

## RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA EM ÉGUAS INSEMINADAS COM SÊMEN FRESCO E CONGELADO DE JUMENTO\*

Caroline Spitz dos Santos<sup>1+</sup>, Vera Lúcia Teixeira de Jesus<sup>2</sup>, Rita de Cássia Gomes Pereira<sup>1</sup>, Daniel da Silva Guedes Júnior<sup>3</sup>, Marcos Antônio José dos Santos<sup>4</sup> e Júlio César Ferraz Jacob<sup>5</sup>

**ABSTRACT.** dos Santos C.S., de Jesus V.L.T., Pereira R. de C.G., Guedes Júnior D. da S., dos Santos M.A.J. & Jacob J.C.F. [**Uterine inflammatory response in mares inseminated with fresh and frozen donkey semen**]. Resposta inflamatória uterina em éguas inseminadas com sêmen fresco e congelado de jumento. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(2):155-162, 2013. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 07, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: carolinespitz@yahoo.com.br

This study aimed to characterize the uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh and frozen donkey semen. Seven mares were inseminated with fresh (G1) and frozen (G2) semen for two estrous cycles. The uterine inflammatory response was evaluated by ultrasonography and uterine cytology performed before (T1), four hours (T2) and 24 hours after insemination (T3). The results were analyzed by ANOVA. Ultrasonography in T1 revealed no accumulation of intrauterine fluid, but in T2 and T3 there were accumulation of less than 2 cm in G1 and G2 ( $p > 0.05$ ). Statistical analysis revealed significant differences between T1 in relation to other moments (T2 and T3), demonstrating that after insemination the uterine fluid accumulation observed for both groups was attributed to the inflammatory response to semen. Uterine cytology in T1 revealed mean percentage less than 5%, at T2 was higher than 50% (G1 and G2) and no significant difference ( $p > 0.05$ ) between groups was observed. In G1 T3, there was a reduction in the percentage of neutrophils observed for T2 ( $p < 0.001$ ) for both groups showing that 24 hours after AI started the process of resolution of inflammation. The observed uterine inflammation in mares inseminated with fresh and frozen donkey semen was similar to those reported for equine semen in the same times of collection, and reduction of this response was also according to the literature. Therefore, the donkey's sperm was able to promote uterine response similar to that described for equine sperm which was not related to the type of semen used, if fresh or cryopreserved.

**KEY WORDS.** Endometritis, asinine semen, uterine cytology, ultrasonography.

**RESUMO.** Este estudo objetivou caracterizar a resposta inflamatória uterina de éguas após a inseminação com sêmen fresco e congelado de jumento. Sete éguas foram inseminadas com sêmen fresco (G1) e congelado (G2) por dois ciclos estrais. A res-

posta inflamatória uterina foi avaliada por ultrassonografia e citologia uterina, realizadas antes (T1), quatro horas (T2) e 24 horas após as inseminações (T3). Os resultados foram analisados por ANOVA. A ultrassonografia em T1 não revelou acúmulos de

\* Recebi em 26 de abril de 2012.

Aceito para publicação em 6 de maio de 2013.

<sup>1</sup> Médica-veterinária, *M.Med.Vet.*, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. +Autora para correspondência. E-mail: carolinespitz@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Médica-veterinária, *DSc.* Departamento de Avaliação e Reprodução Animal (DRRA), Instituto de Zootecnia (IZ), UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: jesus@ufrj.br

<sup>3</sup> Médico-veterinário, *DSc.* Departamento de Controle de Qualidade, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Av Brasil nº 4365, Manguinhos, RJ 21040-360, Brasil. E-mail: daniel.guedes@bio.fiocruz.br

<sup>4</sup> Médico-veterinário, *DSc.* Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. Email: majsantos@ufrj.br

<sup>5</sup> Médico-veterinário, *DSc.* DRRA, IZ, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: juliorep@ufrj.br

fluido intrauterino, porém, em T2 e T3 houve acúmulos menores que 2 cm em G1 e G2 ( $p>0,05$ ). A análise estatística revelou diferença significativa entre T1 em relação aos demais momentos de coleta (T2 e T3), demonstrando que após a inseminação o acúmulo de fluido uterino observado para ambos os grupos foi atribuído à resposta inflamatória ao sêmen. A citologia uterina em T1 revelou porcentual médio de PMNs menor que 5%, já em T2, foi superior a 50% (G1 e G2), não apresentando diferença ( $p>0,05$ ) entre os grupos. Em G1 T3, houve redução no percentual de neutrófilos observados em relação a T2 ( $p<0,001$ ) para ambos os grupos demonstrando que 24 horas após a IA teve início o processo de resolução da inflamação. A inflamação uterina observada em éguas inseminadas com sêmen fresco e congelado de jumento foi semelhante aos relatos para o sêmen equino, nos mesmos momentos de coleta, e a redução desta resposta também esteve de acordo com a literatura. Sendo assim, o espermatozoide asinino foi capaz de promover uma resposta uterina semelhante ao que é descrito para equino não teve relação com o tipo de sêmen utilizado, se fresco ou criopreservado.

