

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TESE

**Avaliação de Extratos Aquosos de Plantas no
Tratamento da Endometrite Bacteriana em
Éguas (*Equus caballus*).**

Carla Fernanda Paranhos de Moura Carvalho

2008



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DE EXTRATOS AQUOSOS DE PLANTAS
NO TRATAMENTO DA ENDOMETRITE BACTERIANA
EM ÉGUAS (*Equus caballus*).**

CARLA FERNANDA PARANHOS DE MOURA CARVALHO

Sob a Orientação do Professor
Hélcio Resende Borba

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

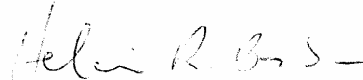
Seropédica, RJ
Setembro de 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

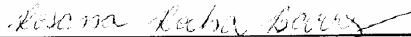
CARLA FERNANDA PARANHOS DE MOURA CARVALHO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**,
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em
Sanidade Animal.

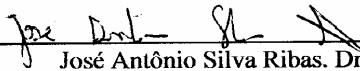
TESE APROVADA EM 05/09/2008.



Hélcio Resende Borba. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)



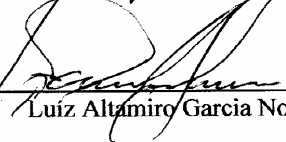
Rosana Rocha Barros. Dr. UFF



José Antônio Silva Ribas. Dr. UFF



Vinícius Rezende Ribeiro Ph.D.UFRRJ



Luiz Altamiro Garcia Nogueira. Dr. UFF

DEDICATÓRIA

*A meu pai Carlos Cintra de Moura Carvalho (in memoriam),
pela sabedoria e incentivo durante a minha formação.
Agradeço o amor, a ternura e o esforço de procurar sempre dar o melhor de si.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que possibilitou a obtenção deste título;

A Universidade Federal Fluminense pelo conhecimento adquirido durante minha formação, e pelo apoio técnico e de infra-estrutura para a realização deste trabalho, através do Departamento de Microbiologia do CCS, que disponibilizou os laboratórios com equipamentos e material de consumo para realização dos trabalhos;

Ao Centro Universitário Plínio Leite, através do Coordenador Walker Chagas, por ter disponibilizado o laboratório de Anatomia Patológica para confecção das lâminas de biópsia;

Ao meu Orientador Prof. Dr. Hélcio Resende Borba pela oportunidade de realização deste Doutorado, pelo incentivo, ajuda e compreensão durante a realização deste trabalho;

A Rosana Rocha Barros, professora de Bacteriologia e responsável pelo Laboratório de Bactérias Anaeróbias e Cocos do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense, pela ajuda nos testes bacteriológicos, pela disponibilidade, dedicação e paciência na realização deste trabalho, pois sem seu apoio não teria sido possível chegar ao final. Serei eternamente grata;

A Michelle Musitano, farmacêutica, pela ajuda na seleção das plantas, liofilização e registro. Agradeço o carinho e disponibilidade;

A Doutora Sônia Soares Costa do Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais da UFRJ (NPPN) que disponibilizou o laboratório para liofilização das plantas utilizadas no experimento;

Ao professor José Antônio Ribas, professor da Disciplina de Fisiologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense, pela ajuda na leitura das lâminas de biópsias, pela disponibilidade, apoio e carinho dedicado durante o experimento;

Aos professores, colegas de trabalho, Flávia Lisparisi e Lorenzo Piccinatti pela disponibilidade e ajuda na leitura das lâminas de biópsia uterina;

Aos professores Lauro Boechat e Fabiana pela colaboração quanto à estatística deste trabalho.

A Ana Paula aluna de Mestrado da UFRRJ, pela ajuda incondicional na estruturação da tese. Agradeço o esforço e carinho;

Ao Departamento de Zootecnia da UFRRJ e a professora Flávia Almeida pela disponibilização dos animais e ajuda inestimável durante a coleta de dados;

Ao professor Vinícius Resende Ribeiro professor de Histologia da UFRRJ pela ajuda durante a realização do Doutorado;

Aos proprietários e tratadores dos Haras que disponibilizaram os animais e viabilizaram a colheita de material para a tese;

Ao D. Ana, Leonora, José Mateiro, Ana Paula, que contribuíram com seus conhecimentos durante o período de seleção das plantas;

Ao meu amigo e companheiro de trabalho André Vianna Martins, pela amizade sincera, apoio e palavras de carinho e estímulo;

A amiga, professora Isis Lustosa pela disponibilidade nos momentos de aperto, me ajudando e substituindo sempre que necessário;

Ao Médico Veterinário Flávio Tavares Fernandes pelos ensinamentos durante a minha formação como Médica Veterinária na área de Reprodução equina e ultrasonografia.

Agradeço a minha família, mamãe, Nessa, Fit, Cau, Flávia, Luiza e Ecilda pela compreensão nos momentos de ausência e impaciência. Amo vocês;

Aos meus amigos que me apoiaram nesta longa jornada;

E finalmente, as minhas filhas Bruna e Beatriz, que mais uma vez tiveram que compreender os momentos de ausência, cansaço e impaciência. Amo vocês...

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho.

RESUMO

CARVALHO, Carla Fernanda Paranhos de Moura. **Avaliação de Extratos Aquosos de Plantas no Tratamento da Endometrite Bacteriana em Éguas (*Equus caballus*)**. 2008. 121p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

O trabalho foi conduzido durante o período de 2005 a 2007, e teve por objetivo avaliar a atividade de extratos de plantas frente a bactérias isoladas do útero de éguas susceptíveis a endometrite. Após realização de exame ginecológico em 135 éguas localizadas em propriedades particulares e pertencentes ao Instituto de Zootecnia da UFRRJ, selecionou-se 21 animais com características de susceptibilidade a endometrite. Foram coletadas secreções uterinas com swabs protegidos para os estudos bacteriológicos e citológicos e coleta de fragmentos para biópsia endometrial. Foram isoladas cepas de *Escherichia coli* (10, 47,6%), seguidas de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (8, 38%) e *Staphylococcus aureus* (2, 9,5%), além de componentes da microbiota, considerados não patogênicos, como estafilococos coagulase negativos, micrococos, *Streptococcus* α hemolíticos, bacilos gram positivos e enterecocos. Cepas de *S. aureus*, Streptococos do grupo C, *Enterococcus* sp. e *E. coli* isoladas das secreções uterinas foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos de acordo com as recomendações do CLSI (2005). O perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* demonstrou resistência a eritromicina em um isolado de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* e resistência intermediária a cefalotina entre isolados de *E. coli*. Posteriormente, a atividade anti-bacteriana *in vitro* dos extratos aquosos (EA) das plantas *Stryphnodendron adstringens*, *Kalanchoe pinnata* e *Kalanchoe brasiliensis*, frente as cepas padrão ATCC, foram avaliadas. Observou-se ação da planta *Stryphnodendron adstringens* frente a cepas de bactérias Gram positivas. Um total de 57,1% das éguas do experimento apresentaram endometrite no exame citológico. Dentre as 12 éguas que apresentaram inflamação, em nove foi diagnosticada inflamação severa (>5 neutrófilos por campo). Empregando-se a correlação de Pearson para avaliar a relação entre o isolamento de bactérias patogênicas e inflamação uterina, observou-se uma correlação positiva entre as duas variáveis ($r = 0,94$). Nas amostras analisadas, obtivemos endometrite crônica em 11 éguas (52,3%), sete éguas (33,3%) apresentaram endometrite com resposta crônica e uma reação aguda se sobrepondo e em três éguas (14,3%) foi observada endometrite aguda. O achado histopatológico mais freqüente foi a fibrose e o infiltrado inflamatório de mononucleares. No teste *in vivo* com extrato aquoso da planta *S. adstringens*, as 12 éguas que foram isoladas bactérias Gram positivas das secreções uterinas, foram divididas em 3 grupos com três diferentes tratamentos: Grupo 1, infusão uterina com 20 ml de antibiótico (Penicilina e estreptomina), grupo 2 infusão com 20ml de solução fisiológica e grupo 3 infusão com 20ml de extrato aquoso de *S. adstringens*. O extrato aquoso da planta *S. adstringens* teve eficácia variável frente as cepas Gram positivas isoladas do útero das éguas, diferindo, em parte, dos resultados obtidos *in vitro*. Os resultados obtidos sugerem a necessidade de estudos criteriosos com o *Stryphnodendron adstringens* buscando o isolamento dos princípios ativos, no sentido de contribuir para tratamentos alternativos da endometrite infecciosa eqüina.

Palavras-chave: *Stryphnodendron adstringens*, Endometrite, Éguas.

ABSTRACT

CARVALHO, Carla Fernanda Paranhos de Moura. **Evaluation of aqueose extracts of plants in the treatment of mares infections endometrites (*Equus caballus*).** 2008. 121p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

This study was conducted during 2005-2007 seasons, and aimed at the evaluation of the activity of extracts of plants in isolated bacteria from susceptible uterus of mares. Twenty-one susceptible to endometritis animals were selected after a gynecological exam performed in 135 mares located in private properties and Instituto de Zootecnia from UFRRJ. Uterine smears were collected with guarded swabs to perform bacteriology, cytology and samples to endometrial biopsy. Pure cultures of *Escherichia coli* (10, 47,6%), *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (8, 38%) and *Staphylococcus aureus* (2, 9,5%) were isolated, and compounds of nonpathogenic microorganisms like: *Staphylococcus* coagulase negative, micrococcus, Streptococci alpha-hemolytic, bacillus gram positives e *Enterobacter* spp. Species of *S. aureus*, Streptococci of group C, *Enterococcus* sp. e *Escherichia coli* isolated from uterine smears was submitted to Microbiological sensitivity test according to CLSE (2005). The antimicrobiological sensitivity test *in vitro* demonstrated resistance to eritromycin in one specimen of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* and intermediary resistance to cephalotin in *E. coli* specimens. Antimicrobial activity *in vitro* of aqueous extracts (AE) of three plants: *Stryphnodendron adstringens*, *Kalanchoe pinnata* and *Kalanchoe brasiliensis*, in AACT standard form, was available. Results revealed antimicrobial activity of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) against Gram positive bacteria. A total of 57,1% mares presented endometritis in cytological exams. Out of the 12 females that presented inflammation, nine were diagnosed with severe inflammation (>5 neutrophils for field). In Pearson's correlation to evaluate the relationship between the isolation of pathogenic bacteria and uterine inflammation, a high correlation between the two variable ($r = 0,94$) was observed. Among the evaluated specimens, chronic endometritis was diagnosed in 11 mares (52,3%); seven mares (33,3%) presented endometritis in chronic and acute forms and in three mares (14,3%) acute endometrites were observed. Fibrosis and infiltration of mononuclear cells were the most commonly found. On the *in vivo* testing with aqueous extract of *S. adstringens*, the 12 mares in which uterine smears Gram positive bacteria was isolated were divided in 3 groups that received 3 different treatments: Group 1, uterine infusion with 20 ml of antibiotic (Penicillin and streptomycin), group 2 infusion with 20ml of saline solution and group 3 infusion with 20 ml of aqueous extract of *S. adstringens*. The aqueous extract of *S. adstringens* has variable effectiveness to inhibit Gram positive specimes isolated from uterus of mares, partly differing from the *in vitro* results. The effect of *Stryphnodendron adstringens* extracts suggests the need of further studies toward the isolation of the compounds associated with the biological activity, to provide an alternative treatment to equine bacterial endometritis.

Key words: *Stryphnodendron adstringens*, Endometritis, Mares.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árvore do <i>Stryphnodendron adstringens</i>	07
Figura 2	Aspectos botânicos: <i>Kalanchoe brasiliensis</i> , crescimento até 150 centímetros, presença de folhas simples, opostas e carnosas.....	10
Figura 3	A e B= Aspectos botânicos de <i>Kalanchoe pinnata</i> : subarbusto de ramos herbáceos, as flores são de coloração rósea e apresentam-se em cachos no ápice dos ramos, as folhas são ovais, arredondadas na base e serrilhadas nas bordas.....	12
Figura 4	Presença de neutrófilos na amostra citológica (setas) obtida através da colheita da secreção do útero de éguas indicando processo inflamatório (Obj.400x)	31
Figura 5	Identificação através da inspeção, a má coaptação dos lábios vulvares, determinando um quadro de pneumovagina (Égua 10).....	56
Figura 6	Presença de secreção vulvar muco- purulenta através de inspeção vulvar (Égua 10).....	56
Figura 7	Exame ginecológico através do espéculo vaginal para avaliação da vagina e cérvix (Égua 19).....	57
Figura 8	Exame ginecológico através da palpação retal para avaliação do tônus uterino da égua (Égua 4).....	57
Figura 9	Avaliação ultra-sonográfica do corno uterino no estro com presença de dobras endometriais e fluido anecóico (Égua 8).....	58
Figura 10	Ultra-sonografia do útero de égua com presença de fluido no lúmen uterino (Égua 10).....	59
Figura 11	Fluxograma para a identificação laboratorial de bactérias	60
Figura 12	Coleta de fragmento endometrial com auxílio da pinça de biópsia para realização de exame histopatológico e categorização do grau da lesão endometrial (Égua 14).....	64
Figura 13	Prevalência de bactérias isoladas de <i>swabs</i> obtidos de secreções uterinas de 21 éguas susceptíveis selecionadas através do histórico e exame ginecológico durante os anos de 2005 a 2007.....	70
Figura 14	Classificação histopatológica do útero das éguas de acordo com a faixa etária categorizada.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Métodos quantitativos para a interpretação de amostras citológicas endometriais de éguas.....	31
Tabela 2	Tipos de células e debris observados no exame citológico uterino de éguas.....	32
Tabela 3	Classificação do grau de endometrite.....	40
Tabela 4	Identificação das espécies estudadas e os números de registros das excisatas depositadas nos herbários do Jardim Botânico (RJ) e Teresópolis (RJ).....	53
Tabela 5	Escala de avaliação de tamanho ovariano e crescimento folicular através da palpação retal.....	58
Tabela 6	Resultados referentes aos exames citológicos, microbiológicos e histopatológicos das 21 éguas classificadas como susceptíveis antes do tratamento.	68
Tabela 7	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato aquoso de <i>Stryphnodendron adstringens</i> frente as oito cepas de <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	73
Tabela 8	Relação entre microorganismos patogênicos isolados, presença de secreção e exames citológicos das éguas susceptíveis.	75
Tabela 9	Relação entre número de éguas e achados citológicos e cultura de éguas susceptíveis.....	75
Tabela 10	Relação entre a idade e biópsia endometrial das 21 éguas.....	78
Tabela 11	Resultados da cultura bacteriológica uterina e biópsia endometrial em 21 éguas susceptíveis a endometrite.....	79
Tabela 12	Dados referentes aos exames citológicos, bacteriológicos e histopatológicos das 12 éguas selecionadas, após tratamento com Antibiótico (controle positivo) ou soro fisiológico (controle negativo) ou barbatimão (teste).....	82

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DL ₅₀	Dose Letal que mata 50% da população
HE	Hematoxilina-eosina
mg	Miligrama
mL	Militro
NCCLS	National Committe for Clinical Laboratory Standart
OMS	Organização Mundial de Saúde
PMNs	Polimorfonucleares
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Plantas Medicinais	3
2.1.1	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Martius) Coville.....	6
2.1.2	<i>Kalanchoe brasiliensis</i> (Cambess.).....	9
2.1.3	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	11
2.2	Endometrite	13
2.2.1	Éguas resistentes e susceptíveis.....	15
2.2.2	Mecanismos de defesa uterina.	18
2.2.3	Microorganismos causadores da endometrite.....	21
2.2.4	Patogenia microbiana.....	23
2.3	Métodos de Diagnóstico da Endometrite	24
2.3.1	Diagnóstico clínico: histórico, exame físico e palpação retal.	25
2.3.2	Ultra-sonografia.....	27
2.3.3	Citologia.....	29
2.3.4	Cultura.....	33
2.3.5	Biópsia endometrial.....	35
2.4	Métodos de Tratamento da Endometrite	43
2.4.1	Antibióticos.....	44
2.4.2	Soluções anti-sépticas.....	47
2.4.3	Estrogênio e lavagem uterina.....	47
2.4.4	Plasma.....	48
2.4.5	Ocitocina e análogos da prostaglandina.....	49
2.4.6	Imunomoduladores.....	50
2.4.7	Extratos de plantas.....	51
3	MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1	Obtenção da Matéria Vegetal	53
3.1.1	Preparo da matéria vegetal: <i>Kalanchoe pinnata</i> , <i>Kalanchoe brasiliensis</i> e <i>Stryphnodendron adstringens</i>	54
3.1.2	Preparo dos extratos aquosos.....	54
3.2	Animais	54
3.2.1	Exame ginecológico.....	55
3.3	Obtenção das amostras uterinas: análise laboratorial	59
3.3.1	Cultura bacteriológica.....	59
3.3.2	Testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).....	60
3.3.3	Determinação de fenótipo de resistência a eritromicina.....	61
3.3.4	Testes de sensibilidade aos extratos de plantas: triagem.....	62

3.3.5	Testes de sensibilidade aos extratos de plantas: determinação da concentração bactericida mínima do extrato de barbatimão (CBM).....	62
3.3.6	Citologia uterina.....	63
3.3.7	Biópsia uterina.....	63
3.3.8	Teste de eficácia dos extratos <i>in vivo</i> : tratamentos.....	64
3.4	Análise Estatística	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	Exames dos animais e testes <i>in vitro</i>	66
4.2	Tratamentos – Testes <i>in vivo</i>	79
5	CONCLUSÕES	84
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	ANEXO	100
	A - Ficha ginecológica das éguas	100
	B - Ficha de Exame Citológico.....	101
	C - Ficha de Biópsia.....	102
	D - Resultados referentes ao histórico, exames ginecológicos e ultra-sonografia do útero das 21 éguas examinadas.....	103
	E - Classificação histológica do endométrio das 21 éguas susceptíveis.....	104
	F- Classificação histológica do endométrio de éguas susceptíveis, após os tratamentos com antibiótico, soro fisiológico e extrato aquoso de barbatimão a 10%.	109

1 INTRODUÇÃO

A endometrite é uma das maiores causas de infertilidade nas éguas e tem um grande impacto econômico na indústria eqüina. As endometrites em consequência de infecções bacterianas trazem sérias complicações à reprodução das éguas, resultando na diminuição da taxa de fertilidade. Um dos aspectos mais importantes para que se mantenha a gestação é a existência de um útero sem alterações anatômicas e histológicas e um endométrio sadio. Desta forma, o diagnóstico de sub-fertilidade e infertilidade em éguas reprodutoras torna-se de extrema importância na tentativa de prevenir ou minimizar tais perdas econômicas.

