

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**Caracterização da Microbiota Uterina e Análise Citológica
de Éguas em Diferentes Idades**

FEDERICO DOS SANTOS CUPELLO

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA UTERINA E ANÁLISE
CITOLÓGICA DE ÉGUAS EM DIFERENTES IDADES**

FEDERICO DOS SANTOS CUPELLO

Sob a Orientação do Professor
Marco Roberto Bourg de Mello

e Coorientação do Professor
Julio César Ferraz Jacob

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Patologia e Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Julho de 2023

C974c Cupello, Federico dos Santos, 1978-
 Caracterização da Microbiota Uterina e Análise
 Citológica de Éguas em Diferentes Idades / Federico dos
 Santos Cupello. - Rio de Janeiro, 2023.
 66 f.: il.

 Orientador: Marco Roberto Bourg de Mello.
 Coorientador: Julio César Ferraz Jacob.
 Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
 Rural do Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
 MEDICINA VETERINÁRIA, 2023.

 1. Reprodução Equina. 2. Citologia Uterina. 3.
 Cultura Bacteriana. 4. Cultura Fúngica. 5. Microbiota
 Uterina. I. Mello, Marco Roberto Bourg de, 1971-,
 orient. II. Jacob, Julio César Ferraz , 1961-,
 coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
 Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
 VETERINÁRIA. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

FEDERICO DOS SANTOS CUPELLO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 25/07/2023

Marco Roberto Bourg de Mello. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Vera Lucia Teixeira De Jesus. Dra. UFRRJ

Alline Ferreira Brasil. Dra. UES

Marcus André Ferreira Sa. Dr. UES



Emitido em 02/08/2023

TERMO Nº 873/2023 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 02/08/2023 14:59)

MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)
Matrícula: ###480#3

(Assinado digitalmente em 02/08/2023 11:28)

VERA LUCIA TEIXEIRA DE JESUS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)
Matrícula: ###015#9

(Assinado digitalmente em 02/08/2023 14:27)

ALLINE FERREIRA BRASIL
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.053-##

(Assinado digitalmente em 02/08/2023 10:56)

MARCUS ANDRÉ FERREIRA SÁ
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.587-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: 873, ano: 2023, tipo: TERMO, data de emissão: 02/08/2023 e o código de verificação: 52d686c0b3

DEDICATÓRIA

Ao meu PAI, meu amigo e meu verdadeiro herói!!! Através dele, tive acesso a esse universo único e mágico que são os animais. Onde você estiver, não se esqueça de mim!!!

Minha MÃE amada e tão dedicada com a minha felicidade e minha IRMÃ, uma segunda mãe que a vida me presenteou.

Aos queridos amigos Alline Brasil e Leonardo Lima, que estiveram ao meu lado em todos os momentos. Vocês são família!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marco Roberto Bourg de Mello, pelos ensinamentos, experiências e lições passadas ao longo desses dois anos de convivência. Sua generosidade, carinho e atenção foram um diferencial na minha vida pessoal e principalmente profissional. Tenho buscado melhorar como professor com base em seus ensinamentos e condutas. Muito obrigado!!!

À Professora Vera Lúcia Teixeira de Jesus, por sua amizade, confiança e apoio nos momentos mais difíceis. Pela orientação em todas as fases deste projeto, sem a qual não teria conseguido chegar até aqui. Agradeço por tudo o que fez, e principalmente por ter acreditado no meu trabalho.

Ao Professor Júlio César Ferraz Jacob, pelos ensinamentos sobre Reprodução Animal e por sua amizade. Pelo apoio na realização do sonho de me tornar mestre em reprodução animal, me encaminhando ao professor Marco e me orientando juntamente.

Ao professor Francisco de Assis Baroni, pelos ensinamentos, generosidade, carinho e preocupação. De uma forma educada, suave e sempre disposto a ajudar, abrindo o laboratório de micologia para processamento das amostras.

À professora Thérèse Camille Nascimento Holmström, professora Miliane Moreira Soares de Souza e, assim como, todos da equipe do Labacvet que tão generosamente abriram espaço no laboratório de bacteriologia para que todas as amostras fossem processadas, me dando a oportunidade de acompanhar e expandir meus conhecimentos.

Camila e Isadora minhas companheiras no programa de pós-graduação e uma verdadeira força nos momentos mais complicados.

Minhas amigas para todas as vidas: Marta Desidério, Alline Brasil e Sílvia Turner. Vocês são a minha fonte de inspiração, minhas amigas e não tenho palavras para agradecer a nossa amizade e o cuidado que têm comigo.

Danielle Misael e Alexandro Ribeiro, queridos amigos que a Estácio me trouxe, sou tão feliz com a nossa amizade.

Natália, Luana, Thaice e Fabíola, minhas amigas de graduação, onde tudo começou!!! Sinto falta dos nossos dias, das noites viradas estudando fichas, do desespero saudável à espera de uma nota de prova e de tantas outras histórias que só nós conhecemos. Amo vocês!!!

Minha amada Fran, por todo o amor, dedicação e cuidados comigo em nossa casa.

Aos meus professores, ex-professores e atuais colegas de trabalho pelos ensinamentos e incentivos desde o início da minha trajetória na medicina veterinária.

E a todos os meus amigos e alunos que de forma direta ou, até mesmo, indireta me incentivaram!!!

Eu amo todos vocês e serei sempre grato!!!

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas)

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

RESUMO

CUPELLO, Federico dos Santos. **Caracterização da microbiota uterina e análise citológica de éguas em diferentes idades.** 2023. 66p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciência Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

O objetivo deste estudo foi caracterizar qualitativa e comparativamente os microrganismos encontrados no endométrio de éguas de diferentes idades. Foi coletado material intrauterino de 46 éguas saudáveis para análise citológica, cultura fúngica e bacteriana. Os animais selecionados foram alocados em três grupos etários: G1 (n = 10) - éguas nulíparas com idade entre 2 e 4 anos; G2 (n = 17) - éguas em fase reprodutiva com idade entre 5 e 10 anos; e G3 (n = 19) - éguas em fase reprodutiva com idade entre 11 e 18 anos. As éguas foram submetidas à avaliação ultrassonográfica para acompanhamento do ciclo estral e, quando apresentaram folículo com diâmetro ≥ 35 mm e edema uterino grau 3 (escala de 1 a 5), foi realizada a coleta de material intrauterino. A coleta das amostras foi realizada utilizando *swab* estéril e escova citológica estéril com auxílio da pinça ginecológica. O material coletado para isolamento fúngico/bacteriano foi acondicionado em meio Stuart em temperatura ambiente e encaminhado ao laboratório da UFRRJ. As lâminas foram coradas com Panótico rápido e a citologia buscou identificar a presença de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, em microscopia óptica com aumento de 400 a 1000X. A análise estatística foi realizada utilizando o Teste χ^2 com nível de significância de 5%. Dentre os resultados encontrados, a cultura bacteriana apresentou: *Bacillus spp.*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Streptococcus sp.* Os animais do grupo G1 não possuíam diferenças significativas nas proporções de gêneros de bactérias encontradas; os animais do grupo G2 possuíam mais indivíduos com bactérias dos gêneros *Staphylococcus* do que os grupos G1 e G3; e os animais do grupo G3 possuíam maior incidência de bactérias do gênero *Bacillus*. O gênero *Streptococcus* não foi encontrado no grupo G3, fato que pode estar relacionado à idade dos animais e ao seu histórico de tratamentos uterinos. Bactérias do gênero *Bacillus* foram as mais comuns. Na cultura fúngica observou-se a presença de *Candida albicans*, *Geotrichum sp.*, *Rhodotorula sp.* e *Trichosporon sp.* A colonização fúngica é mais diversificada nas éguas dos grupos G2 e G3, com prevaletismo de *Candida albicans*, *Geotrichum sp.*, *Rhodotorula sp.* e *Trichosporon sp.* O grupo G1 apresentou colonização fúngica por *Candida albicans* e *Rhodotorula sp.* Na avaliação citológicas do endométrio das éguas observou-se que 90% dos animais do grupo G1 apresentaram citologia sem alteração característica. As alterações presentes em G2 e G3 podem estar associadas aos processos inflamatórios do endométrio, dado o aumento do número de células de resposta inflamatória (G2 = 58,9% e G3 = 78,9%) o que pode apresentar correlação com a idade do animal e as condições do manejo reprodutivo. Não foram observadas diferenças significativas quanto à presença de microrganismos nocivos entre G2 e G3, o que não ocorreu em comparação a G1. Esses resultados demonstraram que ocorre uma menor incidência de microrganismos nocivos no endométrio uterino de éguas jovens e nulíparas quando comparada aos outros grupos etários.

Palavras-chave: Endométrio equino. Fertilidade equina. Microbiota uterina equina.

ABSTRACT

CUPELLO, Federico dos Santos. **Characterization of uterine microbiota and cytological analysis of mares at different ages.** 2023. 66p. Dissertation (Master's in Veterinary Medicine, Pathology, and Clinical Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The objective of this study was to qualitatively and comparatively characterize the microorganisms found in the endometrium of mares of different ages. Intrauterine material was collected from 46 healthy mares for cytological analysis, fungal, and bacterial culture. The selected animals were allocated into three age groups: G1 (n = 10) - nulliparous mares aged between 2 and 4 years; G2 (n = 17) - reproductive phase mares aged between 5 and 10 years; and G3 (n = 19) - reproductive phase mares aged between 11 and 18 years. The mares underwent ultrasonographic evaluation to monitor the estrous cycle, and when they presented a follicle with a diameter ≥ 35 mm and uterine edema grade 3 (on a scale of 1 to 5), intrauterine material was collected. The samples were collected using a sterile swab and cytological brush with the aid of a gynecological forceps. The collected material for fungal/bacterial isolation was placed in Stuart medium at room temperature and sent to the laboratory at UFRRJ. Slides were stained with rapid panoptic staining, and cytology aimed to identify the presence of neutrophils, macrophages, and eosinophils, under optical microscopy at magnifications of 400 to 1000X. Statistical analysis was performed using the Chi-square test with a significance level of 5%. Among the findings, bacterial culture showed the presence of *Bacillus spp*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, and *Streptococcus sp*. Animals in Group G1 did not have significant differences in the proportions of bacterial genera found; animals in Group G2 had more individuals with *Staphylococcus* bacteria than Groups G1 and G3; and animals in Group G3 had a higher incidence of *Bacillus* bacteria. The genus *Streptococcus* was not found in Group G3, which may be related to the age of the animals and their history of uterine treatments. *Bacillus* bacteria were the most common. Fungal culture showed the presence of *Candida albicans*, *Geotrichum sp.*, *Rhodotorula sp.*, and *Trichosporon sp*. Fungal colonization is more diverse in mares from Groups G2 and G3, with a prevalence of *Candida albicans*, *Geotrichum sp.*, *Rhodotorula sp.*, and *Trichosporon sp*. Group G1 showed fungal colonization by *Candida albicans* and *Rhodotorula sp*. Cytological evaluation of the mares' endometrium showed that 90% of the animals in Group G1 presented cytology without characteristic alteration. The alterations present in G2 and G3 may be associated with endometrial inflammatory processes, given the increased number of inflammatory response cells (G2 = 58.9% and G3 = 78.9%), which may correlate with the age of the animal and reproductive management conditions. No significant differences were observed regarding the presence of harmful microorganisms between G2 and G3, which was not the case when compared to G1. These results demonstrated that there is a lower incidence of harmful microorganisms in the uterine endometrium of young and nulliparous mares compared to the other groups.

Keywords: Equine endometrium. Equine fertility. Equine uterine microbiota.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação entre crescimento bacteriano e tipos de bactérias entre as amostras coletadas	48
Tabela 2: Comparação de crescimento bacteriano entre as amostras analisadas, com base no Teste χ^2	49
Tabela 3: Comparação entre crescimento e tipos de fungos entre as amostras coletadas em porcentagem	50
Tabela 4: Comparação entre os resultados das análises citológicas das amostras.....	51
Tabela 5: Tipos de bactérias, tipos de fungos e análise citológica encontrados nas amostras dos grupos de animais.....	52

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Órgãos genitais femininos de uma égua (representação esquemática).....	13
Figura 2: Esquema do eixo Hipotalâmico Hipofisário Gonadal.	16
Figura 3. Um resumo simplificado das principais alterações da concentração hormonal no plasma durante o ciclo estral de égua não prenhe. LH – Hormônio luteinizante; FSH – Hormônio folículo estimulante; PGF2 α - Prostaglandina F2 α	17
Figura 4. Ovário de uma égua (representação esquemática).....	19
Figura 5. Animais criados em sistema extensivo recebendo suplementação diária.....	33
Figura 6. Trato diário oferecido às éguas individualmente.....	33
Figura 7. Éguas contidas em brete para avaliação e coleta de material	34
Figura 8. Avaliação ultrassonográfica de ovário equino para determinação do diâmetro folicular.	35
Figura 9. Swab estéril em meio de transporte Stuart e escova citológica estéril.	35
Figura 10. Material utilizado individualmente para cada animal.....	35
Figura 11. Lâminas antes de serem coradas em Panótico.....	37
Figura 12. Técnica de coloração Panótico	37
Figura 13. Esfregaços corados em Panótico rápido	38
Figura 14. Citologia endometrial de uma égua sem alteração, presença de muco abundante, precipitado eosinofílico e células epiteliais. Coloração pelo método Panótico rápido, aumento de aumento de 1000X.	38
Figura 15. Citologia endometrial, evidenciando a presença de neutrófilos (marcação em vermelho). Coloração pelo método Panótico rápido, aumento de aumento de 1000X.....	39
Figura 16. Citologia endometrial, evidenciando a presença de neutrófilos (marcação em vermelho). Coloração pelo método Panótico rápido, aumento de aumento de 1000X.....	39
Figura 17 Placa de Petri em meio Ágar Sangue . Placas de Petri em meio Ágar Sangue e Azida semeadas e acondicionadas em estufa a 37°C.....	40
Figura 18. Placas de Petri semeadas e mantidas em estufa a 37°C por 24/48 horas. Após período em estufa, placas apresentando colônias a serem identificadas.	41
Figura 19. Esquema de testes de assimilação de fontes nitrogenadas.....	45

LISTA DE ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS

μ - Micron

AMVF - Ágar Manitol Vermelho de Fenol

ASC - Ágar Sangue de Carneiro

AZS - Azida Sangue de Carneiro

BALs - Bactérias Ácido-Láticas

BHI - *Brain Heart Infusion*

C – Graus Celsius

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

EHV-1 - *Herpesvirus equino* tipo 1

FSH - Hormônio Folículo-Estimulante

G1 - Grupo 1

G2 - Grupo 2

G3 - Grupo 3

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofina

IA - Inseminação Artificial

IC - Nível de Significância

IMViC - Indol, Metil Vermelho, Voges-Proskauer e Citrato

KOH - Hidróxido de Potássio

LABCVET - Laboratório de Bacteriologia Veterinária

LH - Hormônio Luteinizante

LLPA - Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais

mL - Mililitro

N - Número de Elementos

NaCl - Cloreto de Sódio

P - Probabilidade de Significância

PGE - Prostaglandina E

PGF2α - Prostaglandina F2α.

pH - Potencial Hidrogeniônico

PMNs - Polimorfonucleares

TE - Transferência de Embriões

TSI -Ágar Três Açúcares Ferro

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

UI – Unidade internacional

VM - Vermelho de Metila

VP - *Voges-Proskauer*

YCB - *Yeast Carbon Base*

YCB - *Yeast Carbon Base*

YNB - *Yeast Nitrogen Base*

YNB - *Yeast Nitrogen Base*

χ^2 – Qui-quadrado

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS	xiv
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Anatomia do Trato Reprodutivo da Égua	13
2.2 Fisiologia Reprodutiva de Éguas	15
2.3 A Microbiota Uterina de Éguas	19
2.4 Principais Causas de Perda Gestacional em Éguas	21
2.5 Endometrite em Éguas	22
2.6 Citologia Endometrial	26
2.7 Cultura Microbiológica Uterina	28
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Animais e Local do Experimento.....	32
4.2 Coleta e Preparo de Material Intrauterino	33
4.3 Citologia Endometrial	38
4.4 Análise Laboratorial.....	39
4.4.1 Cultura Bacteriana.....	40
4.4.2 Cultura Fúngica.....	43
4.5 Análise Estatística	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Crescimento Bacteriano	47
5.2 Crescimento Fúngico	49
5.3 Citologia Uterina.....	51
5.4 Análise Citológica, Fúngica e Bacteriana	51
6 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	64
Anexo 1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-IZ/UFRRJ	64
Anexo 2. Protocolo de Identificação de Leveduras	65
Anexo 3. Tabela de identificação de <i>Candida spp</i>	66

1 INTRODUÇÃO

O mercado do cavalo, como parte atuante do agronegócio, é responsável anualmente por gerar milhares de empregos no Brasil e no mundo, tornando-se motivo de estudo para o aprimoramento da produção. Nas últimas décadas, o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas possibilitou o melhor aproveitamento dos animais, tornando possível acelerar o aprimoramento das raças através de seus cruzamentos. A ampla utilização das biotécnicas reprodutivas trouxe, ao longo dos anos, inúmeros benefícios aos criadores de equinos e, com isso, possibilitou o melhoramento genético e o aumento da produtividade, tornando viável que um animal com alto valor zootécnico fosse capaz de produzir inúmeros produtos por ano.

