

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FABIANO TREVISAN DA ROCHA

**MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO
TRATAMENTO DE ENDOMETROSE EM ÉGUAS**

**PORTO ALEGRE, RS
2018**

FABIANO TREVISAN DA ROCHA

**MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO
TRATAMENTO DE ENDOMETROSE EM ÉGUAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de grau de mestre em Medicina Veterinária Equina do Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos da UFRGS.

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin
Co-Orientador: Néelson Kretzmann

**PORTO ALEGRE, RS
2018**

CIP - Catalogação na Publicação

Rocha, Fabiano Trevisan da Rocha
MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
COMO TRATAMENTO DE ENDOMETROSE EM ÉGUAS / Fabiano
Trevisan da Rocha Rocha. -- 2018.

62 f.

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin Rubin.

Coorientador: Néelson Alexandre Kretzmann Filho
Kretzmann Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Endometrose. 2. Éguas. 3. Meio condicionado. 4.
Células tronco. I. Rubin, Mara Iolanda Batistella
Rubin, orient. II. Kretzmann Filho, Néelson
Alexandre Kretzmann Filho, coorient. III. Título.

FABIANO TREVISAN DA ROCHA

**MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO
TRATAMENTO DE ENDOMETROSE EM ÉGUAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de Grau De Mestre em Medicina Veterinária Equina do Programa de Pós-Graduação Em Medicina Animal: Equinos da UFRGS.

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin

Co-Orientador: Néelson Kretzmann

Porto Alegre, 23 de abril de 2018.

Prof.^a. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Ricardo Pozzobon
(UFSM)

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky
(ULBRA)

Prof.^a. Dr.^a Roberta Carneiro da Fontoura Pereira
(UNIJUI)

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo por permitir que cada homem busque a concretização dos seus sonhos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos pela oportunidade de fazer parte do grupo discente;

À Professora e orientadora Mara Iolanda Batistella Rubin pela oportunidade, pelos ensinamentos, suporte e incentivo e durante esse período;

Ao Professor Néelson Kretzmann pela co-orientação e auxílio na pesquisa;

Aos meus pais, Pedro e Maria Ignez Trevisan da Rocha, bem como minha irmã Juliana Trevisan da Rocha pelo incondicional apoio incentivando-me para alcançar meus objetivos;

À minha namorada, Juciane Bonella, pelo tempo, carinho e dedicação, estando ao meu lado nessa jornada;

Aos meus colegas de Pós-graduação Ana Paula Martini, Eliana Burtet Parmeggiani, Prof. Gilson Antônio Pessoa, Janislene Mach Trentin, Mariani Fiorenza, Ricardo Olimpio Schenatto, Romulo Oliveira Fernandes pelo auxílio, incentivo, amizade e por terem contribuído no meu crescimento profissional;

Aos estagiários do EMBRYOLAB/UFSM pela colaboração fundamental na realização dos experimentos e pelo vínculo de amizade estabelecido;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida;

A todos aqueles amigos que de uma forma outra me incentivaram.

RESUMO

MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS COMO TRATAMENTO DE ENDOMETROSE EM ÉGUAS

Autor: Fabiano Trevisan da Rocha
Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin

Durante a vida reprodutiva das éguas o endométrio é exposto a eventos como: cópula, parto, puerpério e infecções. Tais circunstâncias podem levar gradativamente a diminuição da capacidade funcional do endométrio com queda da fertilidade. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com o meio condicionado de células tronco mesenquimais sobre o endométrio de éguas com fibrose uterina através de avaliação histopatológica. No experimento 1, 21 éguas que não pariram pelo menos em duas temporadas foram avaliadas por meio de exames ultrassonográfico, citológico, bacteriológico e histopatológico. No experimento 2, das 21 éguas avaliadas, quatro éguas classificadas como grau II e duas éguas classificadas como grau III na histopatologia endometrial, foram submetidas a infusão uterina com o meio condicionado de células tronco mesenquimais para promover a regeneração endometrial. No experimento 1, a presença de edema uterino foi observada em 81% (17/21) das fêmeas líquido intrauterino em 23,81% (5/21) e cistos uterinos em 57,14% das éguas (12/21). O crescimento bacteriano identificado em 42,90% (9/21) das éguas pelo exame bacteriológico revelou predominância de *Escherichia coli* (4/21). O exame citológico revelou processo inflamatório em 44,40% das fêmeas (4/9) com crescimento bacteriano, enquanto 16,70% (2/12) das éguas sem crescimento bacteriano tinham presença de processo inflamatório ($P = 0,331$). A inflamação uterina foi detectada em 28,60% (6/21) das éguas. A biópsia uterina e avaliação histopatológica revelou 14,30% (3/21) das éguas pertencentes à classe Grau I, 47,60% Grau II (10/21) e 38,10% Grau III (8/21). Verificou-se correlação positiva significativa ($r = 0,69$; $P = 0,0005$) entre o grau de endometrose pelo Índice de Caslick e o grau atribuído após exame histopatológico. Maior percentual de éguas com índice Caslick superior a 200 foi observado ($P = 0,0242$) em éguas classificadas como Grau III (87,5%; 7/8) do que Grau I (0,0%; 0/3). Não houve diferença ($P = 0,59$) entre as éguas Grau III e as Grau II (70%; 7/10); estas últimas tenderam ($P = 0,07$) a ter maior percentual com índice Caslick acima

de 200 do que as fêmeas com Grau I. O índice Caslick médio comparado entre os graus histológicos revelou maior índice nas éguas Grau III do que nas éguas Grau I (252,0 vs 78,3; $P= 0,007$). As éguas com Grau II apresentaram índice intermediário (174,6). Não houve associação entre a presença de cistos uterinos e o grau histopatológico das biópsias ($P= 0,813$). Éguas com cistos uterinos tiveram 16,7%, 41,7% e 41,7% das biópsias classificadas no exame histológico como Graus I, II e III, respectivamente. Esses percentuais nas éguas sem cistos foram de 11,1%, 55,6% e 33,3%, para os Graus I, II e III, respectivamente. A idade média das fêmeas foi similar ($P= 0,112$) entre as fêmeas com e sem cistos uterinos (20,3 vs 16,3 anos). No experimento 2, a aplicação de 20 mL de meio condicionado de células tronco no lúmen uterino das seis éguas com endometrose grau II e III não resultou em melhoria na condição endometrial.

Palavras-chave: endometrose, éguas, fertilidade, meio condicionado, células tronco.

ABSTRACT

CONDITIONED MESENQUIMIAL STEM CELLS MEDIUM AS TREATMENT FOR ENDOMETROSIS IN MARE

Author: Fabiano Trevisan da Rocha
Adviser: Mara Iolanda Batistella Rubin

During the mare reproductive life, the endometrium is exposed to events such as copulation, parturition, puerperium, and infections. Such circumstances may gradually lead to a decrease in the functional capacity of the endometrium, resulting in a drop in fertility. The objective of this study was to evaluate, by using ultrasonographic, cytological, bacteriological, and histopathological exams, the effect of a treatment with mesenchymal stem cell-conditioned medium on the endometrium of 21 mares with uterine fibrosis that did not foal in at least two seasons. In experiment 1, 21 mares were evaluated by using ultrasonographic, cytological, bacteriological and histopathological exams. In experiment 2, from the total 21 females, four mares classified by the endometrial histopathology as grade II and two mares classified as grade III were submitted to uterine infusion with mesenchymal stem cell-conditioned medium to promote the endometrial regeneration. In experiment 1, the evaluation revealed the presence of uterine edema in 81% (17/21), intrauterine liquid in 23.81% (5/21), and uterine cysts in 57.14% of the mares (12/21). Bacteriological examination revealed that 42.86% (9/21) of the mares showed bacterial growth, and the microorganism with the highest incidence was *Escherichia coli* (4/21). The cytological exam showed inflammatory process in 44.40% (4/9) of the females with bacterial growth, while 16.70% (2/12) of the mares without bacterial growth showed inflammatory process ($P = 0.331$). Uterine inflammatory process was observed in 28.60% (6/21) of the mares. It was possible to identify by using uterine biopsy and histopathological evaluation that 14.30% (3/21), 47.60% (10/21), and 38.10% (8/21) of mares belong to Grade I, II and III, respectively. There was a significant positive correlation ($r = 0.69$, $P = 0.0005$) between the degree of endometrosis evaluated by the Caslick Index and the grade attributed after histopathological examination. The percentage of mares with Caslick index over 200 was higher in females classified as grade III ($P = 0.0242$) than in grade I females (0.0%; 0/3). There was no difference between mares grade III and grade II

(70%; 7/10). Grade II females tended to have a higher percentage with Caslick index above 200 ($P = 0.07$) when compared to the grade I females. The medium Caslick index compared between the histological grades revealed a higher index in grade III than in grade I mares (252.0 vs 78.3, $P = 0.007$). Mares grade II showed intermediate index (174.6). There was no association between the presence of uterine cysts and the histopathological grade of biopsies ($P = 0.813$). Mares with uterine cysts had 16.70%, 41.70%, and 41.70% of the biopsies classified in the histological examination as grades I, II, and III, respectively. The percentages in mares without cysts were 11.10%, 55.60%, and 33.30%, respectively, for Grade I, II and III. The mares mean age was similar ($P=0.112$) among females with or without uterine cysts (20.3 vs 16.3 years). In experiment 2, the application of 20 mL of mesenchymal stem cell-conditioned medium in the uterine lumen of six mares with endometriosis Grade II and III did not improve the endometrial condition.

Key-words: endometriosis, mare, fertility, conditioned medium, stem cells.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Identificação da raça, idade, último parto (anos), índice Caslick, presença ou ausência de edema e líquido uterino, análise bacteriológica, citológica e histopatológica do útero de éguas com histórico de nenhum parto nas duas últimas duas temporadas reprodutivas.....40

TABELA 2 - Classificação histopatológica pré e pós-tratamento com meio condicionado de células tronco mesenquimais de 6 éguas categorizadas como Grau II e III.....44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Corte esquemático do corno uterino da égua. CME – Camada muscular externa; V- Vênula; CMI – Camada muscular interna; CLP – Conjuntivo da lâmina própria; LU – Luz do corno uterino; GE – Glândulas endometriais; L – Linfático; A- Arteriola; P- Perimétrio16

ARTIGO

FIGURA 1 - Citologia compatível com processo inflamatório. Podem ser observados alguns fibroblastos (I), bactérias cocos (+) (II), presença de neutrófilos degenerados (III) e células epiteliais displásicas (IV).....41

FIGURA 2 - Aspecto citológico fisiológico de região uterina de égua. Observa-se pequena quantidade de bactérias cocos. A alta celularidade é composta por células epiteliais basais uniformes (II), dispostas em monocamada. Estas células apresentam citoplasma indistinto e basofílico, o núcleo é redondo com cromatina densa e nucléolos inconspícuos. Pode ser visualizada a presença de pequena quantidade fibroblastos individualizados (III).....41

FIGURA 3 - Associação entre o índice de Caslick e o grau de endometrose avaliado por exame histopatológico de biópsia uterina. Alguns pontos estão superpostos, pois algumas fêmeas de mesmo grau histopatológico possuem o mesmo valor de índice de Caslick.....42

FIGURA 4 - Associação entre a idade das éguas e o índice Caslick. Nesta figura são visualizados 20 pontos, porque duas fêmeas da mesma idade também tiveram o mesmo valor de índice de Caslick.43

FIGURA 5 - Biópsia endometrial equina Grau III. A – Ninhos com dilatação glandular e fibrose. B – Ninho com dilatação glandular e fibrose após tratamento com meio condicionado de células tronco.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTM	Células Tronco Mesenquimais
MC	Meio Condicionado
LH	Hormônio Luteinizante
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
cm	Centímetros
CME	Camada Muscular Externa
V	Vênula
%	Porcentagem
CMI	Camada Muscular Interna
CLP	Conjunto da Lâmina Própria
LU	Luz do Corno Uterino
GE	Glândulas Endometriais
L	Linfático
A	Arteriola
P	Perimétrio
PGF _{2α}	Prostaglandina F2α
IUGR	Retardo no Crescimento Uterino
CE	Comprimento Efetivo
A	Ângulo
IC	Índice Caslick
VEGF-A	Fator de Crescimento
IGF-1	Fator de Crescimento Insulínico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
mL	Mililitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Fisiologia do Ciclo estral	15
2.2 Morfologia Uterina	15
2.3 Função uterina	17
2.4 Reconhecimento materno da gestação na espécie equina.....	18
2.5 Endometrose	19
2.6 Conformação Vulvar	21
2.6.1 Índice Caslick	21
2.7 Avaliação Ultrassonográfica Uterina	22
2.8 Avaliação Histopatológica	23
2.8.1 Biópsia Endometrial	23
2.8.2 Classificação endometrial	24
2.9 Avaliação Citológica	24
2.10 Avaliação Bacteriológica	25
2.11 Terapias para regeneração uterina.....	26
2.11.1 Plasma Rico em Plaquetas – PRP.....	26
2.11.2 Querosene.....	27
2.11.3 Dimetilsufóxido – DMSO.....	27
2.12 Meio condicionado de células tronco	28
3 ARTIGO	30
4 COMITÊ DE ÉTICA	52
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

A equideocultura brasileira ocupa posição de destaque internacional, pois pelo expressivo número de animais é a segunda maior população de equinos puros de raça do mundo, além do plantel de excelente genética. Segundo dados do Ministério da Agricultura, o plantel nacional de equinos é superior a cinco milhões de animais, movimenta anualmente R\$ 16,15 bilhões, gera 610 mil empregos diretos e mais de dois mil empregos indiretos, sendo responsável por três milhões de postos de trabalho (FILHO, 2016).

Em meio a esse contexto, a eficiência reprodutiva da égua é determinada pela produção de um potro viável por ano, que é de extrema importância para o manejo do criatório de equinos e de grande interesse para criadores e médicos veterinários (GINTHER, 1986; MÖLLER, 2007).

Durante a vida reprodutiva, o endométrio é submetido a eventos que podem, sob determinadas circunstâncias, ser considerados agressões, tais como a cópula, o parto, o puerpério e as infecções genitais, os quais gradativamente diminuem a capacidade funcional do endométrio, tendo como consequência a infertilidade (SILVA et al., 1987).

