Color-flow (M5Vet, Mindray – 6,5 mHz) do corte transversal do corno uterino de égua.

Legenda: Escore de vascularização da análise subjetiva da vascularização do endométrio (1-4): A: Escore 1; B: Escore 2; C: Escore 3 e D: Escore 4 – Piedade, SP – 2013

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

Dois avaliadores diferentes analisaram os vídeos, e a média das duas avaliações foi utilizada para a análise estatística.

5.1.8 Avaliação do processo inflamatório uterino: citologia endometrial

Seis horas após a inseminação artificial, foi realizado o exame citológico endometrial. Foi utilizando o aparelho específico para citologia endometrial com escova ginecológica, protegido com a utilização de camisinha sanitária até atravessar a cérvix.

Uma vez dentro do corpo do útero, foi exposta a escova ginecológica para entrar em contato com a parede endometrial. A escova foi girada cautelosamente algumas vezes para coletar a amostra celular, e foi retraída para dentro do aparelho novamente.

Com o material coletado, foram preparadas as lâminas para citologia girando delicadamente a escova sobre a lâmina, para posteriormente serem coradas pelo método de

Panótico Rápido® (Laborclin Ltda. Paraná, Brasil). As lâminas foram analisadas por meio de microscopia óptica (Nikon, Eclipse E200, Tokio, Japão), em aumento de 400x, sendo realizada a contagem de trezentas células por lâmina, classificando-as como células endometriais (células cubóides ou colunares com núcleo arredondado e basófilo) e células inflamatórias, principalmente neutrófilos (células polimorfonucleares), determinando a porcentagem de células polimorfonucleares (Figura 4).

Os graus de resposta inflamatória uterina foram determinados de acordo com Brook (1993), onde < 5% de células polimorfonucleares é um processo inflamatório normal para éguas em estro ou há ausência do mesmo; processo inflamatório leve (entre 5 e 15% de células polimorfonucleares), moderado (entre 15 e 30% de células polimorfonucleares) e severo (> 30% de células polimorfonucleares).

Figura 4 – Citologia endometrial de égua realizado por meio da utilização de aparelho de citologia com escova ginecológica. Coloração com Panótico Rápido.

Legenda: A: Ausência de células polimorfonucleares; B: Citologia realizada 6 horas após a IA, com presença de células polimorfonucleares.

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

5.2 EXPERIMENTO 2

5.2.1 Esquema experimental

Na Figura 5 está o esquema experimental referente ao Experimento 2.

Figura 5 - Esquema experimental simplificado do Experimento 2

Legenda: CASA: Computer-Assisted Sperm Analysis; PIAIA: membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial; IA: inseminação artificial realizada na ponta do corno uterino ipsilateral ao lado da ovulação; TIO: ultrassonografia Doppler imediatamente antes da indução da ovulação; TIA: imediatamente antes da IA; T6: seis horas após a IA. D14: catorze dias após a ovulação.

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

5.2.2 Local e período experimental

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, no Centro de Biotecnologia de Reprodução Animal, do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Campus Administrativo de Pirassununga, SP. Este estudo foi realizado no período de Setembro de 2013 a Março de 2014.

5.2.3 Manejo e seleção dos animais

Foi utilizado um garanhão da raça Árabe com nove anos de idade, com o intuito de minimizar a variabilidade individual. Para a seleção do garanhão foi realizada a avaliação reprodutiva da mesma forma como realizado no Experimento 1.

Foram utilizadas 12 éguas, sendo oito éguas solteiras e quatro éguas recém-paridas, sem raça definida, com idade entre oito e nove anos, e entre três e quatro parições. A seleção das éguas foi realizada a partir do histórico reprodutivo, de acordo com ocorrências de endometrite nas duas últimas estações de monta e pela realização do exame clínico reprodutivo completo de cada égua como descrito no Experimento 1.

As éguas ficaram alojadas em um piquete no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal e o garanhão foi mantido em baia individual no setor de Equideocultura da Prefeitura do Campus da USP, Pirassununga. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, com feno de Azevém (*Lolium multiflorum*), concentrado e recebiam suplementação mineral e água *ad libidum*.

5.2.4 Coleta e criopreservação de sêmen

Antes da coleta, foi realizada cuidadosamente a higienização do pênis e prepúcio com a utilização de algodão e água aquecida a 35°C. A coleta de sêmen foi realizada em

manequim por meio da utilização de vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma – SP – Brasil). Para estímulo do garanhão foi apresentada uma égua no estro frente ao manequim.

Foi obtido um ejaculado, filtrado com filtro de nylon (nacional, específico para sêmen equino) em um Becker, e diluído 1:1 com diluidor a base de leite desnatado (Botu-semen[®], Botupharma, Botucatu, SP–Brasil). O sêmen foi analisado em seguida quanto ao volume total do ejaculado (mL), concentração, motilidade e morfologia espermática da mesma forma que no Experimento 1.

O sêmen foi centrifugado em tubos cônicos de 15 mL 500g durante 12 minutos. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e o sêmen foi resuspenso com diluidor a base de gema de ovo com crioprotetor (Botucio[®], Botupharma, Botucatu, SP – Brasil) na concentração de 200×10^6 espermatozoides/ml. Posteriormente, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL devidamente identificadas, em uma concentração de 100×10^6 espermatozoides/palheta, e devidamente lacradas com álcool polivinílico.

O sêmen foi criopreservado em sistema automatizado (*Tetakon[®] TK 3000; Uberaba, Brazil*), utilizando a mesma curva descrita no Experimento 1.

5.2.5 Análise do sêmen criopreservado

Para a análise após o processo de criopreservação, duas palhetas de sêmen foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos em banho-Maria e o sêmen foi depositado em um tubo de microcentrifuga pré-aquecido a 37°C em banho-Maria seco, e foi analisado quanto a motilidade e morfologia espermática, além da integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial. Após esta avaliação, o sêmen foi considerado como sendo de alta qualidade.

5.2.5.1 Avaliação computadorizada das características de motilidade espermática (CASA - Computer-Assisted Sperm Analysis)

A motilidade espermática foi avaliada utilizando uma alíquota do sêmen descongelado diluída em meio TALP *sperm*, ajustando a concentração para 25×10^6 espermatozoides/mL. Dez microlitros da diluição foram colocados na câmara de Makler, a qual foi inserida no aparelho com configurações previamente ajustadas para a análise de sêmen equino. Foram selecionados cinco campos para a leitura e análise. As características analisadas foram as mesmas utilizadas Experimento 1.

5.2.5.2 Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial

A integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial foram avaliadas pela associação das sondas fluorescentes PI-H342, FITC-PSA e JC-1, da mesma forma como foi descrito para o Experimento 1, e as células foram também classificadas da mesma forma.

5.2.5.3 Morfologia espermática

Para avaliar as alterações morfológicas, uma alíquota do sêmen foi diluída em formol salino tamponado e uma gota foi colocada entre lâmina e lamínula. A leitura foi realizada sob microscopia de contraste de interferência diferencial (Nikon, modelo Eclipse 80i) com aumento de 1.000 x. Foram consideradas duzentas células por amostra. A classificação das células seguiu conforme as definições descritas por Brito (2007).

5.2.5.4 Determinação da qualidade do sêmen

Os resultados da avaliação computadorizada das características de motilidade espermática – (CASA) e da análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial pela associação das sondas fluorescentes PI-H342, FITC-PSA e JC-1 do sêmen congelado utilizado no presente experimento, estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Valores de integridade de membrana plasmática (MPI, %), integridade de membrana acrossomal (MAI, %), alto potencial mitocondrial (APM, %), células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial mitocondrial (PIAIA, %), motilidade total (TMOT,%), motilidade progressiva (PMOT, %) e total de defeitos (%) da partida analisada – Pirassununga – SP - 2014

Características Espermáticas						
MPI (%)	MAI (%)	APM (%)	PIAIA (%)	T MOT (%)	P MOT (%)	Total de defeitos (%)
54	76	56	52	75	67	26

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

Das oito categorias de células classificadas pelas sondas fluorescentes, somente o percentual das células que apresentaram membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial (PIAIA) foi considerado para a divisão dos grupos experimentais. O sêmen avaliado apresentou 52% de espermatozoides PIAIA após criopreservação, sendo assim considerado o sêmen de alta qualidade.

Para a obtenção do sêmen de baixa qualidade, duas das três palhetas a serem utilizadas na dose inseminante foram submetidas ao processo de *flash frozen*.

A dose inseminante utilizada foi de 300×10^6 de espermatozoides totais, portanto sendo utilizadas três palhetas por inseminação. De acordo com o percentual de células PIAIA, foram divididos os grupos:

- ALTA = sêmen de alta qualidade, 52% de espermatozoides PIAIA (156×10^6 spz PIAIA/dose).
- BAIXA = sêmen de baixa qualidade, 16% de espermatozoides PIAIA ($49,5 \times 10^6$ spz PIAIA/dose).

