Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia
ISSN: 1982-1263
http://doi.org/10.22256/pubvet.v10n12.895-908

Métodos diagnósticos de endometrite em éguas

Miguel Alejandro Silva Rua[1*], Celia Raquel Quirino[1], Aylton Bartholazzi Junior[1], Marcus Antônio Pessanha Barreto[1]**

*[1]Laboratório de Biotecnologia da Reprodução e Melhoramento Genético Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. ** Pesquisadora CNPq. Av. Alberto Lamego, 2000, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.*
**autor para correspondência: miguelvetrua@hotmail.com.*

RESUMO. A presente revisão tem como objetivo abordar a importância de exames diagnósticos para afecções uterinas como no caso de endometrite e endometriose para que se tenha maior sucesso em programas reprodutivos de equinos. A endometrite é a patologia que leva a maior perda econômica na Equideocultura. Essa afecção uterina pode acometer éguas de qualquer idade e em qualquer categoria reprodutiva. Existem éguas mais susceptíveis e situações as quais também levam a uma maior taxa de ocorrência da patologia. A indústria equina vem crescendo muito e cada vez mais busca soluções de alguns problemas encontrados para que aumente a eficiência na utilização das biotecnologias reprodutivas como inseminação artificial e transferência de embriões. O diagnóstico de endometrite através de exames como a citologia uterina, análise microbiológica de amostras coletadas do útero e principalmente da histopatologia através da biópsia de amostra extraída do endométrio das éguas elucidam algumas dúvidas que se tem quando se trabalha com doadoras de embriões que apresentam baixa taxa de recuperação embrionária assim como na escolha de melhores receptoras de embriões já que as mesmas exercem um dos papeis mais importantes no sucesso dos resultados da transferência de embriões. São abordados também alguns tratamento e perspectivas futuras. Os três métodos diagnósticos citados explicados na presente revisão apresentam boa eficiência, com diferença entre os mesmos sendo utilizados em conjunto aumentam a acurácia dos resultados. Diante do exposto, torna-se indispensável a utilização dos métodos diagnósticos discutidos na rotina reprodutiva de éguas doadoras e receptoras de embriões com objetivo de aumento da eficiência na reprodução de equinos.

Palavras chave: equinos, patologia reprodução, útero

Methods of diagnosis of endometritis in mares

ABSTRACT. The aim of this review is discuss about the importance of the diagnostic examination for uterine affections as endometritis and endometrosis in order to improve the results in equine breeding programs. Endometritis is a pathology that leads to a great loss in horses creation. This uterine disease affects mares in all different ages and in all reproductive category. There are mares more susceptible as well as situations that provides increase the occurrence of this pathology. The horse industry is increasing constantly and there are necessity of researches about the best solutions of some reproductive problems in order to increase the reproductive efficiency of mares submitted to reproductive technologies as artificial insemination and embryo transfer. The diagnoses of endometritis through exams as uterine cytology, microbiology examination of intrauterine samples and mainly histopathology examination by uterine biopsy clarify some doubts about embryo donor and recipients problems as low embryo recovery rates and high embryo loss rates. This diagnosis methods aid the recipient mare choice, considering this mares very important in the embryo transfer results. Some treatments are also discussed as well as new perspectives. The three diagnosis discussed in this review are efficient, but different among them, though used in conjunction increase the accuracy

of the results. Therefore, the utilization of this diagnosis is necessary in the reproduction assessment examination of mares donors and recipient of embryos in order to increase the equine reproductive efficiency.

Keywords: horses, pathology, reproduction, uterus

Introdução

Normalmente recupera-se um embrião por égua em cada ciclo estral, e devido a esse fato, para se conseguir vários produtos de uma égua com boa genética, em uma estação reprodutiva, há a necessidade de realizar a técnica de transferência de embriões várias vezes (Panzani et al., 2014). No entanto, pouco se sabe sobre os possíveis danos ao endométrio e a cérvix dessas éguas que são exaustivamente submetidas à inseminação artificial (IA) e lavagens uterinas para recuperação embrionária em repetidas estações reprodutiva. Segundo Troedsson et al. (1995), éguas em estro submetidas à cópula, proporciona à indução de resposta inflamatória transitória do endométrio. No entanto, não apenas a cópula ou a IA podem induzir a resposta inflamatória intrauterina, mas também a aplicação de fluidos intrauterinos para lavagem e recuperação embrionária (Palm et al., 2008). Além disso, éguas em faze luteal, a situação é pior, pois, apenas o fato de se realizar artificialmente a abertura da cérvix ou combinado com a infusão intrauterina de fluido podem carrear agentes patológicos ao lúmen uterino que poderiam consequentemente causar inflamação e estímulo da liberação de prostaglandina e eventualmente causar a luteólise prematura (Koblischke et al., 2008), o que se torna um problemas em relação à éguas doadoras de embriões que são exaustivamente submetidas a várias colheitas de embriões durante uma estação reprodutiva.

Assim como a doadora de embriões, visa-se pelo cuidado com as éguas receptoras de embriões que devem apresentar boa saúde uterina para que levem a gestação à termo. No entanto sabe-se que são inúmeras as possíveis causas para que haja perda embrionária precoce ou em qualquer outra fase gestacional. Dentre essas causas leva-se em consideração a idade das éguas, condição corporal, estresse, protocolos hormonais entre outras causas que podem tornar uma égua subfértil ou infértil (McKinnon et al., 1988b).

Dentre as causas de subfertilidade ou infertilidade em éguas, a endometrite é a mais importante, e que causa mais prejuízos por diminuição da fertilidade. As condições inflamatórias no útero são classificadas como aguda, crônica, ativa, subclínica, bacterial, fúngica, induzida pelo coito ou inseminação artificial, persistente, entre outros. Cada uma dessa classificação é válida para descrever infecções e processos inflamatórios no útero (Hurtgen, 2006).

Diante de vários problemas enfrentados na rotina reprodutiva de éguas doadoras e receptoras de embriões, o objetivo dessa revisão é apresentar as causas, mecanismos e alguns tratamentos para endometrite.

Revisão de literatura

Endometrite

As falhas no mecanismo de defesa uterina em eliminar antígenos como bactérias espermatozoides e produtos inflamatórios do útero resultam em endometrite persistente, a qual é a maior causa de redução da fertilidade em éguas em reprodução. O útero, normalmente, é bem protegido da contaminação externa por barreiras físicas consistindo na vulva, no vestíbulo, vagina e cérvix. Qualquer comprometimento de uma dessas barreiras predispõe a égua à endometrite crônica (Pascoe, 1978).