Dentre as patologias que acometem o sistema reprodutivo da égua, as infecções uterinas, principalmente as endometrites, são consideradas como a principal causa de subfertilidade e infertilidade (PYCOCK, 1999; BRINSKO et al., 2011). Segundo Hurtgen (2006), a inflamação uterina pode ser classificada como aguda, crônica, subclínica, pós-parto, bacteriana, fúngica, viral, persistente pós-cobertura e um processo inflamatório crônico e degenerativo descrito como endometrose (HOFFMANN et al., 2009). Segundo Ley (2006), endometrose é o termo usado para descrever uma ampla variedade de características histopatológicas degenerativas do endométrio de éguas.

Em 1978, Kenney desenvolveu uma classificação para o endométrio com base no histórico, exame físico, comportamento, aparência histológica das glândulas, vasos sanguíneos e linfáticos endometriais, magnitude das alterações inflamatórias e fibrose. A partir da classificação, o tecido endometrial saudável pode ser classificado como categoria I, enquanto categorias II corresponde à inflamação moderada a grave e III a fibrose. Essas categorias definidas por Kenney (1978) estão relacionadas à probabilidade do animal conceber um potro e levar a gestação a termo (categoria I de 70 a 92%, categoria II de 50 – 67% e categoria III é < 10%).

Qualquer condição que afetar a homeostasia corporal da égua pode influenciar a circulação uterina e, portanto, o aporte nutricional ao feto. O risco ao potro em formação depende da natureza e severidade da condição, da sua duração e do estágio da gestação em que ela ocorre. As curvas de crescimento celular, tecidual e dos órgãos são assíncronas, criando “janelas” de suscetibilidade para efeitos deletérios ao desenvolvimento (ROSSDALE & OUSEY, 2003). Alterações na secreção uterina foram sugeridas por Ball (1993) como uma das principais causas de morte embrionária, em especial em éguas velhas e apresentando lesões degenerativas do endométrio.

Os tratamentos para causar irritação mecânica e química do endométrio foram amplamente utilizados no passado com o intuito de melhorar as condições uterinas em processos degenerativos caracterizados por fibrose. Tais técnicas tem como objetivo remover uma camada de endométrio possibilitando renovação por tecido funcional. No entanto a utilização desses métodos é controversa pois pode produzir ainda mais tecido cicatricial dificultando o reparo tecidual. O prognóstico de um animal com fibrose degenerativa do útero (endometrose) é desfavorável cursando muitas vezes com o descarte do animal da reprodução (TROEDSSON, 1997; ARRUDA et al., 2003).

As células tronco mesenquimais (CTM) ou células estromais mesenquimais são células progenitoras multipotentes estromais com propriedades regenerativas que estão presentes em muitos tecidos e órgãos (DITTMER & LEYH, 2014). Com o intuito de promover regeneração do tecido endometrial, Mambelli et al. (2013) utilizaram infusão de células tronco em seis éguas com endometrose e compararam com tratamento placebo. Quando avaliadas as biópsias uterinas coletadas sete dias após a infusão, constatou-se que ocorreu melhora significativa a nível de organização tecidual e morfologia das glândulas uterinas e também nas amostras coletadas nos dias 21 e 61 pós-tratamento. Nos animais controle não foram observadas modificações.

Recentemente foram identificados fatores estimulantes angiogênicos no meio condicionado (MC) de CTM equinas que demonstraram a indução da proliferação e formação de células endoteliais *in vitro* (BUSSCHE e Van de WALLE, 2014). Isto implica que o meio condicionado obtido a partir da cultura de CTMs contém todos os fatores secretados pelas CTMs, podendo ser usado como terapia regenerativa isenta de células (HAARER et al., 2015; MAGUIRE, 2013). As pesquisas prosseguiram nesta área com Corradetti et al. (2014), que indicaram o meio condicionado como terapia livre de células para aplicações na medicina regenerativa.

Com base nestas afirmações, a presente pesquisa teve por objetivo avaliar a capacidade regenerativa do Meio Condicionado de Células Tronco no útero de éguas com endometrose.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fisiologia do Ciclo Estral

A duração do ciclo estral nas éguas é de cerca de 22 dias com 5 a 7 dias de estro e 14 a 15 dias de diestro. Durante o estro, a égua apresenta-se receptiva ao garanhão devido ao predomínio do estrogênio que é produzido pelas células da granulosa de folículos ovarianos (GINTHER, 1986; LEY, 2006). No diestro ocorre a secreção de progesterona pelo corpo lúteo, e, mesmo que haja folículos em desenvolvimento secretando estrogênio, há predomínio desse progestágeno, o qual imprime suas características sobre o trato reprodutivo feminino e com isso a égua exhibe comportamento de rejeição ao garanhão (BACK et al., 1974).

As células gonadotróficas estão localizadas na hipófise e a diferença no padrão de armazenamento de hormônio luteinizante (LH) e de hormônio folículo estimulante (FSH) dentro destas células é considerada a base para a regulação da secreção de gonadotrofinas ao longo do ciclo reprodutivo. Em geral, o folículo pré-ovulatório nas éguas atinge tamanho médio de 40 milímetros. Após a ovulação, o nível de progesterona aumenta e atinge concentração máxima no oitavo dia do ciclo. Uma vez que não ocorra a fertilização, a luteólise funcional ocorre ao redor do dia 15 e é iniciada pela secreção endometrial de Prostaglandina 2 α (PGF_{2 α}) (GINTHER, 1986; LEY, 2006).

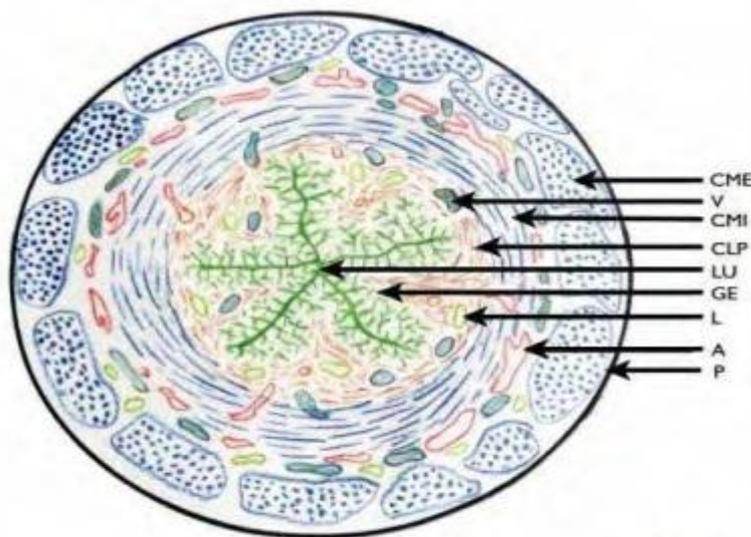
2.2 Morfologia Uterina

O corpo e os cornos uterinos têm, tipicamente, o formato de Y ou T. O corpo é cilíndrico e está situado parcialmente na cavidade abdominal e parcialmente dentro da cavidade pélvica. O corpo é liso dorso-ventralmente e tem cerca de 18 a 20 cm de comprimento. A superfície endometrial é similar à dos cornos uterinos, mas com menos aberturas de glândulas tubulares na superfície (GINTHER, 1979).

O útero da égua é formado por três camadas: a camada interna; endométrio (mucosa), a média, miométrio (camada muscular) e a externa, perimétrio (serosa) (Figura 1). A mucosa do lúmen uterino é revestida por células epiteliais, que variam de cúbicas a cilíndricas altas. Abaixo do epitélio está a lâmina própria, que é dividida em

estrato compacto e esponjoso (KENNEY, 1978; BARROS e MASUDA, 2009; MASSENO, 2012).

Figura 1 - Corte esquemático do corno uterino da égua. CME – Camada muscular externa; V- Vênula; CMI – Camada muscular interna; CLP – Conjuntivo da lâmina própria; LU – Luz do corno uterino; GE – Glândulas endometriais; L – Linfático; A- Arteríola; P- Perimétrio.



Fonte: Barros e Masuda, 2009.

A camada epitelial do endométrio é colunar simples com células cubóides a cilíndricas, dependendo do estágio do ciclo estral. As glândulas endometriais tubulares se estendem, de suas aberturas na superfície epitelial através da camada compacta da lâmina própria, até a camada esponjosa, localizada imediatamente abaixo da camada circular mais interna da musculatura lisa do miométrio (GINTHER, 1979).

Na fase proliferativa, as células do epitélio luminal e do epitélio das glândulas são prismáticas altas, com grande núcleo oval a redondo, hipocromático. As glândulas estão distendidas. Na fase secretória, as células do epitélio luminal variam de isoprismáticas a cúbicas, com núcleo ovalado ou redondo. As glândulas são tortuosas, o lúmen está aumentado e seu epitélio de revestimento é baixo, com vacúolos secretórios na porção apical. Neste período, as estruturas glandulares começam a perder a tortuosidade. Sendo estas características observadas nas fases de estro e diestro (BRUNCKHORST et al., 1991).

No período do anestro, o endométrio entra em atrofia fisiológica. Quando não é marcado por atividade folicular ou luteínica caracteriza-se por epitélio luminal cuboide com aumento de basofilia do citoplasma, lâmina própria não edematosa, população de glândulas com alta densidade e não tortuosas, com epitélio de baixo colunar a cuboide (KENNEY, 1978).

2.3 Função uterina

O útero permite e favorece o acesso dos espermatozoides até a tuba uterina, sendo capaz de reagir à presença do sêmen e à contaminação causada pela cobertura e garante um ambiente capaz de manter o desenvolvimento do embrião e do feto, durante o longo período de gestação característico da espécie equina (ROSSDALE et al., 2004). Além disso, o útero através do endométrio produz Prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), transporta, armazena e auxilia na maturação e capacitação de espermatozoides através das secreções endometriais (HAFEZ, 1975; BARTOL et al., 1999).

A falha na concepção tem sido assunto de grande interesse frente ao seu impacto na equideocultura. Existem muitas razões pelas quais éguas falham na concepção, estando a eficiência reprodutiva da fêmea equina diretamente correlacionada com a capacidade uterina de manter um ambiente adequado para o desenvolvimento embrionário, crescimento fetal e parto fisiológico (CARMO & ALVARENGA, 2015). O estudo conduzido por LeBlanc et al. (1998) enfatiza que a posição do útero tem influência na limpeza uterina. Úteros pendulares, que estão inclinados ventralmente em relação à base da pélvis, estando na grande maioria das vezes relacionados a senilidade podem apresentar uma ineficiente expulsão da contaminação uterina ao contrário de úteros sem esta inclinação.

Alterações na secreção uterina foram sugeridas por Ball (1993) como uma das principais causas de morte embrionária, especialmente em éguas velhas com lesões degenerativas do endométrio.

Ao final do primeiro mês da gestação a organogênese está completa e o embrião equino formado, os efeitos do ambiente uterino neste período sobre o desenvolvimento podem ir até o período pós-natal, incluindo a vida adulta e mesmo as gerações futuras (BETTERIDGE, 2011). Algumas das influências que o ambiente uterino pode ter após o nascimento incluem o aumento da predisposição à hemorragia induzida pelo exercício

e de obstrução recorrente das vias aéreas, por alterações da microestrutura do tecido pulmonar, hemiplegia de laringe, pelos efeitos do retardo no crescimento uterino (IUGR) (ROSSDALE & OUSEY, 2003).

Santos e Nogueira (2012) avaliaram as características individuais e maternas do cavalo Crioulo em relação ao seu desempenho na Prova do Freio de Ouro e detectaram que éguas após o 13º parto, ou acima de 24 anos de idade, tem mínimas chances de produzirem potros vencedores. Isto estaria relacionado a distúrbios uterinos causados por partos prévios, alterações na nutrição fetal e distúrbios uterinos que podem limitar o desenvolvimento do potro influenciando desta forma seu futuro desempenho atlético (ROSSDALE et al., 2004).

2.4 Reconhecimento materno da gestação na espécie equina

O desenvolvimento embrionário tem início a partir da fecundação do oócito pelo espermatozóide (GINTHER, 1986), este atravessa a junção útero-tubária, entrando no útero entre 144 e 168 horas após a ovulação (dia 6 - 6,5) no estágio de desenvolvimento de mórula tardia ou blastocisto inicial (BETTERIDGE et al., 1982). Sabe-se que o embrião viável começa a secretar grande quantidade de PGE₂ quando atinge o estágio de mórula compacta, no dia 5 após a ovulação (GINTHER, 1992; ALLEN, 2001). Essa PGE₂ tem a propriedade de promover contrações locais e relaxamento da musculatura lisa, atuando na parede do oviduto, permitindo o movimento progressivo do embrião com o auxílio do batimento ciliar rítmico (GASTAL et al., 1998).

Durante o desenvolvimento do concepto equino dentro do lúmen uterino, pode se observar por ultrassonografia que o embrião se movimenta frequentemente antes que ocorra a fixação mesometrial. Paralelamente, há mudanças dramáticas na forma do embrião entre os dias 11 a 21, variando entre as formas, esféricas, oblongada, triangular e irregular (GINTHER, 1986). Na espécie equina, com a movimentação do embrião de forma contínua ao longo do corno uterino, há a supressão da liberação cíclica normal da prostaglandina F_{2α} pelo endométrio, que resulta na manutenção funcional do corpo lúteo, sendo este responsável por produzir progesterona (GINTHER, 1979; SPENCER et al., 2004).

2.5 Endometrose

O termo endometrose, definido para o endométrio das éguas, foi descrito inicialmente por Kenney (1992) para substituir o termo endometrite crônica degenerativa (ALLEN, 2001).

Schoon et al. (1992) descrevem que a endometrose equina é uma doença associada à idade, que cursa com alteração degenerativa das glândulas uterinas e estromais ao seu entorno, estando diretamente relacionada a problemas de fertilidade. Posteriormente, Hoffmann et al. (2003) a descrevem como fibrose periglandular ou do estroma do endométrio, o qual inclui alterações glandulares no foco fibrótico.