Em relação à reprodução equina, inúmeras técnicas se tornaram difundidas tais como a IA (inseminação artificial), a TE (transferência de embriões) e a manipulação do sêmen. As biotécnicas da reprodução se tornaram uma importante ferramenta a serviço da equideocultura mundial. Dadas as vantagens proporcionadas pela IA, quando utilizada eficientemente, pode ser considerada a biotécnica com maior impacto na produção equina, pois um reprodutor pode deixar centenas de descendentes ao longo de sua vida reprodutiva. Neste cenário, o Brasil se destaca na produção de embriões com a utilização dessas biotécnicas.

Alguns fatores podem impactar negativamente a reprodução equina e trazer prejuízos para o ramo. Estes fatores estão diretamente relacionados aos índices de enfermidades em éguas que podem levar a quadros de infertilidade, subfertilidade ou perdas embrionárias. Dentre as inúmeras patologias que acometem o trato reprodutivo desses animais, a endometrite é a principal delas. Trata-se da terceira doença que mais acomete equídeos no mundo.

A identificação da origem deste quadro clínico é o elemento-chave para o desenvolvimento de tratamentos eficazes. E a identificação dos agentes causadores que, na maioria das vezes são fungos e/ou bactérias patogênicas, é o principal elemento para o diagnóstico da doença. Desta forma, torna-se necessária a busca por diagnósticos e tratamentos para estas enfermidades comuns relacionadas ao trato reprodutivo das éguas.

Com base na literatura disponível, é possível encontrar estudos que atestam que éguas que estejam em idade reprodutiva avançada, são mais susceptíveis à endometrite do que éguas que nunca foram manipuladas ou que estejam no início da vida reprodutiva. Essas manipulações referem-se àquelas relacionadas aos procedimentos realizados pelo médico veterinário que faz uso de técnicas reprodutivas como IA e a TE. Estes procedimentos podem

tornar as éguas matrizes, doadoras e receptoras susceptíveis à contaminação do trato reprodutivo.

A endometrite pode ser considerada uma condição particular em que ocorre uma falha fisiológica do mecanismo de limpeza e defesa do endométrio. Essa condição pode afetar, inclusive, as éguas que nunca foram manipuladas ou cobertas por garanhão. Assim, o presente estudo testou a hipótese de que existem diferenças nos tipos e nas densidades populacionais de microrganismos encontrados no endométrio de éguas em comparação com as diferentes faixas etárias. Portanto, este estudo teve como objetivo caracterizar quantitativa e qualitativamente os microrganismos encontrados no endométrio de éguas de diferentes faixas etárias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia do Trato Reprodutivo da Égua

A reprodução equina é um campo multidisciplinar e está associada, dentre outras áreas de conhecimento, à anatomia, à fisiologia reprodutiva e ao manejo reprodutivo desses animais. A compreensão das peculiaridades inerentes a esses animais é fundamental para o exercício profissional, sendo necessários conhecimentos amplos e sólidos para as possibilidades de eficiência e sucesso nesta área (GINTHER, 1992; BRINSKO et al., 2011).

Os conhecimentos acerca do funcionamento do aparelho reprodutor das éguas e suas interações com outros sistemas, como o endócrino e nervoso, são fundamentais para se desenvolver, com possibilidades de êxito, um programa de reprodução equina. O conhecimento dessas interações, por parte dos médicos veterinários, tratadores e proprietários, permite a tomada de decisões mais assertivas e o desenvolvimento de estratégias de manejo nutricional e reprodutivo, por exemplo, que sejam mais adequados às condições dos animais e possam garantir maiores taxas de sucesso na reprodução, associados ao bem-estar e saúde dos animais (BRINSKO et al., 2011), (Figura 1).

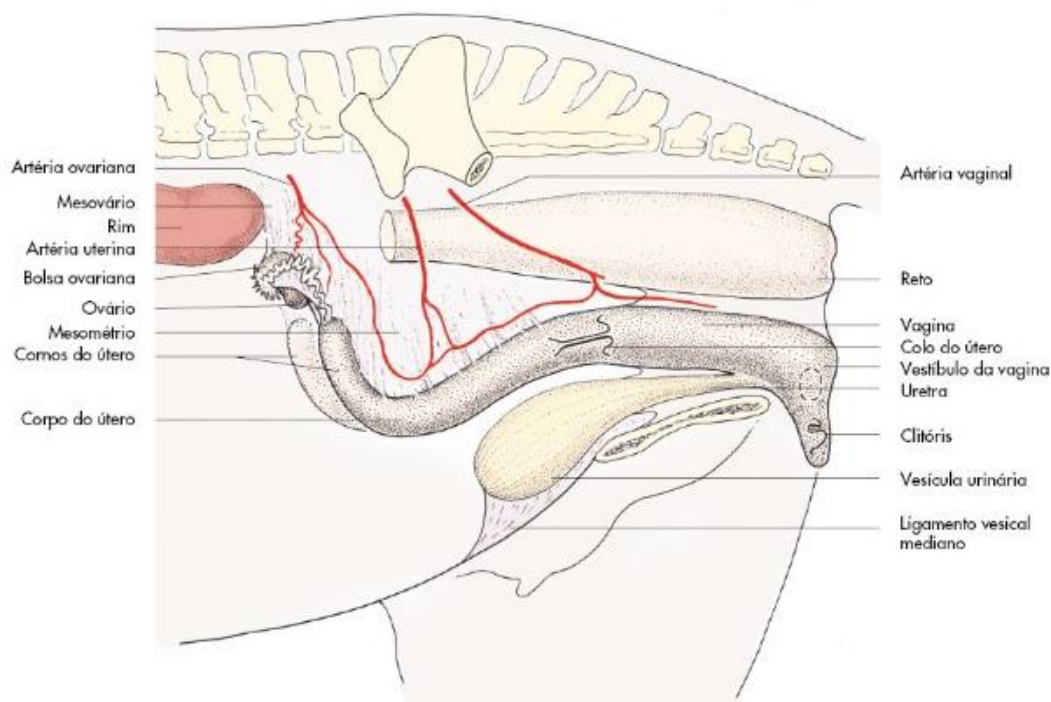


Figura 1. Órgãos genitais femininos de uma égua (representação esquemática).
Fonte: König; Liebich, 2021.

Fazem parte do aparelho reprodutor equino, as seguintes estruturas (MCKINNON; VOSS, 1995; BRINSKO et al., 2011):

- Vulva – corresponde a parte externa do canal e é constituída por lábios, clitóris e vestíbulo. A constituição desta região é de elevada importância para a saúde do trato reprodutivo do animal porque o protege de possíveis entradas de ar e da contaminação por agentes infecciosos.

- Vagina – tubo muscular, revestido por mucosa, que realiza a conexão entre o vestíbulo da vulva e o colo do útero. As características dos tecidos que formam a vagina apresentam características elásticas e distensíveis que estão associadas à acomodação do pênis durante a cópula e à saída do potro durante o parto.

- Cérvix – trata-se da porção inferior do útero conectada à porção final da vagina. Possui como funções facilitar o transporte de espermatozoides para o interior do útero e atuar como barreira física para a ascensão de agentes patogênicos que possam causar infecções que afetem a saúde do animal, a gestação ou a saúde do feto.

- Útero – órgão muscular constituído por endométrio, mesométrio e miométrio. Possui inúmeras funções, por exemplo: meio de passagem de espermatozoides, atividade endócrina, fixação e desenvolvimento do embrião, manutenção da gestação e contrações durante o parto.

- Ovários – órgãos bilaterais com formato semelhante a rins. Responsáveis pela produção de oócitos e pela produção de hormônios sexuais (estrogênio e progesterona).

- Ovidutos – órgãos bilaterais que realizam a captação do oócito, por meio do terço final do oviduto (infundíbulo), que será direcionado para a ampola por meio da movimentação das fimbrias. Na ampola ocorrerá a fertilização do óvulo, caso haja espermatozoides viáveis, e será o local do desenvolvimento inicial do embrião (MCKINNON; VOSS, 1995; BRINSKO et al., 2011).

Uma das questões que merecem atenção é a influência de alterações na conformação da vulva quanto à predisposição à infecção uterina. Nos animais que possuem uma conformação vulvar adequada, o útero é protegido por meio da vulva, do vestíbulo, da vagina e da cérvix. Qualquer irregularidade em uma dessas estruturas pode ser considerada um fator de predisposição para infecções uterinas nas éguas. As alterações na conformação vulvar das éguas pode aumentar sua suscetibilidade a infecções uterinas (MAIA et al., 2019; MOREL, 2020).

Mudanças na conformação da vulva podem aumentar a suscetibilidade da égua a infecções uterinas. Existe uma estreita relação entre uma conformação vulvar adequada, exames

citológicos negativos em éguas e, a capacidade dessas éguas conceberem (MAIA et al., 2019; MOREL, 2020).

Como um exemplo, a falta de coaptação completa dos lábios vulvares torna a égua suscetível a infecções uterinas subclínicas. A presença de pneumovagina é uma causa significativa de problemas reprodutivos em éguas (CASLICK, 1937). Após a ovulação, a cérvix se fecha, e o sistema linfático assume a principal responsabilidade pela drenagem do processo inflamatório uterino. O hormônio estrogênio desempenha uma função importante na limpeza física do útero, promovendo a abertura da cérvix e facilitando a eliminação de fluidos do útero (MATTOS et al., 2021).

Hember et al. (2005) investigaram as relações entre o estado vulvar (não operado por Caslick, grupo A; anteriormente operado por Caslick e/ou não ressuturado após o último parto, grupos B e C, respectivamente) e a citologia endometrial, taxa de concepção e taxa de potros vivos, levando em consideração diferentes faixas etárias e categorias de éguas puro-sangue. Os resultados dessa pesquisa revelaram que as éguas pertencentes ao grupo de status vulvar A apresentaram a maior taxa de concepção e taxa de potros vivos, enquanto as menores taxas foram observadas em éguas com status vulvar do grupo C. Uma análise multifatorial demonstrou que o estado vulvar no momento da chegada teve um efeito significativo sobre a taxa de prenhez e a taxa de potros vivos, mas não na perda fetal. Essa prática contribui para melhorar a taxa de concepção das éguas minimizando o crescimento de microrganismos, prevenindo a ocorrência de endometrite e garantindo que elas levem a gestação a termo com sucesso (HEMBER et al., 2005).

2.2 Fisiologia Reprodutiva de Éguas

Segundo Ginther (1992), Romano et al. (1998) e Fawcett et al. (2021), a partir de suas características fisiológicas reprodutivas, as éguas podem ser classificadas como animais poliétricos estacionais de dia longos. Estes animais apresentam ciclos reprodutivos que se dividem em duas fases:

Fase folicular – primeira fase do ciclo estral, com duração entre 7 e 10 dias, na qual ocorre o desenvolvimento dos folículos ovarianos e a seleção do folículo dominante, que crescerá até sua maturação, atingindo a fase pré-ovulatória. Estes folículos serão responsáveis pela produção de estrogênio e pela preparação do útero para a recepção do embrião. Nesta fase, a hipófise produz hormônios gonadotróficos, com destaque para o hormônio folículo-estimulante (FSH) que atuam sobre os folículos antrais e os estimulam a crescer e a produzir

estradiol. Este, por sua vez, tem atuação relevante no ciclo estral por promover inúmeras alterações fisiológicas e comportamentais no animal, tais como os sinais que caracterizam o cio expressam a receptividade da égua ao garanhão e sinalizam que a ovulação ocorrerá entre 24h e 48h após seu início. O pico na produção do hormônio luteinizante (LH) marca o final dessa fase, culminando com a ovulação do folículo dominante; e

Fase luteínica – fase em que ocorre a formação do corpo lúteo, responsável pela produção de progesterona que mantém o útero em condições para o desenvolvimento da gestação. Estas fases estão sobre influência direta da duração do fotoperíodo (número de horas de luz durante o dia). A entrada no ciclo reprodutivo ocorre entre primavera e verão onde ocorrem os dias mais longos (GINTHER, 1992; ROMANO et al., 1998; FAWCETT et al., 2021). O aumento da luminosidade durante as estações de primavera e verão, tanto em ambiente natural quanto sob estímulo artificial, com períodos de exposição de 15 a 16 horas de duração, estimula receptores nervosos presentes na retina do animal, que enviam sinais para o hipotálamo. Esses sinais deflagram a produção de hormônios reprodutivos e, também, a diminuição da produção de melatonina. Com a diminuição na produção deste hormônio e, consequentemente, sua menor concentração na circulação, ocorre a ativação do eixo pineal-hipotalâmico-hipofisário-gonadal do animal (MAIA et al., 2019; BARBA et al., 2020), (Figura 2).

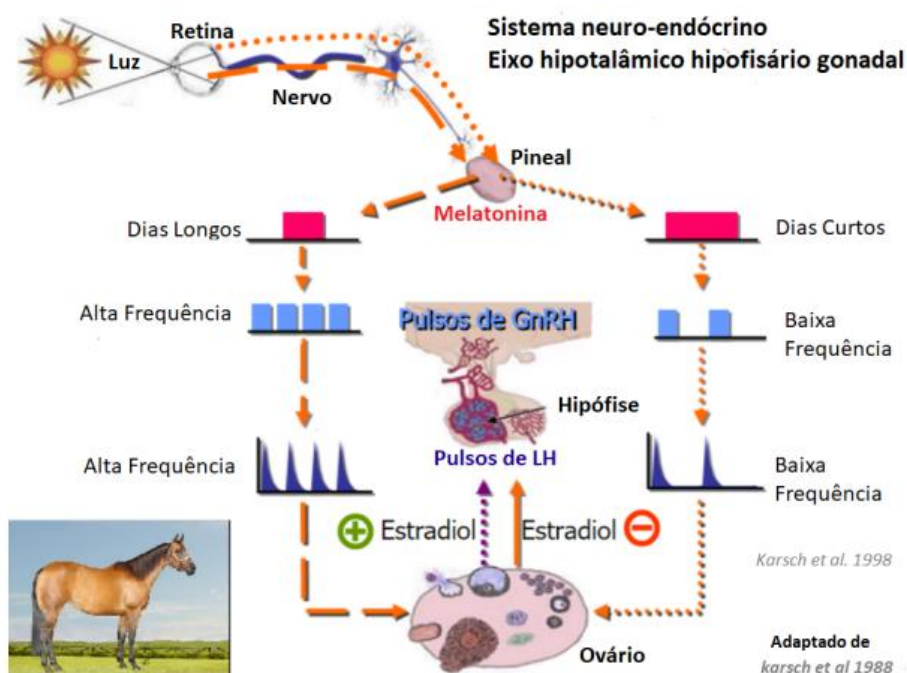


Figura 2: Esquema do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal.

Fonte: Karsch et al., 1988.

Neste eixo, o hipotálamo inicia a produção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Este hormônio terá ação sobre a hipófise e a estimulará a produzir os hormônios FSH e LH. Desta forma, o GnRH é responsável pela regulação das atividades dos ovários. Os receptores hormonais presentes nos ovários responderão aos estímulos promovidos pelo FSH e LH, que realizará o recrutamento, seleção e dominância do folículo (Figura 3) (MCKINNON; VOSS, 1995; MAIA et al., 2019; BARBA et al., 2020).

Segundo Mckinnon e Voss (1995), Romano et al. (1998), Maia et al. (2019) e Barba et al. (2020), o ciclo estral refere-se ao período entre dois estros consecutivos, em que a fêmea sofre mudanças endócrinas que afetam sua fisiologia e comportamento e possui diferentes fases (Figura 3) denominadas anestro, estro e diestro.

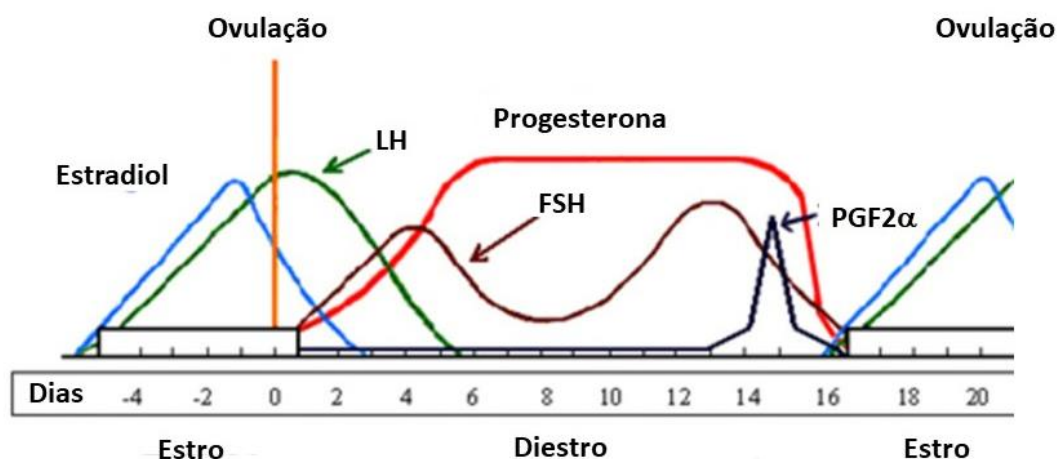


Figura 3. Um resumo simplificado das principais alterações da concentração hormonal no plasma durante o ciclo estral de égua não prenhe. LH – Hormônio luteinizante; FSH – Hormônio folículo estimulante; PGF2 α - Prostaglandina F2 α .

Fonte: MOREL, 2003 (adaptado).