Os resultados completos da avaliação espermática do sêmen de alta e de baixa qualidade podem ser observados no Apêndice B.

5.2.6 Acompanhamento do desenvolvimento folicular e inseminação artificial

Foram determinados quatro grupos de tratamento: CT (controle): não inseminado, mas submetido a mimetização da técnica de inseminação artificial (n=8); DIL: no qual foi feita a infusão intrauterina somente de diluidor a base de leite desnatado (Botu-semen[®]) acrescido de 1,5mL de diluidor a base de gema de ovo (Botucurio[®]) (n=8); ALTA: inseminado com sêmen de Alta qualidade (n=8) e o BAIXA: inseminado com sêmen de Baixa qualidade (n=8). Foram utilizados quatro ciclos de oito éguas, os mesmos que foram distribuídos entre os grupos de forma aleatória, e todos os animais passaram por todos os tratamentos, conforme a realizar o delineamento experimental em Quadrado Latino 4x4.

Foi realizado diariamente o acompanhamento do desenvolvimento folicular ovariano das éguas por meio de palpação e ultrassonografia transretal com a utilização do aparelho de ultrassonografia Doppler (modelo M5vet, marca Mindray[®], China) com probe linear transretal (6,5 MHz). Na presença de um folículo ≥ 35 mm juntamente com a presença de edema uterino, foi administrado 2.500 UI de hCG (Vetecor[®], Callier Laboratories, Barcelona, Spain), por via intravenosa (IV) e 750 µg de GnRH, por via intramuscular (IM), simultaneamente, para a indução da ovulação. Após trinta horas do momento da indução, as éguas passaram a serem examinadas a cada seis horas.

A mimetização, infusão ou inseminação artificial ocorreu imediatamente após a detecção da ovulação. Foi realizada a técnica de inseminação profunda, com deposição do sêmen (diluidor ou manipulação) na ponta do corno uterino ipsilateral ao lado da ovulação, utilizando a pipeta flexível com cateter interno (Minitube[®], Tieffenback, Alemanha) de 75 cm de comprimento, acoplada a uma seringa de 5 mL para inseminação artificial com pequeno volume, a qual foi direcionada por meio de palpação transretal. Para o grupo de alta qualidade de sêmen, foram descongeladas três palhetas em banho-Maria a 37°C durante 30 segundos, o sêmen foi diluído em 2,5 mL de diluidor a base de leite desnatado, obtendo o volume final de 4 mL referente à dose inseminante.

Para o grupo de baixa qualidade de sêmen, duas palhetas foram descongeladas em banho-Maria a 37°C durante 30 segundos e o sêmen foi depositado em um tubo de micro centrífuga para ser submetido ao processo de *flash frozen*. Mais uma palheta foi descongelada em banho maria a 37°C durante 30 segundos e o sêmen foi acrescentado ao lesado, e após foi diluído com mais 2,5 mL de diluidor a base de leite desnatado, obtendo assim o volume final de 4 mL referente à dose inseminante.

5.2.7 Avaliação da hemodinâmica uterina: perfusão vascular do endométrio

A análise da hemodinâmica uterina foi realizada utilizando o aparelho de ultrassonografia Doppler (modelo M5vet, marca Mindray®, China) com probe linear transretal (6,5 mHz), nos modos Espectral e color Doppler, com as seguintes configurações do aparelho: ganho de 37, IP4, filtro 100HZ, 4,1 cm/s de detecção de fluxo. Esta avaliação foi realizada em três períodos: imediatamente antes da indução da ovulação (TIO), imediatamente antes da IA (TIA) e 6 horas (T6) após a IA.

O modo espectral foi utilizado para realizar a avaliação objetiva do fluxo sanguíneo das artérias uterinas, considerando o valor do índice de resistência (RI). Foram gravados três vídeos, cada um contendo no mínimo três ondas consecutivas completas de ciclo cardíaco, Posteriormente para a avaliação, de cada vídeo por separado, das três ondas similares foi selecionado o RI da onda do meio, e foi obtida a média dos três valores de RI. O valor final foi utilizado como dado a ser analisado pela estatística, como descrito em estudos anteriores (SILVA et al., 2005; FERREIRA et al., 2008)

Para o modo Doppler função Color-flow foi gravado um vídeo de no mínimo trinta segundos para a posterior avaliação. O grau de vascularização dos cornos uterinos foi determinado de acordo com os escores de 1, referente a vascularização mínima a 4, referente à vascularização máxima (SILVA et al., 2005). Dois avaliadores diferentes analisaram os vídeos e a média das duas avaliações foi utilizada para a análise estatística.

Posteriormente, os dados da avaliação hemodinâmica uterina foram separados para levar em consideração o lado do ovário da ovulação, para assim comparar as artérias ipsi (AI) e contralateral (AC) e vascularização subjetiva dos cornos uterinos ipsi (CI) e contralateral (CC) ao ovário da ovulação.

5.2.8 Avaliação do processo inflamatório uterino: citologia endometrial

Seis horas após a inseminação artificial, foi realizado o exame citológico endometrial. Foi utilizado o aparelho específico para citologia endometrial com escova ginecológica, protegido com a utilização de camisinha sanitária até atravessar a cérvix.

Uma vez dentro do corpo do útero, foi exposta a escova ginecológica para entrar em contato com a parede endometrial. A escova foi girada cautelosamente algumas vezes para coletar a amostra celular e foi retraída para dentro do aparelho novamente.

Com o material coletado, foram preparadas as lâminas para citologia girando delicadamente a escova sobre a lâmina, para posteriormente serem coradas pelo método de Panótico Rápido® (Laborclin Ltda. Paraná, Brasil). As lâminas foram analisadas por meio de microscopia óptica (Nikon, Eclipse E200, Tokio, Japão), em aumento de 400x, sendo realizada a contagem de trezentas células por lâmina, classificando-as como células endometriais e células inflamatórias, principalmente neutrófilos, determinando a porcentagem de células polimorfonucleares. Os graus de resposta inflamatória uterina foram determinados de acordo com Brook (1993).

5.2.9 Análise do potencial de fertilidade do sêmen de diferentes qualidades

Como uma segunda parte do Experimento 2, foram consideradas as taxas de prenhez dos grupos A (sêmen de Alta qualidade, n=11) e B (sêmen de Baixa qualidade, n=11). As onze éguas foram divididas entre os grupos de forma aleatória, e todos os animais passaram pelos dois tratamentos, sendo assim utilizados dois ciclos de cada égua, com delineamento experimental em cross-over para a análise estatística. Uma das éguas foi descartada do experimento por apresentar irregularidade no ciclo estral com presença de folículos anovulatórios sucessivos.

5.2.9 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultrassonográfico via transretal, após 14 dias da inseminação artificial.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística descrita a seguir foi utilizada para os dois experimentos (1 e 2), com exceção da análise dos dados de fertilidade que somente foi parte do Experimento 2.

Os dados obtidos foram examinados quanto à normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett). Quando algum dos testes foi significativo ($P < 0,05$), os dados foram transformados e reavaliados. Comparações entre grupos foram analisadas para efeitos principais de tratamento (CT, DIL, ALTA e BAIXA) e tempo, assim como para efeito de interação tratamento x tempo. O procedimento misto (PROC MIXED) do SAS (Versão 9.3; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) foi utilizado com a função *repeated* para a autocorrelação entre mensurações sequenciais.

Quando algum efeito significativo foi observado, as diferenças foram localizadas através do Teste de Tukey. Dados com fator único foram avaliados por ANOVA e os dados de fertilidade foram avaliados pelo teste exato de Fisher. A probabilidade de $p \leq 0,05$ indica que houve diferença significativa, e probabilidade entre $p > 0,05$ e $\leq 0,1$ indica que a diferença aproximou-se de ser significativa (tendência). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.), a não ser por indicação contrária.

6 RESULTADOS

Os resultados dos experimentos 1 e 2 serão apresentados separadamente.

6.1 EXPERIMENTO 1

6.1.1 Hemodinâmica uterina

As médias e erros padrão da média dos índices de resistência (RI) das artérias uterinas obtidas do escaneamento por meio da ultrassonografia Doppler espectral, nos momentos anteriormente estabelecidos (imediatamente antes da indução da ovulação - IO, imediatamente antes da inseminação artificial - IA, 2, 6, 12, 24 e 48 horas após a IA) estão apresentados na tabela 4. Não foi encontrado efeito de tratamento ($p = 0,463$) ou tempo ($p = 0,085$) entre os grupos em qualquer momento de avaliação, e não houve interação tempo x tratamento ($p = 0,650$) para os valores de RI.