A endometrite é um das principais causas da redução da fertilidade em éguas, causando a maior parte das perdas econômicas na indústria equina, com prevalência de 25 a 60% das éguas com problemas de fertilidade (Traub-Dargatz et al., 1991). A endometrite induzida pela cópula ou inseminação artificial (IA), é um evento normal que ocorre algumas horas pós-deposição do sêmen no trato reprodutivo da égua. Esse processo é considerado necessário para efetiva remoção de bactérias e excesso de espermatozoide introduzidos no lúmen uterino (Troedsson, 2006). Em éguas resistentes, a inflamação uterina termina e a limpeza uterina ocorre antes do oócito fertilizado entrar no útero após a passagem pelo oviduto seis dias após a ovulação aproximadamente, enquanto que o útero de éguas susceptíveis persiste com o processo inflamatório (Troedsson, 2006).

A inflamação uterina pode ser classificada como aguda, crônica, subclínica, pós-parto, bacterial, fungica, viral, induzida pelo coito ou IA

e persistente. Cada uma dessas classificações tem a validade de descrever a infecção e inflamação que estão afetando o útero. Na avaliação de uma égua com endometrite, é apropriado o uso de mais de um dos termos acima como critério classificatório de positivo ou negativo (Hurtgen, 2006).

A deposição do sêmen por monta natural ou IA é uma fonte de contaminação. As égua são classificadas como susceptíveis e resistentes à infecções uterinas (Diel de Amorim et al., 2015). Alguns mecanismos de defesa uterina estão envolvidos na proteção do útero contra endometrite persistente. Os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) são as primeiras células inflamatórias a entrar no lúmen uterino seguido por estímulo inflamatório (Lehrer et al., 1988).

Acredita-se que uma falha no aspecto mecânico da defesa uterina seria o maior fator na contribuição para o desenvolvimento de uma endometrite persistente. Segundo LeBlanc et al. (1994) existem falhas no processo fisiológico natural de limpeza uterina em éguas susceptíveis em comparação com éguas resistentes. Esse processo está ligado à capacidade do útero em eliminar o agente inflamatório por contrações do miométrio. Alghamdi et al. (2005) observaram que éguas susceptíveis apresentaram aumento de óxido nítrico no lúmen uterino 13 horas após a inseminação. O óxido nítrico faz a mediação do relaxamento do músculo liso, sendo assim, foi sugerido que esse seja o fato de haver falha na expulsão de materiais que possam causar inflamação uterina por contração muscular da parece uterina.

Falhas no relaxamento cervical durante o estro ou insuficiente drenagem linfática também podem contribuir para falhas na limpeza uterina e acúmulo de líquido (LeBlanc et al., 1995).

Fatores inflamatórios

A presença de sêmen no útero quando depositado por inseminação artificial ou cópula sempre provoca uma resposta inflamatória ao endométrio. Após a cópula ou IA ocorre uma limpeza uterina fisiológica natural do excesso de espermatozoides e outros componentes do ejaculado ou diluentes utilizados na IA (Woodward et al., 2012). Essa inflamação é caracterizada por um influxo de neutrófilos polimorfonucleares que se inicia aproximadamente 30 minutos após a entrada do sêmen no útero (Katila, 1995). O pico dessa resposta inflamatória ocorre após 12 horas e normalmente descresse entre 12 a 24 horas (Troedsson et al., 2001). Quando ocorre essa falha na limpeza natural fisiológica pelo organismo dos agentes causadores da inflamação, provavelmente resultará em um ambiente intrauterino favorável ao crescimento bacteriano ou fungico; no entanto desfavorável para quando ocorrer a chegada do embrião no útero (Troedsson et al., 2001). Devido ao processo inflamatório intrauterino, há um aumento da produção e secreção de prostaglandina F2α proporcionando uma luteólise prematura e subsequente perda embrionária (McKinnon et al., 1988a).

Palm et al. (2008) testaram a reação inflamatória uterina quando realizaram infusão de plasma seminal, diluentes de sêmen e solução PBS em pequenas quantidades no útero, e observaram que não houve diferença na densidade do fluido recuperado das éguas, assim como também não houve diferença na quantidade de leucócitos encontrados por microlitro no lavado. No entanto, em todos os tratamentos foram observados resposta inflamatória intrauterina nas éguas. Os mesmos autores relataram que imigração de leucócitos principalmente polimorfonucleares no endométrio foram regulados após os tratamentos. Mesmo a solução de PBS que é considerada não irritante provocou resposta inflamatória.

Ferreira et al. (2015) ao avaliarem a resposta de limpeza uterina após IA em éguas, observaram um pronunciado e transitório aumento na perfusão vascular uterina durante duas horas após a realização da IA. Katila (1995) realizou a infusão de sêmen intrauterino em éguas e relataram que ocorre um estímulo imediato no fluxo de neutrófilos no lúmen uterino por ativação do sistema imunológico.

Citologia endometrial

Os neutrófilos polimorfonucleares migram para o lúmen uterino em resposta à inflamação, então a endometrite é diagnosticada pelo exame de raspado uterino com escova ginecológica e esfregaço em lâmina de *vitro*. A amostra pode ser coletada com escova ginecológica, swab ou do líquido recuperado do útero. No esfregaço corado, pode-se observar células epiteliais do endométrio e em alguns casos células de defesa, principalmente neutrófilos PMNs. Sendo assim, a endometrite é estabelecida baseado no número de PMNs encontrados nas lâminas. Mais de um PMN

a cada 10 células epiteliais é considerado como endometrite. Riddle et al. (2007) ao avaliarem a citologia uterina observaram que éguas com menos de 2 PMNs por campo (x400 objetiva) apresentavam maiores taxas de prenhez (60% por ciclo) comparado com éguas com 2 a 5 PMNs por campos (x400), que apresentavam taxa de prenhez de 23%. Os mesmos autores relataram que infecções associada com *E. coli*, eram menos prováveis de serem associadas com citologia positiva comparada com éguas infectadas com *Streptococcus zooepidemicus.*

Biópsia uterina

Segundo Kenney (1978) o útero da égua é formado por três camadas que são: a camada interna, o endométrio que é a mucosa, a camada média que o miométrio considerada a camada muscular e a camada externa ou perimétrio (camada serosa). O endométrio ou lúmen uterino é revestido por células epiteliais, que podem variar o formato de cúbicas à cilíndricas altas e abaixo do epitélio está a lâmina própria dividida em estrato compacto e esponjoso.