As infecções uterinas em éguas cíclicas têm desafiado clínicos veterinários e pesquisadores durante muitos anos (DIMOCK; EDWARDS, 1928; TRAUB-DARGATZ et al., 1991 apud CAUSEY et al., 2006). Estas surgem devido a uma variedade de causas e tem uma variedade de apresentações clínicas. Casos clínicos variam desde aqueles causados pela susceptibilidade de éguas a infecção (a maioria) até infecções causadas por um patógeno reprodutivo específico.

Os organismos isolados incluem, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* e *Escherichia coli*, os mais patogênicos, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Taylorella equigenitalis*. Bactérias anaeróbias como *Bacteroides fragilis* também aparecem como causa de infecção principalmente em éguas no período pós-parto e no cio do potro (RICKETTS; MACKINTOSH, 1987). Algumas cepas destas bactérias têm desenvolvido resistência a múltiplos antibióticos e isto tem feito com que os tratamentos se tornem cada vez mais difíceis.

Entender as causas da infecção e dos processos subjacentes é necessário para estabelecer novas terapias. Vários tratamentos têm sido adotados na intenção de curar a endometrite. Lavagens intra-uterinas com solução salina, antibioticoterapia sistêmica ou local, infusões com soluções anti-sépticas, têm sido empregadas. Entretanto estas terapias possuem limitado sucesso e podem estar associadas ao estabelecimento de resistência as bactérias e infecções fúngicas. Terapias como plasma intra-uterino, têm sido utilizadas por alguns veterinários, porém com resultados controversos.

Nos últimos 15 anos, a resistência microbiana às múltiplas drogas vem aumentando progressivamente e se tornando um problema mundial, ameaçando os tratamentos das doenças

infeciosas, pois existem relatos de vários casos de patógenos comuns resistentes a quase todos os antibacterianos disponíveis no mercado (VIKSVEEN, 2003). Por isso, torna-se necessária e urgente à busca de novos agentes antimicrobianos.

O interesse em terapias alternativas tem crescido e o uso terapêutico de produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas. A utilização de plantas medicinais como terapêutica pode ser considerada simples, de baixo custo e bastante eficaz.

O conhecimento da biodiversidade existente e o estabelecimento de estratégias de utilização das plantas medicinais, ainda se constituem em uma área de pesquisa relativamente recente no país. O número de pesquisas relacionadas à utilização de plantas medicinais ainda é muito reduzido se comparado com as espécies que necessitam de estudos.

A sistemática de investigar extratos de plantas com atividade antibacteriana representa um esforço contínuo em encontrar novos componentes com atividade para agir contra bactérias multi-resistentes (SUFFREDINI et al., 2004).

Apesar de muitas plantas serem utilizadas como antimicrobiano e anti-inflamatório, poucas têm sido submetidas à pesquisa científica para determinar o seu potencial terapêutico. Assim, estudos científicos são fundamentais, pois possibilitam a transformação segura e eficaz de uma planta em um medicamento de qualidade, diferente do uso baseado na crença popular. Matos (2000), afirma que a avaliação de novas drogas vegetais através da pesquisa é o caminho para que se possa fazer o correto aproveitamento das plantas medicinais e seus derivados aplicados a fitoterapia.

As plantas aparecem como uma opção na substituição de medicamentos antimicrobianos que tenham levado ao estabelecimento de resistência além destes produtos apresentarem desvantagens como: custo elevado, indução de resistência, poluição do meio ambiente e contaminação dos alimentos através dos resíduos.

Este trabalho se propõe a avaliar a atividade de extratos aquosos de plantas no útero de éguas susceptíveis a endometrite, visando estabelecer métodos alternativos de tratamento para a endometrite infecciosa e desta forma contribuir significativamente para o incremento da taxa de fertilidade em éguas susceptíveis a infecções uterinas e na pesquisa com plantas naturais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e, por longo tempo, produtos minerais, animais e vegetais foram as principais fontes de drogas (RATES, 2001).

As mais antigas obras sobre medicina e plantas medicinais surgiram na China e no Egito, no livro de PenTsao-Ching (2700 aC) e nos Papiros (1500 aC), bem como na Bíblia escrita pelos hebreus. Hipócrates (460-361 aC), Teofrasto (225 aC) e Dioscórides (20 dC), que por mais de 1500 anos influenciaram a farmácia, foram autores de vários e valiosos volumes sobre vegetais usados na cura de enfermidades (CARVALHO, J., 2004).

Desde os tempos mais remotos, o homem tenta aliviar o sofrimento causado pelas doenças através da ingestão de misturas ou partes vegetais, cujas propriedades terapêuticas quase sempre são conhecidas pela medicina folclórica (BLACK, 2002).

Segundo Oliveira e Silva (1994) o descobrimento das propriedades curativas foi no início meramente intuitivo ou, pela observação dos animais quando doentes que buscavam nas ervas a cura para as suas afecções.

Durante a Idade Média (entre os séculos XIV e XV), quando o progresso da ciência empírica foi mínimo, graças às escolas árabes, partes dos antigos textos foram preservadas e seus conteúdos passados para o ocidente (CARVALHO, J., 2004).

No Brasil, as contribuições dos índios, escravos e imigrantes, representaram papel importante para o surgimento de uma medicina popular rica e original (SIMÕES et al., 1986). Em todo o mundo, a fitoterapia foi peça essencial do arsenal terapêutico até meados do século XIX.

Já no início do século XX, a consolidação do processo de industrialização e o aumento na produção de compostos terapêuticos sintéticos, mais puros, ativos e com menos efeitos colaterais, aliados ao difícil controle de qualidade dos extratos vegetais utilizados, ocasionaram uma preferência mundial pelos medicamentos farmacêuticos industrializados (TOLEDO, 2002). Neste período, as plantas medicinais perderam a importância e passaram a serem utilizadas somente como terapia alternativa no Brasil, e em outros países do terceiro

mundo, onde cerca de 70 a 80% da população não tinha acesso à assistência farmacêutica (CARVALHO, J., 2004).

A partir do desenvolvimento das sulfonamidas, em 1930, e da penicilina e estreptomicina, em 1940, muitas novas classes de agentes antibacterianos foram desenvolvidas, como a tetraciclina, as quinolonas e os aminoglicosídeos (NORBY; NORD, 2005). A moderna terapia antimicrobiana não apenas reduziu acentuadamente a taxa de morbidade e de mortalidade humana causadas pelas infecções, mas também evitou a ocorrência de várias doenças (COHEN, 1992). Porém, simultaneamente ao crescente desenvolvimento de vários agentes antibacterianos, houve também um rápido aumento na incidência de resistência antibacteriana (NORBY; NORD, 2005).

No decorrer das últimas décadas, observa-se, em vários países, uma diversificação do quadro, recolocando os produtos naturais em pauta na disputa pelo mercado farmacêutico. Nota-se um retorno do interesse pelas plantas medicinais, devido à grande procura por terapias alternativas. Isto se deve principalmente à ineficácia de alguns produtos sintéticos, ao alto custo dos medicamentos alopáticos e à busca da população por tratamentos menos agressivos (RIBEIRO; LEITE; DANTAS-BARROS, 2005).

Segundo Fernandes, T. (2004), o interesse pelos produtos naturais tem origem em fatores comportamentais, biológicos, farmacológicos, biotecnológicos e químicos, e resultaram em uma mudança na estratégia das empresas, que passaram a visar o mercado dos produtos originados de plantas.

Os medicamentos fitoterápicos são preparações farmacêuticas (extratos, tinturas, pomadas e cápsulas) de ervas medicinais, obtidas a partir de uma ou mais plantas, que podem ser utilizadas para o tratamento de várias doenças. Dentre as inúmeras vantagens dos fitoterápicos estão seu largo uso terapêutico, baixo custo e a grande disponibilidade para a população de baixa renda (CALIXTO, 2000).

O uso popular ou mesmo tradicional é insuficiente para validar cientificamente as plantas medicinais como fitoterápicos eficazes e seguros, pois esta prática é feita de modo empírico sem o conhecimento do verdadeiro potencial terapêutico (MATOS, 1999).

Com o crescente interesse da sociedade pelas plantas medicinais, tornam-se importantes e necessários estudos criteriosos para que haja comprovação ou não dos seus efeitos terapêuticos-farmacológicos e possíveis efeitos colaterais (CORRÊA et al., 2003).

A escolha das plantas a serem avaliadas em um estudo deve ser feita de forma cuidadosa, observando o uso e forma de administração na medicina popular, bem como os

possíveis efeitos tóxicos observados. Aliado a isto, faz-se necessário o conhecimento e experiência da população e da cultura local ou informações sobre composição química, relacionando ao gênero ou família e dos possíveis compostos com atividade química e farmacológica definidas, presentes na planta em estudo (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998).

Apesar dos efeitos colaterais na utilização dos fitoterápicos serem menos frequentes do que das drogas sintéticas, os testes clínicos atestam que eles existem. Há poucos dados sobre a eficácia, segurança e qualidade de muitas plantas medicinais, e a sua larga utilização não é suficiente para validá-las eticamente como medicamentos seguros e eficazes (CALIXTO, 2000). A Organização Mundial de Saúde (OMS) descreve que o consumo de fitoterápicos atinge cerca de 80% da população mundial, movimentando cerca de um bilhão de reais por ano só no mercado brasileiro (RATES, 2001).

O aumento da comercialização de produto fitoterápico provocou algumas discussões enquanto a qualidade destes produtos. No Brasil, em 2000, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - do Ministério da Saúde, normatizou o registro de produtos fitoterápicos, Resolução RDC 17/2000 (ANVISA, 2000) e definiu o medicamento fitoterápico como "toda preparação farmacêutica que utiliza como matéria-prima parte da planta como folha, caules, raízes, semente, componentes ativos exclusivamente de origem vegetal".

Em 2004, a Anvisa publicou a Resolução RDC 48/2004 atualizando a normatização de registro de medicamentos fitoterápicos, onde prevê a necessidade da comprovação do tripé: eficácia, segurança e qualidade destes produtos, garantindo a qualidade do medicamento ao consumidor (ANVISA, 2004). Esta resolução revolucionou este setor, em função principalmente, da escassez de informações científicas quanto ao uso de plantas medicinais.

Aproximadamente 20% das plantas encontradas no mundo têm sido submetidas a testes farmacológicos e biológicos, e um número substancial de novos antimicrobianos introduzidos no mercado são obtidos de recursos naturais e semi-sintéticos. Foi reportado que entre os anos de 1983 e 1994, de 93 novos agentes antibacterianos submetidos a análises pelo FDA, seis eram produtos naturais, 45 eram produtos semi-sintéticos modelados de procedência de produtos naturais (SUFFREDINI et al., 2004).

Vários fitoterápicos têm sido utilizados pela população de forma empírica, como antiinflamatórios. Muitos já foram e estão sendo analisados com o objetivo de caracterizar os princípios ativos quanto à sua constituição química, seus efeitos terapêuticos e efeitos colaterais e finalmente, se possível, sintetizar o princípio ativo (CARVALHO, J., 2004).

O Brasil detém a maior diversidade biológica do mundo, contando com uma rica flora, que abriga 120 mil espécies de plantas, aproximadamente um quarto de todas as espécies conhecidas (Ibid.), despertando interesses de comunidades científicas internacionais para o estudo, conservação e utilização racional destes recursos (SOUZA C.; FELFILI, 2006). Segundo Nodari e Guerra (2000), somente 8% das espécies vegetais da biota brasileira foram estudadas em suas propriedades medicinais, sendo que apenas 590 espécies foram registradas no Ministério da Saúde.

No Brasil, o crescimento do mercado de medicamentos fitoterápicos é da ordem de 15% ao ano, enquanto o crescimento anual do mercado de medicamentos sintéticos gira em torno de 3 a 4% (ABIFISA, 2002). Segundo pesquisadores, o mercado mundial de produtos farmacêuticos, cosméticos e agroquímicos somam aproximadamente US\$ 400 bilhões ao ano, o que dá a dimensão da enorme oportunidade existente para os produtos brasileiros (DIAS, 1996).

2.1.1 *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville.

Stryphnodendron: do grego *Stryphos*, duro, e *dendron*, árvore. Apresenta os seguintes sinônimos: *Stryphnodendron barbatiman* (Mart.), *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Mart., *Stryphnodendron barbatimao* (Mart.), *Mimosa barba de timam* (Vellozo) Mart., *Mimosa virginalis* (Arruda), *Acacia adstringens* (Mart.).

É conhecido popularmente como: abaramotemo, barbatimão-verdadeiro, barba-de-timão, casca da virgindade, iba-timão, ibatimô, paricarana, uabatimô, ubatima, chorãozinho roxo, paricana e casca da mocidade (CAMARGO, 1985).

Planta arbórea da família Leguminosae, subfamília Mimosoideae de pouca folhagem. É uma árvore do cerrado brasileiro, com 4 a 5 metros de altura, com diâmetro do tronco de 20 a 30 centímetros e ramos tortuosos (CORRÊA, 1926-1975). Possui pequenas folhas palmadas com folíolos ovais, pequenas flores avermelhadas ou esbraquiçadas pequenas dispostas em espigas cilíndricas, e frutos sob a forma de vagens grossas e escamosas de 10 centímetros de comprimento, que encerram sementes similares a grãos de feijão (CORRÊA et al., 2003). O florescimento é em setembro, prolongando-se até o final de novembro. Os frutos amadurecem entre julho e setembro (LORENZI, 2000) (Figura 1).



Figura 1. Árvore do *Stryphnodendron adstringens* (UNITINS, 2005).

A casca do *Stryphnodendron adstringens* fornece material tintorial vermelho, muito utilizado pelas indústrias para produzir tinta de escrever. Possui grande efeito adstringente, por isso é muito empregada nas indústrias de curtume (CORRÊA, 1926-1975). Em levantamento feito por Verde, Paula, Carneiro (2003) e Nunes et al. (2003), em Goiás e Campo Grande respectivamente, demonstraram que o barbatimão está entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população.

