



Relação entre a qualidade do sêmen com a endometrite pós-cobertura em equinos

Relationship between semen quality and post-breeding endometritis in equine

Eneiva Carla Carvalho Celeghini^{1,3}, Rubens Paes de Arruda², Shirley Andrea Florez-Rodriguez¹,
Elena Carolina Serrano-Recalde¹, Bruna Marcele Martins de Oliveira¹, Máira Bianchi Rodrigues Alves¹

¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

²Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

³Correspondência: celeghin@usp.br

Resumo

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 a fertilidade. Muitos estudos estão sendo realizados na busca de reconhecer todos estes fatores e suas interações, e todos com o objetivo de aumentar a taxa de fertilidade. Na resposta inflamatória fisiológica e transitória que ocorre após a deposição do sêmen no útero das éguas, há liberação de mediadores quimiotáticos e migração de células polimorfonucleares (PMN). Tal processo é desencadeado pelos espermatozoides, microrganismos e componentes dos diluidores. Este processo precisa ser debelado para restabelecer as condições uterinas normais quando da chegada do embrião. No entanto, acredita-se que a deposição de sêmen de baixa qualidade, ou seja, com mais espermatozoides lesados, aumenta a resposta inflamatória. Desta forma, o objetivo desta revisão é estabelecer a importância das interações entre a qualidade do sêmen e a resposta inflamatória uterina em éguas, com o intuito de reconhecer seus efeitos sobre a fertilidade.

Palavras-chave: espermatozoide, resposta inflamatória, inseminação artificial.

Abstract

The conditions of the female reproductive tract, the quality of the semen and the various physical and biochemical events that the gametes pass through to fertilization are some of the factors that influence fertility. Many studies are being conducted in the quest to recognize all these factors and their interactions, and all with the aim of increasing the fertility rate. In the physiological and transient inflammatory response that occurs after the deposition of semen in the uterus of mares, there is release of chemotactic mediators and migration of polymorphonuclear cells (PMN). Such a process is triggered by spermatozoa, microorganisms and diluent components. This process must be terminated to restore normal uterine conditions upon the arrival of the embryo. However, it is believed that the deposition of low quality semen, that is, with more spermatozoa damaged, increases the inflammatory response. Thus, the purpose of this review is to establish the importance of the interactions between semen quality and the uterine inflammatory response in mares, in order to recognize its effects on fertility.

Keywords: sperm, inflammatory response, artificial insemination.

Introdução

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 a fertilidade. Muitos estudos estão sendo realizados na busca de reconhecer todos os fatores e suas interações, e todos com o mesmo objetivo de aumentar a taxa de fertilidade da criação.

A refrigeração e congelamento seminal são técnicas difundidas na reprodução de equinos, que trouxeram aumento da eficiência reprodutiva, melhorando os índices de fertilidade e simplificando os protocolos de inseminação (Crowe et al., 2008). Porém, quando o sêmen é submetido a processos de preservação há comprometimento das células espermáticas, como danos de membrana, danos oxidativos, comprometimento da integridade da estrutura nuclear, danos morfológicos e funcionais das células (Watson, 2000a; Sieme; Harrison; Petrunikina, 2008; Nascimento et al., 2008). A resistência do sêmen ao efeito deletério destes processos varia de acordo com a raça, garanhão, ejaculados e entre populações espermáticas presentes no mesmo ejaculado (Rodriguez-Martinez, 2003). Principalmente após a criopreservação surge uma população de espermatozoides não viáveis que influenciam negativamente a sobrevivência no ambiente uterino das populações viáveis para eventualmente causar disfunção irreversível, reduzindo sua capacidade de desenvolver embriões saudáveis (Roca

et al., 2016).

No trato reprodutivo da fêmea após a deposição de sêmen pela cobertura ou inseminação artificial (IA) ocorre uma resposta inflamatória fisiológica (Troedsson, 2014) e transitória (Watson, 2000b), 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 por exemplo a gema de ovo e o glicerol (Troedsson et al., 1997). 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 do processo inflamatório (Serrano-Recalde, 2014).