A avaliação histológica do endométrio da égua tornou-se rotineira e um essencial aspecto da avaliação reprodutiva. Os primeiros relatos sobre a histologia do endométrio da fêmea equina foram feitos por Seaborn (1925) que também foi um dos primeiros pesquisadores a descrever mudanças histológicas de úteros de éguas que sofreram aborto. No entanto, esses primeiros relatos ainda não foram utilizados como diagnóstico e prognóstico na época. A biópsia uterina é o único exame em que se pode avaliar a integridade estrutural do endométrio em relação a infiltrados inflamatórios, mudanças fibróticas e dilatação de glândulas endometriais e vasos linfáticos. Assim como também permite-se avaliar as mudanças cíclicas consistentes no endométrio normal ao decorrer dos efeitos sazonais (McKinnon et al., 1988b). De acordo com Kenney (1978) a biópsia uterina é indicada para constatação de alterações do trato genial, quando constata-se infertilidade após monta natural ou IA (sêmen de qualidade comprovada) em mais de três ciclos em uma mesma estação reprodutiva, em éguas com histórico de perda embrionária precoce ou aborto, quando se identifica comportamento de anestro durante a estação de monta, em casos de piometra e mucometra e para avaliação de fertilidade.

O termo endometrose foi introduzido primeiramente por Kenney (1992), o qual observou diferentes alterações no endométrio equino. Kenney (1978) relatou que a endometrose poderia ser definida como fibroses periglandulares e/ou fibrose endometrial estromal ativa ou inativa, incluindo alterações glandulares com focos fibróticos. Os mesmos autores também relataram que glândulas isoladas ou em "ninhos" podem estar afetadas. O primeiro sinal de endometrose é a diferenciação morfológica e funcional atípica das células estromais do endométrio. O primeiro estágio da fibrose é caracterizado por grandes células estromais poligonal periglandulares que sintetizam fibras de colágeno denso. Em fibroses mais avançadas, não ocorre síntese de colágeno, sendo que há um predomínio de miofibroblastos (Walter et al., 2001).

De acordo com Walter et al. (2001), a dilatação glandular é outro achado da histopatologia uterina, que pode ocorrer em função da capacidade de contratilidade dos miofibroblastos que apresentam capacidade de afetar a composição e a quantidade de matriz extracelular. Ferreira et al. (2015) observaram efeito de mudanças degenerativas no útero de éguas no índice de pulsatilidade arterial. O índice de pulsatilidade arterial (PI) é mensurado por US Doppler e tem como objetivo evidenciar sobre a suplementação hemodinâmica de tecidos por artérias (Ginther, 1995). Um aumento da PI indica aumento na resistência arterial e diminuição do fluxo sanguíneo no tecido (Ginther & Utt, 2004). Ferreira et al. (2015) observaram altos valores de PI em um grupo de éguas consideradas com alta degeneração uterina pela classificação de Kenney (1992) indicando que éguas com degeneração endometrial severa e difusa apresentam alta resistência arterial no miométrio e consequentemente, baixo fluxo sanguíneo após a IA. Segundo Oikawa et al. (1993), esse distúrbio arterial associado à diminuição do aporte sanguíneo, ocorre principalmente em éguas multíparas. De acordo com os relatos de Kotilainen et al. (1994) após o acasalamento ou IA, uma resposta inflamatória local torna-se essencial para uma efetiva eliminação de espermatozoides, plasma seminal e possíveis bactérias que foram carreadas para dentro do útero. Dessa forma, a presença de falhas na circulação em éguas com degeneração uterina possivelmente reduz a habilidade dos vasos sanguíneos a se adaptarem às variações de demanda circulatória uterina durante os ciclos reprodutivos e prenhez (Grüninger et al., 1998, Schoon et al., 1999).

O aumento da resistência arterial intrauterina em éguas observada por Ferreira et al. (2015) pode também comprometer a vasodilatação local requerida para a migração de neutrófilos para o lúmen uterino (Troedsson et al., 1995). Ferreira et al. (2015) relataram que não houve efeito da idade no fluxo sanguíneo uterino após o depósito de sêmen no útero das éguas. Ferreira et al. (2008) também observaram que a perfusão vascular e a resistência arterial não foram afetadas pela idade em éguas nulíparas. Ou seja, a degeneração vascular uterina tem sido associada com mudanças degenerativas endometriais e número de prenhez da mesma égua, sem associação com a idade (Esteller-Vico et al., 2012).

Indicações para a realização da biópsia

As indicações para que uma égua seja submetida ao exame histopatológico, seriam para éguas com suspeita de anormalidades no endométrio, como éguas idosas ou éguas com histórico de complicações reprodutivas, antes da compra de uma receptora em exame ginecológico, particularmente em éguas mais velhas com histórico de fertilidade desconhecido, histórico de infertilidade mesmo quando acasaladas ou inseminadas com garanhões comprovadamente férteis, éguas não prenhas que estiverem em anestro durante a estação reprodutiva, éguas que irão ser submetidas a algum procedimento cirúrgico como reparação cervical e/ou remoção de cisto endometrial. Nesse último caso, seria interessante a avaliação da biópsia antes da cirurgia para comprovar se a égua será capaz de levar uma gestação a termo depois do procedimento cirúrgico. Dessa forma, se detectado pela biópsia que a égua não será capaz de levar uma gestação a termo mesmo com a realização da cirurgia, não justifica o procedimento cirúrgico (McKinnon et al., 1988b). A biópsia uterina em éguas é realizada principalmente para melhor detalhar avaliações de anormalidade que possam afetar o endométrio como lesões servem também para determinar o potencial de fertilidade da égua em relação às características do seu endométrio (Kenney, 1978).

Contraindicações para realização da biópsia

A principal contraindicação é a remoção de tecido endometrial de éguas prenhas, devido ao risco de ruptura de membranas fetais assim como o risco de ocorrer liberação de prostaglandina e sangue no interior do útero. O período ao qual se vai realizar a coleta de tecido intrauterino também é importante, sendo assim deve-se assegurar que a égua a ser submetida ao procedimento não tenha sido inseminada ou coberta poucos dias antes, pois o procedimento poderia comprometer a recuperação embrionária dessa égua ou uma possível prenhez (McKinnon et al., 1988b). Apesar de a biópsia ser um procedimento pouco invasivo, o mesmo pode causar mudanças no ambiente uterino, pelo fato de ocorrer uma pequena hemorragia no locar onde se retira a amostra de tecido, sendo essa a sequela mais comum (Sertich, 1996).

Coleta de material para biópsia

A anatomia histológica do útero da égua consiste no epitélio luminal, na lâmina própria que contém o estrato compacto (EC) e o estrato esponjoso (EE); a lâmina própria que contém as glândulas endometriais e vasos sanguíneos e linfáticos, todos conectados por uma matriz de colágeno. As glândulas têm suas aberturas na superfície luminal e se estendem até o estrato esponjoso. Abaixo do endométrio, encontra-se o miométrio que comumente não é visto na biópsia (Kenney, 1978).

Uma porção do tecido endometrial uterino deve ser coletado de forma que possa ser avaliado. Para isso, deve-se utilizar o instrumento adequado para coleta, com tamanho da mandíbula coletora de aproximadamente (20 x 4 x 3 mm) e que seja afiada para evitar danos ao tecido coletado e ao útero. Segundo Kenney (1978), a coleta do material para biópsia pode ser realizada sem qualquer prejuízo para a fertilidade da égua.