As características dessas fases são: i) anestro: estação não reprodutiva que ocorre durante o outono e inverno. Neste período, os ovários desses animais não desenvolvem nenhuma de suas estruturas para a formação do embrião, ocorre a produção muito reduzida de hormônios ovarianos e esses não respondem aos estímulos decorrentes da presença do garanhão (MCKINNON; VOSS, 1995; ROMANO et al., 1998; MAIA et al., 2019; BARBA et al., 2020); ii) diestro: com duração aproximada de 14 a 16 dias, caracteriza-se por ser a fase pós-ovulatória do ciclo estral onde o folículo ovariano se transforma em corpo lúteo, após a liberação do óvulo, que produz o hormônio progesterona. Este hormônio mantém o útero em condições para o

desenvolvimento de uma gestação e atua inibindo novas ovulações (feedback negativo no hipotálamo). Nesta fase, a égua apresenta comportamento menos receptivo ao macho (MCKINNON; VOSS, 1995; ROMANO et al., 1998; MAIA et al., 2019; BARBA et al., 2020);

iii) estro: estação reprodutiva, ocorre entre a primavera e o verão. Neste período os dias são mais longos e isso estimula o aumento das secreções hormonais dos ovários. A produção destes hormônios altera a fisiologia e o comportamento desses animais que começam a realizar uma série de ciclos estrais até que haja a prenhez. Com duração aproximada de sete dias, essa fase é considerada a mais curta do ciclo estral. Nela o folículo ovariano alcança seu máximo tamanho e ocorre a liberação do oócito. A égua se apresenta receptiva ao macho, apresentando comportamentos como a postura de cópula, o aumento na frequência da micção, o aumento da secreção vaginal e a dilatação do colo do útero (MCKINNON; VOSS, 1995; ROMANO et al., 1998; MAIA et al., 2019; BARBA et al., 2020).

O endométrio das éguas secretará prostaglandina (PGf2alfa) em três situações: não havendo fecundação, não havendo cobertura ou quando há morte embrionária precoce (anterior ao 12º e 14º dia de gestação). Nesta condição, a PGF2alfa, por via sistêmica, afeta o corpo lúteo, induzindo-o à destruição e à consequente queda nos níveis de progesterona. Este fenômeno é conhecido como luteólise. A estacionalidade das éguas é um fenômeno multifatorial e por isso é de grande complexidade. Desta forma, é influenciado por diversos fatores como: a luz do dia, as variações de temperatura, o manejo nutricional, o comportamento social do animal e fatores genéticos que, associados, desencadeiam o ciclo estral (SEBASTIAN et al., 2008; LIMA et al., 2017), (Figura 4).

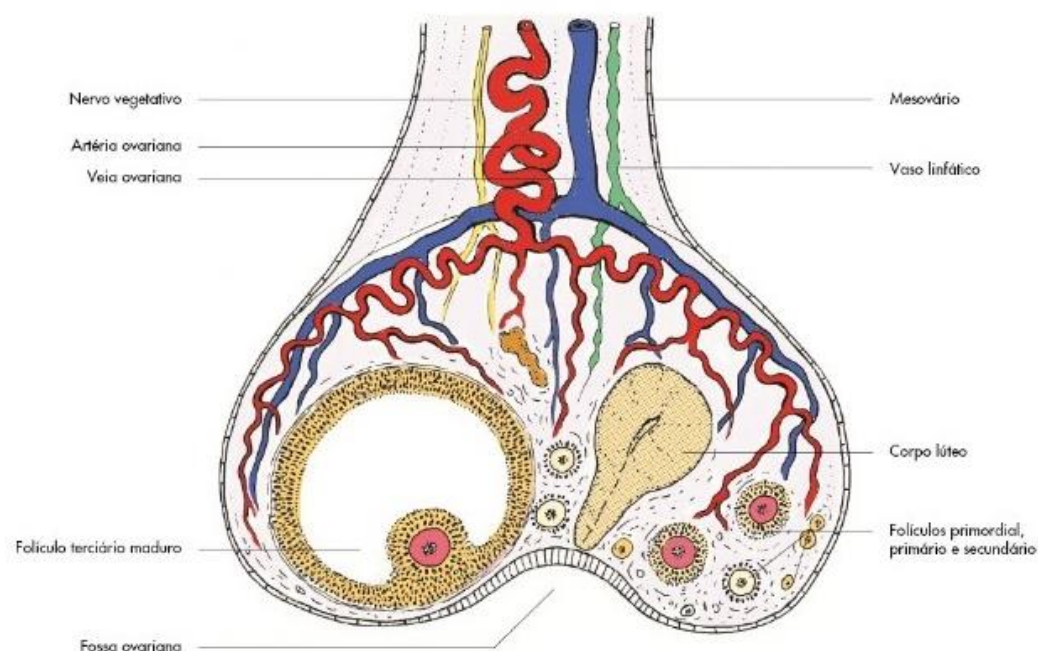


Figura 4. Ovário de uma égua (representação esquemática)

Fonte: König; Liebich, 2021.

A puberdade é o início da idade reprodutiva do animal e ocorre entre 12 e 24 meses de idade, podendo variar com a época do ano. Ela é influenciada por fatores ambientais, genéticos, escore corporal, raça, manejo nutricional e pela influência de outras éguas em período de estro ou de ganhões (o que reflete o ambiente social ao qual o animal pertence) (SEBASTIAN et al., 2008; MAIA et al., 2019).

2.3 A Microbiota Uterina de Éguas

A saúde reprodutiva dos equinos é um fator crucial para a produtividade. Inúmeras variáveis podem influenciar esse estado, dentre elas destacam-se a composição da microbiota uterina de éguas e a relação entre a menor prevalência de infecções uterinas e uma maior taxa de concepção (BARBA et al., 2020). É fundamental para a compreensão das taxas reprodutivas saber como essa microbiota pode ser influenciada por fatores como idade, raça, dieta, condições de manejo reprodutivo e estação do ano, e como isso pode levar ao desenvolvimento de infecções e inflamações (MCKINNON; VOSS, 1995; LEBLANC; CAUSEY, 2009).

Existem diferenças significativas na composição da microbiota uterina equina. Éguas Puro Sangue Inglês apresentaram maior diversidade na composição da microbiota em comparação com as éguas árabes. As éguas Puro Sangue Inglês apresentaram uma proporção

maior de bactérias benéficas, como *Lactobacillus* spp. Em contrapartida, as éguas Árabes apresentaram uma maior proporção de bactérias potencialmente patogênicas, como *Streptococcus* spp, por exemplo. Esses dados, embora tenham sido obtidos com um número limitado de animais, podem indicar influência na composição da microbiota e resultam em implicações na saúde reprodutiva desses animais (AEKNATH VIRENDRA et al., 2022).

Uma análise da microbiota uterina de éguas agrupadas em saudáveis, subférteis e inférteis em diferentes estágios do ciclo reprodutivo, apresentou como resultado a diversidade da microbiota uterina e sua variação de acordo com o estado reprodutivo e a fertilidade. As éguas subférteis e inférteis possuíam uma maior diversidade na composição da microbiota uterina. As éguas inférteis possuíam um aumento da prevalência de bactérias patogênicas, em comparação com os resultados obtidos nas amostras coletadas de éguas saudáveis e subférteis. A avaliação da microbiota uterina em diferentes estágios reprodutivos pode ser útil para o diagnóstico e tratamento de problemas de fertilidade em éguas (BARBA et al., 2020).

A composição da microbiota uterina de éguas pode conter bactérias, fungos e vírus, por exemplo. O equilíbrio dessa microbiota é um importante aspecto da saúde reprodutiva da égua. A microbiota equilibrada é fundamental para garantir a fertilidade e a gestação bem-sucedida das éguas, ao passo que estados de desequilíbrio podem levar a infecções uterinas que comprometem a saúde do animal e resultar em uma redução na fertilidade e no sucesso reprodutivo (GUAY, 1980; GINTHER, 1992; BARBA et al., 2020).

Vários estudos têm investigado a composição da microbiota uterina de éguas saudáveis. Em geral, a microbiota uterina é composta por uma diversidade de bactérias, incluindo Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes e Actinobacteria. No entanto, a composição exata da microbiota pode variar de acordo com vários fatores, incluindo a idade, a raça, a dieta e o estado hormonal das éguas (THOMSON et al, 2022; AEKNATH VIRENDRA et al, 2022). A microbiota uterina de éguas saudáveis é composta principalmente por bactérias benéficas, como *Lactobacillus* spp., e em menor quantidade por bactérias patogênicas, como *Streptococcus* spp. e *Escherichia coli* (AULT-SEAY et al., 2023).

A microbiota uterina de éguas saudáveis é composta principalmente por bactérias ácido-láticas (BALs) e bactérias anaeróbicas facultativas, como *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli*, sendo as de maior prevalência *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Outras bactérias encontradas com frequência incluem *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. Além disso, a presença de fungos, como *Candida* spp., e vírus, como o *Herpesvirus equino* tipo 1 (EHV-1), também foi observada em algumas éguas (BARBA et al., 2020; HOLYOAK et al., 2022).

A microbiota uterina de éguas saudáveis possui como bactérias predominantes as BALs (WOODWARD; TROEDSSON, 2012), representando mais de 80% das espécies bacterianas presentes nas amostras analisadas (SEBASTIAN et al., 2008). Além disso, o estudo mostrou que a diversidade da microbiota uterina das éguas saudáveis era baixa, com pouca variedade de espécies bacterianas (LIMA et al., 2017; HOLYOAK et al., 2022).

A microbiota uterina pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a administração de antibióticos e outros tratamentos medicamentosos. O tratamento com antibióticos para eliminar bactérias patogênicas da microbiota uterina pode ser efetivo para melhorar a fertilidade. No entanto, o uso indiscriminado de antibióticos pode levar a uma disbiose da microbiota, tornando o problema ainda mais grave (THOMSON et al., 2022).

A ecologia do trato reprodutivo de éguas desempenha um papel fundamental e sua compreensão é um tema de grande interesse para a saúde reprodutiva animal. A presença de *Lactobacillus spp.* na microbiota uterina tem sido associada a um equilíbrio microbiológico saudável, a uma menor incidência de endometrite e pode desempenhar um papel importante na saúde reprodutiva, agindo como mecanismo de proteção contra patógenos. A presença dessas bactérias na microbiota uterina tem sido associada a um Potencial Hidrogeniônico (pH) ácido que constitui um ambiente hostil para microrganismos patogênicos, como *Streptococcus spp.* e *Escherichia coli*, que foram associadas a um maior risco de infecções uterinas em éguas (CHAVES, 2011).

A compreensão da composição da microbiota uterina de éguas saudáveis, de acordo com a idade, os estágios do ciclo reprodutivo e a condição reprodutiva, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento de infecções uterinas, como o uso de probióticos e prebióticos, que visam restaurar o equilíbrio da microbiota e prevenir o crescimento de patógenos (CANISSO et al., 2020; AULT-SEAY et al., 2023; CARNEIRO, 2023).

2.4 Principais Causas de Perda Gestacional em Éguas

Na equinocultura, as perdas gestacionais são um problema muito comum e representam prejuízos significativos para produtores e médicos veterinários que muitas vezes cobram os serviços prestados levando em consideração a gestação confirmada. Suas implicações dizem respeito aos investimentos financeiros e de tempo no manejo reprodutivo dos animais que envolvem custos com repetição de cobertura ou inseminação e redução do número de produtos por estação reprodutiva (SENA et al., 2016).

No âmbito da reprodução equina, dois conceitos são importantes: infertilidade e subfertilidade. A infertilidade é entendida como a inaptidão de uma égua em emprenhar, mesmo após inúmeras tentativas durante a temporada reprodutiva. A subfertilidade diz respeito à capacidade limitada ou reduzida da égua em conceber e/ou manter uma gestação até seu término. Esta condição do animal pode ter relações com deficiência nutricional, doenças metabólicas, estresse ou idade avançada, por exemplo. As duas situações podem estar associadas a diversos fatores como: fatores genéticos, problemas de manejo reprodutivo, nutricionais ou aqueles relacionados ao ambiente, à inseminação ou coberturas mal sucedidas ou às doenças reprodutivas (JACOB et al., 2002; MOREL, 2020).

Desta forma, os conhecimentos sobre manejo reprodutivo e nutricional, a identificação, o diagnóstico e o tratamento de doenças do trato reprodutivo de equinos, assim como a aplicação correta de técnicas reprodutivas avançadas para melhorar a fertilidade dos animais, são fundamentais para a profilaxia ou solução do problema no estágio inicial. Nos quadros de infertilidade e subfertilidade transitórias, as mesmas podem ser provocadas por alterações cromossômicas maternas; alterações no local de implantação da vesícula embrionária; cistos ovarianos e no útero; deficiência de progesterona; endometrite; estresse; falha no reconhecimento materno da gestação; fibrose periglandular; gestação gemelar; leptospirose; nutrição inadequada; placentite e problemas durante a lactação (VARELA BETTENCOURT et al., 2018).

Dentre as doenças do trato reprodutivo de éguas, a endometrite se destaca como a principal e maior causadora de infertilidade e subfertilidade em equinos. Essa infecção apresenta impactos diretos nas taxas de prenhez, pois compromete a concepção. Nesse contexto, destaca-se um estudo realizado em 2020 que relatou a prevalência de 30,5% de animais com endometrite em um universo de 215 éguas. Este estudo ainda aponta que a endometrite crônica, causada por agentes etiológicos bacterianos, é a mais comum no cenário nacional (SCHÖNIGER; SCHOON, 2020).

2.5 Endometrite em Éguas

A endometrite é a inflamação aguda ou crônica do tecido que reveste a cavidade uterina (endométrio). Esta infecção apresenta impactos diretos nas taxas de prenhez por comprometer a concepção, ocasionar perdas de embriões, gerar abortamentos, ocasionar placentites, promover o nascimento de potros com septicemia, promover o desenvolvimento de metrite, atrasos na concepção pós-parto (LEBLANC; CAUSEY, 2009) e, ainda, pode favorecer a

entrada de determinados patógenos (LEBLANC; CAUSEY, 2009; FERRIS et al., 2015). Os estudos sobre endometrite em equinos buscam elucidar os mecanismos fisiopatológicos relacionados ao baixo desempenho reprodutivo desses animais, uma vez que o quadro infeccioso pode levar à morte embrionária após a regressão antecipada do corpo lúteo - luteólise (SÁ et al., 2020).

A endometrite está associada à falta de aptidão uterina para promover a remoção de bactérias, fungos, sêmen e exsudato derivado de processos infecciosos do trato reprodutor e pode ter relação com inúmeros fatores, tais como alterações fisiológicas e/ou anatômicas. Estes fatores podem incluir inflamações de caráter crônico, cicatrizes no útero relacionadas a traumas anteriores, desequilíbrios endócrinos entre outras condições que possam afetar as funções e atividades do útero (RIDDLE et al., 2007; LEBLANC; CAUSEY, 2009).

Os processos de limpeza uterina são mecanismos naturais realizados pelas éguas por meio de contrações musculares do útero. Estas contrações ocorrem de forma cíclica, durante o ciclo estral, e são capazes de realizar a expulsão de flúidos intrauterinos que possam estar possibilitando a proliferação de alguns patógenos no trato reprodutivo do animal (fungos, bactérias, fluidos, por exemplo), protegendo o útero contra infecções. Mas podem ter sua atividade e função comprometidas em quadros de doenças que afetem o útero ou outras regiões do trato reprodutivo do animal (EVANS et al., 1987; WATSON, 1988; TROEDSSON et al., 1993; LEBLANC et al., 1994; TROEDSSON, 1997).

Outra estratégia de proteção está ligada a ocorrência do biofilme podendo promover dificuldades significativas para a eliminação de infecções crônicas, pois bloqueia o acesso dos anticorpos às bactérias situadas no interior do biofilme. (BROWN et al., 1988; ANWAR et al., 1992; STEWART; COSTERTON 2001; BORRIELLO et al. 2004; JEFFERSON et al., 2005; SHAH et al. 2006). Os biofilmes também desempenham a função de proteger as bactérias dos efeitos dos antibióticos, estabelecendo uma barreira de difusão que reduz a quantidade de agentes antibióticos que conseguem alcançar as colônias bacterianas protegidas. Existe o prevalecimento do estado de biofilme que corresponde a cerca de 99% da biomassa de bactérias em escala mundial, pois pode abrigar múltiplas espécies de bactérias, pode permitir o compartilhamento de material genético entre elas e o desempenho de nichos distintos dentro do próprio biofilme.

A formação do biofilme ocorre, em um primeiro momento, com a migração e a adesão das bactérias a uma superfície que pode ocorrer por movimentação realizada por flagelos, movimento de fatores do ambiente ou do hospedeiro. Em determinadas condições são ativados os genes produtores de polissacarídeos que irão constituir uma matriz de exopolissacarídeo que

se tornará a estrutura de ancoragem para o desenvolvimento da comunidade de biofilme. No contexto equino, os biofilmes desempenham um papel crucial nas infecções crônicas, incluindo aquelas que afetam o útero e que demonstram resistência aos tratamentos antimicrobianos que podem estar associados à formação de biofilmes (FERRIS, 2017).

A endometrite é uma condição prevalente em éguas, representando de 25% a 60% dos casos relacionados a doenças do trato reprodutivo. No entanto, é comum ocorrer subdiagnóstico dessa condição (LEBLANC; CAUSEY, 2009). O subdiagnóstico refere-se à situação em que a endometrite não é diagnosticada corretamente ou não é identificada em uma égua, resultando em uma falha ou atraso no diagnóstico. Isso significa que o animal pode estar sob essa condição, mas não ter recebido diagnóstico adequado ou nem mesmo ter sido diagnosticado. Isto representa implicações diretas nas questões econômicas relacionadas à criação e à comercialização desses animais (LISBOA, 2021). Trata-se de um tema de pesquisa amplamente explorado em Medicina Veterinária nas últimas décadas por se tratar de uma das principais causas associadas a quadros de subfertilidade em éguas (LEBLANC, 2010).