Eigenheer-Moreira et al. (2014) observaram correlação entre senilidade da égua, categoria da biópsia e subfertilidade, ou seja, quanto maior as alterações histológicas do endométrio, maiores as chances de que a égua seja subfértil. Para Rebordão et al. (2014) essa alteração é considerada a principal causa de infertilidade em éguas.

A idade, inflamação endometrial repetida, reprodução, múltiplas gestações e partos foram considerados ao longo das últimas décadas potenciais fatores etiológicos das alterações degenerativas do endométrio (HOFFMANN et al., 2009). Na verdade, o endométrio da égua, em resposta a bactérias ou a estímulos não infecciosos, como o sêmen durante a reprodução, tem a particularidade de desenvolver fibrose (deposição de colágeno) no estroma, levando à endometrose (KENNEY, 1992; HOFFMANN et al., 2009).

A formação de fibrose ocorre devido à alteração do depósito de colágeno no estroma tanto do estrato compacto como do estrato esponjoso - e na membrana basal do epitélio luminal, podendo levar à formação de ninhos glandulares de tamanho variado. A severidade pode ser avaliada pelo número de camadas e pela frequência de aparecimento de focos fibróticos na amostra (KENNEY e DOIG, 1986).

Os distúrbios da drenagem linfática podem ser induzidos, juntamente com a redução do fluxo sanguíneo venoso endometrial devido a flebosclerose. Esta alteração vascular pode cursar com distúrbios na circulação linfática, resultando em edema linfático. Subsequentemente, o edema estromal pode levar à fibroproliferação induzida por edema do endométrio (fibrose endometrial) (LUDWIG et al., 2002).

Em geral, a fibrose é o último passo de um processo contínuo que inicia com lesão e inflamação celular. A progressão da resposta ocorre com influxo de neutrófilos

polimorfonucleares, monócitos e macrófagos, seguida de neovascularização, desenvolvimento de células gigantes de corpo estranho, ativação de fibroblastos e, finalmente, fibrose (CHAMBERS, 2008). O processo fibrótico é uma complicação da inflamação crônica e da exposição ambiental, regulado por fatores incluindo interação com a matriz extracelular, superfície de células inflamatórias, hormônios e complexa rede de citocinas profibróticas. A natureza do mecanismo pelo qual as citocinas regulam a fibrose pode ser indireto, através da atração de células inflamatórias, e direto, através da ligação a receptores específicos em fibroblastos e estimulação da proliferação, produção de colágeno e secreção de fatores autócrinos (ATAMAS, 2002). Carmo & Alvarenga (2015) acrescentam que com a exacerbação do processo inflamatório se estabelece alto grau de fibrose periglandular, que leva a queda drástica da fertilidade da fêmea.

Um estudo realizado no Japão avaliou 50 éguas Puro Sangue de Corrida constatando que 30 (88,2%) das 34 éguas com ou mais de 6 anos apresentavam lesões relacionadas com endometriose, evidenciando que a incidência aumentou com o avanço da idade (HANADA et al., 2014).

Wilsher e Allen (2003) ao pesquisar alterações uterinas degenerativas decorrentes da idade verificaram que as mesmas podem interferir negativamente, limitando a placentação, devido ao fato de ocorrer redução da área efetiva para trocas materno-fetais e resultar em retardo no crescimento uterino. Desta forma, menor quantidade associada a menor tamanho das vilosidades do alanto-córion desenvolvidos nas regiões que estão em contato com áreas degeneradas do endométrio são responsáveis por menor desenvolvimento do feto (ALLEN et al., 2011). Estas observações já haviam sido identificadas por Rossdale (2004) ao relatar que alterações uterinas crônicas como cistos e extensas áreas de fibrose afetam adversamente a relação entre o córion e o endométrio. As falhas na transferência de nutrientes do organismo materno para o fetal podem ocorrer e levar a circulação placentária hipofuncionante. Desta maneira, teoricamente, gestações de éguas velhas são predispostas a apresentar síndrome do mal ajustamento fetal.

Como resultado, a endometriose torna o endométrio incapaz de funcionar adequadamente, o que é crucial para a sobrevivência do embrião jovem, levando, em última análise, a perda precoce da gestação (REBORDÃO et al., 2014).

2.6 Conformação Vulvar

A vulva é definida como a porção do trato genital comum aos sistemas urinário e reprodutivo (GINTHER, 1979; LEY, 2006), na égua saudável a vulva fornece a primeira barreira efetiva para proteger o útero da infecção ascendente. Já na década de trinta, Caslick reportou a importância dessa condição em relação a infecção uterina em éguas (PYCOCK, 2003).

Os problemas na conformação vulvar podem estar associados a má condição corporal, idade (éguas velhas tem maior predisposição), múltiplos partos que podem levar a lacerações perineais e a forma congênita (PYCOCK, 2003). Para minimizar a entrada de bactérias para o lúmen uterino a cirurgia de correção vulvar denominada vulvoplastia é indicada por várias equipes de renome (CASLICK, 1937; SILVA, 1983; McCUE, 2009).

O estudo retrospectivo de cinco anos conduzido por Hemberg et al. (2005) com 171 éguas detectou 81% com conformação vulvar fisiológica apresentaram endométrio sadio ao exame citológico, em contrapartida, apenas 46% das éguas sem cirurgia de correção vulvar apresentaram citologia uterina sadia. Ainda neste estudo os autores relatam que a inadequada coaptação dos lábios vulvares predispõe a infecção uterina.

2.6.1 Índice Caslick

O Índice Caslick avalia a conformação perineal levando em consideração o comprimento da comissura vulvar e o ângulo de inclinação da vulva. Através deste índice são avaliados o comprimento efetivo (CE), que consiste na medida da distância entre a comissura vulvar dorsal até o nível do assoalho da pelve, em centímetros; e o ângulo (A) de inclinação da vulva. O produto (CE x A) fornece o índice utilizado para determinar a necessidade de realizar a vulvoplastia. Com base na avaliação de 9.020 éguas foram caracterizados três grupos de conformação vulvar. O Grupo I com éguas que possuíam comprimento efetivo de 2-3 cm, IC <100 e que raramente foram submetidas a correção através de sutura, mesmo em idade avançada. O Grupo II com as éguas que possuíam comprimento efetivo entre 6- 7 cm e IC >50. As éguas deste grupo, mesmo aos 3 anos de idade apresentavam o assoalho pélvico a mais de 4 cm de

distância da comissura dorsal da vulva. Com a idade, o aumento do comprimento e do ângulo de inclinação resultou em um IC >150 devido ao relaxamento dos órgãos e ligamentos pélvicos. No Grupo III, com as éguas que possuíam comprimento efetivo de 5-9 cm e o IC variou de 5 a >200. Estas éguas apresentavam problemas reprodutivos, necessitavam da sutura de Caslick em idade jovem e apresentavam dificuldade em conceber naturalmente (PASCOE, 1979).

2.7 Avaliação Ultrassonográfica Uterina

A introdução da ultrassonografia no exame ginecológico equino por Palmer & Driancourt (1980) tornou possível a visualização e avaliação das estruturas que compõem o trato reprodutivo, bem como o diagnóstico de patologias associadas a estes.

No exame ultrassonográfico, a dinâmica da ecotextura uterina é influenciada pelos diferentes momentos do ciclo estral, em virtude dos níveis de esteroides ovarianos predominantes. No diestro (período de ação da progesterona), as pregas endometriais não são identificadas, apresentando ecotextura homogênea. Em contrapartida, durante o estro, período de ação estrogênica, as pregas endometriais podem ser visualizadas em conjunto com áreas anecóicas, caracterizando o edema uterino com ecotextura heterogênea. O edema é visualizado primeiramente ao final do diestro e torna-se mais proeminente com o desenvolvimento da fase estral, diminuindo entre 48 e 24 horas antes da ovulação e não deve persistir por mais de 36 horas após a ovulação (GINTHER, 1986). De acordo com Squires et al. (1988) e Ley (2006), na ecotextura uterina do diestro fisiológico não é possível observar acúmulo de líquido. Nesta avaliação é importante não confundir esse líquido com gestação ou cistos endometriais.

Após o contato do sêmen com o útero, ocorre uma forte reação inflamatória entre 4 e 24 horas (CARD, 2005). O pico da reação ocorre entre 6 e 12 horas, e esta decresce entre 24 e 48 horas (TROEDSSON, 1994). A presença de líquido neste período pode ser sugestiva de endometrite aguda ou crônica. Cuervo-Arango & Newcombe (2010) identificaram correlação negativa entre o aumento do edema do endométrio 8 horas após o acasalamento e a taxa de prenhez, independentemente do escore do edema durante o período periovulatório. A inflamação endometrial e os produtos da inflamação no lúmen uterino (por exemplo as prostaglandinas) durante o estágio de mobilidade embrionária são deletérios para a sobrevivência do embrião.

Desta forma, o exame ultrassonográfico antes e após a ovulação para determinar o acúmulo ou ausência de líquido intra-uterino é uma ferramenta chave para o sucesso da gestação (LEY, 2006).

2.8 Avaliação Histopatológica

2.8.1 Biópsia Endometrial

A avaliação histológica endometrial ocorre por meio da realização de biópsia, que auxilia no diagnóstico de doença uterina e também como prognóstico de uma égua ser capaz de levar a gestação a termo (McCUE, 2009). A biópsia endometrial é uma técnica relativamente fácil e segura (KENNEY e DOIG, 1986), sendo considerada um procedimento padrão há várias décadas (RICKETTS e BARRELET, 1997).

Na pesquisa desenvolvida por Watson e Sertich (1992) consecutivos procedimentos de biópsia uterina em uma mesma égua foram avaliados. No estudo, a técnica não exerceu efeito deletério na concepção após duas, três ou quatro biópsias endometriais em um período de 50 dias, pois do total de sete éguas, seis delas gestaram.

A melhor fase para a realização da biópsia é o diestro. Nesta fase, o útero está sob influência da progesterona, e as glândulas potencialmente funcionais estão em atividade máxima. Em contrapartida o endométrio em anestro é hipoplásico e subdesenvolvido, sendo difícil a avaliação da fibrose. Da mesma forma, durante o estro, as glândulas estão presentes em menor quantidade, separadas pelo edema, que pode ser consequência da influência do estrógeno ou de uma inflamação (NEELY, 1983). Corroborando estas afirmações, Ricketts e Sidney (1975) afirma que no diestro os achados são mais facilmente interpretados.

Existem divergências quanto o tamanho da amostra obtida por biópsia uterina. Uma pequena amostra (1 a 2 cm) de tecido endometrial geralmente é representativa de todo o endométrio e é retirada do local usual de fixação embrionária, isto é, entre o corpo e o corno uterino (SCHUMACHER e MOLL, 2007; McCUE, 2009). Em contrapartida, o estudo realizado por Fiala et al. (2010) revelou que apenas uma biópsia não é o suficiente para verificar a quantidade de alterações degenerativas do útero, sendo necessária a coleta de dois fragmentos de porções diferentes do endométrio.

Como método de preservação da biópsia uterina pode-se utilizar solução de Bouin ou formalina 10% (BARROS & MASUDA, 2009; McCUE, 2009).

2.8.2 Classificação endometrial

Com base na avaliação histopatológica realizada por meio de biópsia, o tecido endometrial saudável é classificado na categoria I, enquanto categorias II e III correspondem à inflamação moderada e grave e fibrose, respectivamente (KENNEY, 1978).

Na categoria I, o endométrio não apresenta alterações ou apenas discreta infiltração por neutrófilos e mononucleares e fibrose periglandular focal discreta. Com poucas ou sem glândulas dilatadas (BARROS e MASUDA, 2009).

Já na categoria II o tecido endometrial apresenta alterações mais severas, sendo elas infiltrado difuso por neutrófilos, infiltrado mononuclear moderado podendo ou não apresentar formação de acúmulos linfóides e presença de algumas lacunas linfáticas. Fibrose focal moderada associada ou não com dilatação discreta ou moderada de algumas glândulas (BARROS e MASUDA, 2009).

O endométrio da categoria III é aquele com o pior prognóstico e mostra mudanças severas e irreversíveis no útero (Van CAMP, 1988), apresentando infiltrado mononuclear difuso acentuado com a formação de acúmulos linfóides, presença de numerosas lacunas linfáticas, fibrose difusa de qualquer intensidade e fibrose acentuada focal com formação de inúmeros ninhos glandulares, até piometra e atrofia senil do endométrio (BARROS e MASUDA, 2009).

2.9 Avaliação Citológica

O uso da técnica de citologia endometrial em éguas foi descrita em 1964 por Knudsen, sendo considerada um procedimento de diagnóstico extremamente fácil, prático e útil para avaliação do ambiente uterino. Através da citologia endometrial é possível obter informações clínicas importantes em curto período de tempo. Geralmente as decisões de manejo ou terapêuticas podem ser tomadas com base na avaliação citológica. A interpretação da citologia uterina deve levar em consideração o histórico da égua, resultados de palpação, exames ultrassonográficos e testes complementares como cultura e biópsia (FERRIS et al., 2015).

Em qualquer fase do ciclo estral é possível realizar a coleta de amostras para citologia uterina. Entretanto, a maioria das amostras é coletada no início do estro

quando o colo do útero está aberto, desta forma a coleta de material é mais fácil e o risco de infecção iatrogênica do útero é mínimo. A avaliação de uma amostra inicial do estro também permitirá interpretação e instituição de terapia apropriada, se necessário, antes da utilização reprodutiva desta fêmea (HINRICHS et al., 1988). Schumacher & Moll (2007) acrescentam que as amostras costumam ser obtidas quando a égua é apresentada para avaliação de um programa reprodutivo, independentemente do estágio do ciclo em que se encontre.

O exame citológico do conteúdo uterino pode revelar padrões inflamatórios crônicos e agudos. Plasmócitos, pequenos linfócitos mononucleares, macrófagos e eosinófilos podem ser observados e, quando predominam, ao invés dos polimorfos nucleares, a amostra reflete alteração crônica (LEY, 2006).