O local mais convencional de coleta de material é da parte dorsal do corpo do útero. A pinça de biópsia deve ser protegida com os dedos do profissional que realizará o procedimento, sendo transpassada pela cérvix com a mandíbula fechada para evitar danos aos tecidos adjacentes. Uma vez introduzida a ponta da pinça no útero da égua, retira-se a mão da vagina que até então estava guiando a pinça e introduzindo-a cautelosamente no útero, e a introduz pelo reto para guiar a ponta da pinça contra a parede dorsal do corpo do útero. Em seguida permite-se a abertura da mandíbula da ponta da pinça pressionando-a delicadamente com a mãe que está no reto e fechando-a e puxando para fora do útero. O tecido coletado deve ser imediatamente colocado em meio com formol tamponado a 10% para subsequente processamento do material para análise (McKinnon et al., 1988b).

Patologias endometriais

O histórico reprodutivo das éguas como características uterinas e ovarianas deve ser levado em consideração para determinar o estágio do ciclo estral em que a fêmea se encontra. Essas características devem ser comparadas com os achados histológicos para determinar a sincronia entre ovário, cérvix, útero e comportamento do animal. Normalmente, o epitélio uterino de uma égua em anestro é cuboidal e pequeno, e a densidade glandular são esparsa, enquanto que no estro, o epitélio apresenta-se mais alto e as glândulas aparecem espaçadas devido ao edema. O epitélio no diestro também é alto, porém devido à falta de edema as glândulas apresentam-se mais próximas, com maior densidade (Kenney, 1978).

A caracterização do endométrio é baseada na avaliação de mudanças patológicas no mesmo. A biópsia endometrial é a principal ferramenta de diagnóstico para avaliação clínica do potencial de fertilidade da égua, porque, em contraste com as técnicas de cultura microbiológica e a citologia uterina, que primeiramente avaliam fatores inflamatórios superficiais, a biópsia permite a avaliação de infiltrados profundos e fibroses periglandulares, dilatação de glândulas, densidade glandular, assim como mudanças estacionais (Kenney, 1978).

Inflamação endometrial

Mudanças inflamatórias tentem a ocorrer comumente no estrato compacto em comparação com o estrato esponjoso do endométrio, sugerindo que a maioria dos estímulos antigênicos origina do lúmen uterino. Mesmo que menos comum, pode ocorrer inflamação nas camadas mais profunda do endométrio sendo assim de origem sistêmica. É importante diagnosticar o local da inflamação para adequar o melhor tipo de tratamento. Algumas células inflamatórias, principalmente linfócitos, podem ser identificadas, porém em pequenas quantidades. A questão clinica é, qual o grau de inflamação seria clinicamente relevante para que se realize um tratamento. A resposta para essa pergunta pode ser subjetiva e deve ser baseada no histórico da égua. Além disso, é comum que se observe uma inflamação significante na biópsia, no entanto não estar associada com presença de micro-organismo quando realizado exame microbiológico do útero do animal. Sugerindo que a técnica de swab não seja sensível bastante ou, mais provavelmente, que algumas éguas são mais susceptíveis ao estímulo antigênico que outras éguas consideradas "normais". Essa teoria se enquadra bem no conceito de que algumas éguas são resistentes e outras susceptíveis a infecções. No entanto, éguas que tiverem seus exames negativos tanto para citologia quanto para cultura não são necessariamente livres de infecção até a confirmação da biópsia (Christoffersen et al., 2015a).

Células de defesa quando encontradas fora do vaso sanguíneo em quantidades suficientes considera-se um quadro inflamatório, com neutrófilos e linfócitos associados a quadro agudo ou crônico respectivamente. No entanto, nem todo quadro inflamatório é considerado clinicamente relevante (tratável). A relevância do quadro é subjetiva e deve ser levada em consideração a idade da égua, anos na reprodução, identificação de líquido ultrassonográfico, e histórico de problemas reprodutivos. A presença de eosinófilos pode ser associada com entrada de ar no útero, sugerindo pobre conformação perineal (Slusher et al., 1984).

Fibrose periglandular

A fibrose periglandular representa o grau de "cicatrização" no endométrio e é determinado pelo grau de "ninhos" assim como no número de glândulas individuais que são afetadas. Ninhos fibróticos ocorrem quando há excessiva quantidade de colágeno ao redor da porção basal de glândulas individuais, contraindo as mesmas em um "ninho". Os números são contabilizados em baixa magnitude quando há 1 ninho, 2 a 4 ninhos considera-se moderado e quando tiver mais de 5, é considerado severo. A fibrose periglandular é predominante ao redor de glândulas localizadas no estrato esponjoso e se torna mais severa à medida que os ninhos são maiores, que possuem grande número de glândulas individuais. Essa patologia é considerada irreversível, e há aumento da severidade com o aumento da idade das éguas (McKinnon et al., 1988b).

Apesar dos polimorfonucleares exercerem um papel extremamente importante em processos infecciosos, sendo a primeira linha de defesa imunológica a se expressar, os mesmos também tem efeito deletério em úteros mais susceptíveis pela liberação de moléculas que podem danificar ainda mais os tecidos ao redor da inflamação e contribuir para o desenvolvimento de fibrose (Lögters et al., 2009).

Classificação da biópsia

Kenney (1978) primeiramente categorizou a biópsia endometrial equina em três graus (I, II e III) baseado principalmente na inflamação e fibrose. Uma classificação de grau I é considerada clinicamente insignificante e a de grau III significa que existe alto grau mudanças patológicas. A categorização de Kenney (1978), apesar de depender de observações do parâmetro tipo, extensão e severidade da inflamação e fibrose, também leva em consideração o estágio do ciclo estral, achados microbiológico e endócrino realizados previamente para interpretação dos achados.

Gordon & Sartin (1978), Doig et al. (1981) posteriormente, introduziram uma forma de categorização em que possui quatro graus distintos, e finalmente Kenney & Doig, (1986) publicaram um esquema de classificação que tornou-se como padrão internacional (Tabela 1).

Tabela 1. Categorias de biópsia endometrial Kenney-Doig e o prognóstico para biópsia uterina em éguas.