**PALAVRAS-CHAVE.** Endometrite, sêmen asinino, citologia uterina, ultrassonografia.

## INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória endometrial ocorre naturalmente após a monta natural ou inseminação artificial em éguas. É um processo fisiológico necessário para a limpeza uterina do excesso de espermatozoides, bactérias e outros agentes contaminantes. O espermatozoide induz o processo inflamatório através do efeito quimiotático que exerce sobre as células do sistema imune com a ativação de componentes do sistema complemento (Watson 2000).

Éguas cuja resposta inflamatória uterina está totalmente resolvida entre 36 e 48 horas são consideradas sadias. Entretanto, alguns animais desenvolvem uma inflamação persistente que impede a sobrevivência do embrião, essas éguas são classificadas com susceptíveis a endometrite pós-cobertura (Card 2005). A resposta inflamatória uterina prolongada pode gerar a produção de diversos mediadores inflamatórios dentre os quais a prostaglandina que pode gerar a luteólise precoce e causar a perda do embrião.

A inseminação artificial (IA) com sêmen congelado tem sido associada a uma resposta inflamatória mais prolongada, possivelmente, devido a ausência

do plasma seminal, removido quase completamente durante o processo de criopreservação, ou ainda a uma reação de hipersensibilidade aos componentes dos crioprotetores utilizados (Kotilainen et al. 1994, Dahms & Troedsson 2002).

Nos últimos tempos tem crescido o interesse dos criadores de cavalos pela produção de muare, fruto do acasalamento de éguas com jumento (*Equus caballus* x *Equus asinus*). Os estudos sobre a eficiência reprodutiva na produção desses híbridos ainda são escassos e não se sabe ao certo como o útero equino reage ao sêmen de outra espécie. A resposta inflamatória uterina de éguas ao sêmen de garanhões vem sendo estudada a algum tempo (Kotilainen et al. 1994), contudo, nenhum estudo até o momento relatou essa resposta ao sêmen de jumento. Sendo assim, este estudo teve por objetivos: avaliar a resposta inflamatória uterina de éguas pós-inseminação com sêmen de jumento e comparar os efeitos do sêmen fresco e sêmen congelado sobre o endométrio através de ultrassonografia e citologia uterina empregando a coloração de Papanicolau.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no setor de Reprodução Animal pertencente ao Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia (DRRA/IZ) e no Laboratório de Histologia Animal, Instituto de Veterinária, pertencentes à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica/Rio de Janeiro. Foram utilizadas sete éguas da raça Bretão Postier pertencentes ao Setor de Matrizes da UFRRJ e amostras de sêmen fresco e congelado de reprodutor asinino da raça Pega pertencente ao Setor de Garanhões da UFRRJ. O acompanhamento do ciclo estral dos animais foi monitorado por meio de palpação retal e ultrassonografia. Com a detecção de um folículo ovariano  $\geq 35,0$  mm, foi feita aplicação endovenosa de 1000 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Chorulon®) endovenosa para indução da ovulação, e IA 24 horas após a aplicação. As éguas foram inseminadas com amostras de sêmen fresco (Grupo 1 - G1) e congelado (Grupo 2 - G2), na dose inseminante de  $800 \times 10^6$  de espermatozoides/mL em volume inseminante de 4 ml, oriundos de um mesmo reprodutor asinino com histórico de fertilidade conhecido. As inseminações foram realizadas por dois ciclos estrais consecutivos, totalizando 14 IAs por grupo. A avaliação da resposta inflamatória foi realizada através de ultrassonografia e citologia uterina em

três momentos distintos: antes da inseminação (T1), quatro horas após (T2) e vinte e quatro horas após a IA (T3). A ultrassonografia uterina foi realizada com aparelho de ultrasson Sonovet 600 e transdutor linear de 5 Mhz. Foram realizadas mensurações de áreas de acúmulo de líquido no lúmen uterino e classificação em escores, sendo 0 - ausência de fluido; 1 - acúmulo de fluido uterino menor que 1 cm; 2 - acúmulo médio de 1,1 a 2 cm; 3 - acúmulo severo maiores que 2 cm.

A citologia uterina foi realizada com o uso de escova ginecológica estéril (Citobrush, Inlab®), acopladas a uma haste metálica previamente esterilizada que foi introduzida no útero para realização de uma escarificação superficial do endométrio. O material celular obtido, foi colocado em lâminas histológicas através de *imprint*, fixados em etanol absoluto e levadas ao Laboratório de Histologia Animal para serem coradas pelo método de Papanicolaou (Carvalho 2009). A leitura das lâminas foi realizada em microscopia óptica com aumentos de 400 e 1000x, onde se procedeu à contagem de duzentas células, diferenciando-as em epiteliais uterinas e polimorfonucleares (PMN) e outras células que por ventura estivessem presentes. Os resultados foram transformados em porcentual e o grau de inflamação classificado segundo Brook (1993): inflamação leve (5 -15%), moderada (15 - 30%) e severa (> 30%) de PMN. A análise estatística entre os tratamentos foi realizada através da ANOVA com nível de significância de 5% (IC 95%).