Carvalho et al. (2011) ao utilizarem 21 éguas com idade de 8-30 anos e diferentes raças com histórico de problemas reprodutivos identificaram 11 (52,4%) com inflamação intensa e em todas fêmeas foram isoladas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp.* e *Eschericia coli*, associadas ou não entre si.

As opções para a coleta de uma amostra de citologia incluem swab desprotegido passado por meio de espéculo, swab uterino protegido, escova citológica protegida, lavagem com baixo volume e por meio de biópsia uterina (FERRIS et al., 2015).

Em geral, neutrófilos não são encontrados durante o exame de esfregaços endometriais obtidos de éguas saudáveis e éguas com endometrite aguda exibem grande número de neutrófilos. Mais de um neutrófilo por dez células epiteliais, ou mais de cinco neutrófilos por campo de alta resolução (400x) são indicativos de processo inflamatório endometrial (SCHUMACHER e MOLL, 2007).

2.10 Avaliação Bacteriológica

A cultura uterina tem por finalidade ajudar a determinar se o ambiente uterino de uma égua está livre de infecção, identificar um possível patógeno e determinar o melhor antibiótico para ser usado no tratamento (McCUE, 2009).

Pelo fato de o swab endometrial ser facilmente contaminado com microorganismos da vagina, resultados de culturas sozinhas não devem ser usados para o diagnóstico de endometrite bacteriana. Resultados positivos de cultura devem ser correlacionados com evidências citológicas ou histopatológicas de inflamação antes de

formalizar o diagnóstico definitivo (SCHUMACHER e MOLL, 2007). Desta forma, Ley (2006) recomenda a utilização de um único swab endometrial para a realização da citologia e, posteriormente, a cultura e antibiograma bacteriano.

A observação de líquido livre no lúmen uterino, por meio da ultrassonografia, tende a reforçar o significado das bactérias recuperadas na cultura uterina. Esse achado também está relacionado diretamente com a resposta inflamatória positiva na citologia endometrial (LEY, 2006). Carvalho et al. (2011) observaram em sua pesquisa que das 21 éguas com histórico de problemas reprodutivos, oito (38,1%) delas apresentavam líquido no ambiente uterino e 13 (61,9%) revelaram crescimento positivo para *Escherichia coli*, *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, *Streptococcus dysgalactiae subsp. quisimilis*, *Enterococcus sp.* e *Staphylococcus aureus*.

Entretanto, existe uma vasta lista de bactérias com questionável patogenicidade, porém esses organismos podem estar associados a infecção quando são observados em grande quantidade e com evidência de doença clínica (citologia positiva, líquido intra-uterino ou história de falha reprodutiva). Nestes casos, preconiza-se auxiliar o útero na remoção de agentes infecciosos e detritos inflamatórios (LEBLANC, 2010).

Segundo McCue (2009), éguas que nunca fizeram parte de um programa reprodutivo têm baixa probabilidade de ter bactérias no lúmen uterino. Fêmeas jovens das raças Puro Sangue de Corrida e Quarto de Milha tem maior tendência a aspirar o ar e potencialmente bactérias para sua cavidade vaginal, ou seja, predispondo a contaminação do trato reprodutivo. Estas raças possivelmente têm pré-disposição a uma alteração congênita, caracterizada pelo deslocamento cranial do reto e concomitante declive horizontal da vulva (HURTGEN, 2006).

2.11 Terapias para regeneração uterina

2.11.1 Plasma Rico em Plaquetas – PRP

O plasma rico em plaquetas é uma fonte autógena, de fácil aquisição e baixo custo, que contém diversos fatores de crescimento importantes na reparação tecidual, devido à sua ação mitogênica, quimiotática e neovascular. O PRP é derivado do sangue total e deve conter entre três e cinco vezes mais plaquetas do que os níveis fisiológicos (GONSHOR, 2002).

Considerando os diferentes efeitos do PRP sobre a reparação tecidual e com a observação do aumento de fatores de crescimento sobre os diferentes tratamentos com esse material biológico, Reghini et al. (2016) realizaram um estudo sobre a utilização dessa terapia em éguas com endometrose. O objetivo foi determinar se o uso de PRP era capaz de modular a resposta inflamatória local após IA em éguas sadias e éguas com endometrite crônica degenerativa. Para compor o estudo, 21 éguas foram utilizadas, sendo que 13 dessas fêmeas apresentavam endometrose de histologia grau III e 8 éguas com classificação histológica do endométrio de grau I ou II-a de acordo com Kenney e Doig (1986). Em ambas as categorias o tratamento com PRP foi capaz de reduzir o número de neutrófilos no ambiente uterino 24 horas após a cobertura. Houve também a redução de acúmulo de fluido pós cobertura nas éguas com endometrose, indicando redução da reação inflamatória nessas éguas.

2.11.2 Querosene

Com intuito de promover uma curetagem química do endométrio Rangel et al. (1993) testaram a eficiência terapêutica da infusão de querosene em 15 éguas Puro-Sangue Inglês com 8 a 21 anos de idade e com histórico de infertilidade. Os índices de gestação atingiram 69%, sendo atribuído à infusão de querosene.

Martins e Pimentel (2006) avaliaram 12 éguas após a infusão de 50mL de querosene comercial intrauterina. Uma biópsia foi efetuada no dia 0 (antes do tratamento) e nos dias 1, 7 e 30 após o tratamento. Os autores observaram que o querosene estimula uma resposta inflamatória aguda de curta duração. Os efeitos causados por esta curetagem química não induziram à fibrose endometrial, sendo indicado como uma forma terapêutica alternativa para éguas com endometrites superficiais.

2.11.3 Dimetilsufóxido – DMSO

Um estudo realizado por Ley et al. (1989) avaliou os efeitos da infusão de Dimetilsufóxido (DMSO) em concentrações de 10 a 30% em solução fisiológica sobre as características histopatológicas do endométrio de 16 éguas com histórico de infertilidade. A terapia intrauterina com DMSO a 30% resultou em melhoria (redução do infiltrado crônico de células inflamatórias e redução da fibrose periglandular).

2.12 Meio Condicionado de Células Tronco

Podemos definir as células-tronco como aquelas que possuem a capacidade de autorenovação *in vivo*, proliferação extensiva e de diferenciação em um ou mais tipos celulares. Estas células apresentam alto potencial terapêutico, sendo capazes de regular a inflamação e promover a regeneração tecidual (PITTENGER et al., 1999; ODORICO et al., 2001; BORJESSON & PERONI 2011).

A pesquisa conduzida por CONRAD E HUSS (2005) identificou que na medula óssea há um tipo de células tronco denominada célula tronco mesenquimal (CTM) que possui alta capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo. Em determinadas condições, as CTM podem dar origem a células de diversos tecidos incluindo cartilagem, osso, músculo e gordura.

Segundo Chen & Goldhamer, (2008) as CTM secretam diferentes citocinas e quimiosinas como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A), fator de crescimento insulínico (IGF-1), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator derivado do estroma-1, angiopoietina-1, proteína inflamatória-1 alfa e beta de macrófagos e eritropoietina em quantidades maiores que os fibroblastos da pele. Além disso, a secreção desses fatores pelas CTM recruta macrófagos e células da linhagem endotelial, melhorando a cicatrização de feridas.

Atualmente, as CTM têm sido utilizadas na medicina regenerativa de equinos, no reparo de lesões localizadas nos tendões. Sabe-se que sua participação está presente no processo de crescimento, remodelação e cicatrização tecidual. Aumentando o número de células progenitoras que fisiologicamente estão presentes no tecido afetado, aumenta seu potencial de regeneração (YAMADA et al., 2011; FORTIER e TRAVIS, 2011).

Pavão (2013) administrou no útero de 10 éguas com grau elevado de fibrose endometrial 2×10^7 células tronco mesenquimais divididos em 10mL por corno uterino. Este estudo, delineado com biópsias uterinas na hora 0, 15, 30 e 60 após a aplicação da terapia, revelou diminuição de 70,98% de fibrose endometrial entre as horas 0 e 60 pós tratamento.

Mambelli et al. (2013) utilizaram infusão de células tronco em seis éguas com endometriose e compararam com tratamento placebo avaliando-as através de biópsias uterinas por histopatologia. Sete dias após a infusão, as fêmeas tratadas exibiram

melhora no nível de organização tecidual e morfologia das glândulas uterinas, confirmada com amostras coletadas nos dias 21 e 61. Nos animais controle não houve melhora significativa nos referidos parâmetros.

Lange-Consiglio et al. (2013) ao utilizarem o meio condicionado de células tronco oriundas da membrana amniótica no tratamento de lesões de ligamentos e tendões de cavalos atletas, observaram o efeito anti-inflamatório e capacidade de reorganização tecidual após a aplicação do meio condicionado nas lesões.

O meio condicionado é o meio utilizado para cultura de células, sendo descartado posterior ao crescimento e retirada das células, sendo considerado um subproduto contendo metabólitos, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular secretadas pelas células cultivadas (FRESHNEY, 2005).

Fatores estimulantes angiogênicos foram identificados no meio condicionado de CTMs equinas (BUSSCHE et al., 2014) revelando a indução da proliferação e formação de células endoteliais *in vitro*. Isto indica que o meio condicionado obtido a partir da cultura de CTMs contém todos os fatores secretados pelas CTMs que pode ser empregado como uma terapia regenerativa isenta de células (MAGUIRE, 2013; HAARER et al., 2015). O meio condicionado também foi indicado por Corradetti et al. (2014) como terapia livre de células para aplicações na medicina regenerativa, corroborando os achados de Maguire (2013).

Nesta década, a aplicação de células tronco mesenquimais tiveram importante impulso na ciência humana como animal, sendo objeto de pesquisas em várias áreas da medicina veterinária. Na reprodução equina, em função da conformação anatômica do trato genital da égua, pela constante exigência de produção anual e aumento do valor econômico gerado pela atividade, as alterações uterinas ainda se constituem entraves para concepção das éguas com idade acima de 16 anos e que possuem elevado valor genético. Visualizando este importante aspecto na criação equina, esta pesquisa foi idealizada com objetivo de avaliar o efeito do tratamento com meio condicionado de células tronco mesenquimais sobre o endométrio de éguas com fibrose uterina.

3 ARTIGO

Meio condicionado de células tronco mesenquimais como tratamento de endometrose em éguas

Fabiano Trevisan da Rocha, Mara Iolanda Batistella Rubin

Resumo

Durante a vida reprodutiva das éguas o endométrio é exposto a eventos como: cópula, parto, puerpério e infecções. Tais circunstâncias podem levar gradativamente a diminuição da capacidade funcional do endométrio com queda da fertilidade. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com o meio condicionado de células tronco mesenquimais sobre o endométrio de éguas com fibrose uterina através de avaliação histopatológica. No experimento 1, 21 éguas que não pariram pelo menos em duas temporadas foram avaliadas por meio de exames ultrassonográfico, citológico, bacteriológico e histopatológico. No experimento 2, das 21 éguas avaliadas, quatro éguas classificadas como grau II e duas éguas classificadas como grau III na histopatologia endometrial, foram submetidas a infusão uterina com o meio condicionado de células tronco mesenquimais para promover a regeneração endometrial. No experimento 1, a presença de edema uterino foi observada em 81,0% (17/21) das fêmeas líquido intrauterino em 23,81% (5/21) e cistos uterinos em 57,14% das éguas (12/21). O crescimento bacteriano identificado em 42,9% (9/21) das éguas pelo exame bacteriológico revelou predominância de *Escherichia coli* (4/21). O exame citológico revelou processo inflamatório em 44,4% das fêmeas (4/9) com crescimento bacteriano, enquanto 16,7% (2/12) das éguas sem crescimento bacteriano tinham presença de processo inflamatório ($P = 0,331$). A inflamação uterina foi detectada em 28,6% (6/21) das éguas. A biópsia uterina e avaliação histopatológica revelou 14,3% (3/21) das éguas pertencentes à classe Grau I, 47,6% Grau II (10/21) e 38,1% Grau III (8/21). Verificou-se correlação positiva significativa ($r = 0,69$; $P = 0,0005$) entre o grau de endometrose pelo Índice de Caslick e o grau atribuído após exame histopatológico. Maior percentual de éguas com índice Caslick superior a 200 foi observado ($P = 0,0242$) em éguas classificadas como Grau III (87,5%; 7/8) do que Grau I (0,0%; 0/3). Não houve diferença ($P = 0,59$) entre as éguas Grau III e as Grau II (70%; 7/10); estas últimas tenderam ($P = 0,07$) a ter maior percentual com índice Caslick acima de 200 do

que as fêmeas com Grau I. O índice Caslick médio comparado entre os graus histológicos revelou maior índice nas éguas Grau III do que nas éguas Grau I (252,0 vs 78,3; $P= 0,007$). As éguas com Grau II apresentaram índice intermediário (174,6). Não houve associação entre a presença de cistos uterinos e o grau histopatológico das biópsias ($P= 0,813$). Éguas com cistos uterinos tiveram 16,7%, 41,7% e 41,7% das biópsias classificadas no exame histológico como Graus I, II e III, respectivamente. Esses percentuais nas éguas sem cistos foram de 11,1%, 55,6% e 33,3%, para os Graus I, II e III, respectivamente. A idade média das fêmeas foi similar ($P= 0,112$) entre as fêmeas com e sem cistos uterinos (20,3 vs 16,3 anos). No experimento 2, a aplicação de 20 mL de meio condicionado de células tronco no lúmen uterino das seis éguas com endometrose grau II e III não resultou em melhoria na condição endometrial.

Palavras-chave: endometrose, éguas, fertilidade, meio condicionado, células tronco.