O uso terapêutico inclui quadros diarréicos, diabetes mellitus, escorbuto e flatulência. É aplicada externamente em ferimentos, como efeito cicatrizante e anti-séptico, hemorróidas e irritações vaginais, oftalmias crônicas, atrofia, atonia e úlceras (PENNA, 1930). Além destas aplicabilidades, na medicina caseira, o decocto das cascas da planta é amplamente empregado na maioria das regiões do Brasil no tratamento da leucorréia, hemorragias e na forma de gotas contra conjuntivite (MACEDO; FERREIRA, 2004). Estas atividades devem-se à riqueza em taninos presentes na casca da planta (SANTOS et al., 2006). Segundo Souza T. et al. (2007), os taninos são os metabólitos secundários presentes nas cascas, apresentando, entre outras, atividade antimicrobiana.

Existem três hipóteses quanto ao mecanismo de ação dos taninos sobre as bactérias e fungos: inibição de enzimas dos microorganismos e/ou ligação com o substrato dessas enzimas; através da ação sobre a membrana celular, modificando seu metabolismo ou, ainda,

pela complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade desses íons, que são essenciais ao metabolismo dos microorganismos (LOQUÉRCIO et al., 2005).

Lopes et al. (2003) verificaram a atividade bactericida através da avaliação da concentração inibitória mínima, e observaram que o extrato das cascas de *Stryphnodendron adstringens* demonstra atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (125µg/ml) e *Bacillus subtilis* (250µg/ml), porém não houve atividade inibitória para *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (CIM > 1000µg/ml).

Toledo (2002) observou que o extrato obtido das cascas de *Stryphnodendron adstringens* possui atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Também foi descrito na literatura, atividade tripanocida (HERZOG-SOARES et al., 2002 apud SOUZA T. et al., 2007), antiinflamatória, antioxidante e antiviral dos extratos (MELO et al., 2007).

Em sua composição química encontram-se ácidos elágico, gálico, além de flavonóides, taninos, alcalóides, açúcares, terpenos, estilbenos, esteóides e inibidores da tripsina e de proteases (VASCONCELOS et al., 2004).

Os taninos, são substâncias vegetais, produtos do metabolismo secundário das plantas (VITAL et al., 2004), que formam complexos com proteínas, formando uma camada protetora no processo de cura de feridas, queimaduras, inflamação e úlcera gástrica (SANTOS; MELLO, 2000), sendo capazes de inativar adesinas e enzimas bacterianas, além de formarem complexo com polissacarídeos (COWAN, 1999).

Panizza et al. (1988), estudaram a atividade cicatrizante da casca do barbatimão a 1%. Estes realizaram uma incisão de 0,8cm de diâmetro em camundongos e observaram que além de diminuição do processo inflamatório a cicatrização foi mais rápida que a do grupo controle.

Lima, Martins e Souza Jr. (1998), demonstraram atividade antiinflamatória do extrato bruto de barbatimão, através do modelo de inflamação aguda em patas de ratos, onde a diminuição do edema ocorreu na dose de 400 a 800mg/Kg. Este efeito também foi observado em modelo de inflamação crônica. O extrato teve efeito significativo na redução do exsudato e na migração de leucócitos em análise pleural de ratos, e na dose de 800mg/Kg, reduziu a permeabilidade vascular.

Em um estudo realizado com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana do *Stryphnodendron adstringens* frente ao *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e

Escherichia coli, com o método de difusão em ágar pela técnica do poço, foi observada atividade para todas as bactérias testadas (ALVES, 2000).

Segundo Souza T. et al. (2007), em estudo feito com extrato seco das cascas de *Stryphnodendron adstringens* frente a duas bactérias Gram positivas e uma Gram negativa determinou a concentração bactericida mínima (CBM) através da técnica de diluição em tubos. A atividade antimicrobiana do extrato seco foi avaliada pelo método de difusão em ágar. O extrato apresentou valores de CBM de 50 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus* e 75mg/ml contra *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* e no teste de difusão em ágar, *Staphylococcus aureus*, apresentou maior sensibilidade ao extrato seco que as outras bactérias. Audi et al. (2004), avaliaram a atividade antibacteriana da casca de barbatimão e observaram atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e resistência a *Escherichia coli*.

Rebecca et al. (2002), em estudo feito com extrato acetônico bruto das cascas de *Stryphnodendron adstringens* em ratos, demonstraram baixa toxicidade em doses de até 2.000mg/kg, e obtiveram uma DL 50 de 2.699 mg/kg, porém, se utilizada por período de tempo prolongado nas doses de 800mg/kg a 1600mg/kg pode trazer efeitos tóxicos em animais.

2.1.2 *Kalanchoe brasiliensis* (Cambess.).

A sinonímia botânica é descrita como *Kalanchoe crenata*. É conhecido popularmente como: saião, coirama-branca, folha grossa, folha suculenta, folha de sapo, folha da costa ou orelha de monge (CORRÊA, 1926-1975).

Pertencente a família Crassulaceae, com ocorrência comum em regiões tropicais do Brasil e África, onde é empregada na medicina tradicional (ADENIKE; ERETAN, 2004). No Brasil, esta espécie aparece desde a Bahia até São Paulo, predominantemente na região litorânea (CORRÊA, 1926-1975).

Apresenta características botânicas como sendo um vegetal perene, com crescimento até 150 centímetros de altura, presença de folhas simples, alternas, opostas, carnosas, lanceoladas, apresentando gemas na sua bainha (Figura 2); flores hermafroditas, com corola amarelo-laranja, mais comprida que o cálice e o fruto possui semente com endosperma (CORRÊA et al., 2003).



Figura 2. Aspectos botânicos: *Kalanchoe brasiliensis*, crescimento até 150 centímetros, presença de folhas simples, opostas e carnosas (SILVA, 2007)

A origem da planta é incerta, sendo citada como origem indígena (BARROSO, 1991), como originária do Brasil (SOUZA V.; LORENZI, 2005) ou oriunda da África (LISBOA; FERREIRA; SILVA, 2006).

De acordo com Mourão et al. (1999) as folhas de *Kalanchoe brasiliensis*, são usadas externamente como um agente antiinflamatório nas artrites, injúrias, abscessos e aumento do linfonodos. Foi evidenciada atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, além de efeito inibitório da colinesterase, ação antifúngica e analgésica (TREVISAN et al., 2006), efeito hipotensor, antiinflamatório (CORRÊA et al., 2003) e larvicida e imunomoduladora (TREVISAN et al., 2006).

Em estudo realizado por Silva (2007a), não foi observada sensibilidade *in vitro* das cepas de *Streptococcus* sp. e *Escherichia coli* frente ao óleo essencial de *Kalanchoe brasiliensis*. Porém, foi detectada inibição frente aos espécimes de bactérias Gram positivas de *Staphylococcus aureus*, incluindo amostras multiresistentes e sensíveis a meticilina.

Uma variedade de fitoconstituintes já foi revelada em *Kalanchoe brasiliensis* como flavonóides glicosilados, taninos e esteróides (TREVISAN et al., 2006).

O extrato hidroalcoólico das folhas frescas da espécie *Kalanchoe brasiliensis* (Cambess) demonstrou propriedade inibitória da colinesterase em experimentos realizados com músculo reto abdominal isolado de sapos. Nestes experimentos, o efeito inibitório da d-tubocurarina nas respostas contráteis provocadas por acetilcolina foi efetivamente bloqueado pelo extrato. O mesmo efeito inibitório ocorre com a prostigmina, um anticolinesterásico conhecido. A observação destes efeitos possibilitou: atribuir ao extrato da planta uma atividade anticolinesterásica e, considerar que flavonóides glicosilados, revelados através de uma abordagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico, poderiam ser os responsáveis por este efeito inibitório da colinesterase (TREVISAN et al., 2006).

Trabalhos realizados por pesquisadores da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, demonstraram que o sumo de saião impede o desenvolvimento da inflamação semelhante à artrite em animais de experimentação e provoca a diminuição na quantidade de células do sistema imunológico (linfócito B e T). Essa supressão imunológica provoca inibição do crescimento de células tumorais em cultura e do desenvolvimento de tumores no dorso e peritônio de animais de experimentação (KOATZ, 2007)

2.1.3 *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

É descrito na literatura como sinonímia botânica o *Bryophyllum calycinum*, *Bryophyllum germinans*, *Bryophyllum pinnatum*, *Cotyledon calycina*, *Cotyledon calyculata*, *Cotyledon pinnata*, *Cotyledon rhizophilla*, *Crassuvia floripendia*, *Crassula pinnata*, *Sedum madagascariense* e *Verea pinnata*.

É uma planta perene da família Crassulaceae, popularmente conhecida como coirama vermelha ou folha da fortuna, coirama-brava, orelha de monge, erva da costa, regionalmente como pirarucu. Trata-se de um subarbusto de ramos herbáceos cobertos de penugem. As flores são de coloração rósea e apresentam-se em cachos no ápice dos ramos, as folhas são ovais, arredondadas na base e serrilhadas nas bordas. Os frutos são constituídos de pequenas cápsulas contendo sementes (Figura 3) (SILVEIRA; RODRIGUES; PAULO, [200?]).



Figura 3. A e B= Aspectos botânicos de *Kalanchoe pinnata*: subarbusto de ramos herbáceos, as flores são de coloração rósea e apresentam-se em cachos no ápice dos ramos, as folhas são ovais, arredondadas na base e serrilhadas nas bordas. (STARR,F.; STARR, K., 2002)

É nativa da África, encontrada em países com clima tropical, e amplamente disseminada no Brasil apresentando facilidade de adaptação climática, pelo seu caráter invasor (SCHMITT et al., 2003). A *Kalanchoe pinnata* é muito utilizada em medicina popular para o tratamento de diversas afecções, como por exemplo, em lesões gástricas, como antiinflamatório, imunossupressor, anti-leishmaniose, analgésico, antipirético, antimicrobiano das vias urinárias e genitais, antifúngico e antidiabético. Estas atividades estão relacionadas aos seus constituintes químicos, representados essencialmente por flavonóides glicosídicos, taninos, lipídeos, terpenos e alcalóides, entre outros (STEVENS et. al., 1995).

As folhas são amplamente utilizadas na fitoterapia popular como tônica e no tratamento de úlceras, gastrite, asma, tosse, aftas, calos, leucorréia, inflamações na gengiva, no intestino e nos tendões, usadas também no tratamento de lesões, abscessos, erisipelas, queimaduras e de osteoporose. Possui atividade anti-malarial e anti-histamínica. O seu efeito imunossupressor deve-se a presença de ácidos graxos, a exemplo de ácido palmítico, ácido esteárico e ácido araquidônico. A propriedade anti-leishmanial é atribuída à ativação de intermediários do óxido nítrico, enquanto que a propriedade antibacteriana está relacionada a briofilina, um antibiótico natural (SILVEIRA; RODRIGUES; PAULO, [200?]).

Existe uma diversidade de constituintes químicos que são responsáveis por todas estas propriedades terapêuticas. Dentre eles os flavonóides, que auxiliam no processo de cicatrização, cálcio, ácido succínico, ácido málico, ácido cítrico e ácido lático. Também

existem aminoácidos como arginina, que é anticancerígeno e fertilizante; glicina, que reduz a quantidade de ácido úrico no organismo e histidina. Os bufadienolídeos que estão presentes nas folhas de *Kalanchoe pinnata* promovem uma atividade anti-tumoral; dentre eles destaca-se o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato e a briofilina, sendo que esta última exibiu uma inibição do tumor mais acentuada entre as combinações testadas (GLAND; GUPTA, 1973).

Esta planta possui uma ação anti-colinesterásica, potencializando a resposta depressora da acetilcolina, o que a torna contra-indicada para indivíduos hipotensos. Seu mecanismo de ação é a estimulação de óxido nítrico (NO) que tem como ação a inibição de citocinas inflamatórias, ou impedir a produção de mediadores inflamatórios locais (SILVEIRA; RODRIGUES; PAULO, [200?]).

Schmitt et al. (2003) demonstraram pelo método de diluição em tubo, que o decocto da folha de *Kalanchoe pinnata* (*Bryophyllum pinnatum*), tem ação bactericida sobre bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp.), mas não tem ação nas bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Os testes toxicológicos realizados sobre *Poecilia reticulada* e citotóxico sobre *Artemia salina* demonstraram que *Kalanchoe pinnata* não apresenta nenhum tipo de toxicidade. (SILVEIRA; RODRIGUES; PAULO, [200?]).

2.2 Endometrite

A endometrite é uma inflamação do endométrio uterino (SELLNOW, 2007), muito comum em éguas (TROEDSSON, 2006), e causa sérias perdas econômicas (SELLNOW, 2007), ocorrendo em 25-60% das éguas vazias (BAIN, 1966 apud LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007).

É mais comumente associada a infecções bacterianas aeróbicas mas, também pode ser causada por bactérias anaeróbicas, pneumovagina, acúmulo de urina, sêmen, infusão intra-uterina com substância irritante (RIDDLE et al., 2005), fungos e protozoários (RIBAS, 1998).

Troedsson (1999) classifica as infecções uterinas como venéreas, crônicas ou infecção transitória pós-cobertura. As infecções venéreas são causadas pelo garanhão, disseminando um patógeno reprodutivo virulento entre as éguas, como por exemplo, a *Taylorella equigenitalis*, *Klebsiella pneumoniae* (DIMOCK; EDWARDS, 1928; PLATT; ATHERTON; ORSKOV, 1977) e *Pseudomonas aeruginosa* (HUGHES et al., 1966 apud CAUSEY, 2006). Em contraste, as infecções crônicas são infecções oportunistas persistentes em éguas que têm

tendência à contaminação uterina devido a defeitos de conformação perineal, pneumovagina, trauma durante o parto e perda de contratilidade uterina (LEBLANC et al., 1998) em associação com a expressão dos fatores de virulência bacterianos: aderência, produção de biofilme ou resistência à fagocitose. Sempre aparecem como infecções persistentes associadas a bactérias Gram negativas em éguas velhas. E, finalmente, a infecção pós-cobertura que ocorre seguida à monta natural ou inseminação artificial (TROEDSSON, 1996).

Segundo Watson (2000) a endometrite eqüina possui várias classificações: endometrite aguda, aparecendo após cobertura ou associada a infecções venéreas, endometrite infecciosa crônica, endometrite persistente pós-cobertura e endometriose (endometrite degenerativa crônica)

Hurtgen (2006) descreve que a condição inflamatória do útero pode ser categorizada como aguda, crônica, ativa, subclínica, pós-parto, bacteriana, fúngica, viral, induzida pela cobertura, persistente, e outras. Esses termos, segundo o mesmo autor, podem ser utilizados associados quando detectado uma inflamação no útero da égua.

Já Sellnow (2007), cita que existem basicamente, três categorias de endometrite: endometrite infecciosa aguda, que ocorre mais comumente em éguas velhas, pluríparas, caracterizada por intensa infiltração neutrofilica no endométrio, que secretam substâncias citotóxicas para o embrião impedindo a implantação (WATSON, 1988), infecção uterina crônica e endometrite persistente induzida pela cobertura.

Pensava-se que a resposta inflamatória após a cobertura era exclusivamente devido à contaminação bacteriana do útero no momento da monta ou inseminação (PYCOCK apud SELLNOW, 2007). Atualmente, é aceito que os espermatozóides, juntamente com as bactérias são responsáveis pela resposta inflamatória aguda no útero das éguas pós-cobertura ou inseminação (BRINSKO et al., 2003). Esta resposta inflamatória aguda após a cobertura ou inseminação artificial é um evento fisiológico esperado após a introdução de espermatozóides, bactérias, contaminantes (TROEDSSON, 1995) e debris celulares (SELLNOW, 2007).

Estas infecções pós-cobertura duram menos de 48 horas, porém em éguas susceptíveis pode ser prolongado o suficiente para impedir a gestação (CASEY, 2006).

Kotilainen et al. (1994 apud MALSCHITZKY et al., 2007), demonstraram que, quanto maior for o número total de espermatozóides da dose inseminante, mais intensa é a resposta leucocitária. Fiala et al. (2007), observaram que a quantidade de neutrófilos na luz uterina foi

maior nas éguas inseminadas com um bilhão de espermatozóides do que naquelas inseminadas com menores números, duas e quatro horas após a inseminação.