## RESULTADOS

Todas as éguas foram submetidas à avaliação ultrassonográfica para acompanhamento do ciclo estral e citológica antes das inseminações (T1) para identificação prévia de endometrite. Não foi constatada a presença de fluido no lúmen uterino das

éguas sob estudo (Tabela 1), entretanto, os resultados de um ciclo do Animal 4 em G1 e um ciclo dos Animais 6 e 7 em G2, foram excluídos por terem apresentado resultados de citologia positiva (5,0, 6,0 e 10,0% de PMNs, respectivamente) antes das IAs. Desta forma, somente animais sem endometrite prévia foram utilizados neste estudo.

Os tipos celulares encontrados nas amostras em T1 foram predominantemente de células endometriais mucosecretórias, que pelo método de coloração de Papanicolaou, apresentaram núcleos de coloração roxa e citoplasma em tons variando de verde-azulado a sutilmente alaranjado (Figura1). O porcentual médio de células inflamatórias observadas foi 1,1 e 1,3% em G1 e G2, respectivamente (Tabela 1), não havendo diferença significativa entre T1/G1 e T1/G2.

Após a inseminação (T2) com sêmen fresco e congelado, a ultrassonografia revelou a presença de pequenos acúmulos de fluido, menores que 2,0 cm. A ANOVA revelou diferença ( $p=0,001$ ) entre T1 e T2

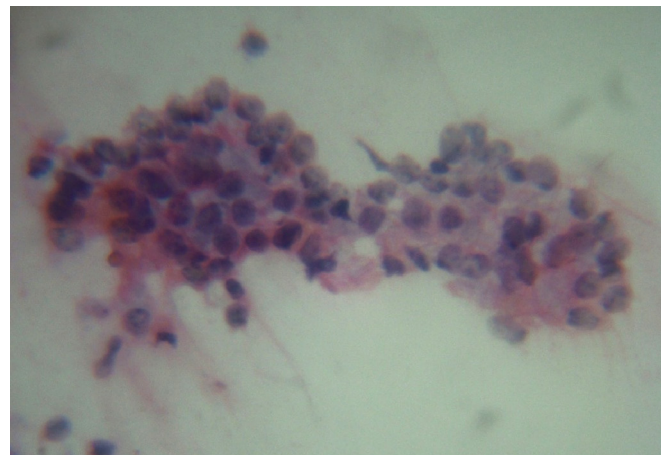


Figura 1. Células endometriais mucosecretórias agrupadas em estrutura semelhante a "favo de mel" apresentando núcleo de cor roxa e citoplasma verde/alaranjado e muco de cor rósea. Papanicolaou, 400X.

Tabela 1. Resultados de ultrassonografia (US) em escore de 0-3 e porcentual de neutrófilos (CIT) nas amostras de citologia uterina (CIT) nos momentos T1 (antes da inseminação), T2 (quatro horas após a inseminação) e T3 (24h após a inseminação).

	G1 (Média/2 ciclos)						G2 (Média/2 ciclos)					
	T1		T2		T3		T1		T2		T3	
	US	CIT	US	CIT	US	CIT	US	CIT	US	CIT	US	CIT
Animal 1	0	0,0	1	75,0	0	28,5	0	0,0	1	46,0	0	12,0
Animal 2	0	5,0	2	66,0	0	10,5	0	0,0	1	62,5	0	16,5
Animal 3	0	0,0	1	74,0	1	24,5	0	1,0	2	20,5	2	10,0
Animal 4*	0	0,0	2	90,0	0	20,0	0	2,0	1	47,5	1	60,0
Animal 5	0	0,0	2	87,0	0	35,5	0	2,0	2	57,5	2	8,0
Animal 6*	0	1,5	1	81,5	1	2,0	0	3,0	2	89,5	0	25,0
Animal 7*	0	1,0	1	88,0	1	76,5	0	1,0	2	94,0	1	9,0
Médias	0	1,1 ±1,8	1,4	80,2±8,9	0,4	28,5±24,0	0	1,3±1,1	1,5	66,1±23,1	0,8	21,5±19,4

\*Exclusão dos resultados de 1 ciclo por apresentarem endometrite antes das inseminações.