Categoria	Achados	Taxa de parição esperada (%)
I	Normal, inflamação ou fibrose leve, escassamente espalhada	80 – 90
IIA	Suave inflamação dispersa, fibrose leve, atrofia do endométrio na estação reprodutiva	50 – 80
IIB	Moderada inflamação dispersa, fibrose moderada	10 – 50
III	Severas alterações irreversíveis, incluindo fibrose e inflamação	<10

Quando Kenney (1978) criou as três categorias de prognóstico para biópsia uterina em éguas, esse resultado era em relação à capacidade do animal em conceber um potro e levar a gestação a termo (categoria I = 70 – 92%); categoria II = 50 – 67% e categoria III = < 10%). No entanto, o ponto crítico dessa avaliação era a definição do prognóstico de ambos (concepção e levar a gestação a termo). De fato, muitos autores tem especificado que a categoria III, que se enquadram éguas com patologias endometriais severas, normalmente pode conceber; no entanto, geralmente apresentam perda embrionária precoce. Kenney (1978) observou que os resultados poderiam ser ligeiramente diferentes dependendo do manejo reprodutivo, com mais altas porcentagens ocorrendo quando o manejo era melhor. Com isso, o mesmo autor percebendo que a categoria II era tão ampla e que havia uma lacuna na gama de prognósticos entre 10 a 50%, juntamente com Doig, reorganizou esse sistema de classificação de maneira a considerar a taxa de partos esperados (Kenney & Doig, 1986). É de suma importância na reprodução equina o resultado da biópsia endometrial para predizer a fertilidade de uma égua (Snider et al., 2011). Apesar do potencial do diagnóstico de uma biópsia uterina em equinos não ser questionável, alguns pesquisadores nos anos 70 e 80 questionaram a técnica como uma ferramenta para prognóstico, no entanto obtiveram resultados precisos e qualitativos (Ricketts, 1975, Kenney, 1978). Apesar de a biópsia endometrial fornecer importantes informações, a mesma não traz todas como, crescimento do folículo e tônus uterino, que são avaliações feitas por palpação retal e ultrassonografia, presença e quantidade de fluido intrauterino, presença de cistos e suas dimensões, que podem ser vistos também por ultrassonografia, identificação exata de qual patógeno os quais são identificados por exame microbiológico, assim como informações de concentrações hormonais. Certamente que a biópsia endometrial fornece uma gama de informações muito úteis, no entanto deve ser levado em consideração juntamente com outras ferramentas de diagnósticos (Kenney, 1978).

Efeito da idade e conformação perineal nas susceptibilidades a afecções uterinas

Uma abordagem na infertilidade em éguas é analisar a predisposição de fatores e desafios no trato reprodutivo em relação à ordem cronológica. Esses fatores mudam desde éguas mais jovens e virgens até as mais velhas multíparas. Éguas jovens geralmente entram em reprodução entre 3 a 6 anos de idade. Um dos problemas encontrados em éguas mais jovens é que durante a carreira de competições, essas éguas atingem um alto nível de condição corporal atlético, apresentando perda de gordura corporal na área perineal. Com isso, o reto torna-se deslocado mais anteriormente permitindo

que a vulva seja inclinada. Essa alteração da conformação permite a entrada de contaminantes fecais pela vulva e vestíbulo. A conformação perineal também pode ser uma característica herdável (Pascoe, 1978).

Durante o período de exercícios, a fadiga muscular juntamente com o estro contribuem para o relaxamento perineal. Aspiração de ar, conteúdo fecal e a entrada da bactéria no vestíbulo e cavidade vaginal é comum em potras em treinamento físico intenso. Essa condição é chamada de pneumovagina. Esses problemas no trato reprodutivo das potras em treinamento físico e podem se agravar pela suplementação frequente com alternogest ou progesterona injetável (Hurtgen, 2006).

Segundo Evans et al. (1986), a susceptibilidade uterina às infecções podem aumentar quando o trato reprodutivo está sobre influencia de progesterona, pelo fato da progesterona aumentar o tônus uterino e cervical diminuindo a contração do músculo endometrial promovendo retenção de líquido intrauterino, favorecendo o crescimento bacteriano intrauterino. A resistência inata de éguas jovens à endometrite bacteriana, pode ser comprometida por pneumovagina e contaminação fecal resultando em vaginites, pneumoutero e endometrite.

A fertilidade de éguas reprodutrizes mais velhas é comprometida. Éguas com mais de 12 anos de idade são mais afetadas, apresentando a cérvix mais alongada, fechada e fibrosa durante o estro. O útero dessas éguas pode acumular maior quantidade de líquido, que pode ser percebido por ultrassonografia (Pycock, 2000).

Algumas informações devem ser passadas aos criadores de equinos sobre o potencial de fertilidade e complicação de éguas mais velhas, antes de iniciar uma estação reprodutiva (ER). Éguas que apresentam afecções uterinas podem facilmente ser identificadas durante o exame ginecológico, prévio à estação reprodutiva, sendo esses exames realizados durante o estro (Brinsko et al., 2003).

Christoffersen et al. (2015a) ao avaliarem a conformação vulvar de éguas, relataram que as mais altas taxas de prenhez foram observadas em éguas com conformação vulvar normal, comparado com éguas com conformação vulvar ruim. Os mesmos autores também relataram que éguas com conformação vulvar ruim que não são submetidas a cirurgia de vulvoplastia tem maior tendência de desenvolverem endometrites bacterianas após a monta natural ou IA.

Categoria reprodutiva

A categoria reprodutiva em que a égua se encontra é um fator que influencia nas características uterinas e susceptibilidade à afecções uterinas em éguas (McKinnon et al., 1988b). Diel de Amorim et al. (2015) avaliaram métodos de diagnósticos para endometrite em éguas levando em consideração o fator categoria reprodutiva das éguas, que foram dividias em éguas virgens (éguas jovens que ainda não entraram em reprodução), éguas paridas (éguas que pariram no mesmo ano da avaliação ou experimento), éguas problema (éguas que foram inseminadas ou submetidas à monta natural nos anos anteriores ao experimento e apresentaram falhas na concepção), éguas solteiras (éguas que pariram em outras estações porém não estava em reprodução no ano anterior ou no ano do experimento) e jovens doadoras de embriões (éguas jovens que nunca pariram, porém fazem parte de programa de transferência de embriões e produziu um embrião no ano do experimento). Segundo Christoffersen et al. (2015b) éguas paridas apresentam maior prevalência de crescimento bacteriano positivo comparado com éguas solteiras, potras e com histórico de infertilidade, sugerindo assim que existe um possível risco da introdução de patógenos no útero de éguas paridas quando inseminadas ou acasaladas por monta natural.

A parição promove desafios ao trato reprodutivo das éguas. O parto em éguas pode ocorrer em ambientes os quais apresentam potencial de contaminação bacteriana. Durante o parto, o material da cama da baia torna-se material contaminante para o períneo, podendo ocorrer também pequenas contusões e pequenos danos ao trato reprodutivo na parição. Durante a passagem do potro pelo trato reprodutivo, antes da saída total da placenta pode ocorrer a contaminação da cavidade vaginal. Com o relaxamento da vulva, da vagina e da cérvix, podem permitir substancial contaminação com ar, debris, conteúdo fecal e bactérias. Éguas apresentam involução uterina e cervical, reduzindo a contaminação bacteriana de 7 a 12 horas após a parição (Arruda et al., 2015). A involução uterina pode demorar mais em éguas que já pariram em outras estações em comparação com éguas jovens (Fernandes et al., 2015), o que seria um predisponente para possíveis problemas uterinos.