Segundo Troedsson et al. (1995 apud METCALF, 2000), esta resposta ocorre devido à natureza antigênica do espermatozóide, especificamente a ativação do complemento e deve ser modulada pela presença de plasma seminal. A inflamação uterina transitória pós-inseminação é importante e serve para limpar o útero do excesso de espermatozóides e debris. Os subprodutos deste evento aparecem como fluido, que deve ser naturalmente eliminado, deixando o útero estéril dentro de poucos dias (PYCOCK, 1990).

O transporte de espermatozóides do útero ao oviduto é completado em quatro horas após a cobertura (BRISKO; VARNER; BLANCHARD, 2003), e somente um pequena número dos espermatozóides ejaculados ou inseminados alcançam o oviduto (SCOTT; LIU; OVERSTREET, 1995).

Segundo Troedsson (1997 apud CARD, 2005), o plasma seminal deprime a resposta inflamatória endometrial aos espermatozóides em éguas cobertas por monta natural ou inseminação artificial com sêmen fresco ou resfriado. Entretanto, se a endometrite persistir por mais de quatro a cinco dias após ovulação, isto é incompatível com a sobrevivência embrionária (NEELY; LIU; HILLMAN, 1983; SELLNOW, 2007; WATSON, 1988).

O aumento da contração miometrial é também responsável pela eliminação de espermatozóides do útero através da cérvix logo após a cobertura (TROEDSSON, 2006). O rápido transporte dos espermatozóides que chegam até o oviduto coincide com o aumento das atividades uterinas (KATILA; SANKARI; MÄKELÄ, 2000). Porém, nem todos os espermatozóides excedentes são removidos através deste mecanismo, sendo necessário outros mecanismos de limpeza uterina (TROEDSSON, 2006).

O pico da inflamação endometrial ocorre 12-24 horas após cobertura (CARD, 2005; KATILA, 2001). Segundo Kotilainen, Huhtinen e Katila (1994), o útero reage rapidamente à presença do sêmen através de um aporte de neutrófilos, que são identificados no útero 30 minutos após a cobertura. Esta resposta objetiva a eliminação do excesso de espermatozóides e daqueles defeituosos ou mortos.

2.2.1 Éguas resistentes e susceptíveis

O fator mais importante na eficiência reprodutiva em éguas é a habilidade em manter um ambiente no lúmen uterino compatível com o embrião e a vida fetal (ASBURY; LYLE,

1993). O lúmen uterino de uma égua fértil normal é bacteriologicamente estéril (JACOB et al., 2002). Este é mantido livre de contaminantes através de mecanismos físicos, imunológicos e de um sistema linfático funcional (MALSCHITZKY et al., 2007). As barreiras físicas que impedem o acesso de microorganismos ao útero são a vulva, prega vestibulo-vaginal e a cérvix (LEBLANC et al., 1995).

As éguas, ao contrário de outras espécies domésticas de grande porte, apresentam relaxamento completo da cérvix durante o estro, de forma que o garanhão ejacula diretamente dentro do útero, na monta natural (DAY; MILLER, 1940 apud AMARAL et al; 1999). Mesmo na inseminação artificial, o sêmen é depositado no lúmen uterino, portanto as barreiras físicas são ultrapassadas, sendo o espermatozóide, proteínas do plasma seminal e bactérias do sêmen e do pênis do garanhão, responsáveis pela indução de uma resposta inflamatória aguda (TROEDSSON, 1997).

Um volume significativo de fluido seminal depositado dentro do útero deve ser eliminado antes do fechamento da cérvix. O tempo para eliminação do fluido é crítico, pois o embrião desce da tuba para o útero cinco dias após a ovulação (NOAKES et al., 1996). Em muitas éguas a endometrite pós-cobertura se resolve espontaneamente dentro de 24 a 48 horas e o ambiente uterino torna-se compatível com a vida embrionária e fetal (SELLNOW, 2007). Falhas na eliminação deste fluido e debris resultam numa coleção de líquido dentro do lúmen uterino durante o diestro (ADAMS et al., 1987), provocando morte embrionária por ação direta ao embrião e por lise do corpo lúteo (NOAKES et al., 1996).

Algumas éguas, geralmente mais velhas e pluríparas, desenvolvem uma deficiência imunológica local e falham em combater a inflamação uterina aguda estimulada pelo coito, pela introdução de bactérias oportunistas e contaminantes ambientais diretamente dentro do útero (HUGHES; LOY, 1975). Parto, exame reprodutivo, conformação perineal deficiente, defeitos na forma e angulação da vulva (LEBLANC; ASBURY; LYLE, 1989), deficiência da contratilidade uterina (CARD, 2005), presença de alterações inflamatórias crônicas no endométrio e fluido intra-uterino no diestro (BRINSKO et al., 2003), também contribuem para a contaminação do útero. As éguas que permanecem infectadas, que não respondem efetivamente e falham em eliminar a inflamação do útero a tempo de promover um ambiente adequado para o embrião (LEBLANC; ASBURY; LYLE, 1989), e desenvolvem uma endometrite persistente são chamadas de susceptíveis (SELLNOW, 2007). Éguas nesta condição apresentam na histopatologia um maior grau de lesões degenerativas, tanto do endométrio quanto dos vasos sanguíneos e linfáticos, o que pode dificultar a atividade dos

hormônios circulantes, alterar o aporte de células à luz do útero e diminuir a drenagem linfática (SCHOON, H.; SCHOON, D.; KLUG, 1997). Estas éguas demonstram atividade miometrial diminuída (TROEDSSON; LIU; THURMOND, 1993a), permitindo a aderência das bactérias ao endométrio pela demora na limpeza de subprodutos da inflamação (LEBLANC, 1994). Segundo Liu (1988), estas éguas apresentam histórico de infecções repetidas e endométrio classificado nas categorias II e III de Kenney (1978).

Ainda segundo Troedsson, Liu e Thurmond (1993a), as éguas susceptíveis apresentam um retardo de aproximadamente duas horas para iniciar a resposta contrátil à presença de espermatozoides e bactérias em relação ao observado em éguas sadias e esta atividade também tem uma duração menor. Em estudos *in vitro*, foi observado que a direção das contrações das fibras musculares é diferente entre as duas categorias de éguas. Enquanto em éguas sadias a contração ocorre a partir da ponta do corno uterino em direção à cérvix, nas éguas susceptíveis a contração não apresenta padrão rítmico e o útero tende a se contrair em direção à ponta do corno uterino, o que dificulta a eliminação de conteúdo pelo órgão (REITZENSTEIN et al., 2002).

Outra característica das éguas susceptíveis é a menor liberação de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) após a inseminação artificial ou à administração de ocitocina exógena, o que explica a menor capacidade contrátil do útero destes animais (NIKOLAKOPOULOS; WATSON, 2000). O resultado é o acúmulo de fluido no útero, que persiste por vários dias após a cobertura, acompanhado de um quadro inflamatório persistente e na maioria das vezes, de infecção bacteriana (LEBLANC, 2003).

Por outro lado, éguas saudáveis (KATILA, 1995), jovens, férteis, chamadas de resistentes, eliminam a inflamação em até 48 horas (TROEDSSON, 1997) ou 96h (ASBURY et al., 1982). Segundo Liu (1988) as éguas resistentes são aquelas que apresentam trato reprodutivo normal, determinado por palpação retal, culturas uterinas negativas, citologia negativa e biópsia endometrial classificada na categoria I de Kenney (1978).

Ball (1993 apud FERREIRA et al., 1999) relatou que a incidência de morte embrionária entre a fertilização e o 14º dia em éguas jovens e férteis foi de 9% e, em éguas idosas e sub-férteis foi de 62 a 73%. Segundo Brinsko et al. (2003), os clínicos podem prever se éguas são eficientes em promover a limpeza uterina baseado na quantidade de fluido intra-uterino presente durante o estro. A habilidade física do útero em eliminar bactérias, debris inflamatórios, e fluidos é um fator crítico no mecanismo de defesa uterino (SELLNOW, 2007). Durante o estro ocorrem períodos de atividade contrátil de

aproximadamente cinco minutos, alternados com períodos equivalentes de repouso (JONES et al., 1991 apud MALSCHITZKY et al., 2007). A resposta à agressão ocorre rapidamente, com um aumento da intensidade das contrações (MALSCHITZKY et al., 2007). Experimentos demonstraram que em éguas sadias, metade do radiocolóide infundido com colônias de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, é eliminada nos primeiros 60 minutos após a inoculação (LEBLANC, 1994).

Peterson et al. (1969 apud CAUSEY et al., 2006), não observaram diferença na capacidade de fagocitose entre éguas resistentes e susceptíveis. Asbury et al. (1980), não detectaram deficiência nos níveis de imunoglobulinas em éguas susceptíveis, mas ao contrário verificaram que os níveis se apresentavam um pouco elevados. Nenhuma diferença foi encontrada na migração de proteínas séricas ou neutrófilos no útero de éguas com infecção aguda, mas a debilidade do fluido estral em opsonizar estreptococos foi observada em éguas susceptíveis (CAUSEY et al., 2006).

2.2.2 Mecanismos de defesa uterina.

A inflamação é uma resposta protetora imediata que ocorre nos tecidos circunjacentes sempre que há lesão ou destruição celular. O processo inflamatório envolve uma série de fenômenos que podem ser desencadeados não só por agentes infecciosos, como também por agentes físicos, químicos, isquemia e interações antígeno-anticorpo (CARVALHO, J. 2004).

A capacidade de desencadear uma resposta inflamatória é fundamental, embora em algumas situações, possa ser exagerada e persistente, levando ao depósito de colágeno (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1984).

A resposta inflamatória apresenta uma série complexa de adaptações teciduais que envolvem principalmente os vasos sanguíneos, os componentes líquido e celular do sangue e o tecido conjuntivo, tendo como objetivo a destruição do agente agressor, seguida de uma série de eventos que visam reconstituir ou cicatrizar o tecido lesado (CARVALHO, J. 2004). Embora havendo uma sucessão previsível de fenômenos, as características, extensão e gravidade das alterações teciduais são modificadas por muitos fatores relacionados com o animal e com a patogenicidade do agente agressor (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1984).

Nas éguas o útero responde à agressão através de uma rápida migração de neutrófilos e proteínas séricas, incluindo imunoglobulinas, para o lúmen uterino e uma imediata expulsão

do material celular e produtos inflamatórios através da cérvix por contratilidade da musculatura lisa uterina (LEBLANC; ASBURY; LYLE, 1989).

O neutrófilo, a mais importante célula de defesa do útero, já está presente na luz uterina 30 minutos após a cobertura, atingindo o pico inflamatório em 12 horas (TROEDSSON, 1997). Substâncias quimiotáticas associadas a bactérias ou secreções uterinas são importantes em recrutar neutrófilos para o lúmen. É sabido que o fluido uterino de éguas clinicamente normais colhido durante o estro, aumenta a fagocitose dos neutrófilos circulantes quando comparado com o fluido do diestro (BLUE et al., 1984 apud WATSON, 1988).

Uma vez iniciado o processo inflamatório, uma série de mediadores pró-inflamatórios é liberada pelos neutrófilos durante a fagocitose, pelas células do endotélio vascular, por células endometriais lesadas e pelos macrófagos ativados pela inflamação. As principais funções desses mediadores são atrair mais células de defesa para o local da inflamação, facilitar o acesso dessas células e melhorar a eficiência da eliminação do agente agressor (MALSCHITZKY et al, 2007).

As prostaglandinas atuam induzindo alterações na permeabilidade vascular, as citocinas mantendo a inflamação ativa e as collagenases, elastases e gelatinases favorecendo o aporte de células e iniciando imediatamente o processo de reparação (MACKAY, 2000).

Um mecanismo de eliminação microbiana foi identificado mais recentemente envolvendo a produção de óxido nítrico. É um mediador anti-inflamatório sintetizado pelas células endoteliais e leucócitos (CARVALHO, J., 2004), sendo responsável pela lise de bactérias no interior do neutrófilo (MACKAY, 2000), e determina o relaxamento da musculatura lisa (ALGHAMDI et al., 2005). Esses autores sugerem que éguas susceptíveis têm aumento no acúmulo de óxido nítrico no lúmen uterino 13 horas após inseminação.

Oponinas, especificamente imunoglobulinas e complemento, são importantes no processo fagocítico, pois aumentam a aderência de organismos a membrana celular do fagócito (MALSCHITZKY et al., 2007).

O complemento é considerado o maior sistema efetor de defesa contra o microorganismo invasor (CARVALHO, J., 2004). Brown, Hansen e Asbury (1985 apud WATSON, 1988), reportaram que complemento estava presente na secreção coletada do útero de éguas seis horas após inoculação de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. A presença de complemento aumenta significativamente a opsonização e a atividade bactericida de neutrófilos (MENZEL, 1978 apud WATSON 1988) e permite a IgM agir como opsonina. Apesar de IgM ser mais eficiente que IgG, sua inabilidade de ter acesso ao sítio do tecido

inflamatório, faz com que a IgG seja a opsonina mais importante. O conceito de que a depleção do complemento pode explicar a redução na opsonização é a base para o tratamento de éguas susceptíveis com infusão de plasma. Em situações em que o útero é invadido, é acionado o sistema complemento, em especial os componentes C3 e C5 que, em conjunto com imunoglobulinas produzidas pela mucosa uterina atraem e facilitam a fagocitose por neutrófilos (TROEDSSON, 1997 apud MALSCHITZKY et al., 2007).

Estudos sugerem que quando o espermatozóide eqüino entra no útero, ativam o complemento na secreção uterina (TROEDSSON; LIU; THURMOND, 1993a). A clivagem do fator C5 em C5a e C5b libera um sinal para os PMNs, resultando no influxo de PMNs para dentro do lúmen uterino (KOTILAINEN; HUHTINEN; KATILA, 1994). Os PMNs ativados se ligam a espermatozóides na presença do complemento e estes são fagocitados (TROEDSSON et al., 2001). As frações C3a e C5a aumentam a permeabilidade vascular, contraem a musculatura lisa e estimulam a degranulação dos mastócitos. C5a é uma das principais fontes da atividade quimiotáxica para leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos que se acumulam e são ativados no local da inflamação (CARVALHO, J., 2004).

Durante a ativação dos neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), a $PGF2\alpha$ é liberada da membrana da célula pelo metabolismo do ácido aracdônico através da enzima ciclooxigenase. Além de ser um mediador inflamatório, a $PGF2\alpha$ causa contração da musculatura lisa do miométrio (TROEDSSON; SCOTT; LIU, 1995). Após a ovulação e o fechamento da cérvix o sistema linfático torna-se responsável pela drenagem de subprodutos do processo inflamatório, para isto é fundamental uma boa contratilidade miometrial (LEBLANC et al., 1995). Éguas com drenagem linfática deficiente tendem a acumular conteúdo no útero, apresentar cistos linfáticos visíveis à ultra-sonografia e são, freqüentemente, inférteis, podendo ocorrer a presença de lacunas linfáticas (LEBLANC, 1997).

Proteínas presentes no plasma seminal foram sugeridas como responsáveis por uma supressão da fagocitose de espermatozóides vivos pelos neutrófilos, em comparação ao que ocorre com as células mortas e apoptóticas, e também inibem a ativação dos componentes C5 e C3 do complemento, que atuam na quimiotaxia de neutrófilos e na opsonização (TROEDSSON et al., 2000 apud MALSCHITZKY et al., 2007).

Experimentos demonstram que, seguido a introdução de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* dentro do útero, $PGE2$ e outros metabólitos do ácido aracdônico aparecem no exsudato uterino em 30 minutos, acompanhados por neutrófilos. Os metabólitos do ácido

aracônico aumentam a permeabilidade vascular, com influxo de proteínas séricas e pico de neutrófilos quatro horas pós-inoculação (PYCOCK; ALLEN, 1990).

O fato de neutrófilos do útero de éguas susceptíveis a endometrite apresentarem menor capacidade bactericida do que os de éguas resistentes, sugere um possível efeito inibidor do fluido uterino sobre esta função neutrofílica (CHEUNG et al., 1985). A capacidade dos neutrófilos polimorfonucleares para orientar e se mover, provenientes do útero e da circulação sanguínea das éguas resistentes e susceptíveis à infecção uterina crônica foram avaliadas por Liu (1988) testou a migração quimiotática dessas células na fase de diestro. Esse autor concluíram que os neutrófilos provenientes do útero de animais susceptíveis respondem em menor intensidade aos fatores quimiostáticos, quando comparados aos provenientes de animais resistentes.