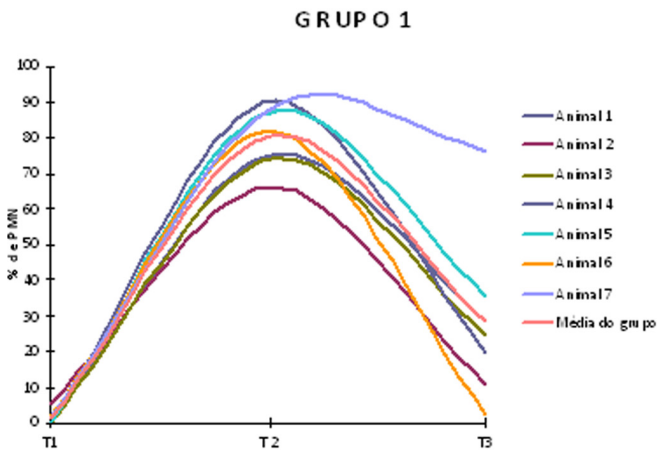


Figura 2. Porcentual de células polimorfonucleares (neutrófilos) de cada indivíduo encontrados antes da inseminação artificial (T1), quatro horas após (T2) e 24 horas após a inseminação (T3) coleta do G1 (semen fresco).

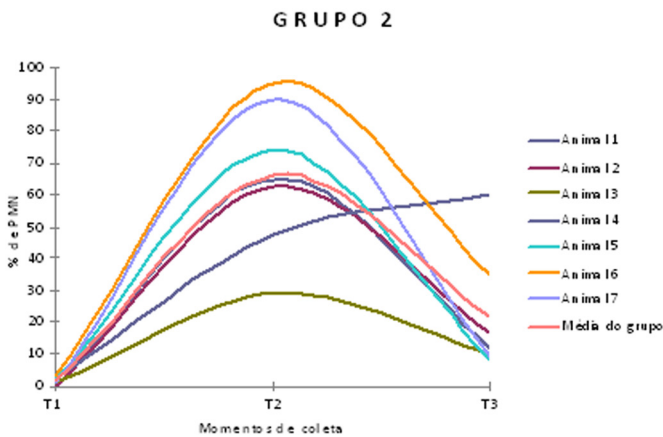


Figura 3. Porcentual de células polimorfonucleares (neutrófilos) por indivíduo nos diferentes momentos de coleta do G2 (semen congelado).

(G1 e G2), porém, não houve diferença entre os grupos. A citologia neste momento revelou um aumento significativo do número de leucócitos presentes na citologia (Figuras 2 e 3) tanto em G1 quanto em G2. O percentual médio de células inflamatórias foi de 80,2% em G1 e 66,1% em G2 (Tabela 1) não diferindo estatisticamente entre si. Neutrófilos foram as células de defesa encontradas com maior frequência e na coloração de Papanicolaou apresentaram citoplasma alaranjado e núcleos roxos (Figuras 4 e 5), e em alguns casos foi possível visualizar a presença de espermatozoides na citologia (Figura 6).

A avaliação após 24 horas (T3), não revelou acúmulos de fluido significativos, observou-se que metade dos animais em G1 e G2, não apresentavam fluido detectável pela ultrassonografia, sendo esses resultados compatíveis com a redução do número de PMN observado na citologia uterina. Não foi constatada diferença significativa entre T2 e T3 em

ambos os grupos dois grupos. Quantitativamente, houve redução de resposta inflamatória (28,2% em G1, e 21,5% em G2, respectivamente) não havendo

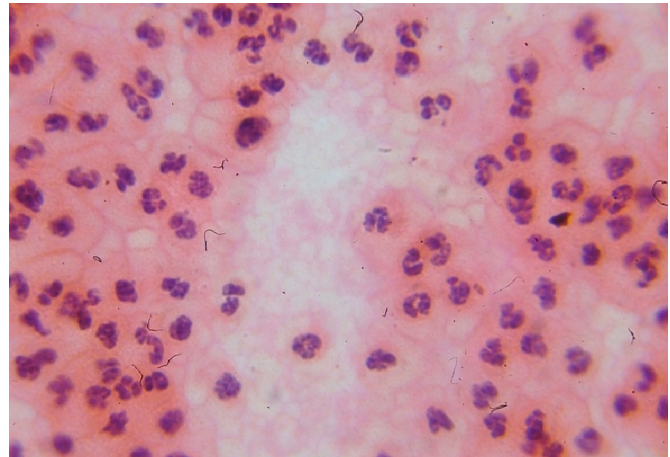


Figura 4. Resposta inflamatória uterina em T2, com sêmen congelado, evidenciando a presença maciça de neutrófilos e muco abundante de coloração alaranjada. Papanicolaou, 400X.

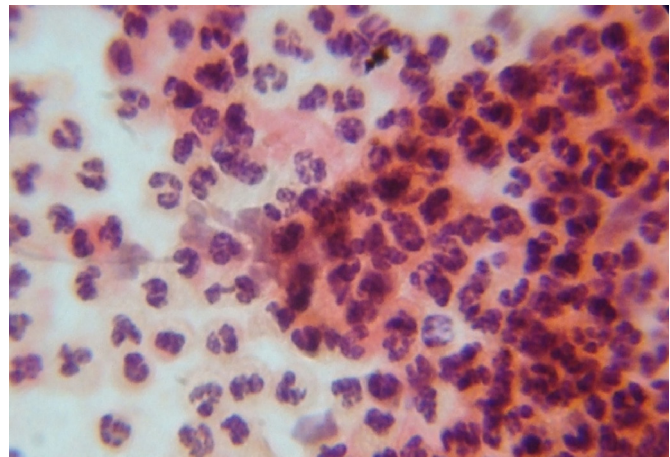


Figura 5. Resposta inflamatória uterina em T2, com sêmen fresco, evidenciando a presença maciça de neutrófilos. Papanicolaou, 400X.