Éguas paridas podem ser inseminadas ou acasaladas durante o cio do potro, podendo apresentar uma fertilidade aceitável. No entanto, se a involução uterina ainda não tiver ocorrido e se no momento da IA ou cobertura, estiver presente no útero uma quantidade significativa de líquido, a fertilidade será substancialmente reduzida podendo levar também a uma endometrite aguda (McKinnon et al., 1988b).

Microbiologia

A endometrite bacteriana é um dos principais problemas em éguas cíclicas com baixa resistência a inflamações persistentes. As bactérias mais comumente isoladas do útero das éguas são: a *streptococcus β-hemolítico* (*Streptococcus equi ssp. zooepidemicus*), *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa e Kleybsiella pneumoniae*. Outras bactérias aeróbicas isoladas do trato reprodutivo de éguas incluem streptococcus α-hemolitico, *Corynebacterium spp., Actinobacter spp., Proteus spp. e Citrobacter spp* (McKinnon et al., 1988b). Buczkowska et al. (2014) ao coletarem amostrar intrauterinas com escova ginecológica e biópsia e em seguida passadas em meios de cultura, observaram que as bactérias encontradas foram *Streptococcus β-hemolítico, Streptococcus α-hemolítico, E. coli, Micrococcus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeroginosa, Corynebacterium spp e Staphylococcus aureus*. Os mesmos autores identificaram também culturas fungicas como a de *Aspergillus spp*. e *Candida spp*. Buczkowska et al. (2014) observaram que as bactérias mais frequentemente isoladas foram os *Bacillus*, a qual não é considerada patogênica. Dentre as bactérias patogênicas isoladas as mais frequentes foram *Streptococcus β-hemolítico*. Os mesmos autores relataram alta frequência de fungos nos materiais coletados, sugerindo que a maioria das éguas que apresentaram crescimento fungico tinha histórico de frequentes infusões de antibióticos intrauterinos anteriormente à estação reprodutiva. Além disso, observaram que o isolamento de *Streptococcus β-hemolítico* é sempre associado com citologia uterina positiva, assim como ocorreu para *Corynectarium* spp, no entanto não ocorreu para *E. coli*. Segundo Nielsen et al. (2010), quando isolado *Streptococcus β-hemolítico*, ocorrem mais comumente associação com citologia uterina positiva, enquanto o isolamento de *E. coli* e outras bactérias gram-negativas eram menos prováveis de serem associadas com citologia uterina positiva. LeBlanc et al. (2007) sugeriram que a patogenicidade da *E. coli* é diferente da patogenicidade da *Streptococcus β-hemolítico*, e consequentemente a resposta inflamatória pode variar com diferentes microrganismos.

Buczkowska et al. (2014) observaram um total de 68,3% de éguas com histopatologia positiva para processo inflamatório, pela presença de PMNs no tecido endometrial. A sensibilidade da citologia uterina obtida por escova citológica é superior comparadas com a sensibilidade do exame microbiológico obtido por swab. Sendo assim, Buczkowska et al. (2014) relataram resultados em que o exame citológico tem mais acurácia em comparação com o exame microbiológico para diagnóstico de inflamação do endométrio, sugerindo que o exame citológico seja mais indicado para diagnóstico de endometrite do que o exame bacteriológico e que qualquer citologia positiva pode ser considerada como uma provável indicativo de endometrite. No entanto, a citologia uterina não promove informações sobre a causa da inflamação. Os mesmos autores relataram que quando associados os dois resultados, aumenta a sensibilidade do exame diagnóstico.

Tratamentos

Na avaliação reprodutiva de éguas com endometrite, pode-se observar fluido intrauterino tanto no diestro como no estro. Pode-se realizar a dilatação da cérvix (por manipulação manual ou com hormônios) de éguas que apresentam afecções uterinas persistentes, quando as mesmas foram inseminadas ou acasaladas por monta natural, sendo benéfica por permitir melhor saída de qualquer conteúdo uterino que venha causar problemas posteriores. O medicamento mais eficaz e utilizado nesses casos, e que promove dilatação cervical satisfatória, além de proporcionar contrações uterinas para expulsar o conteúdo indesejado e limpeza é a Oxytocina, administrada IV ou IM 4 horas após a IA ou acasalamento. Nesses caos, a oxitocina não compromete a fertilidade das éguas quando administrada antes da ovulação ou pós IA. Pode ser necessária repetidas injeções de oxitocina e/ou lavagem uterina para remoção de fluido intrauterino de 2 a 3 dias pós-ovulação. Como muitas vezes o útero é ineficiente em eliminar bactérias, sugere-se a infusão intrauterina de antibióticos intrauterina em conjunto com lavagens uterinas, quando detectado crescimento

bacteriano em cultura microbiológica (McKinnon et al., 1988b).

Uma das formas que podem ser consideradas como tratamento de alguns problemas reprodutivos em éguas seria permitir que doadoras de embriões pudessem levar uma gestação a termo em algum momento da vida reprodutiva. Com isso, as reprodutoras ficariam um longo tempo sem sofrerem manipulação do aparelho reprodutivo pela IA e TE possibilitando a recuperação da integridade do endométrio (McKinnon et al., 1988b).

A cirurgia de vulvloplastia é um procedimento que promove uma proteção do trato reprodutivo, evitando pneumovagina e contaminação fecal. Sendo assim, em éguas com problemas de conformação perineal, recomenda-se a realização do procedimento para prevenir infecções bacterianas e consequentemente aumentar a fertilidade de éguas (Pascoe, 1978, Seabaugh & Schumacher, 2014).

Apesar de a endometriose ser uma patologia degenerativa irreversível, existem estudos que avaliam a eficácia de alguns tratamentos para essa afecção uterina (Alvarenga et al., 2016, Mambelli et al., 2014). Um dos tratamentos para endometriose em éguas mais recentemente que tem sido estudado é com o uso de células tronco mesenquimais.

As células tronco mesenquimais (MSCs) podem ser isoladas de um indivíduo adulto, podendo ser coletadas da medula óssea e tecido adiposo, que são os locais mais utilizados em pesquisas. Essas células tem a capacidade de se diferenciarem em diversos tecidos do mesoderma ou ectoderma, incluindo osso, cartilagem, tendão, músculo, tecido adiposo e neurônios. As MSCs secretam um conjunto diversificado de moléculas bioativas que são imunomoduladoras (Aggarwal & Pittenger, 2005), assim como secretam outras moléculas que promovem a regeneração e remodelamento de injúrias em tecidos (Caplan & Correa, 2011), as quais envolvem inibição da apoptose, estímulo da angiogênese, assim como previnem a formação de tecido cicatricial (Sorrell et al., 2009). As MSCs também secretam agentes mitógenos que estimulam a divisão e diferenciação celular (Wagner et al., 2009). Sendo assim, o uso das MSCs poderia promover e suportar a regeneração natural de injúrias focais (Caplan & Correa, 2011). Segundo Bader et al. (1997), defeitos no epitélio endometrial de éguas causa alterações na expressão de proteínas o qual resulta em distúrbios no microambiente uterino, causando um déficit na nutrição embrionária e perda embrionária precoce.