Existem inúmeros estudos sobre o acúmulo de líquido intrauterino (Cadario et al., 1999; Leblanc et al., 1994) e sobre o mecanismo de defesa humoral e celular na resposta inflamatória após a inseminação artificial em éguas (Tunón et al., 2000; Waelchli et al., 1987; Asbury et al., 1980), estes estudos são baseados nos indícios de que a resposta inflamatória pós-cobertura persistente e uma limpeza uterina ineficiente são importantes causas de subfertilidade em éguas (Serrano-Recalde, 2014). Ressalta-se que a grande maioria destes estudos leva em consideração a patogenia da endometrite focada na contaminação bacteriana; no entanto, deve-se destacar que o espermatozoide é considerado o principal causador da inflamação que ocorre sempre após a cobertura (Kotilainen et al., 1994; Serrano-Recalde, 2014). Por outro lado, foi demonstrado que os resíduos da inflamação são prejudiciais ao espermatozoide e afetam a motilidade e os mecanismos envolvidos na capacitação espermática (Leblanc, 1999; Alghamdi et al., 2001; Serrano-Recalde, 2014).

Desta forma, o objetivo desta revisão é estabelecer a importância das interações entre a qualidade do sêmen e a resposta inflamatória uterina em éguas, com o intuito de reconhecer seus efeitos sobre a fertilidade.

Endometrite pós-cobertura

A endometrite pós-cobertura é um processo inflamatório local, que não evoca resposta inflamatória sistêmica (Tuppitts et al., 2014). Ocorre após a inseminação artificial ou monta natural (Troedsson et al. 1999) como um processo fisiológico próprio da resposta imune inata (Fedorka et al., 2017), cujo objetivo é remover o excesso de espermatozoides, plasma seminal e contaminantes do útero, possibilitando nas éguas o recebimento do embrião no quinto ou sexto dia após a ovulação, em um ambiente adequado que garanta sua sobrevivência (Leblanc et al., 1998). O processo inicia com o influxo transitório de PMN ao lúmen uterino, começando 30 minutos após a inseminação (Troedsson et al., 1999), atingindo o pico de 6 a 12 horas e declina dentro de 12 a 24 horas pós-inseminação. O processo inflamatório se resolve completamente dentro de 36 a 48 horas pós-inseminação e o ambiente uterino retorna ao estado normal (Katila et al., 1995; Troedsson et al., 2001). Éguas que falham em resolver este processo passadas as 72 horas após a cobertura, desenvolvem um processo patológico conhecido como endometrite persistente pós-cobertura, caracterizado pela persistência do processo inflamatório (Fiala et al., 2007). Esta afecção é indesejável porque mantém alterado o ambiente uterino e prejudica o estabelecimento da gestação, resultando em impacto econômico negativo para os criadores de equinos (Troedsson; Liu; Crabo, 1998; Hurtgen, 2006; Leblanc; Magsig; Stromberg, 2007). Pesquisas abordando esta afecção têm sido realizadas intensamente (Troedsson, 2014, 2006, 2001, 1998, 1997, 1995, Liu, 2008, 2011; Fumuso, 2003, 2007; Leblanc, 1998). De 10 a 15% das éguas cobertas geralmente desenvolve uma inflamação endometrial persistente (Troedsson et al., 2006), sendo a terceira condição clínica mais comum em éguas (Maischberger et al., 2008).

Resposta uterina ao sêmen

A égua tem mecanismos importantes para evitar a contaminação uterina e para eliminar de forma rápida o agente contaminante, bem como os componentes e subprodutos inflamatórios (Ferrer, 2005). As barreiras anatômicas, como a vulva, a prega vestibulo-vaginal e a cérvix, protegem o útero de agentes infecciosos ascendentes. Entretanto, esta barreira é quebrada durante a cobertura, sendo o sêmen depositado diretamente dentro do útero, assim, são necessários outros mecanismos para evitar a contaminação, tais como os componentes celulares e humorais do sistema imune, os fatores mecânicos e a drenagem linfática (Ferrer, 2005). Principalmente, a contratilidade miometrial é imprescindível para a limpeza física da luz uterina (Evans et al., 1987; Leblanc et al., 1994; Troedsson et al., 1993).