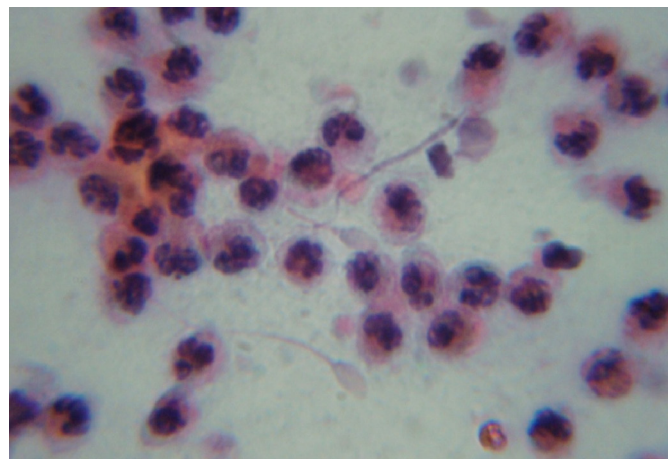


Figura 6. Citologia uterina em T2, presença de espermatozói-de asinino em meio a secreção inflamatória. Coloração Papanicolaou, 1000X.

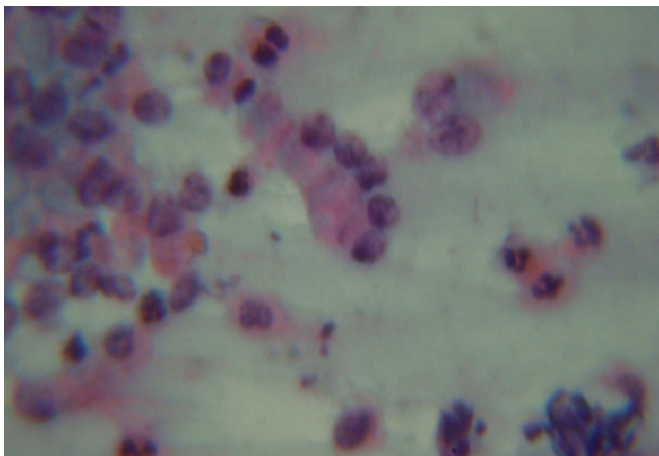


Figura 7. Citologia uterina realizada 24 horas após a inseminação apresentando células endometriais e alguns poucos neutrófilos. Papanicolaou, 1000X e zoom fotográfico de 2,5X.

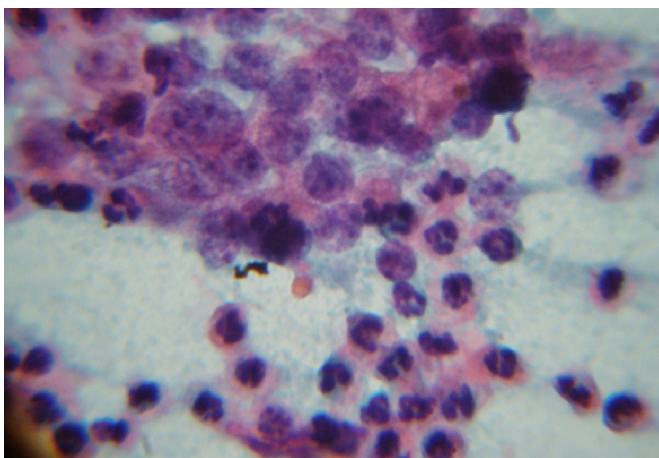


Figura 8. Citologia uterina realizada 24 horas após a inseminação contendo células endometriais apresentando núcleos com pontilhamento de cromatina (seta) e neutrófilos em menor quantidade. Papanicolaou, 1000X e zoom fotográfico de 2,5X.

diferença entre os dois grupos ( $p > 0,05$ ), as exceções foram no animal 7 que diferiu em relação às demais fêmeas no G1 e animal 4 no G2 (Tabela 1), onde a contagem de PMN continuou elevada. A resposta inflamatória uterina em T3 diferiu ( $p = 0,001$ ) na contagem de neutrófilos em relação a T2 em ambos os grupos. Apesar da redução porcentual de neutrófilos em T3, foi possível visualizar aumento no tamanho das células endometriais, com citoplasma vacuolizado, núcleos apresentando pontilhamento de cromatina, e aumento qualitativo na presença de debris inflamatórios, com células degeneradas, núcleos nus e a presença de bactérias (Figuras 7 e 8).