Mambelli et al. (2014) isolaram e expandiram *in vitro* com sucesso células tronco mesenquimais multipotentes de adipócitos equinos (eAT-MSCs) e analisaram a capacidade alogênica dessas células em influenciar a expressão de certas proteínas em tecido endometrial de éguas para promover um positivo remodelamento local. Mambelli et al. (2014) colocaram as células eAT-MSCs em cateter e realizaram a infusão intrauterina imediatamente. Para confirmar o efeito alogênico no tecido endometrial, foi utilizado fluorescência. A presença de fluorescência no tecido coletado do útero das éguas foi observada sete dias após a infusão celular. Para avaliar os benefícios do transplante e enxerto dessas células eAT-MSCs no útero de éguas, foram analisados os padrões de expressão secretório das proteínas: vimentin, laminin, Ki-67, smooth-muscle-α-actin e cytokeratin 18 (CK18).

Segundo Hoffmann et al. (2009) alterações na expressão das proteínas como vimentin, laminin, smooth-muscle-α-actin e (CK18) foram observadas no endométrio de éguas, confirmando endometrose.

Mambelli et al. (2014) relataram que o transplante de células tronco mesenquimais foi confirmada a incorporação dessas células por uso de imunofluorecência. Foi observado também que as MSCs migraram para o espaço periglandular e em alguns casos contribuíram significativamente para a melhora do epitélio glandular. Após o transplante das eAT-MSCs, a expressão de algumas proteínas não foram mais observadas no endométrio de éguas quando comparado com o grupo controle, sugerindo um efeito positivo do transplante de eAC-MSCs no parâmetro de expressão de proteínas. Após sete dias do transplante das eAC-MSCs, foi observado um remodelamento na morfologia do endométrio, quando comparado com éguas do grupo controle. Alterações morfológicas no endométrio foram acompanhados por mudanças na expressão das proteínas analisadas em animais tratados, não ocorrendo com éguas do grupo controle que continuaram apresentando expressão atípica de proteínas. Sendo assim, Mambelli et al. (2014) concluíram que seus dados evidenciaram os benefícios morfológicos e funcionais do transplante de MSCs no o útero de éguas com endometriose. Mambelli et al. (2014) relataram

que o fato de uma das éguas que apresentava um quadro de degeneração endometrial avançado não ter respondido ao tratamento poderia sugerir o uso preventivo da terapia com células tronco, o qual poderia diminuir ou desacelerar o processo de degeneração que ocorre em éguas com perdas gestacionais em estações reprodutivas anteriores.

Considerações finais

A endometrite continua sendo uma das principais causar de perdas econômicas na equideocultura. Uma das sugestões para que isso ainda seja um grande problema seria o fato de ainda ser uma patologia negligenciada e não diagnosticada e avaliada de forma coerente, utilizando os métodos de diagnósticos indispensáveis como a citologia uterina, cultura bacteriana e biópsia uterina para se obter mais informações de como lhe dar com o problema, como tratar e qual o prognóstico. Sendo assim, desprenderia menos tempo insistindo no uso de éguas que realmente apresentam um grau de degeneração irreversível que seja inviável para a reprodução. Além de que, tendo em mãos os resultados das avaliações, pode-se eleger melhores receptoras e ter mais cuidado com o manejo reprodutivo de doadoras de embriões.

Referências bibliográficas

Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood,* 105**,** 1815-1822.

Alghamdi, A. S., Foster, D. N., Carlson, C. S. & Troedsson, M. H. T. 2005. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. *American Journal of Reproductive Immunology,* 53**,** 230-237.

Alvarenga, M. A., Carmo, M. T., Segabinazzi, L. G., Guastali, M. D., Maia, L. & Landim-Alvarenga, F. C. 2016. Feasibility and safety of endometrial injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in mares. *Journal of Equine Veterinary Science,* 42**,** 12-18.

Arruda, R. P., Lemes, K. M., Silva, L. A., Celeghini, E. C. C., Alonso, M. A., Pugliesi, G., Carvalho, H. F., Affonso, F. J., Silva, D. F. & Leite, T. G. 2015. Uterina involution and vascular perfusion during early postpartum in mares. *Reproduction, Fertility and Development,* 27**,** 142-142.

Bader, H., Kremer, H., Vogt, C., Schoon, H.-A. & Beier-Hellwig, K. 1997. Investigations on the protein patterns of the equine uterine secretions as functional parameter of the endometrium. *Pferdeheilkunde,* 13**,** 544-544.

Brinsko, S. P., Rigby, S. L., Varner, D. D. & Blanchard, T. L. 2003. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. *Proceedings of the 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, New Orleans, Louisiana, USA, 21-25 November 2003.* American Association of Equine Practitioners (AAEP).

Buczkowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Raś, A., Staroniewicz, Z. & Siemieniuch, M. J. 2014. Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. *Reproductive Biology and Endocrinology,* 12**,** 2-6.

Caplan, A. I. & Correa, D. 2011. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell,* 9**,** 11-15.

Christoffersen, M., Brandis, L., Samuelsson, J., Bojesen, A. M., Troedsson, M. & Petersen, M. 2015a. Diagnostic double-guarded low-volume uterine lavage in mares. *Theriogenology,* 83**,** 222-227.

Christoffersen, M., Söderlind, M., Rudefalk, S. R., Pedersen, H. G., Allen, J. & Krekeler, N. 2015b. Risk factors associated with uterine fluid after breeding caused by *Streptococcus zooepidemicus*. *Theriogenology,* 84**,** 1283-1290.

Diel de Amorim, M., Gartley, C. J., Foster, R. A., Hill, A., Scholtz, E. L., Hayes, A. & Chenier, T. S. 2015. Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low volume lavage, and uterine biopsy, and combinations in the diagnosis of Equine Endometritis. *Journal of Equine Veterinary Science,* 44**,** 54-61.

Doig, P. A., McKnight, J. D. & Miller, R. B. 1981. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *The Canadian Veterinary Journal,* 22**,** 72-76.

Esteller-Vico, A., Liu, I. K. & Couto, S. 2012. Uterine vascular degeneration is present throughout the uterine wall of multiparous mares. Colinearity between elastosis,

endometrial grade, age and parity. *Theriogenology,* 78**,** 1078-1084.