Tabela 4 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos valores de índice de resistência (RI, 0-1) das artérias uterinas dos animais dos grupos: Controle (CT) (n=7), Diluidor (DIL) (n=7), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) (n=7) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA) (n=7), avaliados nos diferentes tempos em relação à inseminação artificial (imediatamente antes da IO, imediatamente antes da IA, 2, 6, 12, 24, e, 48 horas após a IA) – Piedade - SP – 2013

Tempo	Tratamento				Média
	CT	DIL	ALTA	BAIXA	
TIO	0,769 $\pm$ 0,014	0,74 $\pm$ 0,024	0,756 $\pm$ 0,014	0,746 $\pm$ 0,038	0,752 $\pm$ 0,012
TIA	0,766 $\pm$ 0,011	0,757 $\pm$ 0,014	0,782 $\pm$ 0,021	0,787 $\pm$ 0,020	0,773 $\pm$ 0,008
T2	0,781 $\pm$ 0,017	0,773 $\pm$ 0,008	0,743 $\pm$ 0,016	0,752 $\pm$ 0,019	0,762 $\pm$ 0,008
T6	0,758 $\pm$ 0,017	0,761 $\pm$ 0,016	0,765 $\pm$ 0,020	0,771 $\pm$ 0,016	0,764 $\pm$ 0,008
T12	0,802 $\pm$ 0,017	0,756 $\pm$ 0,011	0,800 $\pm$ 0,009	0,778 $\pm$ 0,014	0,784 $\pm$ 0,007
T24	0,790 $\pm$ 0,018	0,788 $\pm$ 0,014	0,779 $\pm$ 0,023	0,769 $\pm$ 0,016	0,781 $\pm$ 0,009
T48	0,777 $\pm$ 0,021	0,772 $\pm$ 0,022	0,806 $\pm$ 0,012	0,756 $\pm$ 0,027	0,778 $\pm$ 0,010
Geral	0,777 $\pm$ 0,006	0,764 $\pm$ 0,006	0,776 $\pm$ 0,007	0,766 $\pm$ 0,008	0,771 $\pm$ 0,003

*Não foi encontrado efeito de tratamento ($p = 0,463$) ou tempo ($p = 0,085$), nem interação tempo x tratamento ($p = 0,650$)

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

As médias e erros padrão da média da avaliação subjetiva de escore de vascularização (EV) dos cornos uterinos, obtidos por meio da ultrassonografia Doppler modo Color-flow, nos momentos imediatamente antes da IO, imediatamente antes da IA, 2,6,12,24, e 48 horas após a IA estão apresentados na tabela 5. Igualmente ao resultado de RI, não foi encontrado efeito de tratamento ($p = 0,231$) ou tempo ($p = 0,494$) entre os grupos em qualquer momento de avaliação, e não houve interação tempo x tratamento ($p = 0,435$) para os valores de EV.

Tabela 5 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos valores de escores de vascularização (EV, 1 -4) dos cornos uterinos dos animais dos grupos: Controle (CT) (n=7), Diluidor (DIL) (n=7), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) (n=7) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA) (n=7), avaliados nos diferentes tempos em relação à inseminação artificial (imediatamente antes da IO, imediatamente antes da IA, 2, 6, 12, 24, e, 48 horas após a IA) – Piedade - SP – 2013

Tempo	Tratamento				Média
	CT	DIL	ALTA	BAIXA	
TIO	3,375 $\pm$ 0,191	2,536 $\pm$ 0,176	3,071 $\pm$ 0,277	2,929 $\pm$ 0,317	2,963 $\pm$ 0,132
TIA	3,125 $\pm$ 0,308	2,786 $\pm$ 0,291	2,750 $\pm$ 0,289	2,357 $\pm$ 0,327	2,741 $\pm$ 0,152
T2	2,714 $\pm$ 0,380	2,714 $\pm$ 0,301	3,000 $\pm$ 0,332	2,500 $\pm$ 0,294	2,732 $\pm$ 0,158
T6	2,821 $\pm$ 0,254	2,786 $\pm$ 0,264	3,143 $\pm$ 0,298	2,607 $\pm$ 0,162	2,839 $\pm$ 0,123
T12	2,821 $\pm$ 0,352	2,857 $\pm$ 0,261	3,214 $\pm$ 0,301	2,643 $\pm$ 0,327	2,884 $\pm$ 0,152
T24	2,929 $\pm$ 0,248	2,679 $\pm$ 0,266	2,643 $\pm$ 0,283	2,429 $\pm$ 0,344	2,670 $\pm$ 0,140
T48	3,179 $\pm$ 0,202	2,893 $\pm$ 0,237	3,107 $\pm$ 0,18	2,786 $\pm$ 0,32	2,991 $\pm$ 0,117
Geral	2,984 $\pm$ 0,106	2,750 $\pm$ 0,093	2,990 $\pm$ 0,104	2,607 $\pm$ 0,111	2,831 $\pm$ 0,053

*Não foi encontrado efeito de tratamento ($p = 0,231$) ou tempo ($p = 0,494$), nem interação tempo x tratamento ($p = 0,435$)

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

6.1.2 Citologia endometrial

Os resultados referentes à porcentagem de células inflamatórias encontradas na citologia endometrial para cada tratamento estão apresentados no gráfico 1. Foi observado que o grupo inseminado com Sêmen de Baixa Qualidade apresentou um processo inflamatório mais pronunciado 76,41 $\pm$ 5,89% ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo no qual foi realizada a infusão somente de diluidor a base de leite desnatado (20,12 $\pm$ 6,57%), ambos não diferiram ($p > 0,05$) dos grupos Controle (35,58 $\pm$ 6,36%) e Alta (47,87 $\pm$ 10,59%).

Gráfico 1 - Média e erro padrão da média das porcentagens de células inflamatórias (neutrófilos) endometriais dos grupos: Controle (CT) (n=7), Diluidor (DIL) (n=7), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) (n=7) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA) (n=7), realizada seis horas após a infusão – Piedade - SP - 2013

a,b Letras diferentes sobre as barras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

6.2 EXPERIMENTO 2

6.2.1 Hemodinâmica uterina

As médias e erros padrão da média, dos valores de RI das artérias uterinas das éguas, obtidos nos momentos: imediatamente antes da IA e 6 horas após a IA estão apresentados na tabela 6. Não houve diferença estatística em nenhuma das variáveis analisadas, os efeitos da análise estatística foram: tratamento ($p = 0,4221$), tempo ($p = 0,2256$) e tratamento x tempo ($p = 0,5013$).

Tabela 6 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos valores de índice de resistência (RI, 0-1) das artérias uterinas dos animais (n = 8) dos grupos: Controle (CT), Diluidor (DIL), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA), avaliados nos diferentes momentos em relação à inseminação artificial (TIA: imediatamente antes da IA; T6: 6 horas após a IA) – Pirassununga - SP - 2014

Tempo	Tratamento				Média
	CT	DIL	ALTA	BAIXA	
TIA	0,766 $\pm$ 0,017	0,780 $\pm$ 0,008	0,762 $\pm$ 0,027	0,772 $\pm$ 0,020	0,770 $\pm$ 0,009
T6	0,775 $\pm$ 0,011	0,772 $\pm$ 0,019	0,775 $\pm$ 0,018	0,798 $\pm$ 0,015	0,780 $\pm$ 0,008
Geral	0,770 $\pm$ 0,009	0,776 $\pm$ 0,010	0,768 $\pm$ 0,016	0,785 $\pm$ 0,013	0,775 $\pm$ 0,006

* Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$)

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

As médias e erros padrão da média dos valores obtidos da avaliação subjetiva de escore de vascularização (EV) dos cornos uterinos direito e esquerdo, nos momentos: imediatamente antes da IA e 6 horas após a IA estão apresentados na tabela 7. Os efeitos da análise estatística foram: tratamento ($p = 0,0873$), tempo ($p = 0,9225$) e tratamento x tempo ($p = 0,4611$), e foi observada tendência de diferença estatística entre os tratamentos (Alta x CT = 0,10 e Baixa x CT = 0,09).