## DISCUSSÃO

A inflamação endometrial ocorre naturalmente após a monta natural ou inseminação artificial em

éguas. Seja qual for o método, se monta natural ou inseminação, o sêmen é depositado diretamente na luz uterina da égua, sendo sucedida por uma resposta inflamatória que causa um aumento na liberação de muco no endométrio e quimiotaxia (Causey, 2007). O aumento na secreção de muco em éguas também ocorre durante o estro, fase estrogênica, assim pequenos acúmulos de fluido  $\leq 3,0$ mm de diâmetro e edema endometrial proeminente são achados ultrassonográficos normais (Blanchard et al. 2003). Entretanto, a presença de dois ou mais centímetros de fluido durante o estro é um bom indicativo de endometrite (Brinsko et al. 2011). A realização da ultrassonografia antes da inseminação (T1) teve como objetivo caracterizar a presença de qualquer quantidade de fluido intrauterino nas éguas durante o período do experimento, não sendo constatado qualquer acúmulo de fluido, os animais foram considerados normais ao exame.

As amostras de citologia antes das inseminações (T1) não revelaram porcentuais médios significativos de PMNs ( $\geq 5,0\%$ ) que fossem compatíveis com diagnóstico positivo de endometrite segundo a classificação de Brook (1993), apresentando frequência média de  $\leq 3,0\%$ . Dessa forma, os animais que apresentaram resultado positivo na citologia tiveram seus resultados excluídos do estudo. O porcentual de até 5,0% de PMN são considerados por Card (2004) como parte da população de leucócitos residentes no útero, que durante a fase estrogênica, se marginalizam próximo ao endométrio.

Após a inseminação (T2) foram observados pequenos acúmulos de fluido, menores que 2,0 cm, para ambos os grupos, sendo sua presença atribuída a uma resposta inflamatória normal após a deposição de sêmen. A análise estatística de T2 e T3 entre G1 e G2, não demonstrou diferença significativa, demonstrando um processo inflamatório compatível com a deposição de sêmen no lúmen uterino independente de ser fresco ou congelado. Estes achados divergem de Kotilainen et al. (1994), que descreveram uma resposta inflamatória mais intensa com maior acúmulo de fluido intrauterino em éguas inseminadas com sêmen congelado em relação ao sêmen fresco. Uma das possíveis explicações para o acúmulo de fluido uterino após a IA com sêmen congelado seria pela marcada reação inflamatória devido à ausência de plasma seminal atuando como modulador da resposta inflamatória induzida pelos espermatozoides (Dahms & Troedsson 2002).

Assim como constatado para o sêmen equino,

o sêmen de jumento foi igualmente capaz de estimular uma resposta inflamatória rápida e intensa, visualizada clinicamente por corrimento vulvar do tipo purulento em todas as éguas em T2 de ambos os grupos. As amostras de citologia demonstraram que houve um grande fluxo de PMNs para o lúmen uterino, evidenciado como um pico de resposta inflamatória (Figuras 1 e 2) em ambos os grupos, porém não diferindo entre si. Achados semelhantes foram descritos por Katila (1995), que demonstrou a migração leucocitária inicial para o lúmen uterino logo após a deposição do sêmen e o pico de resposta inflamatória ocorrendo entre seis e 12 horas após. O mesmo foi observado por Kakeya et al. (1998), em que a resposta inflamatória ao sêmen equino fresco *in natura* ou diluído, elevou a contagem de leucócitos uma hora após a inseminação com qualquer um dos tratamentos.

No presente estudo, a frequência média de células inflamatórias após a inseminação (T2) foi superior a 50,0%, demonstrando claramente que a presença do espermatozoide no endométrio induziu uma resposta significativamente maior em ambos os grupos. A intensa resposta leucocitária observada é provavelmente, devido a ativação da cascata do complemento estimulada pelo espermatozoide, como demonstrado por Troedsson et al. (1995) para o espermatozoide equino. Corroborando os resultados, Kotilainen et al. (1994) e Fiala et al. (2007), constataram que a concentração de PMNs recuperados do útero, foi significativamente maior após a inseminação do que a simples infusão de diluidores de sêmen ou solução de tampão de salina fosfatada (PBS), demonstrando o importante papel que o espermatozoide exerce na quimiotaxia de PMNs para o lúmen uterino. A intensidade de resposta inflamatória foi diretamente proporcional à concentração espermática utilizada, provavelmente, intensificando a quimiotaxia e estimulando a migração dos PMNs.

Embora tenha ocorrido uma intensa resposta inflamatória quatro horas após a inseminação com sêmen fresco e congelado de jumento, às 24 horas, a quantidade de neutrófilos foi numericamente menor, sendo o percentual encontrado em G1 de 28,2% e em G2 21,5% ( $p < 0,05$ ). Entretanto, a recuperação uterina do processo inflamatório se mostrou individual, sendo ainda elevada no animal 7 (76,5%) em G1 e no animal 4 (60%) no G2, mas como a avaliação só foi realizada até 24 horas, é possível que estes animais tenham se recuperado dentro do prazo estipulado para classificar éguas como sa-

dias que é de até 96 horas segundo Katila (1995). Outros estudos também descreveram uma redução significativa do número de leucócitos presentes no lúmen uterino após 24 horas da inseminação, demonstrando a resolução parcial do processo (Fiala et al. 2007, Kakeya et al. 1998, Card 2005). A avaliação após 24 horas (T3), não revelou acúmulos de fluido significativos em metade dos animais, sendo esses resultados compatíveis com a redução do número de leucócitos observado na citologia uterina. De forma semelhante, Watson et al. (2001) e Hunter et al. (2006) não detectaram a presença de fluido uterino da IA com sêmen congelado após 12 e 24 horas, respectivamente.