Abstract

During the mare reproductive life, the endometrium is exposed to events such as copulation, parturition, puerperium, and infections. Such circumstances may gradually lead to a decrease in the functional capacity of the endometrium, resulting in a drop in fertility. The objective of this study was to evaluate, by using ultrasonographic, cytological, bacteriological and histopathological exams, the effect of a treatment with mesenchymal stem cell-conditioned medium on the endometrium of 21 mares with uterine fibrosis that did not foal in at least two seasons. In experiment 1, 21 mares were evaluated by using ultrasonographic, cytological, bacteriological and histopathological exams. In experiment 2, from 21 females four mares classified by the endometrial histopathology as grade II and two mares classified as grade III were submitted to uterine infusion with mL of mesenchymal stem cell-conditioned medium to promote the endometrial regeneration. In experiment 1, the evaluation revealed the presence of uterine edema in 81.0% (17/21) intrauterine liquid was 23.81% (5/21) and uterine cysts in 57.14% mares (12/21). Bacteriological examination revealed that 42.86% (9/21) of the mares showed bacterial growth, and the microorganism with the highest incidence was *Escherichia coli* (4/21). The cytological exam showed inflammatory process in 44.4% (4/9) females with bacteria growth, while 16.7% (2/12) mares without bacteria growth showed inflammatory process ($P = 0,331$). Inflammatory process of the uterus was observed in 28.6% (6/21) of the mares. Uterine biopsy and histopathological evaluation allowed identifying 14.3% (3/21), 47.6% (10/21), and 38.1% (8/21) of mares belong to Grade I, II and III, respectively. There was a significant positive correlation ($r = 0.69$, $P = 0.0005$) between the degree of endometrosis evaluated by the Caslick Index and the grade attributed after histopathological examination. Higher percentage of mares with Caslick index over 200 was observed ($P = 0.0242$) in females classified as grade III than grade I (0.0%; 0/3). There was no difference between mares grade III and grade II (70%; 7/10); the latter tended ($P = 0.07$) to have a higher percentage with a Caslick index above 200 than the females grade I. The mean Caslick index compared between the histological grades revealed a higher index in grade III than in grade I mares (252.0 vs 78.3, $P = 0.007$). Mares grade II showed intermediate index (174.6). There was no association between the presence of uterine cysts and the histopathological grade of the biopsies ($P = 0.813$). Mares with uterine cysts had 16.7%, 41.7% and 41.7% of the biopsies classified in the histological examination as grades I, II and III, respectively. These percentages in mares without cysts were 11.1%, 55.6%

and 33.3%, respectively for Grade I, II and III respectively. The mares mean age was similar ($P=0.112$) among females with or without uterine cysts (20.3 vs 16.3 years). In experiment 2, the application of 20 mL of mesenchymal stem cell-conditioned medium in the uterine lumen of six mares with endometriosis Grade II and III did not result in improvement in the endometrial condition.

Key-words: endometriosis, mare, fertility, conditioned medium, stem cells.

INTRODUÇÃO

A competência reprodutiva de uma égua, manifestada pela produção de um potro viável por ano, é de extrema importância para o manejo dos criatórios de equinos, sendo de grande interesse para criadores e médicos veterinários (GINTHER, 1986; MÖLLER, 2007). Dentre as afecções que acometem o sistema reprodutivo da égua, as infecções uterinas, principalmente as endometrites, são consideradas como a principal causa de subfertilidade e infertilidade (PYCOCK, 1999; BRINSKO et al., 2011).

A inflamação uterina pode ser classificada como aguda, crônica, subclínica, pós-parto, bacteriana, fúngica, viral, persistente pós-cobertura e endometrose (TROEDSSON, 1997; HURTGEN, 2006; HOFFMANN et al., 2009). Em casos de endometrites crônicas ocorre influxo recorrente de neutrófilos polimorfonucleares no útero, que subsequentemente, auxilia no desenvolvimento de fibrose no endométrio (GALVÃO et al., 2012). O termo endometrose, conforme definido para o endométrio das éguas, foi descrito inicialmente por Kenney (1992) para substituir o termo endometrite crônica degenerativa (ALLEN, 2001).

Schoon et al. (1992) descreveram que a endometrose equina é uma doença associada à idade, que cursa com alteração degenerativa das glândulas uterinas e estromais ao seu entorno, estando diretamente relacionada a problemas de fertilidade. Hoffmann et al. (2003) a descrevem como uma fibrose periglandular ou do estroma do endométrio, a qual inclui alterações glandulares no foco fibrótico. Como resultado, a endometrose torna o endométrio incapaz de função adequada, crucial para a sobrevivência do embrião jovem, levando, em última análise, à perda precoce da gestação (REBORDÃO et al., 2014).

O uso de terapia com células tronco tem se tornado uma importante ferramenta no tratamento de patologias na espécie equina, especialmente para lesões tendíneas (CARMO & ALVARENGA, 2015). Na década passada, as células tronco foram utilizadas com sucesso para tratamento de artrites, lesões nos ligamentos e tendões de equinos, devido ao seu poder de regeneração (LACITIGNOLA et al. 2008).

O meio condicionado é o meio utilizado para cultura de células, o qual é descartado posteriormente ao crescimento e retirada das células, sendo considerado um subproduto contendo metabólitos, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular secretadas pelas células cultivadas (FRESHNEY, 2005). Há poucos anos

foram identificados fatores estimulantes angiogênicos e factores de crescimento tais como interleucinas, EGF (factor de crescimento epidmico) e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) no meio condicionado de células tronco mesenquimais equinas, revelando que esses fatores poderiam induzir à proliferação e formação de células endoteliais *in vitro* (FRESHNEY, 2005; BUSSCHE e VAN DE WALLE, 2014). Isto implica que o meio condicionado obtido a partir da cultura de células tronco mesenquimais contém todos os fatores secretados por essas células, podendo ser usado como uma terapia regenerativa isenta de células (MAGUIRE, 2013; HAARER et al., 2015). Corroborando estes achados, Corradetti et al. (2014) indicaram o meio condicionado como terapia livre de células para aplicações na medicina regenerativa.

No presente estudo, foi investigada a associação entre as seguintes variáveis: conformação vulvar, aspecto ultrassonográfico (presença ou não de edema uterino, líquido uterino e cistos uterinos), citologia, bacteriologia e histopatologia das 21 éguas (Experimento 1). Na sequência, foi avaliado o efeito da infusão uterina do meio condicionado de células tronco mesenquimais, em éguas com fibrose confirmada por avaliação histopatológica, com o objetivo de promover a regeneração do endométrio. A confirmação ou não da regeneração foi avaliada com base no exame histopatológico uterino, após o tratamento em seis éguas classificadas como Grau II e Grau III de degeneração uterina (Experimento 2).

1. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Histórico e exames clínicos

Durante o período de julho de 2017 a fevereiro de 2018 foram selecionadas 21 éguas (Crioula, Puro Sangue de Corrida, Quarto de Milha e Brasileiro de Hipismo) na faixa etária dos 7 aos 28 anos, média de $18,61 \pm 5,68$, com histórico de nenhum parto nas duas últimas duas temporadas reprodutivas. As éguas pertenciam a diferentes criatórios localizados na região central do RS. Nessas fêmeas, foi efetuado o exame ginecológico completo. A conformação vulvar foi avaliada de acordo com o Índice Caslick (PASCOE, 1979) e o útero e ovários por ultrassonografia. Todas as éguas foram submetidas aos exames citológico e bacteriológico, bem como à biópsia uterina.

Do total de 21 animais, 6 éguas classificadas na avaliação histopatológica como Grupo II ou III (BARROS & MASUDA, 2009) foram selecionados para infusão intrauterina com meio condicionado de células tronco mesenquimais.

2.2 Índice Caslick

Com auxílio de uma régua, um paquímetro e um transferidor foram mensurados a angulação, o comprimento total e o comprimento efetivo da vulva. O produto do comprimento efetivo vulvar multiplicado pelo ângulo fornece o Índice Caslick (PASCOE, 1979).

2.3 Exame do trato reprodutivo e avaliação ultrassonográfica

Por meio de palpação retal e avaliação ultrassonográfica transretal, o trato reprodutivo de cada égua foi avaliado. Para identificação do estágio do ciclo estral de cada égua foram avaliadas as seguintes estruturas ou características: cervix, tamanho e tônus uterino, presença ou não de edema uterino, estruturas presentes nos ovários, número, tamanho de folículos e corpos lúteos. O grau de edema uterino foi avaliado considerando as seguintes classes: 0= ausência de tônus; 1= leve; 2= moderado; 3= edema característico de cio, e 4= edema alterado/patológico. A presença ou ausência de líquido no lúmen uterino foi observada e registrada. Ainda, por meio da ultrassonografia, todo útero de cada égua foi mapeado quanto à presença, quantidade e a localização dos cistos uterinos, bem como sua quantidade foi registrada.

2.4 Avaliação citológica

A higienização da região perineal, foi efetuada para na sequência proceder a coleta de secreção uterina para exame citológico com auxílio de uma escova citológica (coletor uterino para éguas – Provar, Brasil). Este coletor possui uma proteção que permite que a escova citológica, ao ser introduzida na cervix para alcançar o útero, não entre em contato com a mucosa cervical. A escova foi posicionada na parede uterina e girada com movimento rotacional por tempo aproximado de 10 segundos. Após a coleta, foram realizados esfregaços pelo rolamento da escova em lâminas estéreis para

microscopia que foram submetidas à coloração com Panótico Rápido (Laborclin, Paraná – Brasil). As amostras foram enviadas para um laboratório de referência para avaliação. Células com displasia associada à quantidade moderada de neutrófilos foi utilizada para caracterizar um processo inflamatório.

2.5 Avaliação Bacteriológica

Com o intuito de prevenir contaminações, a mesma escova citológica utilizada para a coleta da amostra citológica foi acondicionada em meio de transporte Stuart para proceder a análise bacteriológica, conforme protocolo de identificação das espécies descrito por Murray et al. (1999) e Facklam (2002). As amostras foram encaminhadas para um laboratório de referência para isolamento e identificação bacteriana, considerando-se apenas as culturas puras de crescimento bacteriano.

2.6 Avaliação Histopatológica

A biópsia uterina foi realizada com pinça Yeoman e o fragmento uterino retirado foi armazenado em solução Bouin, pelo período de 12 horas. Posteriormente, os fragmentos da biópsia foram submetidos a vários banhos em álcool 70° e foram mantidos no mesmo produto até serem encaminhadas ao laboratório para confecção das lâminas. A classificação dos resultados das biópsias uterinas foi efetuada de acordo com Kenney (1978) e Barros & Masuda (2009).

2.7 Produção do meio condicionado de células tronco mesenquimais

A seleção das células tronco e produção do meio condicionado foi conduzida conforme técnica descrita por Mambelli et al. (2013) e Corradetti et al. (2014), a partir de coleta de tecido gorduroso da região lombar de um equino.

2.8 Seleção dos Animais para Tratamento (Experimento 2)

Com base nas informações obtidas no momento da avaliação histopatológica, de todas as 21 éguas, apenas seis (1 da raça Crioula e 5 da raça Brasileira de Hipismo)

foram selecionadas para a realização de infusão intrauterina de meio condicionado de células tronco mesenquimais, quatro com classificação Grau II e duas como Grau III de endometriose. Com auxílio de uma pipeta de inseminação artificial, 10 mL do meio condicionado foi infundido por corno uterino, conforme protocolo adaptado de Mambelli et al. (2013). Após a aplicação do meio em um corno, foram administrados 5 mL de solução estéril de NaCl a 0,9% para garantir que todo o volume do meio condicionado fosse infundido. Na sequência, o procedimento foi repetido no corno contralateral. Desta forma, um volume total de 20 mL de meio condicionado foi infundido no útero de cada égua.

Decorrido o período de 21 dias após o tratamento com meio condicionado, as seis éguas foram submetidas à biópsia uterina para avaliação histopatológica.

2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando a versão versão 9.4; 2013 do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A distribuição da frequência de fases do ciclo estral, edema uterino, líquido uterino, cistos uterinos, conformação cervical, grau histopatológico das biópsias, ocorrência de crescimento bacteriano e presença de processo inflamatório foi determinada usando o procedimento FREQ. A associação entre as variáveis avaliadas foi analisada pelo teste exato de Fisher.

A correlação de Spearman, entre o índice de Caslick e o grau histopatológico das biópsias uterinas, foi analisada pelo procedimento CORR.

A comparação do índice de Caslick entre os grupos de grau histopatológico foi efetuada com o procedimento GLIMMIX.

Os gráficos foram obtidos usando a versão 3.10 GraphPad InStat para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

3. RESULTADOS

Ao efetuar o exame ginecológico das fêmeas no experimento1, foi constatado que 33,3% animais se encontravam no anestro (7/21), 14,3% no estro (3/21) e 52,4% no

diestro (11/21). O percentual de fêmeas que se encontrava com a cervix fechada foi de 71,4% (15/21).

O edema uterino observado pela avaliação ultrassonográfica foi identificado em 81,0% (17/21) das fêmeas e a presença de líquido intrauterino em 23,8% (5/21). A presença de cistos uterinos foi observada em 57,1% das éguas (12/21).

O exame bacteriológico (Tabela 1) revelou que 42,9% (9/21) das éguas apresentaram crescimento bacteriano e o micro-organismo com maior incidência foi *Escherichia coli* (4/21). Nas fêmeas com crescimento bacteriano, o exame citológico revelou processo inflamatório em 44,4% das fêmeas (4/9), enquanto 16,7% (2/12) das éguas sem crescimento bacteriano tinham presença de processo inflamatório (P = 0,331).

Tabela 1 - Identificação da raça, idade, último parto (anos), índice Caslick, presença ou ausência de edema e líquido uterino, análise bacteriológica, citológica e histopatológica do útero de éguas com histórico de nenhum parto nas duas últimas duas temporadas reprodutivas.