Tabela 7– Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos valores da avaliação subjetiva de escore de vascularização (EV, 1-4) dos cornos uterinos dos animais (n = 8) dos grupos: Controle (CT), Diluidor (DIL), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA), avaliados nos diferentes tempos em relação à inseminação artificial (TIA: imediatamente antes da IA; T6: 6 horas após a IA) – Pirassununga - SP - 2014

Tempo	Tratamento				Média
	CT	DIL	ALTA	BAIXA	
TIA	1,963 $\pm$ 0,252	2,209 $\pm$ 0,266	2,328 $\pm$ 0,271	2,231 $\pm$ 0,231	2,183 $\pm$ 0,124
T6	1,619 $\pm$ 0,123	2,134 $\pm$ 0,300	2,469 $\pm$ 0,244	2,463 $\pm$ 0,253	2,171 $\pm$ 0,130
Geral	1,790 $\pm$ 0,143^b	2,172 $\pm$ 0,194^{ab}	2,398 $\pm$ 0,177^a	2,347 $\pm$ 0,168^a	2,177 $\pm$ 0,089

^{a,b} Linhas com letras sobresscritas minúsculas diferentes indicam tendência estatística ($P \leq 0,1$).

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

Posteriormente, foi verificado o efeito da vascularização uterina (RI e EV) sobre os cornos uterinos ipsi e contralateral ao procedimento, considerando somente o momento 6 horas após a IA. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para RI entre os grupos de tratamento, nem para os diferentes cornos uterinos (tabela 8).

Tabela 8 – Média $\pm$ erro padrão da média (EPM) dos valores de índice de resistência (RI, 0-1) das artérias uterinas ipsi e contralateral dos animais (n=8) dos grupos: Controle (CT), Diluidor (DIL), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA), avaliados no momento T6 (6 horas após a IA) – Pirassununga - SP - 2014

Artéria	Tratamento				Média
	CT	DIL	ALTA	BAIXA	
Ipsilateral	0,776 $\pm$ 0,016	0,785 $\pm$ 0.019	0,765 $\pm$ 0.021	0,808 $\pm$ 0.016	0,784$\pm$0,009
Contralateral	0,765 $\pm$ 0.007	0,760 $\pm$ 0.019	0,784 $\pm$ 0.018	0,788 $\pm$ 0.016	0,774$\pm$0,008
Geral	0,770$\pm$0,008	0,772$\pm$0,013	0,775$\pm$0,014	0,798$\pm$0,011	0,779$\pm$0,006

* Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$)

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

Para EV, foi encontrado efeito de tratamento ($p = 0,007$) entre as médias dos grupos, sendo que os grupos inseminados com Sêmen de Alta (2,469 $\pm$ 0,194) e de Baixa qualidade (2,463 $\pm$ 0,180) apresentaram valores maiores do que o grupo Controle (1,619 $\pm$ 0,114), não diferindo do grupo Diluidor (2,134 $\pm$ 0,206) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Média e erro padrão da média (EPM) dos valores de escore de vascularização (EV, 1-4) dos cornos uterinos ipsi e contralateral dos animais (n = 8) dos grupos: Controle (CT), Diluidor (DIL), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA), avaliados no momento T6 (6 horas após a IA) – Pirassununga - SP - 2014

a,b Letras sobrescritas minúsculas diferentes diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

6.2.2 Citologia endometrial

Os resultados referentes à porcentagem de células inflamatórias encontradas na citologia endometrial para cada tratamento estão apresentados no gráfico 3. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,45$). Porém, a maior porcentagem de células inflamatórias encontrada foi no grupo de Sêmen de Baixa Qualidade ($72,19 \pm 3,94\%$), e a menor porcentagem foi no grupo do Diluidor ($59,76 \pm 7,04\%$).

Gráfico 3 - Média e erro padrão da média (EPM) das porcentagens de células inflamatórias (neutrófilos) endometriais dos grupos: Controle (CT) (n = 8), Diluidor (DIL) (n = 8), Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) (n = 8) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA) (n = 8), realizada seis horas após a infusão – Pirassununga-SP-2014.

* Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$)
 Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

6.2.3 Taxa de prenhez

A taxa de prenhez (%) de acordo com o grupo de tratamento quanto à qualidade do sêmen utilizado para a inseminação artificial está apresentada no gráfico 4.

Embora não tenha sido encontrada diferença estatística entre os grupos ($p = 0,36$), foi observada maior taxa de prenhez (81,82%) quando se utilizou o Sêmen de Alta Qualidade comparado com a utilização de Sêmen de Baixa Qualidade (54,55%).

Gráfico 4 - Taxa de prenhez (%) de acordo com a qualidade de sêmen utilizado para a inseminação artificial: Sêmen de Alta Qualidade (ALTA) (n = 11) e Sêmen de Baixa Qualidade (BAIXA) (n = 11) – Pirassununga-SP-2014.

* Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$)

Fonte: (SERRANO-RECALDE, 2014)

7 DISCUSSÃO

A maioria de trabalhos relacionados com o estudo do processo inflamatório uterino de éguas após a inseminação artificial, estão principalmente associados à utilização de técnicas de caráter invasivo, como é o caso do exame citológico endometrial, além disso este ainda apresenta várias formas de interpretação, já que não tem se chegado a um acordo entre os diversos autores (CARD, 2005).

Baseados no fato de que o processo inflamatório uterino pode provocar alterações vasculares, e que estas poderiam ser diagnosticadas pela ultrassonografia Doppler, uma técnica não invasiva, o presente estudo foi delineado para testar se a endometrite pós-cobertura na égua poderia ser identificada por esta técnica, e se ao se introduzir maior número de espermatozoides lesados no útero esta resposta inflamatória seria intensificada.

Alterações na hemodinâmica uterina eram esperadas após a IA, devido à resposta inflamatória uterina ao sêmen (TROEDSSON, 1995; 2001). Ao se analisar o gráfico 1, observa-se que as éguas inseminadas com o sêmen de baixa qualidade apresentaram uma reação inflamatória significativamente maior que as éguas do grupo diluidor, mas sem diferir do grupo inseminado com sêmen de alta qualidade. Embora este processo não tenha sido percebido pela técnica de ultrassonografia Doppler, entre os grupos em qualquer momento da avaliação no Experimento 1, foi possível detectar esta diferença nos valores de escore de vascularização (EV) do modo Color-flow no Experimento 2, sendo que os grupos inseminados, tanto com sêmen de alta como de baixa qualidade, apresentaram valores maiores de EV do que o grupo controle. Da mesma forma, quando realizada a comparação entre os cornos ipsi e contralateral à IA somente no tempo seis horas após a inseminação, foi novamente encontrada diferença significativa entre os mesmos grupos de tratamento para os valores de EV, mostrando assim que somente os grupos inseminados apresentaram aumento de vascularização uterina após a inseminação artificial, o que não ocorreu no grupo controle nem no grupo no qual foi somente realizada a infusão de diluidor. Ferreira (2012), conseguiu detectar aumento da vascularização endometrial duas e oito horas após a inseminação, considerando o valor de escore de vascularização endometrial, porém, nesse trabalho foi utilizado sêmen fresco, diferente do sêmen congelado diluído utilizado no presente estudo.

Bollwein et al. (2003b), considerando somente o valor de velocidade máxima média do fluxo sanguíneo da artéria uterina, também detectaram aumento da vascularização uterina

após uma hora da inseminação artificial com sêmen fresco, e não obteve diferença quando somente feita a infusão de diluidor. Mas, nesse estudo não foram analisados os valores de índice de resistência da artéria uterina, nem de escore de vascularização, portanto, sendo inadequado afirmar que há alteração na perfusão sanguínea uterina de éguas após inseminação.

Foi verificado que o plasma seminal leva a um aumento da vascularização uterina de forma similar à utilização de sêmen fresco, porém causando menor resposta inflamatória, o que sugere que não somente o processo inflamatório é o responsável pelo aumento da vascularização uterina, envolvendo assim outros fatores (BOLLWEIN et al., 2003b). Um estudo realizado em ovelhas verificou que o processo inflamatório uterino agudo leva à liberação de prostaglandina E, o mesmo que causa aumento da perfusão uterina (STILL e GREISS, 1978). Além disso, durante o processo inflamatório endometrial é liberado óxido nítrico (NO), considerado um potente vasodilatador (ROSSELLI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K., 1998). De acordo com Lewis et al. (1996), o próprio espermatozoide pode causar aumento da vascularização uterina devido à ação da enzima NO-sintase, a qual produz NO, e tem sido identificada na cabeça do espermatozoide.

Nos procedimentos de inseminação artificial de ambos experimentos, foi utilizado sêmen congelado diluído em diluidor a base de leite desnatado, podendo ser este responsável por diminuir a concentração espermática e quantidade de crioprotetor por mL, mascarando o real processo inflamatório que ocorre em éguas quando inseminadas com sêmen congelado rotineiramente. De acordo com Katila (2005), o volume da dose não é de grande importância, mas o volume é negativamente correlacionado com a concentração espermática. Tem sido demonstrado que mesma quantidade de espermatozoides em menor volume de diluidor, leva a um maior processo inflamatório, que quando diluído em maior quantidade de diluidor (KOTILAINEN et al., 1994). No Experimento 1 foi utilizado o volume de 30mL totais contendo 1 bilhão de espermatozoides, resultando em $33,33 \times 10^6$ de espermatozoides/mL para a inseminação no corpo do útero, e neste caso não foi possível observar diferença alguma na vascularização uterina. Mas já no Experimento 2, foi utilizado o volume de 4mL com 300×10^6 de espermatozoides totais, resultando em 75×10^6 de espermatozoides/mL para a inseminação no corno uterino, e assim foi possível observar diferença na vascularização uterina dos animais inseminados, porém não houve diferença entre os grupos de qualidades diferentes. Sêmen altamente concentrado provavelmente é mais irritante devido ao maior contato entre o espermatozoide e o endométrio (KOTILAINEN et al., 1994).