Após a redução do processo inflamatório, foi possível observar a presença de muco e debris celulares, indicando que 24 horas após um processo intenso, é possível visualizar o início da resolução da resposta inflamatória, onde são observados algumas alterações celulares, como, pontilhamento de cromatina (Figura 6), núcleos nus, picnose e cariorrexe. Esses achados são semelhantes aos de Causey et al. (2008) que observaram uma maior quantidade de muco extracelular, aumento na intensidade de coloração, e aumento no tamanho das células endometriais em inflamações moderadas a severas.

A resposta inflamatória observada para o sêmen fresco e congelado de jumento foi semelhante em T2 e T3, demonstrando que o sêmen congelado de jumento não produziu uma resposta inflamatória uterina mais intensa e prolongada como descrito por Kotilainen et al. (1994) para o sêmen equino, o único estudo que efetivamente comparou a ação do sêmen fresco *versus* congelado sobre o endométrio. Estes resultados poderiam ser decorrentes de diferenças entre o local de deposição do sêmen congelado (extremidade do corno) e a coleta de material citológico, que foi realizada no corpo do útero, uma vez que a haste de metal não possibilitaria o acesso ao corno uterino e a resposta poderia de se dar mais intensamente no local. Contudo, Guvenc et al. (2005), constataram que não houve diferença no número de PMNs recuperados do útero de éguas inseminadas com sêmen congelado no corno ou corpo do útero, demonstrando que a resposta inflamatória ao espermatozoide foi generalizada.

Desta forma, os achados no presente estudo demonstraram não haver diferenças na estimulação da resposta inflamatória pelo sêmen fresco ou congelado na dose inseminante de  $800 \times 10^6$ , revelando que ambos foram capazes de promover uma estimula-

ção antigênica, e estão de acordo com outros estudos realizados com sêmen equino congelado (Card 2005, Troedsson et al. 1995).

O método de coleta de citologia uterina utilizando a escova ginecológica demonstrou ser eficaz, rendendo amostras citológicas consideradas satisfatórias, e esfregaços com boa celularidade para realização do diagnóstico de endometrite. Outros autores também relataram bons resultados na qualidade das amostras e de sensibilidade da técnica realizada com escova ginecológica em comparação com outras técnicas (Defontis et al. 2011, Overbeck et al. 2011, Cocchia et al. 2012).

A utilização do método de coloração de Papanicolaou estava restrito a citologia vaginal em cadelas, cabras e outras espécies (Raposo et al. 1999, Jesus et al. 2000), principalmente, para diferenciação das fases do ciclo estral. O emprego desta coloração na citologia endometrial equina foi feita por Walter et al. (2011), que utilizaram o método de coloração de Papanicolaou-Shorr. Os autores relataram que as amostras celulares foram suficientemente coradas pelo método e facilmente identificadas como endometriais e PMNs. A desvantagem do uso da coloração foi o tempo para realização da técnica, cerca de 60 minutos. Da mesma forma, a coloração de Papanicolaou utilizada no presente estudo, permitiu uma adequada visualização de todos os tipos celulares, uma boa leitura e interpretação citológica, principalmente, em lâminas que apresentavam grumos celulares, fornecendo uma visualização mais definida das camadas de células presentes no esfregaço e, uma melhor caracterização celular. Por ser um método multicromático baseado em três soluções corantes com afinidades distintas, possibilita corar de forma diferente os tipos celulares encontrados na citologia uterina.

A inflamação uterina observada em éguas inseminadas com sêmen fresco e congelado de jumento foi semelhante aos relatos para o sêmen equino, nos mesmos momentos de coleta, e a redução desta resposta também esteve de acordo com a literatura (Card, 2004; Fiala, 2007). Sendo assim, o espermatozoide asinino foi capaz de promover uma resposta uterina semelhante ao que é descrito para o espermatozoide equino e que não teve relação com o tipo de sêmen utilizado, se fresco ou criopreservado.

## CONCLUSÕES

O sêmen fresco e congelado asinino foi capaz de provocar uma resposta inflamatória uterina de

igual intensidade semelhante ao que é descrito para o sêmen equino, quatro horas após a inseminação. Contudo, após 24 horas ocorre uma diminuição da intensidade da resposta dando início o processo de recuperação uterina. Os métodos de diagnósticos utilizados em conjunto permitiram avaliar o grau de resposta inflamatória suscitado pelo sêmen asinino, porém a utilização apenas da ultrassonografia não se mostrou confiável e adequada para a avaliação do ambiente uterino quanto a presença ou não de inflamação, pois só permitiu o diagnóstico quando o grau de inflamação endometrial se apresentou severo. A citologia endometrial pela coloração de Papanicolaou permitiu avaliar não somente o grau de resposta inflamatória uterina, mas também as mudanças estruturais provocadas pela inflamação como núcleos picnóticos e pontilhamento de cromatina que ocorrem durante a resolução do processo inflamatório.