Evans, M. J., Hamer, J. M., Gason, L. M., Graham, C. S., Asbury, A. C. & Irvine, C. H. G. 1986. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: effect of steroid hormone environment. *Theriogenology,* 26**,** 37-50.

Fernandes, C. B., Guimaraes, C. F., Oliveira, B. M., Oliveira, G. C., Oliveira, C. G., Meirelles, M. G. & Celeghini, E. C. 2015. Peripartum urogenital disorders in mares. *Veterinária e Zootecnia,* 21**,** 516-526.

Ferreira, J. C., Gastal, E. L. & Ginther, O. J. 2008. Uterine blood flow and perfusion in mares with uterine cysts: effect of the size of the cystic area and age. *Reproduction,* 135**,** 541-550.

Ferreira, J. C., Ignácio, F. S., Rocha, N. S., Thompson, D. L., Pinto, C. R. & Meira, C. d. 2015. Real-time characterization of the uterine blood flow in mares before and after artificial insemination. *Animal Reproduction Science,* 160**,** 90-96.

Ginther, O. J. 1995. *Ultrasonic imaging and animal reproduction*.

Ginther, O. J. & Utt, M. D. 2004. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. *Journal of Equine Veterinary Science,* 24**,** 516-526.

Gordon, L. R. & Sartin, E. M. 1978. Endometrial biopsy as an aid to diagnosis and prognosis in equine infertility. *Journal of Equine Medicine and Surgery,* 2**,** 328-336.

Grüninger, B., Schoon, H.-A., Schoon, D., Menger, S. & Klug, E. 1998. Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity. *Journal of Comparative Pathology,* 119**,** 293-309.

Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R. C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B. & Schoon, H.-A. 2009. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Animal Reproduction Science,* 111**,** 261-278.

Hurtgen, J. P. 2006. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. *Theriogenology,* 66**,** 560-566.

Katila, T. 1995. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. Society for the Study of Reproduction.

Kenney, R. M. 1978. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 172**,** 241-262.

Kenney, R. M. 1992. The aetiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis. *Equine Veterinary Journal,* 25**,** 186.

Koblischke, P., Kindahl, H., Budik, S., Aurich, J., Palm, F., Walter, I., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Hoppen, H.-O. & Aurich, C. 2008. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology,* 70**,** 1147-1158.

Kotilainen, T., Huhtinen, M. & Katila, T. 1994. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology,* 41**,** 629-636.

LeBlanc, M. M., Johnson, R. D., Mays, M. B. C. & Valderrama, C. 1995. Lymphatic clearance of India ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. Society for the Study of Reproduction.

LeBlanc, M. M., Magsig, J. & Stromberg, A. J. 2007. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology,* 68**,** 403-412.

LeBlanc, M. M., Neuwirth, L., Asbury, A. C., Tran, T., Mauragis, D. & Klapstein, E. 1994. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine Veterinary Journal,* 26**,** 109-113.

Lehrer, R. I., Ganz, T., Selsted, M. E., Babior, B. M. & Curnutte, J. T. 1988. Neutrophils and host defense. *Annals of Internal Medicine,* 109**,** 127-142.

Lögters, T., Margraf, S., Altrichter, J., Cinatl, J., Mitzner, S., Windolf, J. & Scholz, M. 2009. The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Medical Microbiology and Immunology,* 198**,** 211-219.

Mambelli, L. I., Mattos, R. C., Winter, G. H., Madeiro, D. S., Morais, B. P., Malschitzky, E., Miglino, M. A., Kerkis, A. & Kerkis, I. 2014. Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometrosis. *PloS one,* 9**,** e97889.

McKinnon, A., Carnevale, E., Squires, E., Voss, J. & Seidel, G. 1988a. Heterogenous and xenogenous fertilization of in vivo matured equine oocytes. *Journal of Equine Veterinary Science,* 8**,** 143-147.

McKinnon, A. O., Squires, E. L., Harrison, L. A., Blach, E. L. & Shideler, R. K. 1988b. Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 192**,** 350-353.

Oikawa, M., Katayama, Y., Yoshihara, T., Kaneko, M. & Yoshikawa, T. 1993. Microscopical characteristics of uterine wall arteries in barren aged mares. *Journal of Comparative Pathology,* 108**,** 411-415.

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

Panzani, D., Rota, A., Marmorini, P., Vannozzi, I. & Camillo, F. 2014. Retrospective study of factors affecting multiple ovulations, embryo recovery, quality, and diameter in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology,* 82**,** 807-814.

Pascoe, R. R. 1978. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility,* 27**,** 299-305.

Pycock, J. F. 2000. Breeding management of the problem mare. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination,* 1**,** 195-228.

Ricketts, S. W. 1975. The technique and clinical application of endometrial biopsy in the mare. *Equine Veterinary Journal,* 7**,** 102-108.

Riddle, W. T., LeBlanc, M. M. & Stromberg, A. J. 2007. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology,* 68**,** 395-402.

Schoon, D., Schoon, H. A. & Klug, E. 1999. Angioses in the equine endometrium-pathogenesis and clinical correlations. *Pferdeheilkunde,* 15**,** 541-546.

Seabaugh, K. A. & Schumacher, J. 2014. Urogenital surgery performed with the mare standing. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice,* 30**,** 191-209.

Seaborn, E. 1925. The oestrous cycle in the mare and some associated phenomena. *The Anatomical Record,* 30**,** 277-287.

Slusher, S. H., Freeman, K. P. & Roszel, J. F. 1984. Eosinophils in equine uterine cytology and histology specimens. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 184**,** 665-670.

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

Sorrell, J. M., Baber, M. A. & Caplan, A. I. 2009. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue Engineering Part A,* 15**,** 1751-1761.

Traub-Dargatz, J. L., Salman, M. D. & Voss, J. L. 1991. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 198**,** 1745-1747.

Troedsson, M. H. T. 2006. Breeding-induced endometritis in mares. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice,* 22**,** 705-712.

Troedsson, M. H. T., Loset, K., Alghamdi, A. M., Dahms, B. & Crabo, B. G. 2001. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science,* 68**,** 273-278.

Troedsson, M. H. T., Scott, M. A. & Liu, I. K. 1995. Comparative treatment of mares susceptible to chronic uterine infection. *American Journal of Veterinary Research,* 56**,** 468-472.

Wagner, J., Kean, T., Young, R., Dennis, J. E. & Caplan, A. I. 2009. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. *Current Opinion in Biotechnology,* 20**,** 531-536.

Walter, I., Handler, J., Reifinger, M. & Aurich, C. 2001. Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction,* 121**,** 581-586.

Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Squires, E. L. & Troedsson, M. H. T. 2012.

Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology*, 78**,** 495-501.

Article History:
Received 29 September 2016
Accepted 14 October 2016
Available on line 20 October 2016

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.