Dentre a diversidade dos quadros de endometrite em equinos, destacam-se a endometrite persistente pós-cobertura, a endometrite por doenças sexualmente transmissíveis, a endometrite crônica e a endometrite crônica degenerativa ou endometriose (CANISSO et al, 2020; LISBOA, 2021). Esta doença pode ser classificada em duas fases: fase aguda e fase crônica (HUGES; LOY, 1969).

A vulva, o complexo vestibulo-vaginal e a cérvix são estruturas anatômicas que realizam a proteção do útero e atuam como barreira física para a entrada de agentes patogênicos. A fossa do clítoris e a vagina atuam como reservatório de bactérias tendo a função de impedir a colonização por agentes patogênicos como fungos e bactérias. Se estas estruturas forem comprometidas, as éguas tornam-se predispostas a desenvolverem endometrite crônica (LEBLANC; CAUSEY, 2009). Esta predisposição pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: o longo período de cio; as condições da cérvix; a cópula; a inseminação artificial; a conformação perineal do animal e suas relações com as barreiras protetoras estabelecidas entre o meio externo e o ambiente intrauterino; a idade do animal (sendo que animais mais velhos apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de infecções intrauterinas); a disposição anatômica do útero e da borda pélvica que se relaciona com a capacidade e/ou obstáculo para a eliminação de material contaminante do ambiente intrauterino; o número elevado de partos (que pode se associar a uma resposta imune alterada); o desenvolvimento de fibrose do endométrio e/ou da cérvix; deficiência na atividade contrátil do miométrio e a excessiva manipulação do animal para fins reprodutivos (WOODWARD; TROEDSSON,

2013; MATTOS et al., 2021).

Em relação à origem etiológica, na maioria das vezes, esta doença apresenta origem bacteriana, sendo as bactérias *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* as mais identificadas nas culturas microbiológicas (STEWART et al., 2018). Todavia, os fungos leveduriformes e filamentosos, são potencialmente patogênicos para o endométrio das éguas (LEBLANC, 2010).

Esta doença pode ser multifatorial e ter sua origem em agentes infecciosos como vírus, fungos e bactérias, ser uma resposta associada à fisiologia do animal devido a uma IA, cobertura ou como resultado da lavagem intrauterina ou recuperação embrionária em decorrência da aplicação de fluido (WOODWARD; TROEDSSON, 2013). O reconhecimento da etiologia deste quadro clínico é de fundamental importância para o diagnóstico e tratamento da doença e a possibilidade de garantia do sucesso reprodutivo destes animais (BARBA et al., 2020).

Dentre os aspectos relacionados aos quadros de endometrite, os animais podem ser classificados da seguinte forma: éguas susceptíveis ou resistentes. Esta classificação se relaciona à atividade celular e humoral das éguas, associada à capacidade fagocitária dos neutrófilos no órgão; e a existências de mecanismos de defesa física (KENNEY; DOIG, 1986; FERRIS et al., 2015; FACTOR et al., 2019).

Considerando que existe uma diversidade de origens para a doença, seu diagnóstico é de extrema importância para o sucesso reprodutivo e para o bem-estar desses animais (FERRIS et al., 2015; FACTOR et al., 2019). A observação de aspectos clínicos como a eliminação de secreções pela comissura ventral vulvar, o aumento do volume vulvar, o retorno ao cio e a perda embrionária são informações que devem ser consideradas para o diagnóstico da doença (LISBOA, 2021).

Outros aspectos devem ser considerados no diagnóstico de endometrite: a avaliação do histórico do animal – que pode oferecer informações sobre a relação entre o número de temporadas em que a égua esteve vazia e sua idade; a inspeção – que visa observar a região perineal e a ocorrência de pneumovagina; a palpação retal – que, em associação com outros métodos de avaliação, pode oferecer informações sobre a ocorrência de líquido intraluminal ou cistos intrauterinos; a ultrassonografia – que permite a observação de alterações intrauterinas que não podem ser percebidas pela palpação retal, tais como a presença de ar, de líquidos, de cistos ou neoplasias intrauterinas; a vaginoscopia – que auxilia na identificação de alterações patológicas ou anatômicas e estágios do ciclo estral; o exame citológico e a biópsia – que são exames que podem complementar ou confirmar o diagnóstico de doenças intrauterinas pelo

exame da composição de fluidos e estruturas uterinas (FERRIS et al., 2015; FACTOR et al., 2019; ÁVILA, 2020).

O diagnóstico da endometrite equina pode ser realizado pela análise de dados como a cultura fúngica e bacteriana; exame citológico do útero, exame da mucosa vaginal visando a observação da ocorrência ou não do exsudato; exames de imagem (como ultrassonografia transretal para avaliação das características do trato reprodutivo); inspeção e observação da ocorrência de secreções na região perineal; o histórico do animal (por meio de informações como idade e número de crias, são relatados na anamnese); e palpação transretal (visando a avaliação do tônus uterino e atividade dos ovários). Estes são alguns exemplos de avaliações que de forma combinada podem aumentar a precisão do diagnóstico e, consequentemente, conduzir à melhora no tratamento, à saúde e ao bem-estar do animal e às chances de sucesso reprodutivo (CARNEIRO 2023).

Alguns casos são de difícil diagnóstico por se tratarem de infecções de caráter crônico ou por serem assintomáticos (LEBLANC; CAUSEY, 2009). Desta forma, há necessidade da realização de exames complementares no diagnóstico de endometrite para confirmação ou descarte do diagnóstico clínico. Os exames complementares podem ser o exame ultrassonográfico, a biópsia endometrial, a cultura bacteriana e fúngica com o antibiograma e antifungigrama e o exame citológico do endométrio (AULT-SEAY et al., 2023). A eficiência na obtenção das amostras está diretamente relacionada às confiabilidades dos resultados obtidos pelas análises e testes realizados nos laboratórios (RIDDLE et al., 2007).

2.6 Citologia Endometrial

Avaliar a citologia endometrial de éguas requer a coleta e interpretação das células que revestem o útero e seu lúmen (MCKINNON; VOSS, 1995). O exame é comumente realizado em éguas destinadas à reprodução como parte da rotina de diagnóstico da endometrite, juntamente com a cultura uterina (LEBLANC; CAUSEY, 2009). Isso ocorre porque o exame é uma maneira rápida e eficaz de diagnosticar a inflamação do endométrio, fornecendo resultados logo após a coleta da amostra e por se tratar de uma opção relativamente acessível e simples de realizar (VARELA BETTENCOURT et al., 2018).

Em muitos casos, é possível diagnosticar a endometrite por meio de resultados de citologia, permitindo o início da terapia adequada antes mesmo da obtenção do resultado completo do exame ginecológico (FERRIS, 2016). A principal desvantagem do exame citológico está em não fornecer informações suficientes sobre a etiologia do processo

inflamatório (VARELA BETTENCOURT et al., 2018).

Recomenda-se fazer o esfregaço imediatamente após a coleta da amostra, independentemente do método utilizado. Para preservar a arquitetura celular, as lâminas contendo os esfregaços devem ser deixadas secar ao ar ou, se a coloração for realizada após 12 horas da coleta das amostras, é recomendado o uso de um fixador. A secagem ao ar das lâminas apresenta menor perda de células em comparação a outros métodos, porém o detalhe celular pode ser comprometido. Quando as amostras contêm muco em excesso, a identificação das células pode se tornar difícil e nesses casos, o uso de um fixador é aconselhado, pois preserva o detalhe celular. Uma alternativa é utilizar a coloração de Romanowsky (LEBLANC, 2011; FERRIS, 2016).

De acordo com Ferris (2016), a avaliação das lâminas deve ser realizada de maneira sistemática e minuciosa, começando pela ampliação baixa para determinar se há celularidade suficiente para uma interpretação precisa. Se a amostra for considerada de boa qualidade, a lâmina é então examinada em ampliações de 400 e 1000 vezes em óleo de imersão, em múltiplos campos, para identificar a presença de células epiteliais uterinas, glóbulos brancos, detritos, glóbulos vermelhos, bactérias, leveduras, organismos fúngicos e espermatozoides. As amostras com escassa celularidade, incapazes de fornecer um diagnóstico preciso, não devem ser submetidas à análise. É importante salientar que a presença de eritrócitos e leucócitos polimorfonucleares no esfregaço pode dificultar a interpretação dos resultados, em especial em casos em que tal condição seja decorrente do uso vigoroso de dispositivos de coleta endouterina (WALTER et al., 2012).

A avaliação da inflamação em esfregaços citológicos é baseada predominantemente em dois métodos distintos. São eles: (1) a contagem de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) por microscopia óptica e (2) a determinação da porcentagem de PMNs em relação às células endometriais. Embora o neutrófilo seja o PMN mais comumente encontrado e utilizado para tais fins, em alguns casos, os eosinófilos também podem ser identificados. É relevante destacar que a escolha do método utilizado para a avaliação pode acarretar em um impacto significativo nos resultados obtidos, independentemente da forma de coleta da amostra (VARELA BETTENCOURT et al., 2018). Todavia, é pertinente ressaltar que, até o momento, não se estabeleceu consenso acerca dos critérios de leitura para a interpretação dos resultados obtidos por meio dos métodos mencionados, fato que tem dificultado a delimitação de um padrão metodológico que possa ser adotado de maneira ampla e sistemática (CARD, 2005; COCCHIA et al., 2012; VARELA BETTENCOURT et al., 2018).

Foi estabelecido por Riddle et al. (2007) que, para aferir a intensidade da inflamação no

endométrio, seria necessário selecionar aleatoriamente dez campos de alta potência (com aumento de 400 vezes) de cada esfregaço, cujos polimorfonucleares neutrofílicos (PMNs) seriam contabilizados e, em seguida, seria aferido o valor médio. Desse modo, a gravidade da inflamação seria categorizada em três níveis distintos: ausente (0-2 PMNs), moderada (2-5 PMNs) ou grave (acima de 5 PMNs).

Leblanc (2011) e Cocchia et al. (2012) adotam a classificação proposta por Riddle et al. (2007), contudo, outros pesquisadores se valem de diferentes modalidades de avaliação da gravidade da inflamação endometrial. Factor et al. (2019) estabelecem a classificação como leve para os graus 1 a 2, moderada para os graus 3 a 5 e intensa para os graus superiores a 5. Por sua vez, Reilas e Katila (2002) adotam uma escala que classifica a inflamação como leve, moderada ou intensa com base em valores numéricos: de 1 a 10 para inflamação leve, acima de 10 para inflamação moderada e grandes aglomerados para inflamação intensa.

Porém, a porcentagem mínima de PMNs para a égua ser considerada com inflamação e estipular a gravidade do processo quando este estiver presente, ainda difere entre os estudos. Isto ocorre devido à falta de consenso sobre o valor fisiológico de PMNs durante a fase de estro, uma vez que, nesta fase a migração de neutrófilos para o lúmen uterino é maior devido à predominância do estrogênio (LEBLANC, 2011).

Varela-Bettencourt et al. (2018), ao compararem os dois métodos de avaliação da inflamação em esfregaços citológicos, ou seja, a determinação da porcentagem de PMNs em relação às células endometriais e o número de PMNs em campos de alta potência, observaram que a interpretação baseada na porcentagem de PMNs resultou em um diagnóstico de endometrite mais sensível, em relação ao outro método. Não se alcançou, até o presente momento, um acordo geral acerca das orientações a serem seguidas na análise e interpretação dos desfechos obtidos (OVERBECK et al., 2011; CARD, 2005; COCCHIA et al., 2012). Essa condição pode acarretar em erros de diagnóstico tanto positivos quanto negativos, conduzindo a um tratamento inadequado e ineficaz, o que repercute negativamente no sucesso terapêutico e, consequentemente, na fertilidade dos animais (VARELA-BETTENCOURT et al., 2018).

2.7 Cultura Microbiológica Uterina

A cultura microbiana subsequente à colheita de amostras intrauterinas é uma prática comum na medicina reprodutiva equina devido à sua praticidade, simplicidade e baixo custo. A detecção de microrganismos durante esse procedimento tem sido consistentemente associada à redução das taxas de gestação, independentemente dos achados citológicos, conferindo,

portanto, uma elevada importância para a avaliação ginecológica e diagnóstico de endometrite infecciosa (LEBLANC; CAUSEY, 2009).

No ambiente laboratorial, as amostras são cultivadas em placas de meios de cultura, seguindo técnicas laboratoriais padrão para evitar contaminações ambientais. A incubação das amostras ocorre em ambiente aeróbico a 37 °C por até 48 horas, uma vez que os microrganismos anaeróbios não desempenham papel relevante na endometrite equina. As culturas são examinadas após 24 e 48 horas (RICKETTS; MACKINTOSH, 2016).

Geralmente, a detecção do crescimento bacteriano é possível dentro de um período de 24 horas, enquanto os fungos demandam um tempo maior para se desenvolverem (MCKINNON; VOSS, 1995). O diagnóstico é fundamentado na análise de critérios como o tamanho da colônia, sua morfologia, pigmentação e hemólise, e para tal é essencial a habilidade e experiência do técnico responsável que, por meio da aparência das colônias, é capaz de identificar a maioria dos patógenos aeróbicos equinos. Além disso, uma técnica de inoculação adequada é crucial para garantir uma separação adequada das colônias e, assim, facilitar sua identificação (RICKETTS; MACKINTOSH, 2016).

É possível utilizar meios de cultura especiais e testes para uma identificação mais precisa dos microrganismos presentes, como o ágar de seleção cromogênica, em que os substratos cromogênicos são adicionados e liberam corantes específicos quando hidrolisados por enzimas de microrganismos patogênicos específicos (BEEHAN; MCKINNON, 2009).

Segundo Reilas e Katila (2002), as colônias podem ser meticulosamente contabilizadas e classificadas em Unidades Formadoras de Colônia (UFC), de acordo com o seu crescimento, sendo: 0 UFC para ausência de crescimento; 1 a 10 UFC para baixo crescimento; 11 a 100 UFC para crescimento moderado; e acima de 100 UFC, ou crescimento demasiado, impossível de contar. Em éguas com infecção uterina, as bactérias e fungos são frequentemente isolados em culturas laboratoriais, sendo que as bactérias são mais comuns do que os fungos. Dentre as bactérias mais isoladas, a *Streptococcus zooepidemicus* é a principal, seguida pela *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, conforme estudos realizados por Mckinnon e Voss (1995), Riddle et al. (2007), Nielsen et al. (2010) e Canisso et al. (2020). Entretanto, outros estudos relatam a *Escherichia coli* como a principal bactéria isolada (LEBLANC; CAUSEY, 2009; CHRISTOFFERSEN et al., 2015).

Diversas espécies de fungos também já foram isoladas em amostras coletadas de órgãos reprodutivos de éguas, entretanto, *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. são as mais prevalentes, conforme relatos (LEBLANC; CAUSEY, 2009; SILVA; ALVARENGA, 2011; RIBAS et al., 2014). Outras bactérias aeróbias, embora menos comuns, também foram identificadas em

culturas, tais como *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Actinobacter spp.*, *Proteus spp.* e *Citrobacter spp.* (STEWART et al., 2018). Para determinar o melhor tratamento, testes de susceptibilidade a antimicrobianos podem ser realizados nos microrganismos cultivados, sendo fundamental que a terapia seja ajustada de acordo com os resultados obtidos a partir da cultura e tais testes (MCKINNON; VOSS, 1995).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar quantitativa e qualitativamente os microrganismos encontrados no endométrio de éguas de diferentes faixas etárias.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar a incidência de contaminação fúngica e/ou bacteriana em éguas de diferentes faixas etárias.
- Comparar a incidência de contaminação fúngica e/ou bacteriana com a citologia endometrial em éguas de diferentes faixas etárias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) sob o número de processo 0179-09-2022 (Anexo 1). Durante a condução do experimento foram seguidos os princípios éticos e legais estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

4.1 Animais e Local do Experimento

Foram selecionadas 46 éguas saudáveis da raça Mangalarga Marchador, não gestantes, com idade entre 2 e 18 anos, oriundas do plantel pertencente ao Setor de Matrizes da UFRRJ. As éguas foram divididas em três grupos experimentais levando-se em consideração sua idade e estágio reprodutivos:

- Grupo 1 (G1; n = 10): éguas nulíparas e com idade entre 2 e 4 anos;
- Grupo 2 (G2; n = 17): éguas em idade reprodutiva apresentando entre 3 e 10 anos e que já tiveram cria ou já foram cobertas ou inseminadas anteriormente;
- Grupo 3 (G3; n = 19): éguas em idade reprodutiva entre 11 e 18 anos e que já tiveram cria ou já foram cobertas ou inseminadas anteriormente.

Os animais foram tratados com fornecimento de volumoso composto por Tifton 85, em sistema extensivo, suplementação de sal mineral, 1 kg de ração à base de concentrado com teor proteico de 10% e água potável *ad libitum*. O experimento foi conduzido no Setor de Matrizes da UFRRJ, em Seropédica, Baixada Fluminense, Zona Oeste do Rio de Janeiro (Figuras 5 e 6).