A habilidade migratória dos neutrófilos nas éguas, com mudanças endometriais e degenerativas pode estar comprometida. Uma vez no lúmen de éguas susceptíveis, os neutrófilos podem manter ou perder a habilidade de fagocitar bactérias. Estudos feitos em câmaras quimiostáticas constataram que neutrófilos polimorfonucleares das secreções uterinas de éguas susceptíveis tem menor capacidade de migrar e fagocitar bactérias, quando comparados aos de éguas resistentes (LIU et al., 1985). Esta fagocitose deficiente seria resultado da influência negativa das secreções uterinas de éguas susceptíveis, que seriam mais pobres em opsoninas que as secreções uterinas das éguas resistentes (TROEDSSON; LIU; THURMOND, 1993b).

Aparentemente, uma reação inflamatória mais intensa favoreceria uma recuperação mais rápida do endométrio (MALSCHITZKY et al., 2007). Estudos relataram que uma dose inseminante maior leva a uma maior estimulação dos mecanismos de defesa uterina, tornando a resolução da inflamação, induzida pelo espermatozóide, mais rápida (FIALA et al., 2007).

2.2.3 Microorganismos causadores da endometrite

Alterações uterinas em consequência de infecções bacterianas trazem importantes complicações à reprodução equina, resultando em falhas na concepção (SILVA N. et al., 1999). Tais falhas são resultados direto da ação dos microorganismos que penetram no útero pela cérvix, após cobertura e parição, resultando em endometrites ou metrites, diminuindo, de forma considerável, as chances de uma nova gestação a termo (GASTAL et al., 1989; RICKETTS, 1981).

Uma grande variedade de microorganismos vem sendo considerada causadora de infertilidade, morte fetal e infecção neonatal em éguas (GASTAL et al., 1989). Esta associação não está bem estabelecida, pois muitos desses microorganismos têm sido cultivados a partir de éguas e garanhões com fertilidade normal e sem evidência clínica da doença, contudo sabe-se que a genitália externa de uma égua normal, incluindo o vestíbulo e clitóris, independente do status reprodutivo e idade, possuem uma microbiota aeróbica mista (RICKETTS; MACKINTOSH, 1987) formada por *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* β hemolíticos, *Staphylococcus albus* e *Pseudomonas aeruginosa* (MCKINNON; VOSS, 1993), e que os garanhões albergam uma variedade de bactérias no trato genital, as quais são transferidas para as éguas no momento da cobertura (JACOB et al., 2002).

A endometrite bacteriana é um problema significativo em éguas cíclicas com baixa resistência a inflamação persistente e em éguas que são cobertas por monta natural (TROEDSSON et al., 2005). Falhas dos mecanismos de defesa imunológica do útero resultam em processos infecciosos por agentes oportunistas.

Em um estudo realizado por Langoni et al. (1994), em 810 amostras de *swabs* uterinos colhidos de éguas de diferentes raças, foi isolado *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (40,6%), *Staphylococcus* sp. (23,5%), *Escherichia coli* (12,3%), *Rhodococcus equi* (7,4%) e *Klebsiella pneumoniae* (3,6%). Estes demonstraram maior sensibilidade ao cloranfenicol e gentamicina. Já Silva N. et al. (1999), trabalhando com 206 *swabs* uterinos e cervicais de éguas encontrou em 164 *swabs* presença de microorganismos causadores de endometrite, sendo isolados *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (25,7%), *Escherichia coli* (15,1%), *Staphylococcus aureus* (9,2%), *Streptococcus* α -hemolítico (9,2%), *Pseudomonas aeruginosa* (3,9%), *Staphylococcus* coagulase negativo (6,3%), *Bacillus* spp. (1,9%), *Rhodococcus equi* (3,4%), *Proteus mirabilis* (1,5%) sensíveis *in vitro* a amicacina e gentamicina (70,2%), ampicilina (59,5%) e cloranfenicol (59,5%). Em 3,4% dos casos, as endometrites estavam associadas a mais de um tipo de bactéria (infecções mistas).

Jacob et al. (2002), examinaram 15 éguas vazias ao término da estação de monta, e observaram crescimento de microorganismos em 11 (73,3%) das éguas. Os microorganismos isolados foram *Enterobacter* sp. (30,8%), *Escherichia coli* (23%), *Streptococcus* sp. (15,4%), *Proteus* sp. (15,4%), *Klebsiella* sp.(7,7%), *Citrobacter* sp. (7,7%). Nos testes de susceptibilidade diante dos antimicrobianos utilizados, observaram maior sensibilidade a sulfazotrim (86,0%), enrofloxacina e florfenicol (77,7%), gentamicina e cloranfenicol

(69,3%). Nielsen (2005), em estudo realizado com 212 éguas, observou que a bactéria mais comumente observada foi *Streptococcus* β -hemolítico (77%).

Segundo Peter (1994 apud ALLEN, 1994) e Sellnow (2007), o *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* é o patógeno primário em aproximadamente 50% dos casos de endometrite bacteriana nas éguas, e está associada aos casos de endometrites persistentes (WATSON; STOKES, 1990). Watson (2000) cita que o *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* é o microorganismo mais comum nas infecções uterinas em éguas, aparecendo em 66% das infecções. Este microorganismo faz parte da microbiota normal da pele dos eqüinos e é um contaminante comum do útero pós-cobertura. O estabelecimento da infecção dependerá da eficiência dos mecanismos de defesa da égua (LEBLANC, 1997). Os fatores de virulência deste patógeno são a proteína anti-fagocítica M, sua cápsula hialurônica e toxinas, como a estreptolisina O, com atividade leucocidal (SELLNOW, 2007).

2.2.4 Patogenia microbiana

As bactérias são importantes em desencadear inflamação. O *Streptococcus* sp pode alterar a defesa uterina por estimular a produção de um exsudato inflamatório que se ficar retido no útero, contribui para a deficiência de opsonizar bactérias por degradar o complemento (TROEDSSON; LIU; THURMOND, 1993b). Algumas bactérias com exsudato tenácio aderem à superfície epitelial, impedindo sua remoção física (OLSON et al., 2002).

Complexo de biofilmes secretado por vários gêneros de bactérias, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*, promove uma matriz adesiva contribuindo para infecções persistentes e oportunistas com micro-colônias tenácias (PARKINS; CERİ; STOREY, 2001). Biofilmes também promovem resistência inerente aos antibióticos e às defesas imunológicas humoral e celular (OLSON et al., 2002).

Escherichia coli e *Streptococcus* β hemolítico parecem variar sua patogenicidade. Fluido uterino é comumente observado durante a avaliação ultra-sonográfica nas infecções estreptocócicas (CAUSEY et al., 2006). O aumento de fluido e do pH deve ser devido á liberação de super antígenos, estreptoquinases e outras toxinas, que atraem mediadores pró-inflamatórios para o lúmen uterino (ASBURY; GORMAN; FOSTER, 1984).

Pouco se conhece sobre a resposta inflamatória a *Escherichia coli* na égua. Sabe-se que adere de forma tenácia ao epitélio (BEACHEY, 1981). Em infecções crônicas, sabe-se que secreta biofilmes, uma matrix hidratada de polisacarídeos e proteínas, promovendo uma

matrix adesiva para microcolônias (COSTERTON et al., 1995 apud LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007).

A resistência à fagocitose é uma importante propriedade de muitos patógenos uterinos, incluindo *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* e *Klebsiella pneumoniae*. Em infecções por *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, isto é provavelmente mediado por uma combinação de variação antigênica, proteína M-like antifagocítica e cápsula de ácido hialurônico e receptores Fc (JONSSON; LINKMARK; GUSS, 1995). Receptores Fc na parede das células streptocócicas interrompem a cascata de complemento e promove oportunidade para organismos Gram negativos colonizarem o útero, caracterizando a natureza mista observada em algumas infecções (LYLE et al., 1991). Infecções mistas são mais comuns com *Escherichia coli* e *Streptococcus* β -hemolítico, pois estes desenvolvem mecanismos patogênicos que promovem infecções mistas

O *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de desenvolver múltiplos mecanismos de resistência a antimicrobianos como a expressão de bomba de efluxo, a inativação de aminoglicosídeos e modificação nas PBPs (proteínas ligadoras de penicilina) incluindo alteração de extrema importância em PBP-2, que confere resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos originando cepas chamadas meticilina resistente (MRSA) (ITO et al., 2003).

2.3 Métodos de Diagnóstico da Endometrite

Segundo Asbury e Lyle (1993), a chave para o diagnóstico da endometrite é a confirmação da presença ou ausência de inflamação uterina. A detecção precoce de uma inflamação endometrial não fisiológica através de técnicas como palpação retal, ultra-som, e citologia endometrial, juntamente com uma intervenção rápida sobre o processo inflamatório endometrial persistente, são requeridas para aumentar a taxa de prenhez (CARD, 2005). A acurácia no diagnóstico reduz as chances de tratar de forma errada éguas sem inflamação ou falhas em reconhecer uma inflamação leve que necessitaria de terapia (ASBURY, 1984a).

É essencial entender a diferença entre endometrite fisiológica induzida pela cobertura e a condição patológica de endometrite persistente pós-cobertura. A endometrite induzida pela cobertura é clinicamente evidente como uma descarga vaginal purulenta durante as primeiras 12 horas após cobertura. Este pode ser um sinal normal de um mecanismo natural e necessário para eliminar o excesso de sêmen do útero e não deve sofrer interferência (TROEDSSON et al., 2005).

É difícil identificar éguas susceptíveis antes da cobertura. Algumas éguas apresentam fluido livre presente no lúmen uterino antes da cobertura, porém muitas éguas não são diagnosticadas até serem cobertas (LEBLANC; ASBURY; LYLE, 1989).

O uso de cintigrafia para medir o “*clearance*” uterino tem sido útil neste diagnóstico, porém nem sempre está disponível. Entretanto, os veterinários utilizam a história prévia e os achados clínicos após cobertura para identificar éguas susceptíveis a endometrite persistente pós-cobertura (Ibid.).

Troedsson, Sott e Liu (1995) definiram éguas susceptíveis como aquelas que têm seus mecanismos de defesa comprometidos e sofrem de endometrite por organismos que são oportunistas, tal como *Streptococcus* β -hemolíticos.

Se ocorrer suspeita de susceptibilidade a endometrite persistente pós-cobertura, a égua deve ser monitorada por ultra-sonografia transretal, seis a 24 horas pós-cobertura. Éguas resistentes retêm fluido por até 12 horas. Se houver retenção de líquido no útero após este período, a égua deve ser considerada como tendo endometrite persistente induzida pela cobertura (TROEDSSON et al., 2005).

O diagnóstico da infecção uterina inclui a história de infertilidade, detecção da inflamação uterina, e isolamento do microorganismo (CAUSEY et al., 2006). Alguns métodos de diagnóstico de endometrite incluem exame clínico, palpação trans retal, ultra-sonografia do trato reprodutivo, exame com espéculo vaginal, cultura uterina, citologia e biópsia endometrial (RIDDLE; LEBLANC; STROMBERG, 2007).

2.3.1 Diagnóstico clínico: histórico, exame físico e palpação retal.

Silva N. et al. (1999) para isolar bactérias em infecções uterinas, utilizaram éguas com histórico de infertilidade, algumas com períodos de até cinco anos sem concepção e sinais clínicos de infecção uterina, detectados após exames ginecológicos.

O histórico de éguas com endometrite comumente indica uma diminuição do ciclo estral, com breves períodos de diestro. Em algumas éguas, é por vezes mencionada uma fase diestral prolongada. Pode haver ausência de ovulação em éguas com endometrite crônica. A reduzida atividade folicular pode resultar em anestro e também pode ocorrer a persistência de corpo lúteo nesse grupo de animais (LEBLANC, 2003).

O exame físico deve ter alta prioridade no diagnóstico (ASBURY, 1984a). Antes do exame do trato reprodutivo, a condição física geral da égua deve ser avaliada. Qualquer

problema sistêmico que possa alterar a fertilidade deve ser observado, pois a condição corporal da égua influencia diretamente na sua taxa de fertilidade. Além de uma avaliação geral, o períneo e conformação pélvica têm que ser examinado completamente (LEBLANC, 2003).

A estrutura normal da vulva atua como uma barreira de proteção contra a penetração de patógenos na vagina que, via ascendente, pode atingir as regiões anteriores do trato genital feminino. A integridade da região do períneo, que inclui o ânus, vulva e região cutânea adjacente, é fundamental para manter a função da vulva e do vestibulo vaginal, garantindo a higidez de vários segmentos do trato genital, contribuindo na manutenção da fertilidade (ASBURY, 1984a). O distúrbio da função da vulva e vestibulo, caracterizada por imperfeita oclusão vulvar possibilita a aspiração de ar contaminado do meio ambiente, com possibilidade de penetração de fezes, sujidades e microorganismos para dentro da cavidade vaginal. O corpo perineal torna-se mais irregular com o avançar da idade e em éguas pluríparas. O defeito ocorre freqüentemente em éguas magras, que apresentam ânus profundo e falta de tecido entre o reto e a vagina (GRUNERT et al., 2005).

A vulva é melhor avaliada durante o estro, quando o relaxamento e o alongamento dos lábios vulvares são mais acentuados. A integridade dos lábios vulvares, a angulação da vulva e a posição da comissura dorsal da vulva em relação à pelve têm que ser avaliada. Os lábios vulvares devem ser bem coaptados e serem firmes. Eles funcionam como uma barreira contra a contaminação externa do útero (LEBLANC, 2003).

Dividindo os lábios vulvares, a cor e a umidade das paredes vestibulares podem ser avaliadas. No estro apresenta um brilho cor de rosa e a mucosa vermelha. No anestro geralmente é caracterizado por uma mucosa pálida e seca. Quando apresenta cor vermelho-escura ou a cor turva indica inflamação. Uma mucosa pálida indica a dominância de progesterona (LEY, 2006).

Em um estudo realizado por Ribas (1998) das 25 éguas com histórico de patologias uterinas submetidas ao exame ginecológico, dez (40%) apresentaram conformação vulvar alterada e em duas (8%) foi observado corrimento vulvar.

Segundo Brinsko et al. (2003), a habilidade dos clínicos em predizer com mais acurácia a susceptibilidade de éguas a deficiência na limpeza uterina antes da cobertura deve facilitar no tratamento precoce e ajudar a reduzir a endometrite crônica pós-cobertura. Através do exame clínico pode-se verificar a presença de exudato na genitália externa e através da vaginoscopia observar presença de exudato e a hiperemia de vagina e cérvix.

O exame do trato vaginal e da cérvix através do espécuro é de absoluta necessidade. Mudanças na cor da mucosa, presença de exudato, lesões traumáticas e defeitos de conformação devem ser detectados através deste procedimento (LEY, 2006).

A endometrite caracteriza-se por um útero flácido e aumentado de volume, o que se deve ao edema inflamatório (HUGHES; LOY, 1975; MATTOS et al., 1984). Mudanças no trato tubular que são evidentes nos exames retais e vaginais sempre promovem evidência imediata a favor ou contra a presença de inflamação. O tônus uterino deve ser avaliado digitalmente no ponto médio dos cornos uterinos e graduado em uma escala de 1 a 4, sendo 1= tônus mínimo, flácido e 4= tônus máximo, túrgido, firme (ALLEN; PYCOCK, 1988). Um tônus uterino diminuído e a presença de fluido intra luminal são associados com deficiência na limpeza uterina e inflamação persistente (LEBLANC, 1999 apud CARD, 2005). A palpação do útero via retal poderá revelar acúmulos de líquidos anormais no lúmen uterino, alterações no tamanho, forma e tônus dos cornos uterinos (YOUNGQUIST, 1994 apud SMITH, 1994). A palpação retal do útero e cérvix é menos eficiente na detecção de secreções, porém em algumas situações sugere acúmulo de fluido e lesões focais no útero (ASBURY, 1984a).

2.3.2 Ultra-sonografia

A ultra-sonografia tem diversas aplicações como método de diagnóstico em várias espécies, especialmente no exame do aparelho reprodutor. Dentre as vantagens da técnica está o fato de não ser invasiva, relativamente simples de ser efetuada, segura tanto para o animal como para o operador, pode ser utilizada a campo e fornecer diagnóstico imediato na maioria dos casos (GUINTER, 1995).