Éguas	Raça	Idade	Último parto (anos)	Caslick	Edema uterino	Líquido uterino	Bacteriológico	Citológico	Histopatológico
1	Crioula	26	2	405	Presente	Ausente	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Processo Inflamatório	GIII
2	Crioula	19	1	210	Presente	Ausente	Negativo	Processo Inflamatório	GII
3	Crioula	20	6	230	Presente	Presente	Negativo	Processo Inflamatório	GIII
4	Quarto de Milha	21	2	245	Presente	Ausente	Negativo	Sem Alteração	GII
5	Quarto de Milha	16	3	45	Ausente	Ausente	Negativo	Sem Alteração	GIII
6	Crioula	25	5	270	Ausente	Ausente	Negativo	Sem Alteração	GIII
7	Crioula	28	3	280	Ausente	Presente	Negativo	Sem Alteração	GIII
8	Crioula	24	2	45	Presente	Ausente	<i>Escherichia coli</i>	Processo Inflamatório	GI
9	Crioula	21	1	210	Presente	Ausente	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Processo Inflamatório	GII
10	Crioula	24	1	240	Presente	Ausente	Negativo	Sem Alteração	GII
11	Crioula	24	1	245	Presente	Ausente	Negativo	Sem Alteração	GIII
12	BH	19	1	245	Presente	Ausente	Negativo	Sem Alteração	GIII
13	BH	16	1	108	Presente	Ausente	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Sem Alteração	GII
14	BH	20	2	160	Presente	Ausente	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Sem Alteração	GI
15	BH	15	2	204	Presente	Ausente	Negativo	Sem Alteração	GII
16	BH	15	3	204	Ausente	Presente	Negativo	Sem Alteração	GII
17	BH	16	5	296	Presente	Ausente	Negativo	Sem Alteração	GIII
18	Crioula	7	4	45	Presente	Ausente	<i>Escherichia coli</i>	Processo Inflamatório	GII
19	Crioula	7	4	30	Presente	Presente	<i>Escherichia coli</i>	Sem Alteração	GI
20	Crioula	13	1	60	Presente	Presente	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Sem Alteração	GII
21	PSI	15	1	220	Presente	Ausente	<i>Escherichia coli</i>	Sem Alteração	GII

A inflamação uterina foi detectada em 28,6% (6/21) das éguas. O processo inflamatório pode ser visualizado nas Figuras 1 e 2.

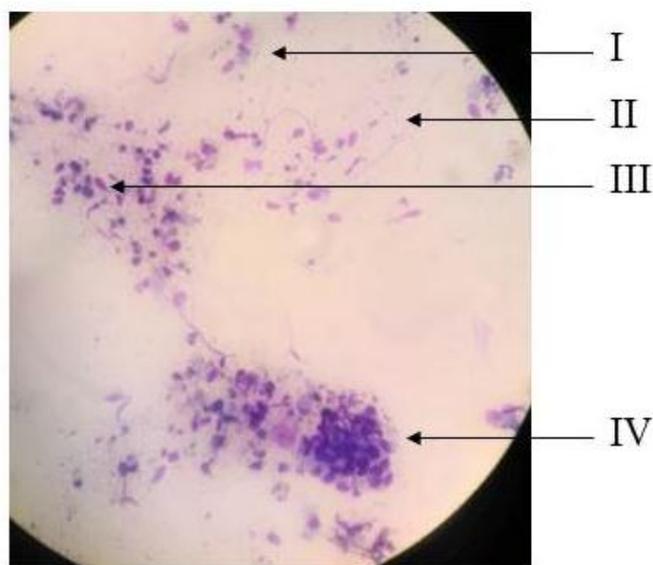


Figura 1 – Citologia compatível com processo inflamatório. Podem ser observados alguns fibroblastos (I), bactérias cocos (+) (II), presença de neutrófilos degenerados (III) e células epiteliais displásicas (IV).

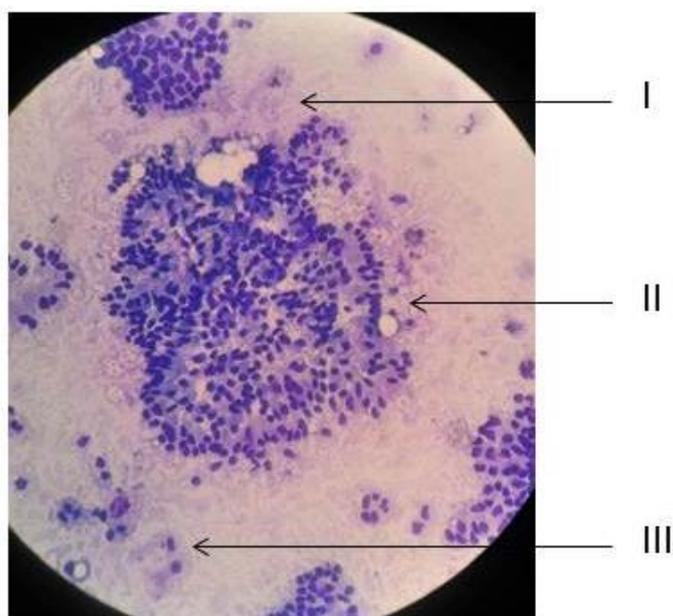


Figura 2 – Aspecto citológico fisiológico de região uterina de égua. Observa-se pequena quantidade de bactérias cocos. A alta celularidade é composta por células epiteliais basais uniformes (II), dispostas em monocamada. Estas células apresentam citoplasma indistinto e basofílico, o núcleo é redondo com cromatina densa e nucléolos inconspícuos. Pode ser visualizada a presença de pequena quantidade fibroblastos individualizados (III).

A biópsia uterina seguida de avaliação histopatológica (Tabela 1) possibilitou identificar 14,3% (3/21) das éguas pertencentes à classe Grau I, 47,6% Grau II (10/21) e 38,1% Grau III (8/21). Verificou-se correlação positiva significativa ($r = 0,69$; $P = 0,0005$) entre o grau de endometrose avaliado pelo Índice de Caslick e o grau atribuído após exame histopatológico. Um maior percentual de éguas com índice Caslick superior a 200 foi observado ($P = 0,0242$) nas éguas classificadas como Grau III (87,5%; 7/8) do que as classificadas como Grau I (0,0%; 0/3; Figura 3). Não houve diferença ($P = 0,59$) entre as éguas Grau III e as Grau II (70%; 7/10); estas últimas tenderam ($P = 0,07$) a ter maior percentual com índice Caslick acima de 200 do que as fêmeas com Grau I. Quando o índice Caslick médio foi comparado entre os graus histológicos, observou-se maior índice nas éguas Grau III do que nas éguas Grau I (252,0 vs 78,3; $P = 0,007$), enquanto éguas com Grau II apresentaram índice intermediário (174,6).

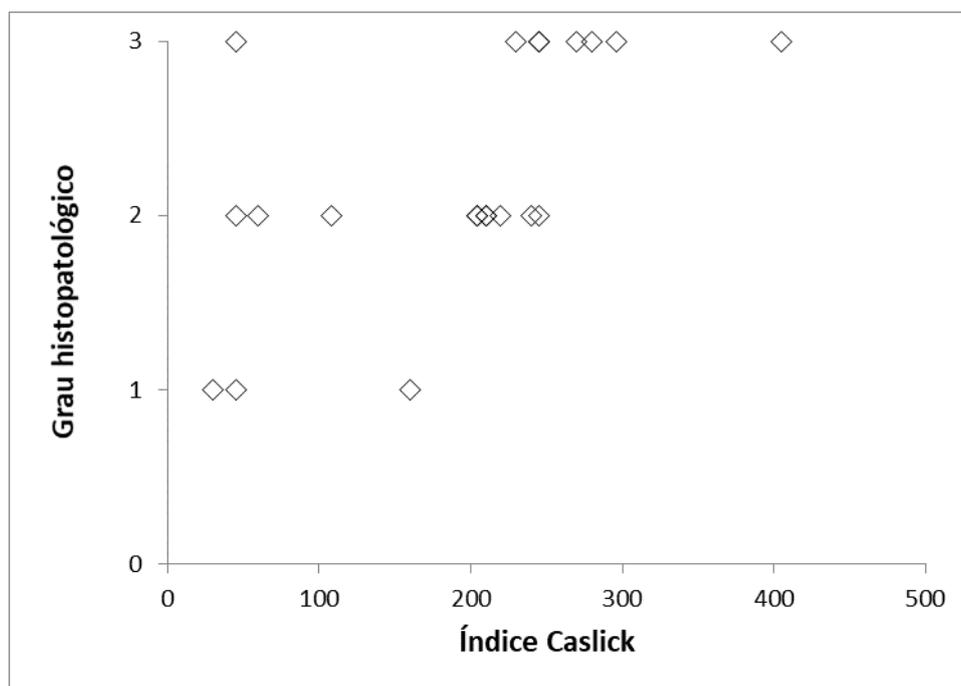


Figura 3 – Associação entre o índice de Caslick e o grau de endometrose avaliado por exame histopatológico de biópsia uterina. Alguns pontos estão superpostos, pois algumas fêmeas de mesmo grau histopatológico possuem o mesmo valor de índice de Caslick.

A necessidade de vulvoplastia, avaliada pelo índice de Caslick >200 foi observada em 66,7% (14/21). Das 14 éguas com indicação de vulvoplastia, 100% tiveram idade igual ou superior a 15 anos (Figura 4). Esse percentual foi

significativamente superior ($P= 0,0263$) ao das fêmeas sem indicação para vulvoplastia (57,1%; 4/7). A idade média das fêmeas com recomendação para vulvoplastia foi significativamente superior ($P= 0,0218$) à idade das fêmeas sem recomendação cirúrgica (20,6 vs 14,7 anos).

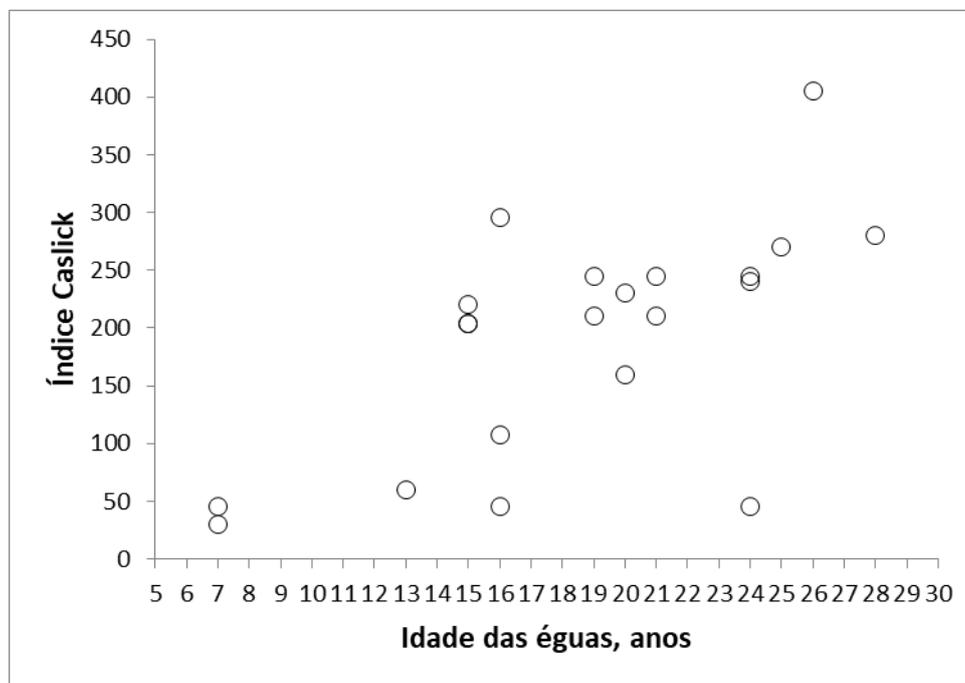


Figura 4 – Associação entre a idade das éguas e o índice Caslick. Nesta figura são visualizados apenas 20 pontos, uma vez que duas fêmeas da mesma idade também tiveram o mesmo valor de índice de Caslick.

Não houve associação entre a presença de cistos uterinos e o grau histopatológico das biópsias ($P= 0,813$). Éguas com presença de cistos uterinos no exame ultrassonográfico tiveram 16,7%, 41,7% e 41,7% das biópsias classificadas como Graus I, II e III, respectivamente, no exame histológico. Nas éguas sem cistos, esses percentuais foram de 11,1%, 55,6% e 33,3%, para os Graus I, II e III, respectivamente. A idade média das fêmeas foi semelhante ($P= 0,112$) entre as fêmeas com e sem cistos uterinos (20,3 vs 16,3 anos). O resultado da avaliação histopatológica (Experimento 2) das seis éguas submetidas ao tratamento com o meio condicionado de células tronco mesenquimais foi similar antes e após o tratamento (Figura 6 e Tabela 2).

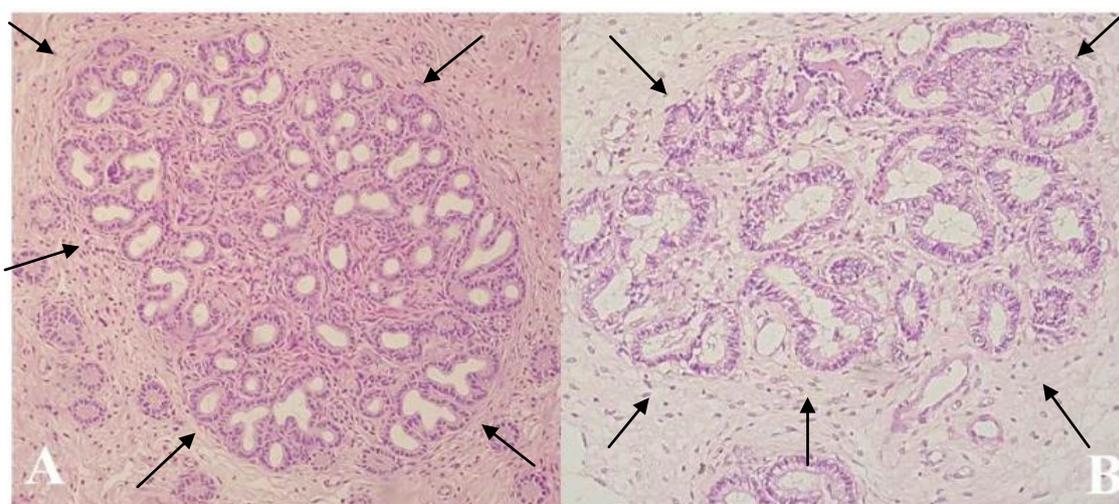


Figura 5 – Biópsia endometrial equina Grau III. A – Ninhos com dilatação glandular e fibrose. B – Ninho com dilatação glandular e fibrose após tratamento com meio condicionado de células tronco.