Figura 5. Animais criados em sistema extensivo recebendo suplementação diária.
Fonte: arquivo pessoal



Figura 6. Trato diário oferecido às éguas individualmente.
Fonte: arquivo pessoal

4.2 Coleta e Preparo de Material Intrauterino

Nos três grupos determinados para esta pesquisa, foi realizado o acompanhamento do ciclo estral por meio de exame ultrassonográfico por via transretal (ultrassom modelo

DM10V.PRO, com transdutor linear de 5 Mhz). Quando as fêmeas apresentaram folículo com diâmetro $\geq 35\text{mm}$ e edema uterino grau 3, em escala de 1 a 5 (GINTHER; UTT, 2004), foi realizada coleta de material intrauterino.

A preparação para a coleta de material foi realizada com as éguas devidamente contidas em tronco de palpação, com a cauda suspensa e amarrada. O conteúdo fecal presente na ampola retal foi removido manualmente, para que durante o procedimento de coleta do material intrauterino, o animal não defecasse e contaminasse a amostra. Em seguida, foi realizada avaliação ultrassonográfica dos ovários e útero assim como higienização de toda a região perineal com água e sabão neutro e posterior secagem com papel toalha. A coleta do material foi realizada utilizando swab uterino estéril contendo meio de transporte Stuart e luva de palpação estéril, que foi introduzido no útero das éguas através da cérvix, acomodado dentro da pinça ginecológica, previamente esterilizada utilizando técnica de flambagem com auxílio de álcool a 70°, com a finalidade de manter o equipamento estéril para a coleta do material sem que houvesse nenhum tipo de contaminação externa. Desta forma, a pinça era acomodada na palma da mão do responsável pela coleta, com o intuito de protegê-la e imediatamente introduzi-la a mão com a pinça ginecológica no vestibulo vaginal, ascendendo até a entrada da cérvix e encaminhando apenas o swab, para dentro da cavidade uterina, onde eram realizados dez movimentos de rotação para coleta do material endometrial (Figura 7, 8, 9 e 10).



Figura 7. Éguas contidas em brete para avaliação e coleta de material.
Fonte: arquivo pessoal



Figura 8. Avaliação ultrassonográfica de ovário equino para determinação do diâmetro folicular.

Fonte: arquivo pessoal



Figura 9. Swab estéril em meio de transporte Stuart e escova citológica estéril.

Fonte: arquivo pessoal

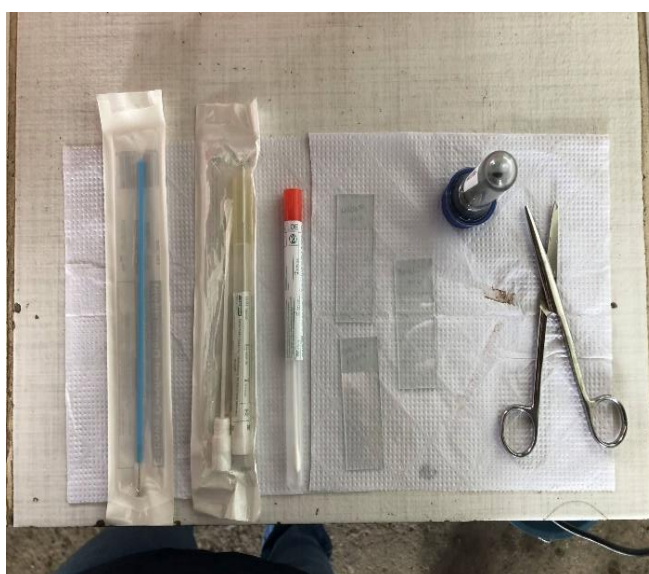


Figura 10. Material utilizado individualmente para cada animal.

Fonte: arquivo pessoal

Em sequência, o swab era retirado da cavidade uterina, reposicionado na pinça ginecológica e novamente protegido até que fosse totalmente retirado do trato reprodutivo da égua. Esse procedimento foi repetido duas vezes com o swab, para que fosse efetuada a coleta de material para isolamento fúngico e bacteriano pelo laboratório. A última coleta de material realizada foi com a escova citológica, utilizando a mesma técnica aplicada com a utilização do swab e com o auxílio da pinça ginecológica, para confecção de três esfregaços em lâmina de vidro.

Os esfregaços foram preparados imediatamente após a coleta do material. As três lâminas de vidro foram separadas, posicionadas em ambiente higienizado previamente com álcool 70% sob uma folha de papel toalha e identificadas com o nome de cada animal e data da coleta. Ao retirar a escova do trato reprodutivo das éguas, contendo amostras de células endometriais, a mesma era posta em contato com a lâmina de vidro. Foram realizados movimentos leves com a escova citológica sobre a lâmina para espalhar o conteúdo da amostra por toda a extensão da mesma, de forma homogênea.

Após esta etapa, as lâminas ficaram sobre o papel toalha por aproximadamente dez minutos ou até que todo o conteúdo coletado secasse e pudesse permanecer fixo na lâmina. Com as lâminas secas, estas foram submetidas ao processo de fixação para preservação das células e para evitar deterioração. Neste estudo, como método de coloração, foi utilizado um *kit* de Panótico rápido composto por três etapas (Figuras 12 e 13): 1ª etapa - realizada com álcool como solvente de fixação por um minuto, responsável por desidratar as células presentes no esfregaço, removendo a água e fixando as estruturas celulares na lâmina; 2ª etapa - realizada com o corante eosina por 10 segundos, um corante ácido que se liga a componentes básicos presentes no citoplasma das células, proporcionando uma coloração de rosada à alaranjada às estruturas plasmáticas; e 3ª e última etapa realizada, também por 10 segundos, com o azul de metileno, um corante básico que se liga a componentes básicos do núcleo celular. Ele colore o núcleo das células em tons de azul, facilitando a identificação das características nucleares, como a forma, tamanho e estrutura do núcleo (Figuras 11 e 12).



Figura 11. Lâminas antes de serem coradas em panóptico.
 Fonte: arquivo pessoal



Figura 12. Técnica de coloração Panótico.
 Fonte: arquivo pessoal

Após a última etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente suavemente para a remoção do excesso de corante. As lâminas foram acomodadas inclinadas em uma bandeja plástica para que secassem completamente e ficassem em condições de serem avaliadas por meio de exame microscópico (Figura 13).

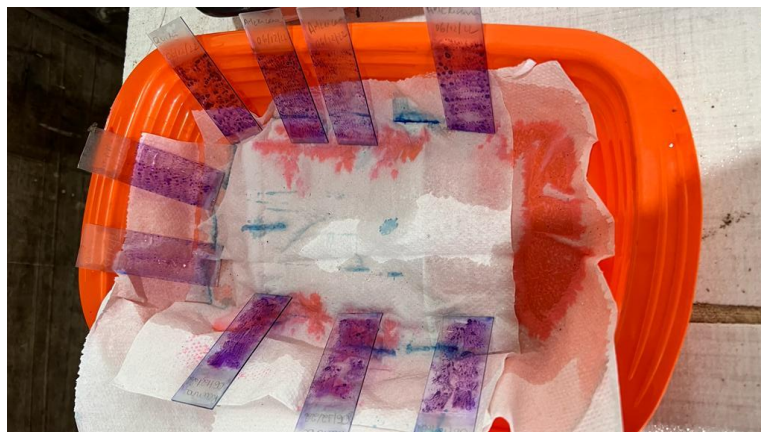


Figura 13. Esfregãos corados em panótico rápido.
Fonte: arquivo pessoal

4.3 Citologia Endometrial

A leitura das lâminas foi realizada em microscopia óptica com aumento de 400 e 1000X, sendo esta última com auxílio do óleo de imersão, utilizado para aumentar a resolução e melhorar a qualidade da imagem em ampliações muito altas, minimizando a refração da luz entre a lente objetiva e a amostra.

A análise das amostras foi realizada com a contagem de células, diferenciando-as em epiteliais uterinas e polimorfonucleares – PMN (neutrófilos, macrófagos e eosinófilos) e outras células que estivessem presentes e que apresentassem relevância em 10 campos aleatórios na lâmina. Em seguida, foi realizada a avaliação da porcentagem de neutrófilos, por terem sido encontrados em maior quantidade nas amostras e por serem células específicas do sistema imunológico capazes de caracterizar a ocorrência de processos inflamatórios e/ou infecciosos (Figuras 14, 15 e 16) .

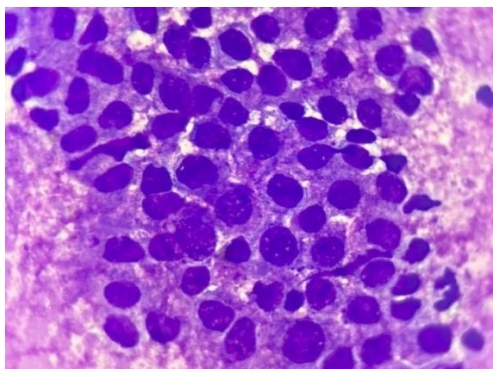


Figura 14. Citologia endometrial de uma égua sem alteração, presença de muco abundante, precipitado eosinofílico e células epiteliais. Coloração pelo método Panótico rápido, aumento de aumento 1000X.
Fonte: arquivo pessoal

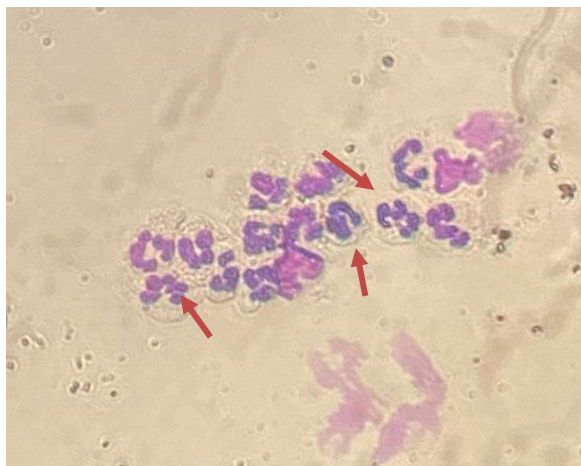


Figura 15. Citologia endometrial, evidenciando a presença de neutrófilos (marcação em vermelho). Coloração pelo método Panótico rápido, aumento de 1000X.
Fonte: arquivo pessoal

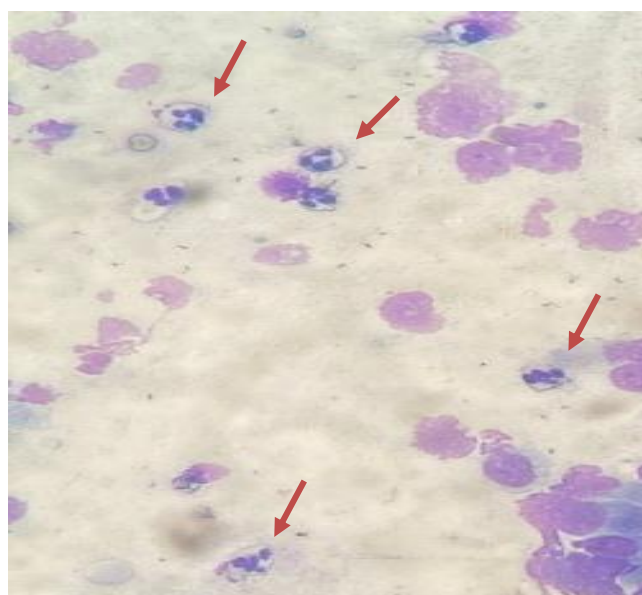


Figura 16. Citologia endometrial, evidenciando a presença de neutrófilos (marcação em vermelho). Coloração pelo método Panótico rápido, aumento de 1000X.
Fonte: arquivo pessoal

4.4 Análise Laboratorial

Para o isolamento bacteriano e fúngico, os swabs uterinos foram encaminhados ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LABCVET) e ao Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (LLPA) da UFRRJ, à temperatura ambiente, no mesmo dia do procedimento de coleta e em meio Stuart. O meio Stuart é utilizado para o transporte de amostras clínicas com o intuito de preservar microrganismos patogênicos e não patogênicos, como bactérias e fungos. Trata-se de uma solução tamponada composta por tampão fosfato,

cloreto de sódio, carboidratos e agente redutor.

4.4.1 Cultura Bacteriana

Os swabs recebidos pelo laboratório de bacteriologia foram semeados em duas placas com meios de cultivo para isolar e identificar diferentes grupos bacterianos: Ágar sangue de carneiro a 5% e Ágar azida sangue de carneiro a 5% para isolamento e identificação fenotípica do endométrio uterino das éguas. O Ágar Sangue de Carneiro a 5% (ASC- HiMedia®) é um meio enriquecido e não seletivo e o meio mais seletivo Azida Sangue de Carneiro a 5% (AZS- HiMedia®) para direcionar a pesquisa para *Streptococcus spp* e *Enterococcus spp*. Placas com esse meio ficaram em jarra sob anaerobiose. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas e quando não se observava crescimento durante esse período, era deixado por mais 24 horas, totalizando 48 horas. Após avaliação do crescimento e características das colônias, testes presuntivos por coloração de Gram, catalase e Hidróxido de potássio (KOH) 3% foram realizados nas colônias isoladas segundo Koneman et al. (2020), (Figura 17 e 18).



Figura 17 Placa de Petri em meio Ágar Sangue . Placas de Petri em meio Ágar Sangue e Azida semeadas e acondicionadas em estufa a 37°C.

Fonte: arquivo pessoal



Figura 18. Placas de Petri semeadas e mantidas em estufa a 37°C por 24/48 horas. Após período em estufa, placas apresentando colônias a serem identificadas.

Fonte: arquivo pessoal

- **Gram:** para identificar se a colônia bacteriana é gram-positiva ou gram-negativa, é realizada coleta de uma amostra da colônia e feita fixação em lâmina de vidro com solução salina próxima à chama do bico de Bunsen e em seguida é feita a coloração técnica descrita a seguir:

- Cristal violeta – 1 minuto;
- Água corrente;
- Lugol – 1 minuto;
- Lavagem com Álcool;
- Água corrente;
- Fucsina - 40 segundos.

A partir da confecção das lâminas e coloração, a interpretação de algumas informações relevantes sobre as bactérias encontradas puderam ser identificadas, quanto ao formato: cocos (redondo), cocobacilos (ovóide), bacilos (bastão alongado) e bastonetes (bastões curtos) e quanto a sua disposição: cachos, cadeias curtas e cadeias longas.

- **Catalase:** foi verificado se a bactéria teria capacidade de transformar peróxido de hidrogênio em água com a presença da enzima catalase. Para isso, foi utilizada uma gota de água oxigenada sobre um pouco das bactérias encontradas. Havendo formação de bolhas o resultado foi considerado positivo, caso contrário, negativo. Em relação à interpretação dos resultados pode-se concluir que:

- POSITIVO - *Staphylococcus spp.*
- NEGATIVO - *Streptococcus spp.* e *Enterococcus spp.*

- **KOH 3%:** foi utilizada uma gota de KOH 3% e colocada a amostra de bactéria sobre ela. Sendo uma bactéria gram-negativa, havia formação de um fio viscoso por conta da destruição da camada de peptidoglicano e exposição do material genético da bactéria, o que por sua vez era considerado um resultado positivo para esta prova. Caso o resultado fosse negativo, a bactéria era uma gram-positiva.

Os procedimentos laboratoriais, visando atender à hipótese desta investigação, foram realizados seguindo os direcionamentos estabelecidos para os meios seletivos:

- Gram-negativos fermentadores identificados a partir do isolamento fenotípico: bastonetes e/ou cocobacilos gram-negativos foram isolados e identificados por meio da bateria de testes bioquímicos utilizando o Indol, Metil Vermelho, Voges-Proskauer e Citrato (IMViC) e meio Ágar Três Açúcares Ferro (TSI). Este procedimento contou com a avaliação pela produção de Indol e as seguintes análises por via fermentativa dos ácidos mistos pelo corante Vermelho de Metila (VM), por via do butilenoglicol pelo teste Voges-Proskauer (VP), a ocorrência da utilização do Citrato de Simmons e ocorrência da fermentação dos açúcares glicose, lactose e sacarose e avaliação de produção de gás em TSI (KONEMAN et al., 2020).

Os procedimentos para identificação do fenotípico observado nas cepas gram-positivas foram realizados pelos seguintes protocolos:

- *Staphylococcus spp.*: o isolamento e a identificação de cocos gram-positivos foram realizado pelo teste antimicrobianos Sensifar-Cefarr por meio da observação da catalase positiva, da prova da coagulase e resistência à bacitracina (0,04 Unidade Internacional -UI). Bactérias do gênero *Staphylococcus* possuem resistência à bacitracina e apresentam crescimento até as bordas do disco e os micrococos, por sua vez, apresentam sensibilidade e por isso se desenvolve um halo de 10mm, no mínimo. Os testes que envolvem a verificação da coagulase são utilizados para a caracterização de grupos de estafilococos coagulase-positivos e coagulase negativos. O isolamento de coagulase-positivos foi realizado posterior aos testes de fermentação dos carboidratos e envolveram: maltose e manose, resistência a polimixina B e prova de VP para a identificação das espécies (KONEMAN et al., 2020).

Os gêneros isolados identificados como coagulase-positivos foram posteriormente submetidos aos testes de fermentação dos carboidratos:

- *Enterococcus spp.* e *Streptococcus spp.*: para os isolados identificados como cocos gram-positivos catalase negativos, hemolíticos ou não, as amostras foram submetidas à prova

de bile-esculina, crescimento em caldo BHI (Brain Heart Infusion HIMEDIA) hipertônico (6,5% de NaCl) e açúcares (sorbitol e arabinose) para diferenciação de espécies de *Enterococcus* spp. (KONEMAN et al., 2020).