Após a deposição do sêmen no útero, seja por monta natural ou inseminação artificial, os espermatozoides ativam a motilidade e são rapidamente transportados do útero até a tuba uterina, processo que ocorre dentro das primeiras quatro horas pós-inseminação; porém, somente uma pequena porcentagem deles atinge o local da fertilização (Scott, 1995; Troedsson et al., 2001). A chegada dos espermatozoides no lúmen uterino estimula a liberação de células inflamatórias, encontrando-se presentes aos 30 minutos depois da inseminação (Almaghamdi et al., 2009). Os PMNs são as primeiras células inflamatórias presentes, o sistema

complemento é ativado, atraindo leucotrienos B4 (LTB4), prostaglandinas E (PGE) e prostaglandina F2 α (PGF2 α), que possuem função na opsonização e contratilidade na musculatura lisa, contribuindo com a fagocitose de espermatozoides, componentes do diluidor, bactérias e detritos (Troedsson et al., 2001). A PGF2 α e a oxitocina regulam as contrações miométrias (Maischberger et al., 2008), as quais contribuem na remoção do acúmulo de líquido e produtos inflamatórios prejudiciais para o ambiente uterino (Troedsson, 2006). Em adição, o incremento de PGF2 α liberada como parte do processo inflamatório pode causar luteólise prematura e subsequentemente perda embrionária (Palm et al., 2008; Rambags et al., 2003). As imunoglobulinas IgG_a, IgG_b, IgG_c, IgG_T, IgA e IgM também são isoladas do útero e desempenham um papel importante na defesa uterina (Maischberger et al., 2008).

Componentes do sêmen e qualidade espermática

A endometrite pós-cobertura é desencadeada tanto pelos microrganismos presentes no sêmen (Troedsson et al., 2001), como pelos próprios espermatozoides (Troedsson, 1995; Kotilainen et al., 1994). Os espermatozoides não são inerentemente quimiotáticos, mas ativam uma cascata do sistema complemento nas secreções uterinas (Katila, 2012). Parece que algumas 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).

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 a limpeza uterina 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., 2003; 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).

O plasma seminal recobre o espermatozoide evitando a opsonização para promover a fagocitose deles. Os linfócitos dos gânglios linfáticos que drenam o útero se ativam pela presença do plasma seminal, devido possivelmente aos imunossupressores inativados pelos antígenos dos espermatozoides que chegam aos gânglios linfáticos (Hafez; Hafez, 2004). As fêmeas podem desenvolver imunidade anti-espermática e em alguns casos podem encontrar anticorpos dirigidos contra o gameta masculino no aparelho reprodutor (Hafez; Hafez, 2004). Anticorpos anti-espermatozoide que levam a subfertilidade por autoimunidade foram descobertos em equinos, causado pela diminuição da ligação do espermatozoide na tuba uterina (Thomas et al., 1997). Amostras de sêmen de equinos considerados como reprodutores ruins, tem maior concentração de IgG do que amostras de reprodutores satisfatórios. Esta ligação foi associada com morfologia deficiente dos espermatozoides e anomalias da cabeça do espermatozoide (Ferrer et al., 2014).

A integridade e funcionalidade dos espermatozoides submetidos à criopreservação é reduzida em torno de 50% (Watson, 2000a). Os efeitos deletérios são provocados pelo aumento da fosforilação de proteínas da membrana plasmática e peroxidação lipídica. Embora, nem todos os espermatozoides respondam igual à criopreservação, devido à heterogeneidade de populações presentes no ejaculado (Andrade et al., 2012). 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 (Jasko et al. 1992). No entanto, a remoção do plasma seminal torna o espermatozoide mais susceptível a criocapacitação. A criocapacitação detectada em espermatozoides equinos descongelados pode explicar, em parte, a baixa taxa de sobrevivência dessas células no trato reprodutivo feminino (Andrade et al., 2012).

Juntamente, foi detectado que o sêmen congelado apresenta uma reação inflamatória mais pronunciada, caracterizado pela maior quantidade de neutrófilos no útero de éguas inseminadas com sêmen congelado (Kotilainen et al. 1994). Sugerindo também 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).

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. Os componentes do diluidor também podem contribuir para o desenvolvimento de um processo inflamatório persistente (Watson, 2000b; Troedsson et al., 2001), já que o diluidor de sêmen congelado contém gema de ovo e glicerol.