Foi observada, em todos os grupos, a instalação de um processo inflamatório após o procedimento de inseminação artificial, independente do tratamento, sendo que até o grupo controle já apresenta aumento de células inflamatórias no endométrio. Isto provavelmente se deve à realização do procedimento de mimetização com subsequente manipulação da cérvix, concordando com os achados de Williamson et al. (1987), que observaram neutrofilia transitória após a manipulação da cérvix e do útero. Em ambos os experimentos foi observada a presença de células inflamatórias também nas éguas do grupo diluidor. A infusão intrauterina de PBS, diluidores seminais e de plasma seminal causam um processo inflamatório leve (KOTILAINEN et al., 1994). De acordo com Palm et al. (2008), a infusão de diluidor a base de gema de ovo leva a um processo inflamatório menos intenso quando comparado com diluidor a base de leite desnatado, provavelmente devido à alta concentração de progesterona da gema de ovo, causando uma redução na resposta inflamatória do endométrio.

Güvenc et al. (2005) verificaram que, tanto o local da inseminação, como a dose inseminante não afetam a magnitude do processo inflamatório após 24 horas da IA, e assim afirma que a manipulação e introdução da pipeta de inseminação até a ponta do corno uterino, não tem efeito irritante a mais em comparação com a outra técnica tradicional. Porém, a reação inflamatória transitória tem pico entre 6 a 12 horas após a inseminação, e 48 horas após podem ser encontrados somente poucos espermatozoides (KATILA, 2005). Para Fiala et al, (2002), o influxo de PMN é maior entre 2 e 4 horas após a inseminação, e para Kotilainen et al.; (1994) é maior às 6 horas após a IA. Embora no presente estudo não foram comparadas as técnicas de inseminação, seis horas após a IA, foi possível observar que no Experimento 1 para o grupo controle, no qual foi realizada somente a técnica de mimetização no corpo do útero, a porcentagem de células inflamatórias foi 35,58%, sendo praticamente metade do valor observado no Experimento 2 (60,79%), no qual foi realizada a técnica de inseminação até a ponta do corno uterino. Deve-se destacar que não é possível esta comparação por se tratarem de experimentos ocorridos em momentos distintos e com éguas diferentes.

Kotilainen et. al. (1994) analisaram o fluido intrauterino de éguas seis horas após a inseminação artificial com sêmen congelado, sêmen fresco diluído e infusão de diluidor, sendo observada uma reação inflamatória mais pronunciada, com maior quantidade de neutrófilos, em éguas inseminadas com sêmen congelado. A alta quantidade de espermatozoides mortos no sêmen criopreservado tem sido proposta como a razão pela forte resposta inflamatória. Embora, no presente estudo, somente duas éguas do Experimento 2 tenham apresentado presença de líquido intrauterino detectado pela ultrassonografia,

constatou-se que, após seis horas da inseminação artificial com sêmen congelado, ocorre um processo inflamatório uterino, detectado pela técnica de citologia endometrial. Mas, de acordo com os resultados obtidos, a utilização de sêmen de menor qualidade, ou seja, com maior porcentagem de espermatozoides mortos não leva a um processo inflamatório mais pronunciado, quando comparado com a utilização de sêmen de alta qualidade, o qual confere com os resultados obtidos por Katila (1997), quem verificou que os espermatozoides mortos não levaram a um aumento de PMN no líquido intrauterino em comparação com espermatozoides vivos. Devemos em este caso, também considerar que foram utilizadas éguas saudáveis, e não suscetíveis.

Éguas inseminadas com 100 a 500 milhões tem uma reação inflamatória menor que éguas inseminadas com 1 bilhão de espermatozoides, duas e quatro horas após a inseminação (FIALA et al., 2004). Comparando novamente os resultados obtidos em ambos experimentos, para a quantidade de células inflamatórias de éguas inseminadas, os valores das médias são bastante próximos entre a dose de 1 bilhão utilizada no Experimento 1, e a dose de 300 milhões utilizada no Experimento 2, porém deve ser considerada a técnica de inseminação utilizada em cada experimento.

A remoção do plasma seminal durante o processo de criopreservação do sêmen equino levando ao uso de pequenos volumes com altas concentrações espermáticas ou uma reação de hipersensibilidade ao diluidor de sêmen congelado o qual contém gema de ovo e glicerol pode levar ao aumento do processo inflamatório quando utilizado sêmen congelado (KOTILAINEN, 1994). Portanto, é necessário considerar que tanto para o Experimento 1 como para o 2, as palhetas de sêmen foram descongeladas e diluídas em diluidor a base de leite desnatado, momento no qual a concentração espermática e a concentração do crioprotetor na dose inseminante diminuiria. Esta diluição não é realizada rotineiramente para a inseminação artificial com sêmen congelado, porém de certa forma no presente estudo, isto pode estar influenciando a não conseguir evidenciar maiores alterações tanto para a hemodinâmica uterina como o percentual de células inflamatórias.

Para os índices de fertilidade, embora a taxa de prenhez do grupo de sêmen de alta qualidade foi numericamente maior do que o grupo de baixa qualidade, não foi encontrada diferença estatística entre os grupos. Para este resultado, deve-se considerar o pequeno número de animais utilizado, podendo ser o responsável por não permitir esclarecer essa diferença. Em um trabalho realizado por Oliveira et al. (2012), foram comparadas as taxas de prenhez obtidas de vacas inseminadas com sêmen de alta (47,5% de espermatozoides PIAIA), média (23,0% de espermatozoides PIAIA) e baixa qualidade (8,5% de espermatozoides

PIAIA), no qual foi observada diferença entre as taxas de prenhez do sêmen de alta (64,7%) comparado com o de baixa (36,2%) qualidade, ambos não diferindo do sêmen considerado como de média qualidade (50%).

Baixos índices de prenhez em éguas suscetíveis não pode ser explicado pela diferença da resposta inflamatória pós-cobertura (KATILA, 2005), já que éguas suscetíveis com idade próxima a 15 anos, e categorias de biopsia endometrial IIA e II tiveram quantidades de PMN e quantidade de líquido intrauterino semelhantes a éguas normais com idade ao redor de 6 anos e categorias de biopsia I e IIA (GÜVENC et al., 2004).

A análise de sêmen congelado com sondas fluorescentes pode nos trazer mais informações sobre as alterações espermáticas individuais ocorridas durante o processo de criopreservação e descongelação, o que se deve ao fato de que a integridade da membrana plasmática e do acrossomo, bem como a função mitocondrial são indispensáveis para manter o balanço iônico celular para o espermatozoide poder se deslocar pelo útero e penetrar na zona pelúcida do ovócito (SQUIRES et al., 1999; GADELLA et. al., 2001). Assim uma avaliação do garanhão mais aprofundada com a utilização da combinação de algumas técnicas como as utilizadas no presente experimento pode nos levar a identificação de animais subférteis e a geração de taxas esperadas de fertilidade.

8 CONCLUSÕES

Experimento 1

1. A deposição de sêmen no trato reprodutivo da égua não altera o fluxo sanguíneo uterino embora cause aumento de células inflamatórias no endométrio, provocados pela resposta inflamatória uterina ao sêmen.
2. A inseminação artificial no corpo do útero com sêmen de baixa qualidade (ou seja, com maior número de espermatozoides lesados) não resulta em aumento do fluxo sanguíneo uterino, e não difere do número de células inflamatórias quando comparada com a inseminação artificial com sêmen de alta qualidade.