A avaliação ultra-sonográfica deve ser considerada como parte do exame reprodutivo da égua. A habilidade de examinar o útero e ovários não invasivamente permite informações sobre a função reprodutiva (MCKINNON; VOSS, 1993).

Pesquisadores descreveram detalhadamente toda a técnica na égua, todos os eventos fisiológicos e as alterações do sistema genital, através de imagens obtidas em tempo real com o aparelho de ultra-som e estabeleceram padrões para a interpretação de patologias genitais através do exame ultra-sonográfico (MCKINNON; VOSS, 1993; GUINTER, 1995; ROHEN; SANTOS, M.; SANTOS, A., 2003; ROSSDALE; RICKETTS, 1980).

Na avaliação ultra-sonográfica do útero, deve-se ajustar a posição do transdutor para obter uma boa imagem do corno uterino. Um exame sistemático dos cornos uterinos é recomendado iniciando-se pela cérvix e progredindo distalmente ao longo de cada um dos cornos uterinos (FERNANDES, T., 2004).

O exame ultra-sonográfico do útero permite avaliar um aumento das dobras endometriais, com quantidade variável de fluido livre no órgão, o qual pode ter diferentes graus de ecogenicidade (CURNOW, 1991).

A aparência ultra-sonográfica do útero e das estruturas reprodutivas presentes nos ovários muda durante o ciclo estral. Estas mudanças, em conjunto com outras observações, ajudam a determinação da fase do ciclo estral (McKINNON; VOSS, 1993).

Durante o estro, os cornos uterinos ficam bem arredondados e o corpo do útero tem um padrão interdigitado de áreas ecogênicas e não ecogênicas alternando-se, semelhantes aos aros de uma roda ou fatia de uma laranja. As áreas de menor ecogenicidade são as partes edematosas externas de pregas endometriais. O edema é causado pela influência do estrogênio e as pregas endometriais em geral acompanham a produção deste hormônio, sendo visíveis no final do diestro, tornando-se bastante proeminente à medida que o estro progride e diminuindo ou desaparecendo 12 horas antes da ovulação (GUINThER, 1995).

Durante o diestro, a textura ecogênica é mais homogênea e o útero está bem circunscrito. Em geral identifica-se o lúmen uterino por uma linha branca hiperecogênica na área de aposição das superfícies endometriais. Isto é resultado de aposição das superfícies endometriais e é causado por reflexão especular (McKINNON; VOSS, 1993). Durante o anestro, o útero fica achatado e irregular, podendo contornar em íntima proximidade os órgãos abdominais circundantes (GUINThER, 1986).

Segundo Sellnow (2007), o uso do ultra-som tem um importante papel em diagnosticar a endometrite. A habilidade em identificar patologias uterinas através da ultra-sonografia é indispensável no manejo de éguas inférteis (GUINThER, 1995).

A ultra-sonografia transretal é o principal método de avaliação da dinâmica folicular. Os folículos ovarianos aparecem como estruturas não ecóicas, geralmente com uma borda delgada. Os folículos podem aparecer irregulares devido à compressão por outras estruturas ovarianas. O corpo lúteo é facilmente detectável um ou dois dias após a ovulação (FERNANDES, C., 2003).

Estudos demonstraram que pequenas coleções de fluido uterino (4x10 mm) observadas do meio ao final do diestro, através da ultra-sonografia, são indicadores de endometrite

(CURNOW, 1991). Acúmulo de fluido no útero é um dos sinais indicativos de uma égua susceptível (CAUSEY et al., 2006).

Os fluidos intra-uterinos começam a aumentar três a quatro dias antes do estro, atingindo o máximo no estro, e então declinando (FERNANDES, C., 2003). A relevância do acúmulo de fluido uterino é avaliada examinando a profundidade (mm), eco-textura (fluidos eco densos são associados a neutrófilos e debris), e persistência de fluido (BRINSKO et al., 2003). Segundo os mesmos autores, existe uma alta correlação ($K=0,80$) entre a presença de mais de 2 cm de fluido uterino no lúmen de éguas durante o estro, e susceptibilidade à endometrite pós- cobertura.

Segundo McKinnon et al. (1988), a ecogenicidade de cada coleção de fluido é classificada segundo escala de 1 a 4 (1= preto ou anecóico, 2= cinza escuro ou hipocóico, 3= cinza claro ou hipocóico e 4= branco ou hiperecóico).

Allen e Pycock (1988) sugerem que éguas susceptíveis apresentam maior quantidade de fluido durante o estro do que éguas resistentes e segundo Troedsson (1997) éguas susceptíveis retêm fluido no útero após cobertura, enquanto as resistentes eliminam em seis a 12 horas.

2.3.3 Citologia

A citologia de *swabs* ou *flushes* uterinos têm sido utilizada para estimar o ambiente uterino. É o método preferencial para detectar a presença de inflamação uterina, principalmente devido ao baixo custo da técnica, quando se comparado ao da cultura uterina (JACOB et al., 2003).

Os autores divergem com relação ao momento ideal para obtenção do material para o exame citológico. A maioria dos pesquisadores sugere a coleta no meio do estro, pois neste período a defesa uterina é máxima, portanto, se bactérias e neutrófilos estão presentes, um problema significativo existe (BROOK, 1993).

A presença de neutrófilos no lúmen uterino, detectada pela citologia, é um indicador absoluto de inflamação (ASBURY; GORMAN; FOSTER, 1984; CAUSEY et al., 2006), porém não determina a etiologia do processo (NIELSEN, 2005). Se somente poucos neutrófilos são encontrados, vários autores têm aplicado o critério semi-quantitativo para distinguir se a égua tem ou não endometrite. Esses métodos incluem a contagem de neutrófilos por campo, neutrófilos por lâmina, número de neutrófilos em relação às células

epiteliais, ou a percentagem de neutrófilos: >1 neutrófilo por campo em 240x; >5 neutrófilos por 10 campos em 400x; proporção de neutrófilos: células epiteliais: >1%.; >2%; >10% (AGUILAR et al., 2006).

Quando o processo é severo o grau de celularidade é facilmente visível através do exame citológico ou mesmo pela presença de pus nas secreções uterinas. Quando o processo é sutil, a única evidência é o aumento do número de células nas preparações para interpretação dos resultados citológicos. Alguns autores usam o sistema positivo-negativo, enquanto outros quantificam o grau de inflamação (CARD, 2005).

Segundo Knudsen (1982), os sistemas de classificação por categoria usando positivo-negativo, ou inflamação endometrial leve, moderada ou severa são problemáticos se não houver uma padronização da coleta e interpretação da citologia endometrial e cultura bacteriológica.

Segundo Asbury (1984a), a presença de abundantes neutrófilos indica que a égua apresenta endometrite aguda. Leblanc, Magsig e Stroberg (2007) citam que a citologia deve ser feita contando um mínimo de dez campos em aumento de 1000x e a amostra citológica deve se avaliada quanto à presença de células epiteliais, debris, bactérias e fungos. Exames citológicos que apresentam poucas células epiteliais, nenhum neutrófilo, debris ou bactérias são classificados como hipocelular. Segundo Crickman e Pugh (1986), a severidade da endometrite é graduada levando-se em consideração o percentual de neutrófilos em relação às células epiteliais, onde 0 a 3% de leucócitos não considera inflamação, 4 a 15% de leucócitos indica inflamação leve, 16 a 50% inflamação moderada e, > 50% inflamação severa (Figura 4).

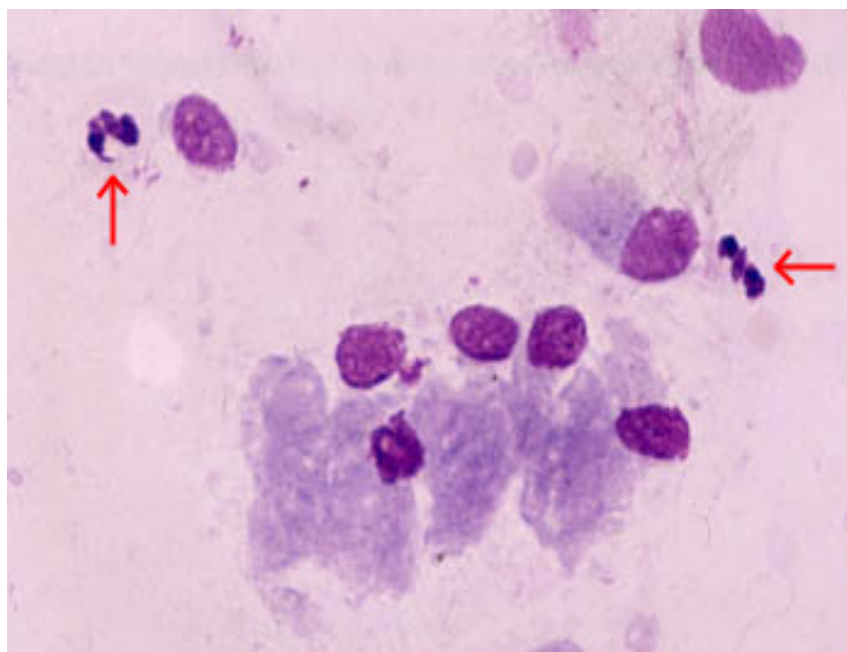


Figura 4. Presença de neutrófilos na amostra citológica (setas) obtida através da colheita da secreção do útero de éguas indicando processo inflamatório (Obj.400x) (PYCOCK, 2003).

Existem vários métodos para interpretação dos resultados citológicos. A tabela 1 mostra os métodos mais comuns que têm sido utilizados para interpretar amostras citológicas do endométrio das éguas (CARD, 2005).

Tabela 1. Métodos quantitativos para a interpretação de amostras citológicas endometriais de éguas (CARD, 2005).

Parâmetro	Autor	Ano
> 1 neutrófilo em cinco campos (x240)	Knudsen	1964
Média de neutrófilos com células epiteliais	Digby e Ricketts	1978
Média de células epiteliais por neutrófilos >10:1	Asbury	1982
>1 neutrófilos por campo	Asbury	1984
Neutrófilos por células epiteliais em oito campos	Couto e Hughes	1984
>5 neutrófilos em 10 campos	Brook	1985
Média de neutrófilos com células epiteliais	La Coeur e Sprinkle	1986
<15 células endometriais para 1 neutrófilos	Ley	1986
≥3% de células são neutrófilos	Crickman e Pugh	1986
≥2% de células são neutrófilos	Ball et al.	1988
≥1 neutrófilos por campo (x400)	Purswell	1989
> 0,5% neutrófilos	Ricketts e Mackintosh	1989

Um procedimento padrão para obtenção de amostras citológicas endometriais deve ser feito. Inicialmente deve-se esvaziar o reto da égua, ligar a cauda, lavar a região perineal com sabão neutro e higienizar com solução de iodo povidona. Deve-se usar uma luva de palpação retal com luva cirúrgica sobreposta e lubrificá-la. Um *swab* é colocado na palma das mãos, passado pela cérvix e o material deve ser coletado. Deve ser feito um esfregaço e a lâmina corada com Wright Giemsa (Diff Quik) e quando indicado, corante Gram (CARD, 2005).

A lavagem uterina com 60 ml com solução salina tamponada (PBS) pode ser utilizada. O líquido recuperado deve ser colocado em um tubo de 10 ml para ser centrifugado a 400xg por 10 minutos e posteriormente resuspendido em 1 ml de PBS. Uma gota da suspensão é colocada na lâmina, fixada e posteriormente corada (LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007).

As células presentes na amostra incluem células endometriais, neutrófilos, linfócitos, monócitos, macrófagos, eritrócitos e células descamativas (Ibid.). A presença de linfócitos, macrófagos ou plasmócitos usualmente indica que existe um problema crônico, apesar de macrófagos estarem ocasionalmente presentes quando um processo agudo está resolvendo. Eosinófilos estão relacionados com infecções fúngicas ou pneumovagina (DASCANIO; LEY; BOWEN, 1997). Eles são mais frequentemente observados em associação com inflamações crônicas e podem estar associados com inflamações fúngicas ou por leveduras. Hemácias indicam trauma ou inflamação muito aguda, enquanto que espermatozoides revelam cobertura recente ou inseminação (NEELY; LIU; HILLMAN, 1991) (Tabela 2).

Tabela 2. Tipos de células e debris observados no exame citológico uterino de éguas (DASCANIO; LEY; BOWEN, 1997).

Tipo celular	Origem	Significado
Células endometriais	Endométrio luminal ou glandular	Normal
Neutrófilos	Endométrio	Indicação de Inflamação aguda
Eosinófilos	Endométrio	Indicação de pneumoútero
Macrófagos	Endométrio	Indicação de inflamação crônica ou recidiva de inflamação aguda
Linfócitos, plasmócitos	Endométrio	Indicação de inflamação crônica
Células epiteliais escamosas ou colunares	Cervical, vaginal	Resultado da Coleta
Hemácias	Endométrio	Pós-parto ou trauma

Alguns veterinários preferem utilizar *swabs* protegidos para coletar a amostra endometrial, pois minimiza a contaminação vaginal (CARD, 2005). Aguilar et al., (2006) observaram a presença de neutrófilos no trato reprodutivo de éguas do vestíbulo até a cérvix. Estes achados têm substancial relevância nos casos onde as células endometriais são coletadas usando técnicas que não protegem a amostra do contato com a vagina e cérvix. A contaminação destes espécimes com neutrófilos determinam um falso diagnóstico de endometrite, levando a um tratamento desnecessário a uma condição que não está presente.

Wingfield e Ricketts (1982) verificaram em experimentos que 91% das éguas com evidência clínica de endometrite persistente apresentavam inflamação na citologia, porém somente 45% apresentavam achados bacteriológicos positivos. Em um estudo realizado por Ribas (1998) com 25 éguas com histórico de sub-fertilidade, foi diagnosticada inflamação em 88% dos animais. Já Riddle, Leblanc e Stromberg (2007) observaram presença de inflamação nos exames citológicos em 19,9% das éguas avaliadas sem seleção prévia.

O exame citológico e a cultura uterina detectam a ocorrência de uma endometrite aguda ou crônica. Segundo Langoni et al. (1994) existe uma correlação positiva entre culturas positivas e exames citológicos. Em estudo realizado por Langoni et al. (1999), 81% (379/468) das amostras com crescimento bacteriano apresentaram citologia positiva. Quando a cultura é positiva, sem presença de PMNs na citologia uterina é indicativo de uma contaminação durante a coleta. E uma cultura positiva, com a presença de PMNs na amostra indica uma endometrite ativa (HASSLER, 1999 apud JACOB et al., 2003).

2.3.4 Cultura

A cultura de bactérias aeróbicas do útero de éguas é o método mais comum para diagnosticar endometrite, entretanto, o isolamento de bactérias não necessariamente confirma a presença de endometrite, nem falhas em isolar a bactéria eliminam a patologia (HUGHES, 1980).

Os exames bacteriológicos representam somente um teste indireto para o diagnóstico, sendo o *swab* uterino protegido o método de coleta de eleição. Deve-se levar em consideração que o isolamento de determinado microorganismo não representa necessariamente a presença de endometrite, pois ocorrem resultados falsos positivos devido à contaminação do ambiente (JACOB et al., 2002; LANGONI et al., 1994), genitália externa e vagina (LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007). Também podem ocorrer culturas falso-negativas, que são

associadas com amostra inadequada, pois o *swab* somente tem contato com uma área do endométrio de 1-2 cm, diretamente cranial a cérvix (Ibid.).

A detecção da bactéria por si só não é um critério adequado para concluir o diagnóstico porque os organismos envolvidos são na maioria das vezes comensais e podem facilmente contaminar a cultura. Esta proporciona informações úteis no diagnóstico de infecções uterinas se usada em conjunto com a citologia uterina, pois ajuda na detecção de culturas falso-positivas (CAUSEY et al., 2006). Organismos comensais (contaminantes), isolados incluem, *Moraxella* spp., *Neisseria* spp., *Streptococcus* spp. (α hemolítico e não hemolítico), *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus albus*, *Anthracooides* spp. (RICKETTS; YOUNG; MEDICI, 1993).

A interpretação dos resultados da cultura é baseada não somente no organismo isolado mas também na história clínica da égua e resultado de exames ginecológicos (DIGBY, 1978). Em um estudo realizado, bactérias foram isoladas em 15 (31%) espécimes de *swabs* endometriais em 48 éguas, sem evidência de endometrite aguda (HINRICHS et al., 1989 apud RICKETTS; YOUNG; MEDICI, 1993). Estudos têm mostrado que em éguas virgens sem evidência citológica de endometrite aguda, foram isoladas bactérias anaeróbicas do útero (RICKETTS; MACKINTOSH, 1987).