A quantidade de neutrófilos na luz uterina, 24 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).

Serrano-Recalde (2014) sugeriu 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. Desta forma, este autor inseminou éguas com sêmen de alta e baixa qualidade, avaliada por associação de sondas fluorescentes para identificar o percentual de espermatozoides com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), sendo este percentual de 30% e 15%, respectivamente para sêmen de alta e baixa qualidade. Realizou citologia endometrial após seis horas da IA, notou que apesar das éguas que receberam o sêmen de baixa qualidade apresentar maior porcentagem de PMN (76,41 ± 5,89%) do que as éguas que receberam sêmen de alta qualidade (47,87 ± 10,59%), esta diferença não foi detectada pelo teste estatístico ($P > 0,05$). Entretanto, ao se comparar este percentual de PMN com éguas do grupo controle, que receberam infusão uterina de somente diluidor (20,12 ± 6,57% PMN), notou-se que o grupo de alta qualidade foi semelhante ao controle ($P > 0,05$) e que o grupo de baixa apresentou aumento significativo ($P < 0,05$) de células inflamatórias no endométrio das éguas.

O processo inflamatório do endométrio pela deposição do sêmen pode alterar a hemodinâmica uterina detectável por ultrassonografia Doppler em éguas (Serrano-Recalde, 2014). Ocorrem mudanças na velocidade do fluxo sanguíneo, com aumento significativo da perfusão uterina aproximadamente uma hora após a infusão de plasma seminal ou sêmen, mas não acontece o mesmo com a infusão de somente o diluidor (Bollwein et al., 2003). Ferreira et al. (2012) identificaram aumento na perfusão sanguínea do útero duas horas após IA e diminuição da mesma a partir de três horas da deposição do sêmen.

Serrano-Recalde (2014) estudou a hemodinâmica uterina em equinos por meio da ultrassonografia Doppler colorida e espectral, após a inseminação artificial no corpo do útero com sêmen congelado. Pelo modo color-flow foi determinando o escore de vascularização uterina (EV, 0 - 4), pelo modo espectral foi determinando o índice de resistência (RI) da artéria uterina. O exame foi realizado prévio à indução da ovulação (30 horas antes da IA), imediatamente antes da IA e 6 horas após a IA. Não foi encontrada diferença estatística entre os grupos para os valores de RI, mas se observou maior EV uterino nos grupos inseminados com sêmen de alta (2,469 ± 0,194) e de baixa qualidade (2,463 ± 0,180) quando comparados com o grupo controle (1,619 ± 0,114). Determinando que o escore de vascularização é alterado pela presença de sêmen, mas não existe diferença significativa na resposta inflamatória entre as qualidades de sêmen (Serrano-Recalde, 2014).

Tsunoda et al. (2015) examinaram os efeitos da pentoxifilina (7,18 mM), adicionada ao diluidor seminal pós-descongelamento sobre a qualidade seminal e indução da resposta inflamatória uterina após a inseminação artificial de éguas. A pentoxifilina provocou diferenças na qualidade seminal, aumentando a velocidade de trajeto, velocidade progressiva e velocidade curvilínea avaliados pelo sistema computadorizado de avaliação da motilidade (CASA). Entretanto, Tsunoda (2013) notou que a adição de pentoxifilina ao diluidor aumentou a resposta inflamatória avaliada pela citologia uterina. O percentual de PMN foi menor no endométrio de éguas que receberam somente diluidor e diluidor com espermatozoides (20,20 ± 6,63 e 47,83 ± 10,61%, respectivamente) do que para aquelas que receberam diluidor com pentoxifilina sem ou com espermatozoides (57,89 ± 9,42 e 82,84 ± 5,71, respectivamente). Porém, nenhuma diferença estatística foi encontrada no fluxo sanguíneo uterino avaliado pela ultrassonografia Doppler. Concluíram que a pentoxifilina estimula mais os mecanismos de defesa, já que aumenta a migração de neutrófilos para o lúmen uterino nas primeiras seis horas após a IA, podendo promover mais rápida recuperação.