Dessas seis éguas, cinco não foram cobertas. As fêmeas provinham de um órgão estatal que, na temporada de monta de execução do estudo, não dispunha de recursos para o programa de cobertura ou inseminação artificial. A outra égua tratada foi descartada por opção do proprietário. Assim, nenhuma tentativa de procedimento reprodutivo foi conduzida nessas seis fêmeas que haviam sido tratadas com meio condicionado de células tronco mesenquimais.

Tabela 2 - Classificação histopatológica pré e pós-tratamento com meio condicionado de células tronco mesenquimais de 6 éguas categorizadas como Grau II e III.

Égua	Histopatológico Pré-Tratamento		Histopatológico Pós-Tratamento	
	Grau	Descrição	Grau	Descrição
10	II	Ninhos com dilatação glandular Fibrose extensa	II	Ninhos com dilatação glandular Fibrose extensa
13	II	Início de formação de ninhos Poucas áreas de fibrose	II	Formação de ninhos Áreas de fibrose
15	II	Fibrose com dilatação glandular Formação de ninhos glandulares	II	Fibrose com dilatação glandular Ninhos glandulares
16	II	Fibrose focal com formação de ninhos Dilatação glandular	II	Formação de ninhos com fibrose Dilatação glandular
12	III	Ninhos glandulares Dilatação glandular e fibrose Nódulos linfóides	III	Ninhos glandulares Dilatação glandular Nódulos linfóides
17	III	Discreto foco de fibrose Formação de ninhos Endométrio atrófico Pequena população glandular	III	Atrofia do endométrio Poucas glândulas Ninhos glandulares Fibrose discreta

DISCUSSÃO

Durante a vida reprodutiva, o endométrio é submetido a eventos que podem, sob determinadas circunstâncias, ser considerados agressões, tais como a cópula, o parto, o puerpério e as infecções genitais, os quais gradativamente diminuem a capacidade funcional do endométrio, tendo como consequência a infertilidade (SILVA et al., 1987).

No experimento 1, as fêmeas com recomendação de vulvoplastia tiveram idade igual ou superior a 15 anos. Sabe-se que as alterações da conformação vulvar podem estar relacionadas com idade da égua, com a condição corporal, com o número de partos sucessivos. Éguas mais velhas geralmente têm menor tônus muscular no abdômen e maior relaxamento dos ligamentos sacroisquiáticos (DASCANIO, 2011).

Das éguas com bacteriológico positivo, 44,4% (4/9) apresentaram o crescimento de *Escheria coli*, corroborando os achados descritos por Carvalho et al. (2011). De acordo com McCue (2009), as infecções por *Streptococcus zooepidemicus* são responsáveis por cerca de 40-50% dos casos de endometrite bacteriana, seguido por *Escheria coli* em 20% dos casos. Entretanto, nenhuma cepa de *Streptococcus* foi isolada.

Uma das formas de avaliar a presença de bactérias no útero da égua é pela cultura uterina (GINTHER, 1986; McCUE, 2009). Schumacher & Moll (2007) reforçam que ao realizar este exame o swab pode ser facilmente contaminado, desta forma os resultados positivos de cultura bacteriana devem ser correlacionados com a avaliação citológica. No presente estudo, a ausência de associação entre o crescimento bacteriano e a presença de processo inflamatório reforçam a necessidade do cuidado na interpretação do resultado do exame bacteriológico.

Dentre as éguas diagnosticadas por exame citológico com processo inflamatório (6/21), duas delas (33,3%; 2/6) tiveram resultado negativo no exame bacteriológico. Estes achados são condizentes com LeBlanc (2010) que descreve que nem todos os patógenos uterinos resultam os sinais clássicos de inflamação uterina. Desta forma, muitas vezes é necessário realizar a cultura bacteriana a partir de um fragmento da biópsia endometrial, ou a avaliação por meio de um lavado de baixo volume uterino que seria mais sensível à identificação de patógenos.

Outra hipótese para éguas com bacteriológico negativo e presença de processo inflamatório no exame citológico seria a presença de fungos. As infecções fúngicas são comumente diagnosticadas em éguas com idade avançada e histórico de problemas

reprodutivos crônicos (McCUE, 2009). Esta hipótese poderia justificar o processo inflamatório observado nas duas éguas da nossa pesquisa, que possuíam 19 e 20 anos. Todavia, a presença de fungos não foi avaliada no estudo.

Um achado importante foi a presença de cistos endometriais em mais da metade (57,14%; 12/21) das éguas avaliadas. A pesquisa desenvolvida por Eilts et al. (1995) detectou que animais com idade igual ou superior a 11 anos possuem maior predisposição a desenvolverem cistos do que aqueles mais jovens. No presente estudo, 90,5% das éguas tinham idade superior a 11 anos, o que pode explicar o percentual relativamente elevado de fêmeas com cistos uterinos, mesmo que a idade média tenha sido semelhante entre fêmeas com e sem cistos.

A pneumovagina é uma das causas mais comuns das infecções uterinas podendo levar a quadros de inflamação crônica da vagina e do útero na égua, provocada por fechamento insuficiente da vulva e vestibulo, associada à deficiência de conformação perineal (CASLICK, 1937, BRINSKO et al., 2011). As lesões histopatológicas observadas foram dilatação das glândulas uterinas, formação de ninhos glandulares e fibrose endometrial. As éguas que apresentaram maior grau de degeneração uterina (Grau III) foram as mesmas que possuíam maior valor no índice de Caslick. Fêmeas mais velhas também tiveram maior índice de Caslick. O conjunto dessas observações corrobora a citação de que a idade, inflamação endometrial repetida, reprodução, múltiplas gestações e partos foram considerados ao longo das últimas décadas potenciais fatores etiológicos das alterações degenerativas do endométrio (HOFFMANN et al., 2009).

Na medicina veterinária equina, o uso de células tronco mesenquimas (CTMs) tem sido amplamente utilizado como forma de tratamento regenerativo. Tais tipos celulares estão envolvidos no processo de crescimento, remodelação e cicatrização tecidual, aumentando o número de células progenitoras que estão presentes no tecido afetado. Consequentemente, há um aumento no potencial de regeneração tecidual (FORTIER e TRAVIS, 2011; YAMADA et al., 2011). O fato de não ter sido verificada regeneração endometrial, nas 6 éguas tratadas, nos leva a hipótese de que por um lado o volume de meio infundido pode não ter sido suficiente, ou em concentração de fatores de crescimento e de fatores angiogênicos, os quais não foram quantificados no presente estudo. No entanto, na pesquisa realizada por Mambelli et al. (2013) com infusão de células tronco e no trabalho realizado por Reghini (2016) com a infusão de plasma rico

em plaquetas intrauterino, o volume de 20mL foi suficiente para promover tanto regeneração tecidual do endométrio, quanto para diminuir a reação inflamatória uterina.

Mambelli et al. (2013) infundiram CTMs em seis éguas com endometrose e compararam com tratamento-placebo. Quando avaliadas as biópsias uterinas ficou evidente que houve melhoria significativa das lesões. A evolução foi observada na morfologia das glândulas uterinas sete dias após a infusão, sendo confirmada com amostras coletadas nos dias 21 e 61. Nos animais tratados com placebo, não houve recuperação. Diferentemente do nosso estudo, Mambelli et al (2013) fizeram uso de células tronco mesenquimais que podem se diferenciar no local onde são depositadas e promovem a regeneração dos tecidos adjacentes. Os meios condicionados foram testados em ligamentos e tendões de equinos atletas, promovendo a reorganização tecidual e a neovascularização (LACITIGNOLA et al., 2008; LANGE-CONSIGLIO et al., 2013).

Os meios condicionados já foram testados em ligamentos e tendões de equinos atletas, promovendo a reorganização tecidual e a neovascularização (LACITIGNOLA et al., 2008; LANGE-CONSIGLIO et al., 2013). Recentemente, foram identificados fatores estimulantes angiogênicos no meio condicionado de CTMs equinas demonstrando que esses fatores poderiam induzir a proliferação e formação de células endoteliais *in vitro* (BUSSCHE e VAN DE WALLE, 2014). Desta forma, o meio condicionado obtido a partir da cultura de CTMs contém todos os fatores secretados pelas CTMs, podendo ser usado como terapia regenerativa isenta de células (MAGUIRE, 2013; HAARER et al., 2015). Corradetti et al. (2014) descreveram o potencial *in vitro* da utilização do meio condicionado de CTMs para a proliferação e regeneração celular endometrial. A determinação dos fatores de crescimento e angiogênicos e o volume de meio a ser infundido poderão servir de embasamento para estudos futuros.

4. CONCLUSÃO

Houve relação entre o aumento do valor do Índice de Caslick, que sugere a necessidade de vulvoplastia e a presença de lesões endometriais. O tratamento com 10 mL de meio condicionado de células tronco mesenquimais por corno uterino em uma

única aplicação, em éguas com endometriose, não induziu regeneração endometrial e, como consequência, não teve efeito sobre a fibrose endometrial.

5. REFERÊNCIAS

ALLEN, W.R. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 3- 4, p. 121-131, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00312.x>

BARROS, S.S.; MASUDA, E.K. **Biopsia endometrial na égua**. Diagnóstico e prognóstico. 1. ed., Santa Maria, [s.n.], 2009.

BRINSKO, S.P. et al. Endometritis. In: **Manual of Equine Reproduction**, 3 ed. Estados Unidos: Mosby Elsevier, cap. 6, p. 73-84, 2011.

BUSSCHE, L; VAN DE WALLE, G.R. Peripheral Blood- Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Angiogenesis via Paracrine Stimulation of Vascular Endothelial Growth Factor Secretion in the Equine Model. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 3, n. 12, p. 1514-1525, 2014.

CARMO, M.T.; ALVARENGA, M.A. Uso de Células Tronco e PRP na Reprodução em Éguas Subférteis. In: **Simpósio Nacional de Equinos**, 1., 2015, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre, RS: Universidade do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, 2015.

CARVALHO, C.F.P.M et al. Diagnóstico bacteriológico, citológico e histopatológico da endometrite equina. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 19-22, 2011. <http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rbcv.2014.114>

CASLICK, E. A. The vulva and the vulvo-vaginal orifice, and its relation to genital health of the thoroughbred mare. **The Cornell Veterinarian**, v. 27, p. 178- 187, 1937.

CORRADETTI, B. et al. Amniotic membrane-derived mesenchymal cells and their conditioned media: potential candidates for uterine regenerative therapy in the horse. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111324, 2014.

DASCANIO. J.J. External Reproductive Anatomy in **Equine Reproduction**, 2nd edition, Wiley-Blackwell, p. 1577-1581, 2011.

EILTS, B. E. et al. Prevalence of endometrial cysts and their effect on fertility. **Biology of Reproduction Science**, v. 1, p. 527, 1995.

FACKLAM, R. What happened to Streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, n. 4, p. 613-630, 2002.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 5 Ed. Wiley Liss; New York. p. 256, 2005

FORTIER, L.A.; TRAVIS, A.J. Stem cells in veterinary medicine. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 2, n.1 p. 9-15, 2011.

GALVÃO AM. et al. Cytokines and neutrophil extracellular traps in the equine endometrium: friends or foes?. **Pferdeheilkunde**, v. 28, n. 1 p. 4-7, 2012.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare. Basic and Applied Aspects**. Equiservices, Cross Plains, Wisconsin. p. 413, 1979. GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare**. Cross Plains. WI: Equiservices. 1986. 378p.

HAARER, J. et al. Caveats of mesenchymal stem cell therapy in solid organ transplantation. **Transplant International**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2015. Acessado em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25082213>

HOFFMANN, C. et al. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. **Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 2-4, p. 261-278, 2009.

HOFFMANN, C. et al. Morpho-functional studies regarding the pathogenesis of the equine endometrosis with special emphasis on uterine secretions preliminary results. **Pferdeheilkunde**, v.19, p. 666-669, 2003.

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

KENNEY, R.M. 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**, v. 172, n. 3, p. 241-262, 1978.

LACITIGNOLA, L. et al. Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. 1, p. 33-38, 2008.

LANGE-CONSIGLIO, A. et al. Conditioned Medium from Horse Amniotic Membrane-Derived Multipotent Progenitor Cells: Immunomodulatory Activity In Vitro and First Clinical Application in Tendon and Ligament Injuries In Vivo. **Stem Cells and Development**. v.22, p. 3015-3024, 2013.

LEBLANC, M.M. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating- Induced Endometritis in the Mare. **Reproduction in**

Domestic Animals, v. 45, p. 21-27, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01634>

MAGUIRE, G. Stem cell therapy without the cells. **Communicative & Integrative Biology**, v. 6, n. 6, p. e26631, 2013.

MAMBELLI, L.I. et al. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 744-750, 2013. Acessado em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23270861>

McCUE, P.M. The problem mare: management philosophy, diagnostic procedures, and therapeutic options. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, p. 619-626, 2009.

MÖLLER, G. **Desempenho reprodutivo da égua crioula**. 47f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Medicina Animal: Equinos, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, 2007. Acessado em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/96906/000919764>

MURRAY. P. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington DC.: American Society for Microbiology, p. 1773, 1999.

PASCOE, R.R. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.27 (Supl.), p. 299-305, 1979.

PYCOCK, J.F. Management of the problem-breeding mare. **The Society for Theriogenology**, p. 79-89, 1999.

REBORDÃO, M.R. et al. Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. s4, p. 82-87, 2014.

REGHINI M.F. et al. **Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma**. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p.516-522, 2016. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.01.029. Epub 2016 Feb 18. Acessado: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27020400>

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. **Pferdeheilkunde**, v. 8, n. 6, p. 355-362, 1992.

SCHUMACHER. J.; MOLL. H.D. **Manual de Procedimentos Diagnósticos em Equinos**. 1ed. São Paulo –SP: Roca, p. 185, 2007.

SILVA, C.A.M. et al. A biopsia endometrial na avaliação da fertilidade da égua. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, p. 131-133, 1987.

TROEDSSON, M.H.T. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. **Pferdeheilkunde**, v. 13, v.5, p. 516-520, 1997.