Éguas com anormalidades genitais como pneumovagina, injúrias vulvares, retovaginal ou cervical ou que possuem o mecanismo de defesa deficiente apresentam endometrite aguda persistente. (HUGHES; LOY, 1975). Segundo estes autores, a endometrite é muito mais um reflexo das anormalidades genitais individuais das éguas, do que dos organismos microbianos isolados.

Segundo Silva N. et al. (1999), a coleta do material através de *swabs* uterinos protegidos deve ser feita após higienização externa da vulva e do períneo. Imediatamente após a coleta, os *swabs* devem ser transportados, sob refrigeração em tubos de ensaio com caldo BHI e incubados a temperatura de 37°C por 24-48 horas. Após esse período, procede-se à semeadura em placas de ágar sangue desfibrinado de carneiro e incubação em estufa a 37°C por 24 horas. Deve ser realizada a identificação dos organismos e dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco.

Em pesquisas realizadas por Doig, Mcknight e Miller (1981), em 92 culturas uterinas de éguas inférteis clinicamente normais, foram isoladas bactérias em 28 espécimes (30,4%). O isolado mais comum foi *Streptococcus* β -hemolítico (10/28) e *Escherichia coli* (11/28). De 64 éguas que foram negativas na cultura, três (5%) apresentavam uma resposta neutrofílica.

Infiltrado de células mononucleares foi encontrado em 75% das éguas com cultura positiva e em 48% das culturas bacteriológicas negativas. Comparando os resultados da cultura uterina e da biópsia endometrial, observaram que culturas positivas nem sempre estão associadas com evidências histopatológicas de endometrite.

Em estudo realizado por Leblanc (2007) o organismo mais freqüentemente isolado foi o *Streptococcus* β -hemolítico (39%), com *Escherichia coli* sendo o segundo organismo mais isolado (16%). Juntos os dois organismos representaram 55% das culturas positivas. Dois ou mais organismos foram isolados em <2,3% das culturas positivas.

Em um estudo realizado durante 11 anos, onde foram isolados 16.386 microorganismos obtidos de 24.913 *swabs* uterinos, a endometrite aguda foi diagnosticada em 21% dos isolados. *Pseudomonas aeruginosa* (46%), *Proteus* spp. (34%), *Klebsiella oxytoca* (34%), *Enterobacter aerogenes* (30%), *Streptococcus* spp. β -hemolítico (29%), *Klebsiella pneumoniae* (29%), *Pasteurella* spp. (27%), *Escherichia coli* (23%), *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* (20%), foram isolados de espécimes com citologia positiva ($\geq 0,5\%$ de leucócitos polimorfonucleares), associadas com endometrite aguda (RICKETTS; YOUNG; MEDICI, 1993).

2.3.5 Biópsia endometrial

O útero da égua é composto por três camadas. A mucosa uterina ou endométrio é a camada mais interna. A camada média é constituída pelo miométrio, subdividido em duas outras camadas, a muscular circular interna e a muscular longitudinal externa, intercaladas pela camada vascular. A camada mais externa ou perimétrio reveste todo o órgão (KENNEY, 1978).

O endométrio é constituído por duas camadas, o epitélio, que reveste o lúmen uterino e a lâmina própria, que se estende desde a membrana basal do epitélio até a musculatura circular interna do miométrio. O epitélio é constituído por células que vão de cuboidais a colunares alta de acordo com a fase do ciclo estral. São em até 50% ciliadas e estão dispostas de forma simples sobre uma membrana basal (QUEIROZ, 1991).

A lâmina própria é composta por duas camadas, que são divididas de acordo com a densidade das células do estroma endometrial. O estrato compacto, mais interno e em contato com o epitélio uterino, mede de 0.75 a 1 mm de espessura; é caracterizado pela alta densidade de células do estroma e pelo grande número de capilares junto à membrana basal. As células

do estrato compacto são dispostas de forma irregular em rosetas ou estreladas, com o núcleo mais oval do que arredondado e citoplasma escasso. O estrato esponjoso possui baixa densidade populacional de células, com muitas fibras interligando-as e criando uma aparência esponjosa. Os espaços na área são preenchidos com fluídos tissulares e se misturam a capilares, arteríolas, vênulas, muitos vasos linfáticos e, ocasionalmente, pequenas artérias musculares. A principal estrutura contida na lâmina própria é a rede glandular uterina. Essas glândulas são derivadas do epitélio endometrial e penetram na lâmina própria formando inicialmente um ducto e depois várias ramificações. São estruturas que se modificam frequentemente, em resposta aos estímulos hormonais durante a atividade reprodutora (KENNEY, 1978).

As variações cíclicas da morfologia endometrial durante a estação de monta refletem os níveis de esteróides sexuais ovarianos, e caracterizam as fases do ciclo estral. Da mesma forma, durante os períodos de transição e de anestro estacional, o exame do endométrio indica o início ou ausência da atividade ovariana. (KENNEY; DOIG, 1986). As éguas durante o anestro estacional apresentam endométrio atrófico. Na fase de diestro o epitélio endometrial e glandular são cuboidais, as glândulas não se apresentam tortuosas e podem conter secreções espessas (QUEIROZ, 1991).

Com a implantação da fase estrogênica, através da presença de um folículo maduro no ovário, as células do epitélio glandular e do lúmen endometrial tornando-se colunares altas, com presença de vacúolos na base de algumas delas. A lâmina própria torna-se edemaciada e o estroma menos denso, com bom espaçamento glandular. As glândulas tornam-se alongadas e podem no início desta fase apresentar ao corte formações de ninhos glandulares. São formações temporárias que não devem ser confundidas com seqüestro por fibrose. É importante observar a presença de polimorfonucleares, apenas no lúmen dos pequenos vasos sanguíneos. A presença de neutrófilos no estroma caracterizaria a existência de um processo inflamatório (VAN CAMP, 1988).

A biópsia endometrial é um procedimento confiável e seguro para o diagnóstico e prognóstico de distúrbios endometriais relacionados à infertilidade na égua (SCHOON et al., 1997 apud KELLER et al., 2004). É indicada para qualquer égua não prenhe com suspeita de patologia uterina (DOIG; MCKNIGHT; MILLER, 1981).

Van Camp (1988), após realizar uma revisão de literatura, interpretação e avaliação prognóstica da biópsia endometrial concluiu que a técnica é estabelecida com segurança e efetividade em avaliar o status reprodutivo do útero das éguas e que isto ajuda ao clínico na

interpretação do histórico, e de achados físicos e laboratoriais, contribuindo para a escolha terapêutica.

Doig, Mcknight e Miller (1981), descrevem que o valor da técnica está em determinar as bases para prever futura habilidade do útero em manter a gestação a termo. Ele enfatiza que a biópsia endometrial deve ser interpretada com cuidado, em contexto com histórico e outros exames.

Segundo Doig e Waelchli (1993), a técnica é útil para detectar alterações associadas com baixa fertilidade, não facilmente diagnosticadas por outros métodos, e para monitoração da resposta a uma terapia uterina específica. Segundo estes autores, esta técnica deve ser usada em conjunto com o histórico, exame dos órgãos genitais externos e internos, vaginoscopia e cultura do útero.

A biópsia associada ao exame histopatológico proporciona informações importantes sobre as condições do endométrio, permitindo uma correlação entre os achados histopatológicos e a futura perspectiva da "performance" reprodutiva das fêmeas (QUEIROZ, 1991).

A biópsia endometrial tem mostrado ser de alto valor no diagnóstico de éguas sub-férteis, e inférteis (DOIG; MCKNIGHT; MILLER, 1981) incluindo éguas vazias após a estação de monta, éguas repetidoras de cio ("repeat breeders"), éguas com histórico de perda embrionária precoce e éguas com endometrite clínica e piometra (KENNEY; DOIG, 1986).

Segundo Doig, Mcknight e Miller (1981), o diagnóstico da endometrite aguda pode ser adequadamente realizado através da biópsia endometrial, porém o exame citológico da secreção endometrial constitui-se um método de diagnóstico alternativo quando o exame de biópsia é inviável ou quando um resultado imediato é necessário. A desvantagem da técnica é a demora entre a coleta e o resultado laboratorial (NIELSEN, 2005).

A técnica consiste em utilizar uma pinça de biópsia eqüina para coletar a amostra com no mínimo 10 x 20 x 3 x 3 mm de tamanho para apropriada interpretação histológica. O ideal é coletar amostras do assoalho e teto de cada corno uterino e corpo. Porém, devido à necessidade de preparação higiênica e procedimento para cada amostra, rotineiramente a retirada de cinco amostras é impraticável. Têm-se mostrado que uma amostra é essencialmente representativa do endométrio como um todo (KENNEY; DOIG, 1986). Na ausência de anormalidades uterinas palpáveis, as biópsias devem ser retiradas do corno uterino esquerdo ou direito, local clinicamente chamado de região de implantação do embrião.

Se existir uma área anormal detectável por palpação ou ultra-sonografia, a biópsia deve ser retirada da área afetada e da área normal (DOIG; MCKNIGHT; MILLER, 1981).

Devido à facilidade de dilatação da cérvix da égua, este procedimento pode ser feito em qualquer fase do ciclo estral, sendo importante informar o estágio do ciclo estral e achados físicos durante a coleta da amostra (Ibid.).

As biópsias uterinas devem ser conservadas em formalina a 10%, embebidas em parafina após procedimento padrão, seccionadas em micrótomo a 3-4 µm e coradas com hematoxilina-eosina. As amostras devem ser avaliadas em aumentos de 100, 200 e 300x (KELLER et al., 2004). Segundo Doig, Mcknight e Miller (1981), as amostras devem ser fixadas em solução de Bouin's por uma a três horas e transferidas para formalina a 10% para serem transportada para o laboratório.

Rossdale e Ricketts (1980) classificaram as endometrites pelos achados de células inflamatórias, em endometrites agudas (caracterizada principalmente pela presença de infiltrado de polimorfonucleares) e crônicas, subdividindo essas em infiltrativas e degenerativas. As infiltrativas são caracterizadas pela presença de infiltrados inflamatórios compostos por leucócitos mononucleares, histiócitos e plasmócitos. Já as degenerativas, além da presença de infiltrados, apresentam fibrose no estroma e dilatações císticas e glandulares.

Asbury (1984a) classificou a resposta inflamatória em aguda ou crônica e ocasionalmente poderia consistir de uma resposta crônica com presença de reação aguda superimposta.

A infiltração celular deve ser avaliada de acordo com o tipo de célula, distribuição e severidade. Os tipos de células são polimorfonuclear (endometrite infiltrativa aguda) ou linfócitos e células plasmáticas (endometrite infiltrativa crônica). A distribuição de células é caracterizada quanto à localização no endométrio (lúmen, estrato compacto, estrato esponjoso ou dentro do lúmen glandular) (DOIG; MCKNIGHT; MILLER, 1981).

A severidade da infiltração celular é subjetivamente graduada como: leve (poucas células, usualmente localizada no estrato compacto ou ocasionalmente como foco isolado no estrato esponjoso), moderada (infiltrado celular difuso no estrato compacto e/ou frequentemente na área periglandular ou dentro do lúmen da glândula), ou severa (infiltrado difuso de células através do endométrio e freqüentemente induzindo pleomorfismo no epitélio) (KENNEY, 1978). A presença de infiltração celular moderada ou severa é utilizada para alertar aos clínicos sobre uma possível necessidade de tratamento (DOIG; MCKNIGHT; MILLER, 1981).

A fibrose endometrial é graduada em quatro categorias: A) ausente, B) leve (frequentemente apresenta fibrose periglandular com menos de quatro focos fibróticos na média de três campos lineares de 5,5 mm), C) moderada (proeminente ninho glandular e quatro ou mais focos fibróticos por 5,5 mm) ou D) severa (fibrose em todo o espécime coletado, com atrofia glandular e/ou mudança cística glandular (KENNEY, 1978).

Os resultados da biópsia endometrial são categorizados e refletem a associação entre patologia e eficiência reprodutiva. A categorização é baseada no aumento da gravidade da inflamação, devido à migração de neutrófilos através do tecido endometrial, algumas vezes associadas a mudanças degenerativas do epitélio luminal (KELLER et al., 2004).

Kenney (1978), propôs um sistema de classificação que era baseado em três categorias: grupo de éguas com endométrio normal (categoria I), éguas com endométrio severamente afetado (categoria III) e um grupo intermediário entre os dois (categoria II), e correlacionada com a taxa de prenhez. Éguas com o endométrio classificado nas categorias I e II e com histórico de infecções repetidas são consideradas potencialmente susceptíveis (LIU, 1988). Segundo Kenney (1978) éguas com o endométrio classificado na categoria III possuem 11% de taxa de parição, enquanto éguas com endométrio classificado como I apresentam 68% e categoria II cerca de 51%.

Usando o sistema originalmente proposto por Kenney (1978) como base, porém observando a extensão de fibrose, Kenney e Doig (1986) e Waelchli (1990), propuseram uma nova avaliação com quatro categorias: I, IIA, IIB e III.

Na categoria I, classificada com endométrio normal, nenhuma atrofia está presente durante a estação fisiológica e nenhuma hipoplasia das glândulas é observada. Mudanças patológicas envolvendo inflamação e fibrose são escassas.

Na categoria IIA, ocorrem alterações histológicas endometriais leves. Alterações inflamatórias são caracterizadas como leve a moderada, apresentam infiltração difusa no estrato compacto com células inflamatórias e secreção, e apresentam frequentemente focos no estrato compacto e esponjoso. Alterações fibróticas glandulares são freqüentes apresentando duas a três camadas ao redor dos ninhos glandulares. Apresentam lacunas linfáticas e atrofia endometrial.

Na categoria IIB, aparecem alterações histológicas endometriais moderadas, com a inflamação caracterizada por infiltração moderada difusa ou focos de células inflamatórias no estrato compacto. Apresentam fibrose difusa e moderada normalmente envolvendo quatro ou

mais camadas ao redor das glândulas. Pode ser observada degeneração glandular cística associada à atrofia glandular.

A categoria III, onde ocorrem alterações endometriais severas, observa-se infiltrado difuso generalizado de células inflamatórias no estrato compacto e fibrose glandular severa. Severa degeneração glandular cística associada à atrofia glandular não uniforme, lacunas linfáticas severas que apresentam textura rugosa que são palpáveis ao exame ginecológico.

Estes autores sugeriram que a expectativa de taxa de parição do grupo I era de 80 a 90%, na categoria IIA era 50 a 80%, IIB: 10 a 50% e categoria III era de 10% (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação do grau de endometrite, segundo: Kenney e Doig (1986) e Waelchli (1990).

Graus	Classificação das Endometrites
I	SEM INFLAMAÇÃO
IIA	INFLAMAÇÃO LEVE
IIB	INFLAMAÇÃO MODERADA
III	INFLAMAÇÃO SEVERA

Segundo Van Camp (1988), a acurácia no prognóstico aumenta avaliando não somente a lesão histopatológica detectada na amostra coletada inicialmente, mas também na habilidade do endométrio em responder ou não ao tratamento, re-avaliando a lesão histológica em uma segunda amostra uterina.

Dois estudos usando um sistema de categorização similar envolvendo quatro categorias, demonstrou baixa taxa de potros nascidos de éguas da categoria III, (0%) e excelente taxa de nascimento na categoria I (82% e 70%). As categorias IIA e IIB apresentaram taxa de nascimento intermediária em cada estudo, porém variável entre os estudos (74% e 42%; 46% e 18%) respectivamente. Esta variabilidade provavelmente ocorreu devido a fatores como idade das éguas, anos sem parição e manejo durante a cobertura, pois estes fatores influenciam as categorias IIA e IIB (DOIG; MCKNIGHT; MILLER, 1981; WAELCHLI, 1990)

Keller et al. (2004), classificaram como grau 1 o endométrio com 0 a 15 células/campo, como grau 2 o endométrio com 15 a 30 células/campo, como grau 3 o com >30 células/campo. Consideraram como graus intermediários (1,5 a 3,5) aqueles que a endometrite abrangia o estrato esponjoso (0,5 grau a mais).