Serrano-Recalde (2014) verificou o efeito da qualidade seminal sobre a taxa de prenhez, o grupo de alta qualidade apresentou maior taxa de prenhez (81,82%) que o grupo de baixa qualidade (54,55%). Esta relação entre o sêmen como principal causador da inflamação após cobertura (Kotilainen et al., 1994) e em contrapartida a inflamação causadora de efeitos deletérios sobre os espermatozoides viáveis, já foi bastante estudada. No entanto, são poucas as pesquisas que mostram que a resposta inflamatória pós-cobertura varia com o tipo de inseminação e com a qualidade do sêmen depositado e qual o impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade.

De fato o sêmen provoca uma resposta inflamatória uterina após a inseminação, sem embargo, o efeito da qualidade do sêmen sobre o útero ainda precisa ser desvendado.

Referências

- Alghamdi AS, Lovaas BJ, Bird SL, Lamb GC, Rendahl AK, Taube PC, Foster DN.** Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding. *Anim Reprod Sci*, v.114, p.331-344, 2009.
- Alghamdi AS, Foster DN.** Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod*, v.73, p.1174-1181, 2005.
- Alghamdi AS, Foster DN, Troedsson MH.** 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.
- Andrade AFC, Zaffalon FG, Celeghini ECC, Nascimento J, Bressan FF, Martins SMMK, & de Arruda**



- RP.** Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Theriogenology*, v.77, p.1866-1872. e3, 2012.
- 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, p.607-16, 2003
- Crowe CAM, Ravenhill PJ, Hepburn RJ, Shepherd CH.** A retrospective study of artificial insemination of 251 mares using chilled and fixed time frozen-thawed semen. *Equi Vet J*, v.40, p.572-576, 2008.
- Fedorka CE, Woodward EM, Scoggin KE, Esteller-Vico A, Squires EL, Ball BA, & Troedsson MH.** The Effect of Cysteine-Rich Secretory Protein-3 and Lactoferrin on Endometrial Cytokine mRNA Expression After Breeding in the Horse. *J Equi Vet Sci*, 2016.
- Ferreira JC.** 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.
- Ferrer MS, George A, Miller LMJ, Flores EG, Wilkerson MJ.** Diagnosis of sperm-bound anti-sperm antibodies by flow cytometry and their association with semen quality. *J Equi Vet Sci*, v. 34, p.57, 2014.
- Ferrer MS.** Post-breeding endometritis after low-dose insemination in the mare. 2005, 86f. Masters thesis. Louisiana State University, School of Veterinary Medicine, Veterinary Clinical Sciences, University of Buenos Aires, 2005.
- Fiala SM, Pimentel CA, Mattos ALG, Gregory RM, Mattos RC.** Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*, v.67, p.556-562, 2007.
- Fumuso E, Giguere S, Wade J, Rogan D, Videla-Dorna I, Bowden RA.** Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Vet Immunol Immun*, v.96, p.31-41, 2003.
- Fumuso EA, Aguilar J, Giguère S, Rivulgo M, Wade J, Rogan D.** Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: effects of immunomodulation. *Vet Immunol Immun*, v.118, p.30-39, 2007.
- Guvenc K, Reilas T, Katila T.** Effect of insemination dose and site on uterine inflammatory response of mares. *Theriogenology*, v.63, p.2504-2512, 2005
- Hafez ESE, Hafez B.** Reprodução animal. 7.ed. São Paulo: Manole, 513p, 2004.
- Hurtgen JP.** Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. *Theriogenology*, v.66, p.560-566, 2006.
- Jasko DJ, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL.** Effect of seminal plasma and egg yolk on motio characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 37, p.1241-1252, 1992.
- Katila T.** Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reprod Dom Anim*, v.47, p.31-41, 2012.
- Katila T.** Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biol of Reprod Mon*, v.1, p.515-517, 1995.
- 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. In: *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 MM, Neuwirth L, Jones L, Cage C, Mauragis D.** Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. *Theriogenology*, v.50, p.49-54, 1998.
- Leblanc MM, Magsig J, Stromberg AJ.** Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, v.68, p.403-412, 2007.
- Liu IKM, Troedsson MHT.** The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Theriogenology*, v.70, p.415-420, 2008.
- Maischberger E, Irwin JA, Carrington SD, Duggan VE.** Equine post-breeding endometritis: A review. *Irish Vet J*, v.61, p.163, 2008.
- Nascimento J, Raphael CF, Andrade AFC, Alonso MA, Celeghini ECC, Arruda RP.** Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *J Eq Vet Sci*, v.28, p.351-358, 2008.
- Nash DM, Sheldon IM, Herath S, Lane EA.** Endometrial explant culture to study the response of equine endometrium to insemination. *Reprod Domc Anim*, v.45, p.670-676, 2010.
- 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.
- Portus BJ, Reilas T, Katila T.** Effect of seminal plasma on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. *Equi Vet J*, v.37, p.515-519, 2005.
- Rambags BPB.** Early pregnancy loss in aged mares: probable causes and cures. *Pferdeheilkunde*, v.19, p.653-