Experimento 2

1. A deposição de sêmen no corno uterino ipsilateral ao lado da ovulação da égua, resulta em um aumento do fluxo sanguíneo uterino, mas não causa aumento de células inflamatórias, provocados pela presença do sêmen.
2. A inseminação artificial no corno uterino ipsilateral ao lado da ovulação com sêmen de baixa qualidade (ou seja, com maior número de espermatozoides lesados) não resulta em aumento do fluxo sanguíneo uterino e nem do número de células inflamatórias quando comparada com a inseminação artificial com sêmen de alta qualidade.
3. A inseminação artificial com sêmen de baixa qualidade (ou seja, com maior número de espermatozoides lesados) não resulta em redução da taxa de prenhez, quando comparada com a inseminação artificial com sêmen de alta qualidade.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. **Biology Reproduction**, v. 71, p. 502–507, 2004.
- AGUILAR, J.; HANKS, M.; SHAW, D. J.; ELSE, R.; WATSON, E. Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares. **Theriogenology** n. 66, p. 423-430, 2006.
- ALATAS, C.; AKSOY, E.; AKARSU, C.; YAKIN, K.; BAHCECI, M. Hemodynamic assessment in pelvic inflammatory disease by transvaginal color Doppler ultrasonography. **European Journal of Obstetrics and Gynecological Reproduction Biology**, v. 70, p. 75–78, 1996
- ALGHAMDI, A. S.; FOSTER, D. N. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 1174–1181, 2005.
- ALGHAMDI, A. S.; FOSTER, D. N.; TROEDSSON, M. H. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. **Reproduction**, v. 127, p. 593–600, 2004.
- ALGHAMDI, A.; TROEDSSON, M. H. T.; LASCHKEWITSCH, T.; XUE, J. L. Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. **Theriogenology**, v. 55, p. 1019–1028, 2001.
- ALGHAMDI, A. S.; TROEDSSON, M. H. T.; XUE, J. L.; CRABO, B. G. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Seopadex filtration of cryopreserved stallion semen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, p. 880-885, 2002.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais avanços no processamento e aplicação do sêmen congelado de equinos. **Spermova**, v. 1, p. 7-10, 2011.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M. M. K.; RAPHAEL, C. F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 190–194, 2007.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 f. - Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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

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

BARBACINI, S.; GULDEN, P.; MARCHI, V.; ZAVAGLIA, G. Incidence of embryo loss in mares inseminated before or after ovulation. **Equine Veterinary Education**, v. 11, p. 251–254, 1999.

BARBACINI, S.; NECCHI, D.; ZAVAGLIA, G.; SQUIRES, E. L. Retrospective study on the incidence of postinsemination uterine fluid in mares inseminated with frozen/thawed semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 23, p. 493–496, 2003.

BAVISTER, B. D.; LEIBFRIED, M. L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 1, p. 235–247, 1983.

BARBACINI, S.; ZAVAGLIA, P.; GULDEN, P.; MARCHI, V.; NECCHI, D. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. **Equine Veterinary Education**, v. 12, n. 6, p. 312–317, 2000.

BEDFORD-GUAUS, S. J. Transported stallion semen and breeding mares with cooled or frozen-thawed semen. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, p. 239–248, 2007.

BLANCHARD, T. L.; GARCIA, M. C.; HURTGEN, J. P.; KENNEY, R. M. Comparison of two techniques for obtaining endometrial bacteriologic cultures in the mare. **Theriogenology**, v. 16, p. 85–93, 1981.

BOLLWEIN, H.; MAIERL, J.; MAYER, R.; STOLLA, R. Transrectal color Doppler sonography of the uterine artery in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 49, n. 8, p. 1483–8, 1998.

BOLLWEIN H.; MAYER, R.; STOLLA R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during early pregnancy in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 597–605–16, 2003a.

BOLLWEIN H.; SOWADE C.; STOLLA R. The effect of semen extender, seminal plasma and raw semen on uterine and ovarian blood flow in mares. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 607–16, 2003b.

BOLLWEIN, H.; WEBER, F.; KOLBERG, B.; STOLLA, R. Uterine and ovarian blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, p. 2129–38, 2002.

BORG, K.; COLENBRANDER, B.; FAZELI, A.; PARLEVLIET, J.; MALMGREN, L. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, n. 4, p. 531–536, 1997.

BRAUNDMEIER, A. G.; MILLER, D. J. The search in on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1915–1925, 2001.

BRINSKO, S. P. Insemination doses: how low can we go? **Theriogenology**, v. 66, p.543-550, 2006.

BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, n. 6, p. 249-264, 2007.

BROOK D. Uterine cytology. In: MCKINNON, A. O., VOSS, J. L., ed. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p. 246–53.

CADARIO, E. M.; 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 reproductively normal mares with delayed uterine clearance. **Theriogenology**, v. 52, p. 1181-1192, 1999.

CARD, C. E.; CARLEY, S. D., GREEN, J., CHIRINO-TREJO, M. Endometrial cytology in mares bred with frozen semen. In: ANNUAL CONV AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 50., 2004, Denver, Colorado . **Proceedings...** Denver, Colorado, 2004.

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

CARMONA, J. M. P. **Resposta inflamatória uterina em éguas submetidas a inseminação artificial**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa. 2011.

CAUSEY, R. C. Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. **The Veterinary Journal**, v. 172, n. 3, p. 405-421, 2006.

CAUSEY, R. C. Mucus and the mare: how little we know. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 386-394, 2007.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

CELEGHINI, E. C. C., ARRUDA, R. P., ANDRADE, A. F. C., NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C. F., RODRIGUES, P. H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, n. 104, p. 119-131, 2008.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Porto Seguro, Bahia, Brazil. Elsevier, Agosto 2004. v. 2. p. 511.

CELEGHINI, E. C. C.; DE ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J. S.; ARRUDA, R. P. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1285-1292, 2010.

CLAUS, R.; DIMMICK, M.; GIMENEZ, T.; HUDSON, L. Estrogens and prostaglandin F2 α in the semen and blood plasma of stallions. **Theriogenology**, v. 38, p. 687-693, 1992.

COCHRAN, J. D.; AMANN, R. P.; FROMAN, D. P.; PICKETT, B. W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C freezing rate and thawing rate on the post thaw motility of equine sperm. **Theriogenology**, v. 22, p.25-38, 1984.

CRICKMAN, J. A; PUGH, D. G. Equine endometrial cytology: a review of techniques and interpretations. **Veterinary Medicine**, v. 81, p. 650-656, 1986.

CROWE, C. A. M.; RAVENHILL, P. J.; HEPBURN, R. J.; SHEPHERD, C. H. A retrospective study of artificial insemination of 251 mares using chilled and fixed time frozen-thawed semen. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 6, p. 572-576, 2008.

ENGLAND, G. C. W., RUSSO, M., FREEMAN, S. L., The bitch uterine response to semen deposition and its modulation by male accessory gland secretions. **The Veterinary Journal**, v. 195, p. 179-184, 2013.

EVANS, M. J.;HAMER, J. M.; GASON, L. M.; IRVINE, C. H. Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. **Journal of Reproduction and Fertility** (Supplement), v. 35, p. 327-334. 1987.

FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Assesment of *Psium sativum* agglutinin in identifying acrossomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, p. 23-27, 1992.

FERREIRA, J. C.; GASTAL, E. L.; GINTHER, O. J. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. **Reproduction**, v. 135, p. 541-550, 2008.

FERREIRA, J. C.; IGNÁCIO, F. S.; MEIRA, C. Uterine vascular perfusion and spectral-Doppler measurements during the early gestation in mares: news concepts of evaluation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION, 10., 2010, Lexington, KY, USA. **Proceedings...** Lexington: Elsevier. . 2010. v.1. p.281-283.

FERREIRA, J. C; MEIRA, C. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1063-1069, 2011.

FERREIRA J.C. **Influência das alterações degenerativas endometriais e da idade na hemodinâmica do trato reprodutivo de éguas após a inseminação artificial e durante as fases iniciais do desenvolvimento embrionário.** 2012. 178f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2012.

FIALA, S. M. E. **Transporte espermático e resposta inflamatória na égua após a inseminação com diferentes concentrações de espermatozoides**. 2004, 73 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. A.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**, v. 67, p. 556-562, 2007.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. A.; STEIGER, K.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of skim milk and seminal plasma uterine infusions in mares. **Theriogenology**, v. 58, p. 491-494, 2002.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FORD, S. P.; CHENAULT, J. R.; ECHTEMKAMP, S. E. Uterine blood flow of cows during the estrous cycle and early pregnancy: effect of the conceptus on the uterine blood supply. **Reproduction and Fertility**, v. 56, p. 53-62, 1979.

FORD, S. P.; REYNOLDS, D. B.; FARLEY, R. K.; BHATNAGAR, R. K.; van ORDEN, D. E. Interaction of ovarian steroid and periarterial α -adrenergic receptors in altering uterine blood flow during the estrous cycle of gilts. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 150, p. 480-484, 1984.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 249-265, 2001.

GARNER, D. L. PINKEL, D.; JOHNSON, L. A.; PACE, M. M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.

GASTAL E. L., GASTAL M. O. & GINTHER O. J. Relationships of changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals in the wall of the preovulatory follicle to changes in systemic oestradiol concentrations and the effects of human chorionic gonadotrophin in mares. **Reproduction**, n. 131, p. 699-709, 2006.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-doppler ultrasonography**. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 2007.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; WITBANK, M. C. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, v. 43, p. 689-703, 1995.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; UTT, M. D.; BEG, M. A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 213-220, 2007.