4.4.2 Cultura Fúngica

Os swabs recebidos pelo laboratório de micologia no LLPA foram identificados segundo Kurtzman et al. (1998), Kurtzman et al. (2011) e Hoog et al. (2020) prioritariamente e complementarmente seguindo o protocolo de identificação de leveduras do Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (Anexo 1) para possíveis isolados de *Candida albicans* e *C. dubliniensis*. Foram consideradas, além das características morfológicas e culturais, as características nutricionais dos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* etc, como a assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas.

Produção de tubo germinativo: o início da rotina de identificação envolveu provas de produção de tubo germinativo. Repiques recentes de 24 – 48 horas das amostras foram inoculadas em tubos tipo “eppendorf” esterilizados contendo soro sanguíneo equino também esterilizado por filtração em membrana Millipore de 0,22 μ . Os tubos inoculados foram incubados em estufa microbiológica a 37°C por um período de 2 a 3 horas, quando passou-se a observar a estrutura por microscopia ótica com aumento de 1000 X, mediante a confecção de lâminas (preparado de uma gota do soro com nigrosina entre lâmina e lamínula). A presença de tubo germinativo caracteriza a espécie *Candida albicans* ou *Candida dubliniensis*.

Cultivo em ágar fubá – posteriormente, foram realizadas as provas de produção de clamidoconídios, artroconídios e blastoconídios de acordo com a metodologia descrita por Yarrow e Meyer (1978). Placas de Petri descartáveis de 50 mm de diâmetro contendo uma camada baixa de ágar fubá foram semeadas em suas superfícies com as amostras fúngicas isoladas e, em seguida foram cobertas com lamínula estéril e incubadas a 36°C. A leitura foi realizada após 48 a 72 horas com uma focalização direta sobre a lamínula utilizando-se aumento de 400 X. Esta prova permite a observação de clamidoconídios, uma forma de resistência fúngica, que auxilia na identificação de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis* por serem as espécies que os produzem. Permite ainda a visualização de hifas verdadeiras, pseudo-hifas e blastoconídios, assim como de sua ramificação e artroconídios, importantes na identificação de *Geotrichum* spp, *Trichosporon* spp e *Pichia* spp. Os artroconídios são produtos da fragmentação transversal de hifas formadas por alguns fungos,

dentre os quais destacam-se as três leveduras mencionadas anteriormente, que são filamentosas.

Auxanograma – Como provas de identificação das amostras, foram realizadas provas de auxanograma que consistem em testes de assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas. Para realizar estas provas, foram utilizados os meios *Yeast Nitrogen Base* (YNB) e *Yeast Carbon Base* (YCB) – DIFCO ®. O primeiro é isento de fontes de carbono e o segundo é isento de fontes de nitrogênio. Os inóculos para os meios foram preparados de acordo com as especificações do fabricante. Inicialmente, o inóculo do meio foi padronizado em suspensão salina de acordo com o grau 3 da escala de Mc Farland, procedimento realizado com todos os isolados. A viabilidade das células trabalhadas foi garantida com a utilização de repiques recentes das amostras (24-48 horas). Uma alíquota de 1 mL da suspensão foi transferida para as placas de Petri que foram imediatamente cobertas com o meio YNB previamente fundido, resfriado e mantido em banho Maria a 50 °C. Em seguida, foi feita a transferência do meio para as placas, realizando-se a sua homogeneização e resfriamento em temperatura ambiente, para que o meio pudesse atingir a solidificação. Cada placa foi identificada de acordo com o número da amostra e com as fontes carbonadas utilizadas. As fontes carbonadas foram, então, depositadas na superfície do meio solidificado, totalizando 4 fontes por placa conforme a Figura 19. Terminado este procedimento, o material foi incubado a 36 °C por até 72 horas com leituras a partir das primeiras 24 horas. Os resultados positivos de assimilação eram computados de acordo com o crescimento das leveduras na região onde a fonte específica foi aplicada.

Para os **testes de assimilação de fontes nitrogenadas** foi utilizado o mesmo procedimento, utilizando-se o meio YCB. As identificações finais foram baseadas no perfil de assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas, específicas de cada levedura como verificado no anexo 2.

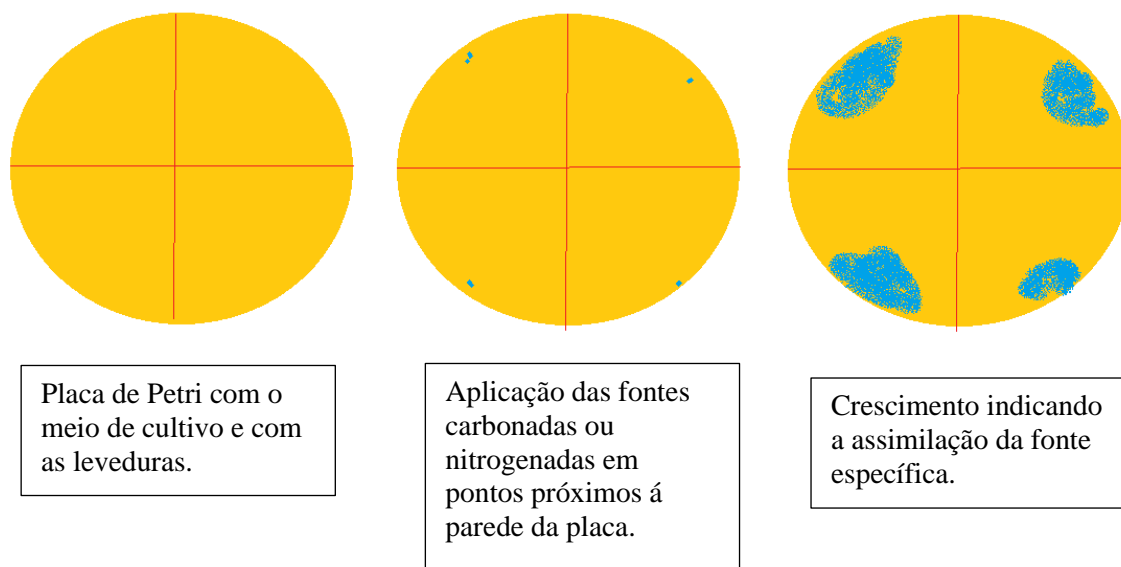


Figura 19. Esquema de testes de assimilação de fontes nitrogenadas.

Fonte: Francisco de Assis Baroni

Zimograma – teste de fermentação realizado para as fontes carbonadas rafinose, glicose, lactose, maltose, sacarose, trealose e galactose. No procedimento foram empregados tubos de ensaio com tampa de baquelite rosqueável, contendo em seu interior caldo peptonado (água destilada acrescida de peptona de caseína) distribuído em volumes iguais (3 mL). Cada microrganismo a ser identificado necessitava de uma bateria de 7 tubos. Cada tubo recebeu, além do caldo peptonado, um tubo invertido (tubo de Durhan) e uma destas fontes diferentes. Cada bateria com as fontes, o tubo de Durhan e o caldo foram inoculadas com o microrganismo e em alguns casos (com exceção das identificações de espécies de *Candida*) havia um indicador de pH (azul de bromotimol). O tubo de Durhan faz-se necessário devido à produção de gás no caso de fermentação positiva. O indicador de pH era necessário devido a possível produção de ácido no processo fermentativo. Considera-se que na fermentação pode haver produção de gás, ácido ou ambos. Nas identificações de *Candida*, considera-se somente a produção de gás. O meio é esterilizado por autoclavação, mas as fontes carbonadas são esterilizadas por filtração e acrescentadas assepticamente *a posteriori*. Após isso, os microrganismos eram adicionados (1,5mL de uma suspensão de 10^6 células/mL). A fermentação com produção de ácido ocorria pela viragem de cor do meio para amarelo, enquanto a produção de gás era notada pela presença de bolha ou bolhas dentro dos tubos invertidos. A incubação era feita por até 14 dias a 36 °C. Cada levedura com capacidade de fermentação apresentava um perfil específico como pode ser verificado no Anexo 3. Embora nem todas as leveduras possuam capacidade fermentativa o teste deve ser realizado pelo menos para a glicose.

Prova de produção de urease em meio de Christensen. O meio de Christensen era constituído por uma solução base de uréia e de outros componentes indispensáveis ao crescimento microbiano. Possuía um indicador de pH, conhecido como vermelho de fenol. Após preparo apresentava pH ácido. Quando o microrganismo era inoculado e possuía a capacidade de produção de urease, esta enzima hidrolisava a uréia e os produtos resultantes desta hidrólise promoviam a alcalinização do substrato fazendo com que o pH se elevasse e com que o revelador de pH tornasse o meio de cor rosa avermelhada, semelhante a um “rosa choque” ou “*pink*”.

4.5 Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizado o teste do χ^2 (Qui-quadrado) com nível de significância de 5% (IC 95%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Crescimento Bacteriano

A análise da composição da microbiota uterina em éguas de diferentes faixas etárias proposta nesta pesquisa buscou a identificação de correlações entre a microbiota, a idade e o manejo reprodutivo desses animais.

Alguns estudos discutem que a população de microrganismos presentes no útero das éguas pode sofrer, por exemplo, transformações ao longo da vida reprodutiva do animal, devido a variações endócrinas que afetam o pH e a composição da microbiota nessa região (BEEHAN; MCKINNON, 2009; WOODWARD; TROEDSSON, 2015; CHRISTOFFERSEN; TROEDSSON, 2017; AEKNATH VIRENDRA, et al, 2022).

Neste estudo que possui caráter comparativo em grupos de éguas de diferentes idades e condições reprodutivas, foi observado que a composição da microbiota intrauterina desses animais apresentou variação de acordo com a idade do animal e seu manejo reprodutivo (éguas receptoras, doadoras e matrizes). A composição e a diversidade da população da microbiota variou de acordo com o avanço da idade do animal, assim como a frequência com que esses microrganismos foram encontrados, como observado na tabela 1. Estes resultados são similares aos observados por Troedsson (2006), Christoffersen e Troedsson (2017), Morris et al (2020) Fawcett et al (2021) e pode estabelecer que, mesmo que exista uma diversidade de fatores que possam influenciar quantitativa e qualitativamente a composição da microbiota intrauterina de éguas, existe um padrão que pode ser estabelecido possuindo a idade do animal como parâmetro de análise.

A comparação da composição da população desses microrganismos revelou que o gênero *Bacillus sp.* é aquele comum a todos os grupos de animais que compõem esta investigação. Os resultados obtidos nesta pesquisa e a comparação com os resultados obtidos em outras pesquisas, como aquelas realizadas por Amaral et al (2007), Beehan e Mckinnon (2009), Azarvandi et al (2017), Bandeira et al (2017) e Silva Filho et al (2021), proporcionam uma compreensão mais abrangente dos agentes etiológicos relacionados ao desenvolvimento e progressão da endometrite. Esses resultados enfatizam a importância dos diagnósticos etiológicos, que podem contribuir de maneira eficaz com os tratamentos e o manejo desses

animais.

Tabela 1: Comparação entre as frequências de crescimento bacteriano e tipos de bactérias entre as amostras coletadas.

Tipo de bactéria	G1	G2	G3	Total
<i>Bacillus spp</i>	10,0%	35,3%	42,1%	15
<i>Staphylococcus sp.</i>	10,0%	11,8%	10,5%	05
<i>Enterococcus sp./Streptococcus sp.</i>	0	5,9%	0	01
<i>Staphylococcus sp./Streptococcus sp./Enterococcus sp.</i>	10,0%	0	0	01
<i>Staphylococcus sp./Bacillus sp.</i>	0	0	10,5%	02
Sem crescimento	70,0%	47,0%	36,9%	24
Total	03/07	09/08	12/09	24/24

Grupos etários: G1 (n = 10) - éguas em fase pré-reprodutiva com idade entre 2 e 4 anos; G2 (n = 17) - éguas em fase reprodutiva com idade entre 5 e 10 anos; e G3 (n = 19) - éguas em fase reprodutiva com idade entre 11 e 18 anos.

Existe uma variação entre as espécies de bactérias que colonizam o endométrio de éguas que compõem este estudo. Os principais gêneros identificadas foram: *Bacillus spp*, *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* e *Streptococcus sp.* Esses microrganismos estavam presentes no útero de éguas saudáveis em quantidades que não impactaram na saúde do animal, bem como em quadros de endometrite (Tabela 1). Esta condição também foi descrita em outros estudos como aqueles realizados por Beehan e McKinnon (2009), Azarvandi et al (2017), Bandeira et al (2017) e Silva Filho et al (2021).

Este estudo observou que os animais que pertenciam ao grupo G1 não possuíam diferenças significativas entre as proporções de gêneros de bactérias encontradas; os animais do grupo G2 tinham mais indivíduos com bactérias dos gêneros *Staphylococcus* que os grupos G1 e G3; e as éguas do grupo G3 apresentavam maior incidência de bactérias do gênero *Bacillus*. O gênero *Streptococcus* não foi encontrado no grupo G3, o que pode estar relacionado a idade dos animais e ao seu histórico de tratamentos anteriores realizados por médico veterinários (Tabela 1).

A colonização bacteriana pode sofrer inúmeras influências, relacionadas ao local onde os animais vivem, ao status reprodutivo, à idade e ao manejo reprodutivo desses animais. Assim, não foi possível estabelecer um padrão genérico para os gêneros de bactérias encontradas no endométrio de éguas que fizeram parte desta pesquisa. De forma comparativa, esses resultados também foram identificados em pesquisas como aquelas realizadas por Beehan e McKinnon (2009), Morris et al (2020),

A comparação do crescimento bacteriano entre os grupos estudados pode ser observada na tabela 2. Os dados obtidos sugerem que a frequência de crescimento bacteriano é proporcional à progressão da idade dos animais, o que está diretamente relacionado ao tempo

de vida reprodutiva e aos números possíveis de partos. Desta forma, os animais mais velhos (G3) apresentaram maior incidência de crescimento bacteriano ($p = 0,05$) em relação aos animais mais novos (G1 e G2). Estes resultados foram identificados em estudos realizados por Woodward et al (2013), Christoffersen e Troedsson (2017) e Beehan e Mckinnon (2009). Não foi observada diferença significativa para crescimento bacteriano entre as éguas dos grupos G1 e G2 ($p = 0,14$) o que sugere que a idade do animal pode exercer influência nos mecanismos fisiológicos de defesa do animal e que de forma progressiva, com relação a idade, perdem a eficiência.

Tabela 2: Comparação de crescimento bacteriano entre as amostras analisadas, com base no teste χ^2 .

	G1	G2	G3	N	Comparação entre grupos (Valor de P)		
Presença de crescimento	30,0%	53,0%	63,1%	24	G1- G3 0,05	G1 – G2 0,14	G2 – G3 0,05
Ausência de crescimento	70,0%	47,0%	36,9%	22			

Grupos etários: G1 (n = 10) - éguas em fase pré-reprodutiva com idade entre 2 e 4 anos; G2 (n = 17) - éguas em fase reprodutiva com idade entre 3 e 10 anos; e G3 (n = 19) - éguas em fase reprodutiva com idade entre 11 e 18 anos; N (N = número total de éguas).

5.2 Crescimento Fúngico

A análise do crescimento fúngico no endométrio das éguas deste estudo reflete um importante campo de pesquisa na Medicina Veterinária, especialmente na área de reprodução. Segundo Jacob et al. (2002), a presença desses microrganismos no endométrio das éguas podem levar à quadros inflamatórios e infecciosos, e consequentemente, à uma condição de subfertilidade e infertilidade transitória. A composição fúngica presente na população deste estudo pode ser observada na tabela 3:

Tabela 3: Comparação das frequências de crescimento e os tipos de fungos entre as amostras coletadas em porcentagem.

Tipo de fungos	G1	G2	G3
<i>Rhodotorula sp.</i>	0	5,9%	0
<i>Trichosporon sp.</i>	0	0	5,3%
<i>Rhodotorula sp./Candida albicans</i>	10,0%	0	0
<i>Geotrichum sp.</i>	0	5,9%	0
<i>Candida albicans</i>	0	0	5,3%
Com crescimento	10,0%	11,8%	10,6%
Sem crescimento	90,0%	88,2%	89,5%
Comparação (Valor de P)	G1-G2 = 0,46	G1-G3 = 0,49	G2-G3 = 0,65

Grupos etários: G1 (n = 10) - éguas em fase pré-reprodutiva com idade entre 2 e 4 anos; G2 (n = 17) - éguas em fase reprodutiva com idade entre 3 e 10 anos; e G3 (n = 19) - éguas em fase reprodutiva com idade entre 11 e 18 anos.

Os gêneros identificados na análise fúngica deste estudo foram: *Candida albicans*, *Geotrichum sp.*, *Rhodotorula sp.* e *Trichosporon sp.* O grupo G1 apresentou colonização fúngica por *Candida albicans* e *Rhodotorula sp.* (Tabela 3). Segundo Tongu et al. (2015) a prevalência do gênero *Candida albicans*, associados aos quadros de endometrite fúngica é uma realidade, principalmente em grupos de risco (éguas multíparas e idosas). A colonização fúngica é mais diversificada em éguas dos grupos G2 e G3, com predominância de *Candida albicans*, *Geotrichum sp.*, *Rhodotorula sp.* e *Trichosporon sp.* A presença desses gêneros no endométrio das éguas, foi descrita em trabalhos como os de Alvarenga (2008) e de Liu e Troedsson (2008) que citam alguns fatores pré-disponentes a quadros de endometrite fúngica como a constante manipulação das éguas, o uso de protocolos hormonais e antibioticoterapias como possíveis causas de contaminação fúngica.