656, 2003.

Reilas T. Uterine luminal environment of the mare. 2001. 80f. Academic Dissertation. Department of Clinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finlândia, 2001.

Rodriguez-Martinez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Dom Anim*, v.38, p.312-318, 2003.

Roca J, Parrilla I, Gil MA, Cuello C, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H. Non-viable sperm in the ejaculate: Lethal escorts for contemporary viable sperm. *Anim Reprod Sci*, v.169, p.24-31, 2016.

Scott MA, Liu IKM, Overstreet JW. Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implications. In: *Proceedings Animal Association Equine Practice*, v.41, p.1-2, 1995.

Serrano-Recalde EC. Influência da qualidade do sêmen criopreservado equino sobre a taxa de prenhez, hemodinâmica uterina e endometrite pós-cobertura. 2014, 104f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014.

Sieme H, Harrison RAP, Petrunkina AM. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci*, v.107, p.276-292, 2008.

Thomas PGA, Ball BA, Ignatz GG, Dobrinski I, Parks JE, Currie WB. Antibody directed against plasma membranecomponents of equine spermatozoa inhibits adhesion of spermatozoato oviduct epithelial cells *in vitro*. *Biol Reprod*, 56(3), 720-730, 1997.

Troedsson MHT. Mating-induced endometritis: Physiology or pathology? *The Vet J*, v.199, p.9-10, 2014.

Troedsson MHT, Desvousges A, Hensen PJ, Buhi WC. 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. *Anim Reprod Sci*, v.94, p.60-61, 2006.

Troedsson MHT, Desvousges A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Buhi WC. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.171-186, 2005.

Troedsson MHT. Uterine response to semen deposition in mare. *Proc Soc Theriogenol*, p.130-135, 1995.

Troedsson MHT, Loset K, Alghamdi AM, Dahms B, Crabo BG. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.273-278, 2001.

Troedsson MHT. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in mare. *Theriogenology*, v.52, p.461-471, 1999.

Troedsson, M. H., Liu, I. K., Crabo, B. G. Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology*, v.50, p.807-818, 1998.

Troedsson MHT. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. *Pferdeheikunde*, v.13, p.516-520, 1997.

Tsunoda RH, Arruda RP, Serrano-Recalde EC, Oliveira BMM, Florez-Rodriguez SA, Alves MBR, Lançoni R, Nichi M, Celeghini ECC. Addition of pentoxifylline to skim milk-based extender on frozen-thawed equine sperm. *J Equ Vet Sci*, v.35, p.823-829, 2015.

Tsunoda RH. Efeitos da pentoxifilina sobre a qualidade espermática e hemodinâmica uterina em equinos. 2013, 111 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Tuppits U, Orro T, Einarsson S, Kask K, Kavak A. Influence of the uterine inflammatory response after insemination with frozen–thawed semen on serum concentrations of acute phase proteins in mares. *Anim Reprod Sci*, v.146, p.182-186, 2014.

Watson ED. Post-breeding endometritis in the mare. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.221-232, 2000a.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.481-492, 2000b.

Tsunoda RH, Arruda RP, Serrano-Recalde EC, Oliveira BMM, Florez-Rodriguez SA, Alves MBR, Celeghini ECC. Addition of Pentoxifylline to Skim Milk–Based Extender on Frozen-Thawed Equine Sperm. *J Equi Vet Sci*, v.35, p.823-829, 2015.