GINTHER, O. J., UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, p. 516-526, 2004.

GOMES, G. M.; JACOB, J. C. F.; MEDEIROS, A. S. L.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M. A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative crioprotectants for mangalarga marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, p. 277-279, 2002.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; BAUMBER, J.; BALL, B. A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1691-1703, 2000.

GUVENEC, K.; REILAS, T.; KATILA, T. Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. **Theriogenology**, v. 63, p. 2504-2512, 2005.

HARRISON, R. A. P.; GADELLA, B.M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 63, p. 342-351, 2005.

HURTGEN, J. P. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 560-566, 2006.

JASKO, D. J.; HATHAWAY, J. A.; SCHALTENBRAND, V. L.; SIMPER, W. D.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motio characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, p.1241-1252, 1992.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. **Biology of Reproduction Monography**, v. 1, p. 515–517, 1995.

KATILA, T. Effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 31-38, 2005.

KAWANO N.; ARAKIB, N.; YOSHIDAC, K.; HIBINOD, T.; OHNAMIA, N.; MAKINOA, M.; KANAIA, S.; HASUWAE, H.; YOSHIDAB, M.; MIYADOA, K.; UMEZAWAA, A. Seminal vesicle protein SVS2 is required for sperm survival in the uterus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 11, p. 4145-4150, 2014.

KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v. 16, p. 630–631, 1994.

LEBLANC, M. M. Persistent mating induced endometritis in the mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. In: Ball, B.A. **Recent Advances in Equine Reproduction**, 2003. Disponível em: <www.ivis.org/advances/Reproduction_Ball/leblanc/IVIS.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2012.

LEBLANC, M. M. The equine endometrium and pathophysiology of endometritis. **Proceeding of Society of Theriogenology**, p. 78-81, 1999.

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

LEBLANC, M. M.; 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, p. 109–113, 1994.

LEIPOLD, S. D.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L.; McCUE, P. M.; BRINSKO, S. P.; VANDERWALL, D. K. Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen semen. **Theriogenology**, v. 49, p. 1537-1543, 1998.

LEWIS, S. E.; DONNELLY, E. T.; STERLING, E. S.; KENNEDY, M. S.; THOMPSON, W.; CHAKRAVARTHY, U. Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, p. 873-8, 1996.

LINDSEY, A. C.; VARNER, D. D.; SEIDEL, Jr. G. E.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Hysteroscopic or rectally guided deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18 h at either 5 degrees C or 15 degrees C prior to flow-cytometric sorting. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 125-130, 2005.

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

LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 119-128, 2008.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction of Fertility and Development**, v. 8, p. 1165-1178, 1997.

MORRIS, L. H. A. Low dose insemination in the mare: an update. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 625-632, 2004.

NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides equinos criopreservados**. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ALONSO, M. A.; CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 351-358, 2008.

NASH, D. M.; SHELDON, I. M.; HERATH, S.; LANE, E. A. Endometrial explant culture to study the response of equine endometrium to insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 670-676, 2010.

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 of Reproduction and Fertility** (Supplement), v. 27, p. 181-189, 1979.

NEILD, D. M.; GADELLA, B. M.; CHAVES, M. G.; MIRAGAYA, M. H.; COLENBRANDER, B.; AGUER, A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 59, p. 1693-1705, 2003.

- NEVES, J. P.; OLIVEIRA, J. F. C.; MACCIEL, M. N. Diagnóstico de gestação em bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**. São Paulo: Varela. p. 7-8, 2001.
- NIELSEN, J. M. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology**, v. 64, p. 510-518, 2005.
- O'BERT, H.; HARRIS, M. A.; ARNS, M. J. Prostaglandin F2 α concentration in stallion semen and the effect of 24 h of cold storage on exogenous prostaglandin F2 α concentrations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 94, p. 39-41, 2004.
- OGURI, N.; TSUTSUMI. Nonsurgical recovery of equine eggs, and an attempt at nonsurgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 187-195 1972.
- OLIVEIRA, B. M. M. Hemodinâmica uterina avaliada por ultrassom Doppler colorido a taxa de fertilidade de vacas submetidas à IATF com sêmen analisado por sondas fluorescentes. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- PALM, F.; WALTER, I.; BUDIK, S.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; AURICH, C. Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α and COX-2 mRNA in the equine endometrium. **Theriogenology**, v. 70, p. 843-851, 2008.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; GRAHAM, J. K. In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. **Theriogenology**, v. 51, p. 461-472, 1999.
- PARKS, E.; LYNCH, V.D. Lipid composition and thermotropic phase behavior stallion, and rooster sperm membranes of boar, bull. **Cryobiology**, v. 266, p. 255-266, 1992.
- PEGG, D. E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars Reproduction Medicine**, v. 20, n. 1, p. 5-13, 2002.
- PARLEVLIET, J. M.; COLENBRANDER, B. Prediction of first season stallion fertility of 3-year-old Dutch Warmbloods with prebreeding assessment of percentage of morphologically normal live sperm. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. 3, p. 248-251, 1999.
- PETERSON, F. B.; MCFEELY, R. A.; DAVID, J. S. E. Studies on the pathogenesis of endometritis in the mare. In: ANNUAL CONV AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 15., 1969, **Proceedings...** Denver, Colorado p. 279-287, 1969.
- PETRUNKINA, A. M. Fundamental aspects of gamete cryobiology. **Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology**, v. 4, n. 2, p. 78-91, 2007.
- PICKETT, B. W.; VOSS, J. L. Physiology and philosophy of breeding horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 19, n.6, p.363-373, 1999.
- PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L.; MCKINNON, A. O. Procedures for collection, evaluation and utilization of stallion semen for artificial insemination, Colorado State University. **Animal Reproduction Laboratory**, p. 1-125, 1987.

PICKETT, B. W.; BURWASH, L. D.; VOSS, J. L.; BACK, D. G. Effect of Seminal extenders on equine fertility. **Journal of Animal Science**, v. 40, p. 1136-1143, 1975.

PORTUS, B. J.; REILAS, T.; KATILA, T. Effect of seminal plasma on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, p. 515–519, 2005.

REGER, H. P.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L.; MACLELLAN, L. J.; BARBACINI, S.; NECCHI, D.; ZAVAGLIA, G. Effects of timing and placement of cryopreserved semen on fertility of mares. **Equine Veterinary Education**, v. 15, p. 101-106, 2003.

REILAS, T. **Uterine luminal environment of the mare**. 2001. 80f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Helsinki, 2001.

RICKETTS, S. W.; BARRELET, A., A retrospective review of the histopathological features seen in a series of 4241 endometrial biopsy samples collected from UK Thoroughbred mares over a 25 year period. **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 525–530, 1997.

ROBERTSON, S. A. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 36–44, 2007.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction of Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 312-318, 2003.

ROSSELLI, M.; KELLER, P. J.; DUBEY, R. K. The role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 4, p. 3–24, 1998.

SALAZAR, J. L.; TEAGUE, S. R.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L., VARNER, D. D. Effect of cryopreservation protocol on post thaw characteristics of stallion sperm. **Theriogenology**, v. 76, p. 409-418, 2011.

SAMPER, J. C.; MORRIS, C. A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. rates. **Theriogenology**, v.49, p. 895-903,1998.

SAMPER, J. C.; HELLANDER, J. C. Relationship between the fertility of fresh and frozen semen and semen quality. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 107-114, 1991.

SAMPER, J. C; PLOUGH, T. Techniques for the insemination of low doses of stallion sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45 (Supl. 2), p. 35-39, 2010.

SCOTT, M. A.; LIU I. K. M.; OVERSTREET, J. W. Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implications. **Proceedings Animal Association Equine Practice**, v. 41, p. 1-2, 1995.

SERTICH, P. L. Intrauterine diagnostic procedures. In: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. (eds). **Current therapy in equine reproduction**. St. Louis, Missouri: Saunders, 2007. p. 36-43.

SIEME, H.; BONK, A.; HAMANN, H.; KLUG, E.; KATILA, T. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. **Theriogenology**, v. 62, p. 915-928, 2004.

SIEME, H.; HARRISON, R. A. P.; PETRUNKINA, A. M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 276-292, 2008.

SCHUBERTH, H.J. Immunological responses to semen in the female genital tract. **Theriogenology**, v. 70, p. 1174–1181, 2008.

SILVA, L. A.; GASTAL, E. L.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 755-761, 2005.