O teste χ^2 demonstrou que não existem diferenças significativas ao se analisar essa categoria. Assim, não houve diferença significativa entre as frequências observadas e as frequências esperadas de crescimento fúngico entre as amostras coletadas nos grupos de éguas estudados.

Embora a endometrite geralmente seja uma infecção de origem bacteriana, também pode ser causada por infecções fúngicas. Portanto, Tongu et al. (2015) relata em sua pesquisa que há uma crescente preocupação com a saúde reprodutiva das éguas e sua relação com a endometrite e fungos. Os resultados obtidos nesta pesquisa refutam a ideia de que o desenvolvimento de endometrite em éguas é exclusivamente causado por contaminação bacteriana, o que indicam a importância de desenvolvimento e utilização de métodos de

diagnóstico e implementação de tratamentos que possam contemplar as diferentes causas de endometrite com o objetivo de melhorar o bem-estar e a fertilidade desses animais.

5.3 Citologia Uterina

A citologia uterina em éguas ocorre a partir da coleta de amostras de fluidos intrauterinos por meio de esponja citológica estéril, e as amostras são analisadas com microscópio óptico para identificação das anormalidades celulares apresentadas na tabela 4. Segundo Dascanio e Ferris (2014) a técnica utilizada para coleta e avaliação citológica é um método rápido, prático e econômico para detectar a presença de processos inflamatórios.

Tabela 4: Análise citológica realizada em conteúdo intrauterino de éguas de diferentes faixas etárias e condição reprodutiva (virgem ou em fase reprodutiva).

Neutrófilos por campo	G1	G2	G3	Total na amostra
0	0	0	0	0
1	90,0%	58,9%	78,9%	73,9%
2	10,0%	17,6%	5,3%	10,8%
3	0	23,5%	10,5%	13,1%
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	5,3%	2,2%

Grupos etários: G1 (n = 10) - éguas em fase pré-reprodutiva com idade entre 2 e 4 anos; G2 (n = 17) - éguas em fase reprodutiva com idade entre 3 e 10 anos; e G3 (n = 19) - éguas em fase reprodutiva com idade entre 11 e 18 anos. Neutrófilos por campo: escala de 1 a 6 representando a quantidade de neutrófilos encontrados por campo de observação de lâminas de análise histológica por microscopia óptico.

Avaliação de características citológicas normais do endométrio de éguas foi observada predominantemente no grupo G1, onde 90,0% dos animais apresentaram citologia sem alteração evidente. As alterações presentes em G2 e G3 podem estar associadas a processos inflamatórios do endométrio, dado o aumento do número de células de resposta inflamatória (G2 = 58,9% e G3 = 78,9%), o que pode apresentar correlação com a idade do animal e as condições do manejo reprodutivo a que esses animais foram submetidos (Tabela 4). Pasolini et al. (2016) corroboram com os resultados do presente estudo afirmando que éguas multíparas, com falhas no manejo, podem apresentar maior pré-disposição a quadros de endometrite.

5.4 Análise Citológica, Fúngica e Bacteriana

A baixa incidência de microrganismos (fungos e bactérias) e a ocorrência de condição não inflamatória em G1 pode ser explicada pelo fato de que o trato reprodutivo dessas éguas ainda não foi exposto a fatores como o acasalamento, a manipulação, a gestação e o parto, considerando que estas condições podem levar a alterações na composição da microbiota uterina, como demonstrado por autores como Woodward e Troedsson, (2013), Canisso et al. (2020) e Lisboa (2021). A comparação entre as frequências dos tipos de bactérias, dos tipos de fungos e das análises citológicas encontradas nas amostras dos três grupos experimentais, obtidas através das análises e dos testes laboratoriais apresentaram os seguintes resultados (Tabela 5):

Tabela 5: Comparação entre as frequências, tipos de bactérias, tipos de fungos e análise citológica encontradas nas amostras do conteúdo intrauterino de éguas de diferentes faixas etárias e condição reprodutiva (virgem ou em fase reprodutiva).

	Análise bacteriana	Análise fúngica	Análise citológica	Percentual na amostra
G1		<i>Rhodotorula/</i>		
	<i>Bacillus</i> spp	<i>Candida albicans</i>	Não inflamatório	10,0%
	<i>Staphylococcus</i> sp	0	Não inflamatório	10,0%
	<i>Staphylococcus</i> sp/ <i>Streptococcus</i> / <i>Enterococcus</i>	0	Não inflamatório	10,0%
G2	<i>Bacillus</i> sp	0	Não inflamatório	29,4%
	<i>Bacillus</i> sp	<i>Candida albicans</i>	Não inflamatório	5,9%
	<i>Bacillus</i> sp	0	Inflamação moderada	11,8%
	<i>Bacillus</i> sp/ <i>Staphylococcus</i> sp	0	Não inflamatório	5,9%
	<i>Bacillus</i> sp/ <i>Staphylococcus</i> sp	0	Inflamação grave	5,9%
G3	<i>Bacillus</i> sp	0	Não inflamatório	15,8%
	<i>Bacillus</i> sp	0	Inflamação moderada	10,5%
	<i>Bacillus</i> sp	<i>Geotrichum</i>	Inflamação moderada	5,3%

Grupos etários: G1 (n = 10) - éguas em fase pré-reprodutiva com idade entre 2 e 4 anos; G2 (n = 17) - éguas em fase reprodutiva com idade entre 3 e 10 anos; e G3 (n = 19) - éguas em fase reprodutiva com idade entre 11 e 18 anos. Análise fúngica: 0 – não apresentou crescimento. Análise citológica: não inflamatório (0-2 neutrófilos/campo), inflamação moderada (2-5 neutrófilos/campo), inflamação grave (>5 neutrófilos/campo) ou hipocelular (escassas células epiteliais e sem neutrófilos).

No presente estudo, foram comparados os resultados de análise bacteriana, fúngica e citológica o que pode contribuir com o estabelecimento de um diagnóstico, como apresentados por pesquisas como Jacob et al. (2002), Fumuso et al. (2007), LeBlanc et al. (2007) e Bucca et al. (2008). Os resultados desta pesquisa podem ser apoiados nos resultados apresentados por LeBlanc (2010) que destacam que a cultura e citologia são técnicas que devem ser realizadas em conjunto com outras análises para o diagnóstico de endometrite. Desta forma, é possível detectar patógenos uterinos e identificar células inflamatórias (neutrófilos) associadas aos quadros de endometrite. A autora também afirma que éguas podem apresentar resultado positivo em exames citológicos e cultura uterina de bactérias e fungos com resultado negativo e vice-versa.

É importante destacar que o sistema imunológico das éguas jovens é mais eficiente em reconhecer e eliminar fungos e bactérias nocivos, isto pode contribuir para a redução da presença desses microrganismos no trato reprodutivo. É relevante ressaltar que mesmo éguas mais jovens e nulíparas podem apresentar desequilíbrios na microbiota uterina que podem comprometer a saúde reprodutiva como observado na tabela 5.

Alguns microrganismos considerados comuns e inofensivos ao trato reprodutivo podem em condições adversas, apresentar crescimento desordenado ou até mesmo quando associados a outros microrganismos, complicações reprodutivas em éguas. As bactérias do gênero *Bacillus sp.* que foram encontradas em todos os grupos de animais que compõem esta pesquisa e que frequentemente são descritas na literatura como comensais ao trato reprodutivo das éguas, e que podem se tornar patogênicas em condições pontuais como mencionado acima. Revisitando a literatura, em sua obra Ferris (2016), ressalta algumas bactérias comuns cultivadas no útero equino e conhecidas por sua patogenicidade. O autor cita como principais: *Streptococcus b-hemolytic*, *Streptococcus Equi* subspecies *zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Klebsiella pneumoniae*. Ainda segundo o autor, algumas apresentam patogenicidade questionável, como *Bordetella bronchiseptica*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* e outras espécies de *Serratia sp*, *Corynebacterium sp*, *Enterobacter sp*, *Bacillus sp* e *Pasteurella sp*. Estes dados são confirmados pelo presente estudo, que identificou o gênero *Bacillus sp* em todos os grupos, sem nenhum comprometimento na condição reprodutiva das éguas.

6 CONCLUSÕES

- Bactérias do gênero *Bacillus* sp. foram identificadas em todos os grupos de animais desta pesquisa, sendo geralmente consideradas comensais no trato reprodutivo das éguas, podendo se tornar patogênicas sob certas condições. Houve variação nas espécies de bactérias colonizadoras do endométrio das éguas estudadas, com *Bacillus* spp., *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp. como principais gêneros identificados, presentes tanto em éguas saudáveis em quantidades não prejudiciais, quanto em casos de endometrite.

- O grupo G1 não apresentou diferenças significativas nas proporções dos gêneros bacterianos. Por outro lado, o grupo G2 mostrou maior presença de *Staphylococcus* em comparação com os grupos G1 e G3, enquanto o grupo G3 apresentou maior incidência de *Bacillus* sp. Além disso, o gênero *Streptococcus* não foi encontrado no grupo G3, possivelmente associado à idade dos animais e aos tratamentos veterinários anteriores. O crescimento bacteriano parece estar relacionado à idade das éguas, influenciado pelo tempo de vida reprodutiva e pelos números de partos ao longo da vida.

- A escassez de microrganismos (fungos e bactérias) e a ausência de inflamação em G1 podem ser compreendidas pela falta de exposição do trato reprodutivo dessas éguas a fatores como acasalamento, manipulação, gestação e parto. Essas condições têm o potencial de alterar a composição da microbiota uterina. As modificações observadas em G2 e G3 estão possivelmente associadas a processos inflamatórios no endométrio, como indicado pelo aumento das células de resposta inflamatória (G2 = 58,9% e G3 = 78,9%). Essa relação pode ser influenciada pela idade das éguas e pelas práticas de manejo reprodutivo às quais foram submetidas.

- O gênero de bactérias *Bacillus* sp., identificado em todos os grupos analisados no estudo, geralmente considerado como comensal no trato reprodutivo equino, demonstra potencial de se tornar patogênico sob circunstâncias específicas, como observado nos grupos G2 e G3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEKNATH VIRENDRA, S.U. *et al.* Metagenomic analysis unravels novel taxonomic differences in the uterine microbiome between healthy mares and mares with endometritis **BioRxiv**, v10; p.1101-1121, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2022.10.09.511479>. Acesso em: 05 jul. 2023.

ALVARENGA, M.A. Diagnóstico e tratamento de endometrite fúngica em éguas. In: IX Conferência anual da ABRAVEQ, 2008. São Paulo, Brasil. Anais. São Paulo. 2008.

AMARAL, M.G. et al. Endometrite equina: fungos e bactérias. **Archivos de Zootecnia.**, v.216, n.56, p.875-884, 2007. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=4952160>. Acesso em: 06 jul. 2023.

ANWAR, H.; STRAP, J.L.; COSTERTON, J.W. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. vol. 36, p. 1347-1351, 1992.

AULT-SEAY, T.B. *et al.* Importance of the female reproductive tract microbiome and its relationship with the uterine environment for health and productivity in cattle: A review. **Animal Science.**, 02, v 4; p.01-12, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fanim.2023.1111636>. Acesso em: 05 jul. 2023.

ÁVILA, A.C.A. **Ozonioterapia no tratamento de endometrite em éguas**. 2020. XI, 49 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Universidade de Brasília, Brasília, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/41331>. Acesso em: 21 jun. 2023.

AZARVANDI A, A. et al. Isolation and identification of molds flora in external genital tract of healthy mares. **Journal of Veterinary Research**, v.72, n.1, p.103-110, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.22059/jvr.2017.61358>. Acesso em: 06 jul. 2023.

BANDEIRA, R.S. et al. Avaliação microbiológica e teste de sensibilidade in vitro de bactérias isoladas do útero de éguas da raça Crioula. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v.15, n.1, p.127-128, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.7213/cienciaanimal.v15i0.15818>. Acesso em: 06 jul. 2023.

BARBA, M., *et al.* Vaginal Microbiota Is Stable throughout the Estrous Cycle in Arabian Mares. **Animals**, 10(11), p. 01-14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10112020>. Acesso em: 21 jun. 2023.

BEEHAN, D.P.; MCKINNON, AO. How to diagnose common equine reproductive tract bacterial pathogens using chromogenic agar. Proc 55th Ann **Conv Am Ass Equine Practitioners**, 2009.

BETTENCOURT, E.M.V. *et al.* **Reprodução em equinos: Manual Prático**. 1 ed. MED: Universidade de Évora, 2018. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10174/26399>. Acesso em: 21 jun. 2023.

BORRIELLO, G.; WERNER, E; ROE, F; KIM, A.M; EHRLICH, GD; STEWART, PS. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of pseudomonas aeruginosa in biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. vol. 48, p. 2659-2664, 2004.

BRINSKO, S.P. *et al.* **Manual of Equine Reproduction**. 3th ed. Maryland Heights: Elsevier. 2011.

BROWN, M.R.; ALLISON, D.G.; GILBERT, P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. vol. 22, p. 777-780, 1988.

BUCCA, S.; CARLI, A.; BUCKLEY, T.; DOLCI, D.; FOGARTY, U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. **Theriogenology**, v. 70, p.1093-1100, 2008.

CANISSO, I.F. *et al.* Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares - a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.4, p.1432, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21041432>. Acesso em: 21 jun. 2023.

CARD, C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. **Theriogenology**, v64,n.3, p.580-8, 2005. 1. PMID: 15978660. Acesso em: 21 jun. 2023.

CARNEIRO, G. F. Endometrite em éguas: diagnóstico e tratamentos convencionais e/ou alternativos. **Ciência Animal**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 113–122, 2023. Disponível em: <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/9837>. Acesso em: 7 jun. 2023.

CASLICK, E.A. The vulva and the vulvovaginal orifice and its relation to genital health of the Thoroughbred mare. **Cornell Vet.**, v.27, p.178-87, 1937.

CHAVES, M. M. B. C. **Estudo da microbiota vaginal de éguas com ênfase na pesquisa de lactobacilos**. 2011. 43 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2011.

CHRISTOFFERSEN, M. *et al.* Risk factors associated with uterine fluid after breeding caused by Streptococcus zooepidemicus. **Theriogenology**, v.84(8), p. 1283-90, 2015 Nov; Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.007>. Acesso em: 05 jul. 2023.

CHRISTOFFERSEN, M.; TROEDSSON, M. Inflammation and fertility in the mare. **Reproduction In Domestic Animals**. v. 52, p. 14-20, ago. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/rda.13013>. Acesso em: 06 jul. 2023.

COCCHIA, N. *et al.* Comparison of the cytobrush, cotton swab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, v.77, p. 89-98, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.07.020>. Acesso em: 21 jun. 2023.

DASCANIO, J.J. Treatment of Fungal Endometritis. In: Current Therapy in Equine Reproduction, **Elsevier Inc**, p. 116-120, 2007.

DASCANIO, J.J.; FERRIS, R. Uterine cytology collection: swab/brush. In: DASCANIO, J.J.; MCCUE, P.M. **Equine Reproductive Procedures**. Aspen: Wiley Blackwell, 560p, cap. 17, p. 58 - 62, 2014.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. vol. 15, p. 167-193, 2002.

EVANS, M.J. *et al.* Factors affecting uterine clearance of inoculated materials in mares. **Journal of Reproduction Fertility Supplements**, v.35, p.327-342, 1987.

FACTOR, L. *et al.* Métodos de coleta de amostra para exame de citologia endometrial em éguas com endometrite. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.43, n.3, p.748- 755, 2019. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n3/p748-755%20\(RB%20731\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n3/p748-755%20(RB%20731).pdf). Acesso em: 21 jun. 2023.

FAWCETT, J. A. *et al.* Effect of advancing age on the reproductive performance of Japanese Thoroughbred broodmares. **Journal of Equine Science**, v.32(2), p.31–37, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1294/jes.32.31>. Acesso em: 21 jun. 2023.

FERRIS R. A. *et al.* Equine endometrial cytology: Collection techniques and interpretation. **Equine Veterinary Education**, v.27, p.1–7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/eve.12280>. Acesso em: 21 jun. 2023.

FERRIS, R. A. Endometritis - Diagnostic Tools for Infectious Endometritis. 0749-0739-16. **Elsevier Inc**. v.32, n.3, p.481-498, December 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.001>. Acesso em: 21 jun. 2023.

FERRIS, R. A. Endometritis: diagnostic tools for infectious endometritis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 481-498, 2016.

FERRIS, R.A. Compreensão atual de biofilmes bacterianos e infecções latentes: uma perspectiva clínica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**., vol. 41, n. 1, p. 74-80, jan. /mar. Belo Horizonte, 2017. Disponível em: [http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p074-080%20\(RB635\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v41/n1/p074-080%20(RB635).pdf). Acesso em: 10 ago. 2023.

FUMUSO, E.A.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; RIVULGO, M.; WADE, J.; ROGAN, D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. **Journal Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 1, p. 830-39, 2007.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare**: basic and applied aspects. 2nd ed. Equiservices: 1992.

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

GUAY, P. Reproductive Biology of the Mare. Basic and Applied Aspects. **The Canadian Veterinary Journal**, v.21(10), p.289, 1980. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1789796/>. Acesso em: 21 jun. 2023.

HEMBERG, E. *et al.* Retrospective study on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in thoroughbred mares. **Journal of Veterinary Medicine**. v.52(9), p.474-7. Nov.2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2005.00760.x>. Acesso em: 05 jul. 2023.