**Agradecimentos.** À Capes pela concessão da bolsa de auxílio financeiro, à Nutricell pelo fornecimento do diluidor de criopreservação de sêmen FR-6 utilizado neste estudo, ao Professor Ulisses R. Dias pelo auxílio na coloração da técnica de Papanicolaou e ao Professor Walter Flausino pela viabilidade na execução da técnica de Papanicolaou.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C., Brinsko S. & Rigby S. Endometritis, p.59-63. In: *Manual of Equine Reproduction*, 2<sup>nd</sup> ed., Mosby, Saint Louis, 2003.
- Brinsko S.P., Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Hinrichs K. & Hartman D. Endometritis, p.73-84. In: *Manual of Equine Reproduction*, 3<sup>rd</sup> ed. Mosby, St. Louis, 2011.
- Brook D. Uterine cytology, p.246-53. In: McKinnon A.O. & Voss J.L. (Eds), *Equine Reproduction*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.
- Card C. Endometrial cytology in mares bred with frozen semen. In: *Proceedings 50<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Denver, CO, USA, 2004. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 10 Fev. 2011.
- Card C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology*, 64:580-588, 2005.
- Carvalho G. *Citologia do Trato Genital Feminino*, 5<sup>a</sup> ed., Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2009. 396p.
- Causey R.C., Miletello T., O'Donnell L., Lyle S.K., Paccamonti D.L., Anderson K.J., Eilts B.E., Morse S. & Leblanc M.M. Pathologic effects of clinical uterine inflammation on the equine endometrial mucosa. In: *Proceedings of 54<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - AAEP*, San Diego, CA, USA, 2008. Disponível em: <www.ivis.org>. Acesso em: 26 Dez. 2012.

- Cochia N., Paciello O.A. & Pasoline M.P. Comparasion of the citobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, 77:89-98, 2012.
- Dahms B.J. & Troedsson M.H.T. The effect of seminal plasma components on opsonisation a PMS-phagocytosis of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 58:457-460, 2002.
- Defontis M., Vaillancour T.D. & Gran D.F.X. Comparison of three methods of sampling for endometrial cytology in the mare. *Tierarztl. Praxis Grobt.*, 39:171-175, 2011.
- Fiala S.M., Pimentel C.A., Mattos A.L.G., Gregory R.M. & Mattos R.C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*, 67:556-562, 2007.
- Guvenc K., Reilas T. & Katila T. Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology*, 63:2504-2512, 2005.
- Hunter B., Raz T., Grey A., Chirino-Trejo M. & Card C. Uterine inflammatory response to simultaneous treatment with frozen semen and bacteria in resistant mares. *Proc. Ann. Conv. AAEP*, 52:389-392, 2006.
- Jesus V.L.T., Chaves A.R., Lilenbaum W., Santos M.J., Dias U.R. & Trabali Filho S.C. Exame citológico esfoliativo na prevenção de lesões ginecológicas de cadelas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 28:282-286, 2005.
- Kekeya A.Y., Lopes M.D., Papa F.O. & Meira C. Resposta inflamatória uterina aguda frente à inseminação artificial com sêmen “in natura” e com diferentes diluentes, através da citologia cérvico-uterina em éguas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 22:216-219, 1998.
- Katila T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biol. Reprod. Monog.*, 1:515-517, 1995.
- Kotilainen T., Huhtinen M. & Katila T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, 41:629-636, 1994.
- Overbeck W., Witte T.S. & Heuwieser W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*, 75:1311-1318, 2011.
- Raposo R.S. & Silva L.D.M. Comparação Qualitativa de Diferentes Técnicas de coloração para a Citologia Vaginal de Cabras da Raça Saanen. *Cienc. Anim.*, 9:81-85, 1999.
- Troedsson M.H.T., Steiger B.N., Ibrahim N.M., Foster D.N. & Crabo B.G. Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. *Biol. Reprod.*, 52(Supl.):307, 1995.
- Walter J., Klein C. & Wehrend A. Comparison of eosin-thiazin and Papanicolaou-Shorr staining for endometrial cytologies of broodmares. *Tierarztl. Praxis Grobt.*, 6:358-362, 2011.
- Watson E.D. Post-breeding endometritis in the mare. *Anim. Reprod. Sci.*, 60:221-232, 2000.
- Watson E.D., Barbacine S., Berrocal B., Sheerin O., March V., Zavaglia G. & Neest D. Effect of insemination time of frozen semen on incidence of uterine fluid in mares. *Theriogenology*, 56:123-131. 2001.