YAMADA, A.L.M. et al. Bone marrow mononuclear cells in the treatment of complete tear of flexor tendons and suspensory ligament in the horse. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, 2011. Acessado em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000600041

4. COMITÊ DE ÉTICA

Esta pesquisa encontra-se registrada no Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria, sob o número de registro 5292210218.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os dados apresentados nesta dissertação é possível concluir que houve relação entre o aumento do valor do índice de Caslick com a presença de lesões endometriais.

Outrossim, observou-se que na população analisada, éguas acima de 16 anos apresentaram maior predisposição de pneumovagina.

O tratamento com meio condicionado de CTMs, no volume de 10 mL por corno uterino em uma única aplicação, em éguas com endometrose não induziu regeneração endometrial, conseqüentemente, não reduziu a fibrose endometrial.

Como perspectiva do presente trabalho, sugere-se avaliar o efeito de maior concentração de células tronco mesenquimais para produção do meio a ser infundido no lúmen uterino de éguas, bem como se volume superior a 10 mL poderia resultar em melhoria da condição endometrial.

REFERÊNCIAS

ALLEN, W.R. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 3-4, p. 121-131, 2001.

ALLEN, W.R. et al. Fetal membrane differentiation, implantation and early placentation. **Equine Reproduction**. Oxford, England: Wiley-Blackwell, p. 2187-2199, 2011.

ARRUDA, R.P., et al. Tratamento das endometrites em éguas. **Anais do I SINEQ**, Curitiba-PR, p. 03-13, 2003.

ATAMAS, S.P. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. **Life Science**, [S.I], v. 72, p. 631-643, 2002.

BACK, D.G. et al. Observations on the sexual behavior of non-lactating mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 165, n. 8, p. 717-720, 1974.

BALL B.A. Embryonic Death in mares. In McKinnon A.O., Voss J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, EUA: Lea & Febiger, p. 532-536, 1993

BARROS, S.S.; MASUDA, E.K. **Biopsia endometrial na égua**. Diagnóstico e prognóstico. 1. ed., Santa Maria, [s.n.], 2009.

BARTOL, F.F. et al. Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 54, p. 287-302, 1999.

BETTERIDGE, K.J. Embryo morphology, growth and development. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. **Equine Reproduction**. 2.ed. Oxford, UK: Blackwell, p. 2167-2186, 2011.

BETTERIDGE, K.J. et al. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **Journal of Anatomy**, v. 135, n. 1, p. 191, 1982.

BORJESSON, D.L.; PERONI, J.F. The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, n. 1, p. 109-123, 2011.

BRINSKO, S.P., et al. Endometritis. **In: Manual of Equine Reproduction**, 3 ed. Estados Unidos: Mosby Elsevier, cap. 6, p. 73-84, 2011.

BRUNCKHORST, D. et al. Morphologische, enzym-und immunhistochemische Charakteristika des endometrialen Zyklus bei der Stute. **Fertilität**, v. 7, p. 44-51, 1991.

BUSSCHE, L; VAN DE WALLE, G.R. Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Angiogenesis via Paracrine Stimulation of Vascular Endothelial Growth Factor Secretion in the Equine Model. **Stem Cells Translational Medicine**, v.

3, n. 12, p. 1514-1525, 2014.
<https://stemcells.journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.5966/sctm.2014-0138>

CARD, C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 580-588, 2005.

CARMO, M.T.; ALVARENGA, M.A. Uso de Células Tronco e PRP na Reprodução em Éguas Subférteis. In: **Simpósio Nacional de Equinos**, 1., 2015, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre, RS: Universidade do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, 2015.

CARVALHO, C.F.P.M et al. Diagnóstico bacteriológico, citológico e histopatológico da endometrite equina. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 1, 2011.

CASLICK, E.A. The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the thoroughbred mare. **The Cornell Veterinarian**, v. 27, p. 178- 187, 1937.

CHAMBERS, R.C. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention? **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 367–378, 2008.

CHEN, J.C.J.; GOLDHAMER, D. J. Skeletal muscle stem cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 101, 2003.

CONRAD C., HUSS R. Adult Stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. **Journal of Surgical Research**, v.124, p. 201-208, 2005.

CORRADETTI, B. et al. Amniotic membrane-derived mesenchymal cells and their conditioned media: potential candidates for uterine regenerative therapy in the horse. **PLoS one**, v. 9, n. 10, p. e111324, 2014.

CUERVO-ARANGO, J.; NEWCOMBE, J.R. Effect of changes in endometrial edema score following mating on pregnancy rate in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. S115-117, 2010.

DITTMER, J.; LEYH, B. Paracrine effects of stem cells in wound healing and cancer progression. **International Journal of Oncology**, v. 44, n. 6, p. 1789-1798, 2014.

EIGENHEER-MOREIRA, J.F. et al. Estudo comparativo de éguas repetidoras ou não de cio através da avaliação histológica do endométrio e das concentrações plasmáticas de progesterona. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 12, p. 506-512, 2014.

FERRIS, R.A.; BOHN, A.; McCUE, P.M. Equine endometrial cytology: collection techniques and interpretation. **Equine Veterinary Education**, v. 27, n. 6, p. 316-322, 2015.

FIALA, S.M. et al. Endometrial fibrotic changes. Is one biopsy enough to diagnose degenerative changes? **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. S89-S90, 2010.

FILHO, F.O. Palavra do Presidente. In: LIMA, R.A.S; CINTRA, A.G. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Caval**. Brasília: MAPA, p. 7, 2016.

FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 5 Ed. Wiley Liss; New York. p. 256, 2005

FORTIER, L.A.; TRAVIS, A.J. Stem cells in veterinary medicine. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 2, p. 9, 2011.

GASTAL, M.O.; et al. Effect of PGE₂ on Uterine Contractility and Tone in Mares. **Theriogenology**, v.50, p. 989-999, 1998.

GINTHER, O.J. **Reproductive Biology of the Mare. Basic and Applied Aspects**. Equiservices, Cross Plains, Wisconsin. 1979. 413p.

GINTHER, O.J. **Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare**. Cross Plains. WI: Equiservices. 1986. 378p.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2^a Ed. Equiservices: Madison, Wisconsin, 1992. 642p.

GONSHOR, A. Technique for producing platelet-rich plasma e platelet concentrate: Background and process. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 22, n. 6, p. 547-557, 2002

HAARER, J. et al. Caveats of mesenchymal stem cell therapy in solid organ transplantation. **Transplant International**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2015.

HAFEZ, E.S.E. **The Behaviour of Domestic Animals**. London: Bailliere Tindall. p. 532, 1975.

HANADA, M.; MAEDA, Y.; OIKAWA, M. Histopathological characteristics of endometriosis in thoroughbred mares in Japan: results from 50 necropsy cases. **Journal of Equine Science**, v. 25, n. 2, p. 45-52, 2014.

HEMBERG, E.; LUNDEHEIM, N.; EINARSSON, S. Retrospective on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in Thoroughbred mares. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, p. 474-477, 2005.

HINRICHS, K. et al. Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 1, p. 72-75, 1988.

HOFFMANN, C. et al. Morpho-functional studies regarding the pathogenesis of the equine endometriosis with special emphasis on uterine secretions preliminary results. **Pferdeheilkunde**, v.19, p. 666-669, 2003.

HOFFMANN, C. et al. The equine endometriosis: new insights into the pathogenesis. **Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 2-4, p. 261-278, 2009.

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

KENNEY, R.M. 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**, v. 172, n. 3, p. 241-262, 1978.

KENNEY, R.M.; DOIG P.A. **Equine endometrial biopsy**. In: MORROW, David (Ed.). *Current Therapy in Theriogenology*. Philadelphia: Saunders. p. 723–729. 1986.

KENNEY, R.M. The aetiology, diagnosis, and classification of chronic degenerative endometritis. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 125, p. 186, 1992.

KNUDSEN, O. Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. **The Cornell Veterinarian**, v. 54, p. 415, 1964.

LACITIGNOLA, L. et al. Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report. **Veterinary Research Communications**, v. 32, n. 1, p. 33-38, 2008.

LANGE-CONSIGLIO, A. et al. Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: in vitro proliferative and multilineage potential assessment. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 6, 2013

LEBLANC, M.M. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. s2, p. 21-27, 2010.

LEBLANC, M.M. et al. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 49-54, 1998.

LEY, W.B. **Reprodução em Éguas**. 1ed. São Paulo- SP: Roca, p. 220, 2006.

LEY, W.B. et al. Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare: effects upon endometrial histological features and biopsy classification. **Theriogenology**, v. 32, n. 2, p. 263-276, 1989.

LUDWIG, S. et al. Functional pathology of the uterine blood flow in the mare-pathohistologic and Doppler sonographic investigations. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 511-513, 2002.

MAGUIRE, G. Stem cell therapy without the cells. **Communicative & Integrative Biology**, v. 6, n. 6, p. e26631, 2013.

MAMBELLI, L.I. et al. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 744-750, 2013.

MASSENO, A.P.B. **Avaliação da fibrose endometrial e dos miofibroblastos nas endometroses ativa e inativa da égua.** 2012. 93f. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista.

McCUE, P.M. The problem mare: management philosophy, diagnostic procedures, and therapeutic options. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, p. 619-626, 2009.

McKINNON, A.O. Reproductive ultrasonography. In. **Equine Stud Medicine Proceedings**, p. 375-430, 1996.

MÖLLER, G. **Desempenho reprodutivo da égua crioula.**47f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Medicina Animal: Equinos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

MURRAY. P. et al. **Manual of Clinical Microbiology.** 7.ed. Washington DC.: American Society for Microbiology, 1999.

NEELY, D.P. Evaluation and Therapy of Genital Disease in The Mare. In: NEELY, D.P.; LIU, I.K.M.; HILLMAN, R.B. **Equine Reproduction**, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, New Jersey,1983. p.40-56.

NEELY, D. P. Evaluation and Therapy of Genital Disease in the Mare. In: NEELY, n. 5411, p. 143-147. 1999.

ODORICO, J.S.; KAUFMAN, D.S.; THOMSON, J.A. Multiline age differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, v. 19, p. 193–204, 2001.

PALMER, E.; DRIANCOURT, M.A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. **Theriogenology**, v. 13, n. 3, p. 203-216, 1980. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X80900825>

PASCOE, R. R. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27 (Supl.), p. 299-305, 1979.

PAVÃO, G.D. Utilização de células tronco mesenquimais autólogas para tratamento de éguas com endometrite crônica degenerativa. 99f. Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, 2013.

PITTENGER, M.F. et al. Management of the problem-breeding mare. **The Society for Theriogenology**, p. 79-89, 1999.

PYCOCK, J.F. Management of the problem-breeding mare. **The Society for Theriogenology**, p. 79-89, 1999.

PYCOCK, J.F. Vulval conformation, common vulval injuries and the Caslick's procedure. **Equine Reproductive Services**, Messenger Farm, Ryton, Yorkshire, 2003.

PYCOCK, J.F. Therapy for mares with uterine fluid. In: SAMPER, J. C.; PYCOCK J. F.; McKINNON, A. O. Current Therapy in Equine Reproduction. Estados Unidos: Elsevier, cap. 14, p. 93- 101, 2007.

RANGEL, J.F. et al. Infusão intra-uterina de querosene em éguas com histórico de infertilidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10, 1993, Belo Horizonte. MG. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1993. v.2, p.303.

REBORDÃO, M.R. et al. Physiopathologic mechanisms involved in mare Endometrosis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. s4, p. 82-87, 2014.

REGHINI, M.F.S. **Effect of treatment with platelet rich plasma on resistant and susceptible post-breeding endometritis mares.** Botucatu, 2013. 104 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

REGHINI M.F. et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p.516-522, 2016. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.01.029. Epub 2016 Feb 18. Acessado: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27020400>

RICKETTS, S.W.; SIDNEY S. The Technique and Clinical Application of Endometrial Biopsy 306 in the Mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 7, p. 102–108, 1975.

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

ROSSDALE, P.D.; OUSEY, J.C. Fetal programming for athletic performance in the horse: potential effects of IUGR. **Equine Veterinary Education**, v. 15, n. S6, p. 24-37, 2003.

ROSSDALE, P.D. et al. The maladjusted foal: influences of intrauterine growth retardation and birth trauma. In: **Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Denver, Colorado, USA, 4-8 December, 2004.** American Association of Equine Practitioners (AAEP), p. 75-126, 2004.

SANTOS, F.C.C.; NOGUEIRA, C.E.W. Características individuais e maternas do cavalo crioulo em relação ao seu desempenho na prova do freio de ouro. In: **II Atualização em Reprodução Equina.** Pelotas, p. 12-15, 2012.

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. **Pferdeheilkunde**, v. 8, n. 6, p. 355-362, 1992.

SCHUMACHER, J.; MOLL, H.D. **Manual de Procedimentos Diagnósticos em Equinos.** 1ed. São Paulo –SP: Roca, p. 185, 2007.

SPENCER, T.E.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 82- 83, p. 537-550, 2004.

SILVA, C.A.M. Uma nova técnica para a correção cirúrgica da pneumovagina na égua. **Revista Turf Fomento**. v. 23, p. 247-248, 1983.

SILVA, C.A.M.; BARROS, S.S.; ESQUERE, R.S.; SILVA, J.H.S. A biopsia endometrial na avaliação da fertilidade da égua. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 7, p. 131-133, 1987.

SQUIRES, E.L. et al. 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 American Veterinary Medicine Association**, v. 192, p. 350-353, 1988.

TROEDSSON, M.H.T. Uterine defense mechanisms in the mare. **Arch. STD/HIV Res.** v. 8, p.259-269, 1994.

TROEDSSON, M.H.T. Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. **Pferdeheilkunde**, v.13, n.15, p. 516-520, 1997.

Van CAMP, S.D. Endometrial biopsy of the mare: A review and update. **The Veterinary Clinics of North America**, Philadelphia, v. 4, p. 229-245, 1988.

WATSON, E.D.; SERTICH, P.L. Effect of repeated collection of multiple endometrial biopsy specimens on subsequent pregnancy in mares. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 201, n. 3, p. 438-40, 1992.

WILSHER, S.; ALLEN, W.R The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 5, p. 476-483, 2003.

YAMADA, A.L.M. et al. Bone marrow mononuclear cells in the treatment of complete tear of flexor tendons and suspensory ligament in the horse. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1579-1582, 2011.