SILVA, L. A., GASTAL E. L., GASTAL M. O., BEG M. A; GINTHER O. J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 339-346. 2006.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

SMILEY, S. T.; REERS, M.; MOTTOLA-HARTSHORN, C.; LIN, M.; CHEN, A.; SMITH, T. W.; STEELE, G. D. J. R.; CHEN, L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. **Cell Biology**, v. 88, p. 3671-3675, 1991.

SQUIRES, E. L.; BARBACINI, S.; NECCHI, D.; REGER, H. P.; BRUEMMER, J. E. Simplifies strategy for insemination of mares with frozen semen. **Reproduction AAEP Proceedings**, v. 48, p. 353-356, 2003

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Factors affecting fertility of frozen-thawed spermatozoa. In: Cooled and frozen stallion semen, Fort Collins, Colorado. Apostila. Fort Collins: College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences of Colorado State University, 1999, p. 61-77.

STEER, C. V.; CAMPBELL, S.; PAMPIGLIONE, J. S.; KINGSLAND, C. R.; MASON, B. A.; COLLINS, W. P. Transvaginal color flow imaging of the uterine arteries during the ovarian and menstrual cycles. **Human Reproduction**, v. 5, p. 391-395, 1990.

STEER, C. V., CAMPBELL, S.; TAN, S. L. The use of transvaginal color flow imaging after in vitro fertilization to identify optimum uterine conditions before embryo transfer. **Fertility and Sterility**, v. 57, p. 372–376, 1992.

STILL, J. G.; GREISS, F. The effect of prostaglandins and other vasoactive substances on uterine blood flow and myometrial activity. **Animal Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 130, p. 1-8, 1978.

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

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

TROEDSSON, M. H. T. Uterine response to semen deposition in mare. **Proceedings of Society of Theriogenology**, p. 130-135, 1995.

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

TROEDSSON, M. H. T.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A. S.; DAHMS, B.; DOW, C. A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P. T.; MACPHERSON, M. L.; POZOR, M.; BUHI, W. C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 171-186, 2005.

TROEDSSON, M. H. T.; DESVOUSGES, A.; HENSEN, P. J.; BUHI, W. C. Equine seminal plasma proteins protect live spermatozoa from PMN-binding and phagocytosis, while providing a mechanism for selective sperm elimination of apoptotic and dead spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 60-61, 2006.

TROEDSSON, M. H. T.; LEE, C. S.; FRANKLIN, R.; CRABO, B. G. The role of seminal plasma in post-breeding inflammation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56 (Suppl), p. 341-349, 2000.

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 to versus resistant to chronic uterine infection. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 502-506, 1993.

TROEDSSON, M. H. T.; LOSET, K.; ALGHAMDI, A. M.; DAHMS, B.; CRABO, B. G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 273-278, 2001.

TROEDSSON, M. H. T.; STEIGER, B. N.; IBRAHIM, N. M.; FOSTER, D. N.; CRABO, B. G. Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 52 (Suppl.), p. 307, (abstract), 1995.

TUNÓN, A. M.; KATILA, T.; MAGNUSSON, U.; NUMMIJÄRVI, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. T-cell distribution in two different segments of equine endometrium 6 and 48 hours after insemination. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 835-41, 2000.

ULIANI, R. C.; SILVA, L. A.; ALVARENGA, M. A. Mare's Folliculogenesis: assessment of ovarian and perifollicular vascular perfusion by Doppler ultrasound. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, p. 113-116, 2011.

VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; HARTMAN, D. L.; BLISS, S. B.; CARROLL, B. S.; ESLICK, M. C. Semen processing for the subfertile stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, p. 677-685, 2008.

VARNER, D. D.; JOHNSON, L. From a Sperm's Eye view revisiting our perception of this intriguing cell. **AAEP Proceedings**, v. 53, p. 105-177, 2007.

VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 115-136, 2005.

VIDAMENT, M.; DUPEIRE, A. M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, n. 48, p. 907-917, 1997.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1-6, 1998.

WAELECHLI, R. O.; CORBOZ, L.; WINDER N.C. Effect of intrauterine plasma infusion in the mare: histological, bacteriological and cytological findings. **Theriogenology**, v. 28, p. 861-9, 1987.

WAITE, L. R.; FORD, S. P.; YOUNG, D. F.; CONLEY, A. J. Use of ultrasonic Doppler waveforms to estimate changes in uterine artery blood flow and vessel compliance **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 2450-2458, 1990.

WATSON, E. Post-breeding endometritis in the mare. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000, Stockholm. **Proceedings...** Stockholm : Elsevier, 2000a. p. 221-232.

WILLIAMSONSON, P.; MUNYUA, S.; MARTIN, R.; PENHALE, W. J. Dynamics of the acute uterine response to infection, endotoxin infusion and a physical manipulation of the reproductive tract in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 35, p. 317-325, 1987.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000b.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, E. D.; BARBACINI, S; BERROCAL, B.; SHEERIN. O.; MARCHI, V.; ZAVAGLIA, G. Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares. **Theriogenology**, v. 5, p. 123-131, 2001.

WILLIAMS, E. J.; FISCHER, D. P.; NOAKES, D. E.; ENGLAND, G. C.; RYCROFT, A.; WINGFIELD-DIGBY, N. J. The technique and clinical application of endometrial cytology in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 10, p. 176-180, 1987.

WINGFIELD-DIGBY, N. J.; RICKETTS, S. W. Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, p. 181-185. 1982.

WOODS, J.; BERGFELDT, D.R.; GINTHER, O. J. Effects of time insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic-loss rate in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, p. 410-415, 1990.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven press, p. 189-317, 1994.

YANIK, L. The basics of Doppler ultrasonography. **Veterinary medicine**, v. 3, p. 388-400, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE A – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DAS CARACTERÍSTICAS DE MOTILIDADE ESPERMÁTICA – (CASA) E CLASSIFICAÇÃO ESPERMÁTICA PELAS SONDAS FLUORESCENTES PI-H342, FITC-PSA e JC-1 - EXPERIMENTO 1.

Característica Analisada	Partida									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MPI (%)	44	37	42,5	62	65	59,5	33,5	21	33,5	39,5
MAI (%)	64,5	72	72,5	74,5	66,5	68,5	72	64	80,5	77,5
APM (%)	44	28	28	40	37,5	49,5	36,5	18,5	35	46,5
PIAIA (%)	29,5	26,5	26,5	32	33,5	33	29,5	15	32	39
Motilidade Subjetiva (%)	35	40	40	30	40	15	40	25	35	45
Vigor (1-5)	2.3	2.3	2	2	2	1	2.3	2	3	3
T MOT (%)	41	57	45	30	31	22	47	67	35	53
P MOT (%)	19	32	20	14	13	14	24	49	11	36
VAP (µm/s)	66,6	66.3	67.3	61,1	59.5	52,9	57.5	78.4	60.6	77.6
VSL (µm/s)	53,1	58.8	56.5	52,1	49.0	45,9	50.7	71.1	49.7	70.5
VCL (µm/s)	122,4	106.5	120.3	97,9	104.5	88	106.8	126.7	114.9	125.4
ALH (µm)	6,1	5.3	5.8	4	5.2	3,7	6.2	4.9	5	4.7
BCF (Hz)	36,6	28.7	35.7	34,2	34.0	35,8	36.9	32.9	37.9	38.6
STR (%)	77	87	82	83	80	85	86	90	79	89
LIN (%)	44	57	49	58	49	54	50	60	48	59
VRAP (%)	24	35	24	16	16	14	26	52	13	39
DMA (%)	4,5	7,5	10	10	8	12	8	7	6	8,5
DME (%)	5	3	2	3	8,5	0,5	9	11,5	8	7,5
Total de defeitos (%)	9,5	10,5	12	13	16,5	12,5	17	18	14	16

APÊNDICE B - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DAS CARACTERÍSTICAS DE MOTILIDADE ESPERMÁTICA – (CASA) E CLASSIFICAÇÃO ESPERMÁTICA PELAS SONDAS FLUORESCENTES PI-H342, FITC-PSA e JC-1 - EXPERIMENTO 1.

Característica Analisada	Qualidade do Sêmen	
	ALTA	BAIXA
MPI (%)	54	16,5
MAI (%)	76	28,5
APM (%)	56	17
PIAIA (%)	52	16
Motilidade Subjetiva (%)	65	30
Vigor (1-5)	3	3
T MOT (%)	75	25
P MOT (%)	67	22
VAP (µm/s)	83,8	85,3
VSL (µm/s)	70,6	73,1
VCL (µm/s)	158,5	158,4
ALH (µm)	6,1	5,8
BCF (Hz)	35,6	37,8
STR (%)	84	85
LIN (%)	46	48
VRAP (%)	75	27
DMA (%)	12,5	18,5
DME (%)	13,5	16,5
Total de defeitos (%)	26	35