HOLYOAK, G.R. *et al.* The healthy equine uterus harbors a distinct core microbiome plus a rich and diverse microbiome that varies with geographical location. **Scientific Reports**, v.12, p.14790, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18971-6>. Acesso em: 21 jun. 2023.

HOOG G. S. *et al.* **Atlas of Clinical Fungi** – The ultimate benchtool for diagnostics. Universitat Rovira i Virgili, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. p. 1599, 2020.

HUGHES, J. P.; LOY, R.G. Investigations on the effect of intrauterine inoculations of 7 *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. **American Association of Equine**, v.8 Practitioners p. 289 – 292, 1969.

JACOB, J.C.F. *et al.* Susceptibilidade antimicrobiana de swab uterino e da fossa clitoriana de éguas com subfertilidade. **Revista Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro– Série Ciências da Vida (Sup.)**, v. 22, n. 2, p. 109-114, 2002. Disponível em: https://www.academia.edu/41103895/Susceptibilidade_Antimicrobiana_De_Swab_Uterino_e_Da_Fossa_Clitoriana_De_guas_Com_Subfertilidade. Acesso em: 21 jun. 2023.

JEFFERSON, K.K.; GOLDMANN, D.A.; PIER, G.B. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. vol. 49, p. 2467-2473, 2005.

KARSCH, FJ. *et al.* Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. **Reproduction Nutrition Development**., v. 28, n.28(2B), p. 459-472, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/rnd:19880311>. Acesso em: 05 jul. 2023.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. In: MORROW D. A. (Ed). **Current Therapy in Theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 723-729, 1986. Disponível em: <https://scirp.org/reference/referencespapers.aspx?referenceid=794213>. Acesso em: 21 jun. 2023.

KONEMAM, E.W.; **Diagnóstico Microbiológico**. Texto e Atlas colorido. 7ª ed., Editora Guanabara Koogan, , 2020.

KURTZMAN, Cletus P.; ROBNETT, Christie J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 4, p. 331-371, 1998.

KURTZMAN, FELL e BOEKHOUT, The Yeasts, a Taxonomic Study, Fifth edition. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. **Elsevier** , ISBN: 978-0-123-84708-9 (Volume 1), 2011.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. **Anatomia dos animais domésticos**: texto e atlas colorido. Porto Alegre, Artmed: Grupo A, 2021. E-book. ISBN 9786558820239. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786558820239/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

LEBLANC, M. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and postmating-induced endometritis in the mare. **Reproduction in Domestic Animals** **45**. v. 2, p. 21-27, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01634.x> Acesso em: 05 jul. 2023.

LEBLANC, M. M. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and postmating-induced endometritis in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 2, p. 21-7, Jun 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01634.x>. Acesso em: 21 jun. 2023.

LEBLANC, M. M. Uterine cytology. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction**, Second Edition. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.

LEBLANC, M. M.; CAUSEY, R. C. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility physical uterine clearance – the critical defence against endometritis. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.10–22, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01485x>. Acesso em: 21 jun. 2023.

LEBLANC, M.M. Oxytocin – the new wonder drug for treatment of endometritis? **Equine Veterinary Education**, v.6, p.39-43, 1994.

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

LIMA, E. A. *et al.* Exame ginecológico e acompanhamento reprodutivo em éguas. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, ano XIV, n. 28, 2017. Disponível em:

http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/GH2qohwvU6XrhiI_2017-9-11-11-42-27.pdf. Acesso em: 21 jun. 2023.

LISBOA, F. P. **Avaliação da capacidade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de manjerição, alecrim e capim limão sobre agentes causadores de endometrite em éguas.** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2021. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-221748>. Acesso em: 21 jun. 2023.

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

MAIA, H. G. O. *et al.* Fisiologia e fatores interferentes na reprodução de éguas. **Ciência Animal**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 112–123, 2019. Disponível em: <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/9788>. Acesso em: 7 jun. 2023.

MATTOS, F. S. *et al.* Efeito da antissepsia da genitália externa sobre a microbiota da fossa clitoriana, vestibulo e útero de éguas / Effect of external genitalia antiseptics on the clitoral fossa microbiota, vestibule and uterus of mares. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 15161–15167, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n2-235. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/24599>. Acesso em: 7 jun. 2023.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. 1 ed. Wiley–Blackwell, 1995.

MOREL, M. C. G. D. **Equine Reproductive: Physiology, Breeding and Stud Management**. 5 ed. Cabi, 2020.

MOREL, M.D. **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management**. 2ªEd. Oxon, UK: CABI Publishing, 2003.

MORRIS, H.A. *et al.* Equine endometritis: a review of challenges and new approaches. **Reproduction**, v. 160, n. 5, p. 95-110, Bioscientifica, nov. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1530/rep-19-0478>. Acesso em: 06 jul. 2023.

NIELSEN, J. M. *et al.* Diagnosis of endometritis in the mare based on bacteriological and cytological examinations of the endometrium: comparison of results obtained by swabs and biopsies. **Journal of Veterinary Science**, v.30, p.27-30, 2010.

OVERBECK W., WITTE TS, HEUWIESER W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. **Theriogenology**, v.75, p.1311-8, 2011.

PASOLINI, M.P.; DEL PRETE, C.; FABBRI, S.; AULETTA, L. Endometritis and infertility in the mare – the challenge in equine breeding industry—a review. In: DARWISH, A.M. **Genital Infections and Infertility**, 1.ed. **Intechopen**, cap. 15, p. 1-45, 2016.

REILAS, T., KATILA, T. Proteins and enzymes in uterine lavage fluid of postpartum and nonparturient mares. **Reproduction in Domestic Animals.**, v.37, p. 261–8, 2002.

RIBAS, J. A et al. Endometrite fúngica em éguas: diagnóstico e implicações clínico-patológicas / Fungal endometritis in mares: diagnosis and clinicopathological aspects. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.21(4), p.204-212, out.-dez.2014. il. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1022084>. Acesso em: 21 jun. 2023.

RICKETTS S. W., MACKINTOSH M. E. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 35, p. 343–51, 2016.

RIDDLE, W.T. *et al.* Relationships between uterine culture, cytology, and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 395-402, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.050>. Acesso em: 21 jun. 2023.

ROMANO, M. A. *et al.* Reproductive biology of the mare: oestrous cycle and ovulation time. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 25-28, 1998. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/5665>. Acesso em: 7 jun. 2023.

SÁ, M.A.F. *et al.* Acute endometritis induced by Escherichia coli in mares evaluated through color doppler ultrasonography Veterinary Medicine. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.72, p.05, Sep-Oct 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11904>. Acesso em: 21 jun. 2023.

SCHÖNIGER, S.; SCHOON, H. A. The Healthy and Diseased Equine Endometrium: A Review of Morphological Features and Molecular Analyses. **Animals: an open access journal from MDPI**, v.10(4), p.625, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10040625>. Acesso em: 21 jun. 2023.

SEBASTIAN M. M. *et al.* Review paper: mare reproductive loss syndrome. **Veterinary Pathology**. v. 45(5), p.710-22, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1354/vp.45-5-710>. Acesso em: 21 jun. 2023.

SENA, L. M. *et al.* Principais causas de perdas gestacionais na espécie equina: Revisão. **Pubvet**, [S. l.], v. 10, n. 12, 2016. Disponível em: <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/1403>. Acesso em: 7 jun. 2023.

SHAH, D.; ZHANG, Z.; KHODURSKY, A.; KALDALU, N.; KURG, K.; LEWIS, K. Persisters: a distinct physiological state of e. Coli. **BMC Microbiology**. vol. 6, p. 53, 2006.

SILVA FILHO, A.B. *et al.* Perfil microbiológico e de resistência antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas do útero de éguas subférteis. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 45, n. 2, p. 82-90, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21451/1809-3000.rbra2021.010>. Acesso em: 06 jul. 2023.

SILVA, M. A. C.; ALVARENGA M. A. Fungal endometritis In: MCKINNON A. O.,

SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. V., editors. **Equine Reproduction**, Second Edition. U.K: Wiley-Blackwell; 2011.

STEWART, J. L. *et al.* Physiological variations in reproductive and metabolic features of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) bucks throughout the rutting season. **Theriogenology**, v.1, n.114, p.308-316, jul 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.04.015>. Acesso em: 21 jun. 2023.

STEWART, P.S.; COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**. vol. 358, p. 135-138, 2001.

THOMSON, P. *et al.* Characterization of microbial communities and predicted metabolic pathways in the uterus of healthy mares. **Open Veterinary Journal**, v.12(6), p.797–805, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.5455/OVJ>. Acesso em: 21 jun. 2023.

TONGU, E.A.O. *et al.* Sensibility of microcultivation assay dermatobac® for fungal endometritis diagnosis in mares. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.4, p. 598-607 out./dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1089-6891v16i431444>. Acesso em: 05 jul. 2023.

TROEDSSON, M. H. T. *et al.* Multiple site electromyographic recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. **Journal of Reproduction and Rertility**, v.99, p.307-313, 1993.

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

TROEDSSON, M.H.T. Breeding-Induced Endometritis in Mares. **Veterinary Clinics Of North America: Equine Practice**, v. 22, n. 3, p. 705-712, Elsevier BV, dez. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cveq.2006.07.003>. Acesso em: 06 jul. 2023.

WALTER, J., NEUBERG, K. P., FAILING, K., WEHREND, A. Cytological diagnosis of endometritis in the mare: investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. **Animal Reproduction Science**, v.132, p.178–186, 2012.

WATSON, E. D. Uterine defense mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: a review. **Equine Veterinary Journal**, v.20, p.397-400, 1988.

WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. Equine Breeding-Induced Endometritis: A Review. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 33, n.9, p.673-682, sep 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.11.010>. Acesso em: 21 jun. 2023.

WOODWARD, E.M. *et al.* Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. **Reproduction**, v. 145, n. 3, p. 289-296, Bioscientifica, mar. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1530/rep-12-0452>. Acesso em: 06 jul. 2023.

WOODWARD, E.M.; TROEDSSON, M.H.T. Inflammatory mechanisms of

endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 4, p. 384-389, Wiley, 3 abr. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/evj.12403>. Acesso em: 06 jul. 2023.

YARROW, D.; MEYER, S.A. Proposal for amandment of the diagnosis of the genus *Candida*. Berkhout nom. cons. **International Journal Of Systematic Bacteriology**. v.28, p.611-615, 1978.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-IZ/UFRRJ



INSTITUTO DE ZOOTECNIA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IZ/UFRRJ

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta de pesquisa intitulada “**Caracterização da microbiota uterina de éguas em diferentes idades.**” – processo nº 0179-09-2022 – de responsabilidade do Dr. Marco Roberto Bourg de Mello e equipe; que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IZ/UFRRJ) na LX Reunião em 11/05/2023.

Finalidade da Proposta: pesquisa

Vigência da Proposta: maio de 2025

Área: Ciências Agrárias; Reprodução Animal;

Origem: Fazenda da UFRRJ

Espécie (quantidade): Equinos (45 fêmeas)

“**Resumo:** O número de estabelecimentos agropecuários voltados para à reprodução equina tem aumentado significativamente nos últimos anos, colocando o Brasil na posição de país número um em programas de Transferência de Embriões (TE). Com o intuito de reduzir os índices de perdas embrionárias, torna-se necessária a busca de novos tratamentos para as enfermidades rotineiras ligadas diretamente ao trato reprodutivo em equinos. A endometrite é a principal enfermidade que acomete o trato reprodutivo das éguas, levando a quadros de subfertilidade e é a terceira doença que mais acomete equídeos no mundo. De um modo geral, éguas susceptíveis apresentam características em comum, como idade avançada, histórico de falha reprodutiva em várias temporadas, histórico de episódios anteriores de endometrite e de perdas gestacionais. Pesquisas demonstram que a idade da égua afeta as interações físicas entre embrião e útero, tendo impacto na gestação e nas perdas embrionárias. No entanto, estudos ainda não foram realizados para determinar se a idade da égua está relacionada à maior susceptibilidade a quadros de endometrite. Assim, a hipótese do presente estudo é que éguas jovens (< 4 anos) e virgens são mais resistentes a endometrite. Neste contexto, este estudo tem como objetivo caracterizar qualitativa e comparativamente os microrganismos encontrados no endométrio de éguas de diferentes idades. Para alcançar este objetivo, material intrauterino será coletado de 45 éguas saudáveis e submetido à análise citológica assim como à cultura fúngica e bacteriana. Os animais selecionados para este estudo serão divididos em três grupos etários: G1 (n = 15) - Grupo de éguas virgens com idade entre 2 e 4 anos; G2 (n = 15) – Grupo de éguas em idade reprodutiva entre 5 e 10 anos; e G3 (n = 15) - Grupo de éguas em idade reprodutiva entre 11 e 18 anos. As éguas serão submetidas à avaliação ultrassonográfica para acompanhamento do ciclo estral e, no momento que apresentarem folículo com diâmetro maior igual a 35 mm e edema uterino grau 3 (escala de 1 a 4), será realizada coleta de material intrauterino. Após higienização da região perineal com água e sabão neutro, será realizada a coleta de amostras uterinas utilizando swab e escova citológica estéril para isolamento fúngico/bacteriano e avaliação da porcentagem de neutrófilos, respectivamente. A análise estatística será efetuada pelo teste de Análise de Variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey de Dunnett ou, e Teste de Kruskal Wallis, quando recomendado”

Seropédica, 20 de junho de 2023

Prof. Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira

Coordenador da CEUA/IZ/UFRRJ

Anexo 2. Protocolo de Identificação de Leveduras

		INSTITUTO DE VETERINÁRIA – DEPTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA VETERINÁRIA LABORATÓRIO DE LEVEDURAS PATOGÊNICAS E AMBIENTAIS					
PROTOCOLO DE TESTES PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS							
Procedência				Registro nº			
				Esquema da visualização microscópica ou foto			
1 - Exame direto							
2 – Crescimento em meios usuais							
Crescimento em meios com ácidos graxos							
3 – Microcultivo							
Pseudomicélio							
		Clamidoconídios					
Blastoconídios		Tubo germinativo em soro sanguíneo					
Arthroconídios							
4 - Reprodução sexuada : Presença de ascos e ascósporos							
5 – Outras provas :				Esquema da visualização do microcultivo			
Síntese de amido							
Produção de melanina							
Cloreto de trifênil tetrazólio							
Prova do azul de diazônio B							
Crescimento em meio CGB							
Crescimento em meio GCP							
Crescimento em meio CDBT							
6 - Auxanograma							
A	KNO ₃	6-Rafinose		16-Adonitol		26-Etanol	
B	Peptona	7-Trealose		17-Manose		27-Ácido succínico	
C	N-acetil - glucosamina	8-Ramnose		18-Dulcitol		28- Glicerol	
D	Creatina	9-Celobiose		19-Arabinose		29-Ribitol	
E	Creatinina	10-Galactose		20-Fructose		30-Galactitol	
	1-Lactose	11-Inulina		21-Xilitol		31-D-glucitol	
	2-Glicose	12-Melezitose		22-Sorbose			
	3-Sacarose	13-Inositol		23-Manitol			
	4-Melibiose	14-Xilose		24-Ácido cítrico			
	5-Maltose	15-Eritritol		25-Metanol			
7- Zimograma							
7.1-Rafinose		Provas complementares :				Outros	
7.2-Glicose		Hidrólise da uréia					
7.3-Lactose		Hidrólise da gelatina					
7.4-Maltose		Crescimento em meio com cicloheximida					
7.5-Sacarose		Crescimento em temperaturas variadas					
7.6-Trealose		Assimilação de D-prolina					
7.7-Galactose		Assimilação de D-triptofano					
Identificação							

Anexo 3. Tabela de identificação de *Cândida spp*

LEVEDURAS	LABORATÓRIO DE LEVEDURAS PATOGÊNICAS E AMBIENTAIS																																		
	Assimilação																	Fermentação																	
	Inulina	Ramnose	d-Arabinose	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Rafinose	Inositol	Xilose	Celobiose	Trealose	Dulcitol	Maltose	Melebiose	Melezitose	Eritritol	Glicose	Sacarose	Lactose	Galactose	Trealose	Maltose	Rafinose	Cápsula	Tubo germin.	Urease								
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	V	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	V	-	G	-	-	V	G	G	-	-	+	-								
<i>C. guilliermondii</i>	+	V	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	V	+	-	G	G	-	V	G	-	G	-	-	-								
<i>C. krusei</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	V	-	V								
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	V	-	-	V	V	-	-	-	-	-								
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	-	V	+	+	+	V	-	-	V	V	V	-	V	-	-	-	G	G	G	G	-	-	G	-	-	-								
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	V	+	-	+	-	V	-	V	V	-	G	G	G	-	-	-	-								
<i>C. zeylanoides</i>	-	-	-	+	-	-	V	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	V	-	-	-	V	-	-	-	-	-								
<i>C. lambica</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	V	-	-								
<i>C. lipolytica</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	V	-	+								
<i>C. lusitaniae</i>	-	V	V	+	+	-	V	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	G	V	-	V	V	-	-	-	-	-								
<i>C. rugosa</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
<i>C. famata</i>	V	V	V/ fr	+	V	V	+	+	-	+	V	V	+	+	V	V	V	V	V	-	-	G	V	fr	-	-	-								
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	G	-	-	-	G	-	-	-	-	-								
V = variável , G = gás , fr = fraco																																			
Adaptado de Kurtzman & Fell (1998)																																			