Segundo Ginther (1986), a idade da égua é um fator importante considerando que há uma maior perda da gestação com o avançar da idade. Aparentemente, este grupo de animais tem sido caracterizado por alterações degenerativas no endométrio (BALL et al., 1988), o que pode dificultar a atividade dos hormônios circulantes, alterar o aporte de células à luz do útero e dificultar a drenagem linfática (SCHOON, H.; SCHOON, D.; KLUG, 1997). As alterações também incluem endometrioses e alterações vasculares (BALL et al., 1988).

Segundo Doig, Mcknight e Miller (1981), a diminuição da fertilidade em éguas idosas ocorre como resultado do aumento da severidade da fibrose endometrial. Carnevale e Ginther (1992) descrevem que éguas mais velhas geralmente apresentam complicações histológicas mais graves do que éguas mais jovens.

Ricketts e Alonso (1991) relataram que infiltrações de células mononucleares e doença endometrial degenerativa crônica tinham correlação significativa com idade e parições, e idade e graus de degeneração endometrial crônica. Demonstraram ainda, que a endometrite aguda, sozinha ou associada com graus de infiltrado de células mononucleares e doença endometrial degenerativa crônica são os achados histopatológicos mais comumente encontrados em biópsias endometriais de éguas sub-férteis e inférteis durante exames ginecológicos de rotina.

Tem sido reportado que mudanças degenerativas levam à incompetência endometrial, reduzindo progressivamente o potencial de parição, e aumentando a taxa de perdas embrionárias e abortos (CARNEVALE; GINTHER, 1992).

Hurtgen (2006) obsevou que éguas idosas vazias, com mais de 12 anos, inseminadas com sêmen fresco ou congelado desenvolvem uma reação inflamatória aguda.

Segundo Rosciani et al. (2000), a biópsia uterina é indispensável para avaliar a habilidade do útero em manter a prenhes, pois permite determinar estados de fibrose, endometrite crônica, endometriose, os quais reduzem a fertilidade e não são diagnosticados por outros métodos.

Aguilar et al. (2006), relataram que a biópsia uterina de éguas idosas vazias é caracterizada por dilatação do lúmen das glândulas, e infiltrado difuso leve a moderado, fibrose periglandular que varia de leve a moderada, e ninhos glandulares fibrosados e não fibrosados

Doig, Mcknigh, Miller (1981) e Asbury (1984a) observaram que as lesões inflamatórias do endométrio não estão necessariamente associadas com o isolamento de bactérias aeróbicas. Somente cinco (18%) éguas com cultura positiva apresentaram evidência

microscópica de neutrófilos no lúmen uterino ou endométrio. Segundo estes autores, com o incremento de novas técnicas de coleta das secreções uterinas reduzindo a contaminação, esta discrepância tende a aumentar.

Tem sido reconhecido que a presença de células polimorfonucleares é o melhor indicador de inflamação, porém sem a detecção de cultura positiva e de um agente causal, é difícil propor protocolos para o tratamento das éguas (RICKETTS, 1999). Roszel e Freeman (1988) indicaram a biópsia uterina como método de diagnóstico para controle da resposta uterina a um tratamento.

Segundo Asbury (1984a) a associação entre lesões histológicas e infecção uterina é baixa em casos de inflamação crônica.

Doig, Mcknight e Miller (1981) em estudos realizados com 700 éguas inférteis, relataram que 88,3% apresentavam fibrose endometrial, sendo que a maioria, 50,9% apresentavam fibrose leve e 35,1% fibrose moderada. Infiltração celular foi observada em 51% de biópsias endometriais. A combinação de endometrite infiltrativa aguda e crônica foi observado em 6% das éguas, endometrite infiltrativa crônica leve foi observada em 35% e endometrite infiltrativa crônica moderada a severa foi observada em 10% das éguas.

Em pesquisas realizadas por Ribas (1998) em 25 éguas com problemas reprodutivos e, média de idade de 7,5 anos, uma (4%) foi classificada com grau I, 15 (60%) foram classificadas com grau IIA, oito (32%) classificadas com grau IIB e uma égua (4%) com grau III, segundo classificação de Kenney e Doig (1986).

Rosciani et al. (2000), em experimento realizado com 29 éguas doadoras de embriões provenientes de um haras da província de Corrientes, Argentina, observaram que 38% delas apresentavam endométrio classificado como grau I, 48,2% como grau IIA, 10,3% classificadas como grau IIB e 3,4% como grau III. Neste mesmo experimento os autores observaram que das seis éguas (20,6%) com diagnóstico citológico positivo para inflamação uterina, cinco foram classificadas com endométrio entre IIA e IIB.

Moreira et al. (2007) ao avaliarem o útero de 25 éguas doadoras e receptoras de programas de transferência de embriões, com histórico de subfertilidade, observaram que 48% das éguas apresentavam histopatologia grau IIB, 40% foram classificadas como grau IIA e 12% como grau III. Neste mesmo experimento, os autores avaliaram o endométrio de 11 doadoras e receptoras sem histórico reprodutivo de sub-fertilidade, estes observaram que oito éguas (73%) apresentaram classificação de biópsia endometrial grau IIA, duas (18%) apresentaram grau IIB e uma (9%) foi classificada como grau III.

Em um estudo realizado por Waelchli (1990) com 201 éguas comparando o valor do exame histológico, citológico e bacteriológico em diagnosticar inflamação aguda e infecção, relatou que 43 (21%) dos espécimes de biópsias uterinas e 26 (13%) dos espécimes citológicos apresentavam leucócitos polimorfonucleares, e que estas células estavam presentes em todos os casos onde os resultados da cultura foram considerados significantes. Este estudo demonstrou que a presença de grande número de polimorfonucleares na biópsia tem alta correlação com o isolamento de bactérias patogênicas, mas não com aquelas consideradas comensais.

2.4 Métodos de Tratamento da Endometrite

No passado acreditava-se que a endometrite era exclusivamente resultado de contaminação bacteriana no útero. As estratégias de tratamento eram focadas na prevenção da entrada de bactérias no útero e as éguas com sinais de endometrite, eram tratadas com antibióticos (TROEDSSON, 2006). Segundo Asbury (1984a) apesar da descoberta de novos e potentes antibióticos, as infecções uterinas bacterianas nas éguas parecem ter a mesma incidência que tinham há muitos anos atrás.

Através dos anos, os primeiros tratamentos para combater a endometrite usavam antibióticos para eliminar a infecção, ocitocina para aumentar a contratilidade uterina e eliminar fluido e lavagens para eliminar debris (SELLNOW, 2007).

Estudos recentes sugerem que o principal causador da inflamação pós-cobertura é o espermatozóide, por isso é fundamental o controle da higiene da região perineal da égua, seja antes da monta natural ou inseminação artificial (MALSCHITZKY et al., 2007). Segundo Mattos et al. (1996) a inseminação artificial pode beneficiar éguas susceptíveis, resultando em taxas superiores de prenhez em comparação a monta natural.

Hassler (2002), ratifica este conceito, justificando que o tratamento de éguas com infecção bacteriana deve-se iniciar com a eliminação das causas predisponentes, indicando cirurgia para a pneumovagina e higiene na hora da cobertura, além de manejo pra minimizar contaminações, acompanhada pela terapia de lavagens e subsequente infusão de antibióticos de largo espectro, sendo ideal a identificação do microorganismo e a realização do antibiograma.

Segundo Asbury (1984a) os princípios de manejo de éguas com endometrite devem incluir: correção dos defeitos anatômicos quando indicado, redução da inflamação e da

população bacteriana no útero e prevenção do reaparecimento dos sintomas. Segundo Hurtgen (2006) o tratamento da endometrite nas éguas é baseado primariamente em minimizar os fatores predisponentes associados com éguas de risco e o entendimento dos mecanismos de resistência inato da égua.

Deve-se buscar a realização de uma única cobertura, preferencialmente antes da ovulação, o que pode ser obtido com um bom controle reprodutivo, e com a utilização de agentes indutores de ovulação (MALSCHITZKY et al., 2007).

Zingher (1996) cita que o tratamento terapêutico das endometrites deve incluir o uso de imunoestimulantes, os quais aumentariam a imunidade local favorecendo a recuperação dos animais, e a aplicação de antimicrobianos por via sistêmica ou por infusões uterinas.

Os tratamentos mais utilizados são infusões com antibióticos, infusões com plasma sanguíneo e plasma enriquecido com leucócitos. Os tratamentos podem ser combinados entre si e com a utilização de lavagens uterinas, ou ocitocina. Além do efeito direto do material infundido, a distensão gerada pela infusão induz também contrações uterinas e leva a uma diluição da secreção uterina, o que facilita a evacuação (MALSCHITZKY et al., 2007).

A avaliação da eficácia do tratamento é baseada no desaparecimento dos sinais clínicos da inflamação. Alterações físicas devem regredir e neutrófilos estarem ausentes ou diminuídos no exame citológico (ASBURY, 1984a).

Asbury (1984a) relata que na endometrite crônica, as substâncias irritantes são capazes de promover reagudização do processo inflamatório, porém o uso destas substâncias no útero deve ser utilizado com cuidado, pois o útero das éguas é extremamente sensível a substâncias irritantes introduzidas no trato reprodutor e podem desenvolver mudanças fibróticas no endométrio.

Existe uma enorme quantidade de variáveis associadas à endometrite. Não é prudente assumir que casos agudos, crônicos ou de endometrites persistentes induzidas pela cobertura possam ser tratadas com protocolos padronizados. Esta discussão se complica por não existir uniformidade e precisão nos métodos de diagnóstico e concordância na interpretação dos achados clínicos (HURTGEN, 2006).

2.4.1 Antibióticos

A terapia antibiótica inclui antibióticos administrados localmente (intra-uterino) ou por via sistêmica e terapia anti-séptica administrada via intra-uterina. A utilização de

antibióticos diluídos em solução salina, infundidos no útero durante o estro tem sido preconizada para tratar endometrite bacteriana (ASBURY, 1984a). Tratamentos com infusões de antibióticos após a cobertura são realizados desde a década de 80 com relatos clínicos de bons resultados (ZENT, 1993 apud MALSCHITZKY et al., 2007).

Existem algumas propriedades que devem ser comuns aos antimicrobianos:

a) toxicidade seletiva, ou seja, devem agir nas bactérias sem causar danos ao hospedeiro;

b) amplo espectro de ação, antimicrobianos com atividade em grande número de espécies de microorganismos,

c) mecanismo de ação, no qual cada antibiótico atua de maneira diferente na célula-alvo, podendo ser em nível de inibição da síntese da parede celular (ex. penicilina, cefalosporina), na destruição da função da membrana citoplasmática (ex. polimixina), pela inibição da síntese de proteínas (ex. tetraciclina, estreptomicina) ou, ainda, por agirem como metabólitos (sulfa/trimetoprim) e;

d) poucos efeitos colaterais (MURRAY et al., 2002).

A terapia sistêmica elimina a necessidade de manipulação do canal vaginal para infundir o antibiótico através da cérvix e permite a continuidade do tratamento durante o diestro (ASBURY, 1984a).

O tratamento das éguas consiste em selecionar o antibiótico específico baseado no resultado de culturas e testes de sensibilidade ao antibiótico *in vitro*, selecionar um veículo que não promova irritação ao endométrio, administrar a solução intra-uterina de forma asséptica, tratar diariamente durante o estro por no mínimo três dias, infundido um volume total de 200 ml por tratamento (Ibid.). Silva N. et al. (1999) citam que a seleção do antibiótico deve ser baseada tanto na determinação da prevalência das bactérias causadoras e a susceptibilidade desses microorganismos frente aos antibióticos.

Estudos realizados revelaram diferentes prevalências e diferentes resultados de susceptibilidade dos microorganismos isolados em *swabs* cervicais e uterinos de éguas (MCCUE; HUGHES; JANG, 1991; SILVA et al., 1999). Alguns antibióticos como penicilina, estreptomicina, amikacina, ampicilina, carbenecilina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, neomicina, ticarcilina (ALLEN, 1994), enrofloxacina (HAINES et al., 2000), são preconizados para o tratamento intra-uterino da endometrite. Éguas tratadas com gentamicina apresentaram aumento nas taxas de concepção (ASBURY, 1984a). Jacob et al (2002) observaram nos testes de susceptibilidade frente aos antimicrobianos, que a maioria dos

microorganismos isolados da fossa clitoriana e útero, apresentaram sensibilidade frente a enrofloxacina, florfenicol, gentamicina e cloranfenicol, sendo a enrofloxacina e o florfenicol os antibióticos com maior sensibilidade, e não apresentaram sensibilidade a penicilina e neomicina.

Troedsson (2006), cita que nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, a amicacina e gentamicina, seguida pela ampicilina e cloranfenicol revelaram maior ação *in vitro* frente aos microorganismos isolados do útero de éguas

Silva N. et al (1999) observaram que todas as amostras de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* foram sensíveis à penicilina e a ampicilina, resultados já esperados uma vez que antibióticos beta-lactâmicos, como penicilina e cefalosporinas, têm alta atividade contra as bactérias do gênero estreptococos (MCCUE; HUGHES; JANG, 1991). É recomendado que o tratamento intra-uterino com penicilina seja realizado em intervalos de 24 horas para manutenção de níveis terapêuticos, durante quatro a cinco dias (ASBURY, 1984a). A susceptibilidade das bactérias Gram negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp. frente aos antimicrobianos: ampicilina, amicacina, cefalotina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomina, gentamicina, nitrofurantoína, neomicina, polimixina B, sulfa/trimetropim e tetraciclina, é alta (SILVA N. et al., 1999), resultados previsíveis, uma vez que os antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos são indicados primariamente para combater as infecções por microorganismos Gram negativos. Neste mesmo estudo, cepas de *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp., apresentaram resistência frente aos antibióticos testados (ASBURY, 1984a).

Segundo Silva N. et al. (1999), o teste de sensibilidade a antibióticos nem sempre se correlaciona com a eficácia *in vivo* quando aplicado no útero das éguas. A polimixina B, que possui efetividade *in vitro* contra *Pseudomonas* e *Klebsiella* raramente apresenta eficiência no tratamento de endometrite causada por estas bactérias.

Problemas associados com antibioticoterapia em éguas incluem irritação, desenvolvimento de resistência bacteriana ao antibiótico e estabelecimento de superinfecção por outros organismos. Esta situação é observada quando o tratamento para *Streptococcus* spp. resulta no aparecimento de *Pseudomonas aeruginosa* no próximo cio (ALLEN, 1994). Drogas da família das tetraciclinas nunca devem ser utilizadas no útero das éguas devido a potente irritação (ASBURY, 1984a).

Devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, e conseqüente surgimento de resistência, têm-se sugerido em caso de infecção do útero, a utilização de terapia

antimicrobiana quando a cultura for positiva associada a sinais clínicos e/ou histórico de infertilidade (SILVA G.; ASSIM; BARBOSA, 2001).

2.4.2 Soluções anti-sépticas

Anti-sépticos são utilizados para reduzir o tamanho e aumentar o tônus do útero por irritação direta. Esses agentes são usados para diminuir a viscosidade do fluido uterino auxiliando na expulsão do conteúdo. Na inflamação crônica sem infecção, estas substâncias são capazes de mudar o status inflamatório crônico para uma inflamação aguda (ASBURY, 1984a). Soluções antisépticas são geralmente antibacterianas e antifúngicas.

Vários antisépticos têm sido usados durante os anos, acriflavina, ácido bórico, soluções iodadas, iodoforme, óxido de prata. Infusões de lugol a 10% em três éguas resultou em alteração no endométrio, com sangue, fluido serosanguinolento e fibrina. Apesar da superfície epitelial apresentar aparência normal, observou-se áreas de ulceração 21 dias após a infusão (WOOLCOCK, 1980).

As infusões com iodo povidona devem ser realizadas por cinco a seis dias. Evidência histológica de melhora no endométrio foi observada com este tratamento, e a fertilidade tem sido estabelecida em um número significativo de éguas problemas (ASBURY, 1984a).

O uso de substâncias anti-sépticas no útero deve ser utilizado com cautela, pois as éguas são extremamente sensíveis a substâncias irritantes introduzidas no trato reprodutor e podem desenvolver necrose e subseqüentes mudanças fibróticas no endométrio, cérvix e vagina. Soluções com altas concentrações de iodo e clorexidine são contra-indicadas (ASBURY, 1984a).

2.4.3 Estrogênio e lavagem uterina

Tratamentos com a intenção de aumentar o mecanismo natural de defesa uterino têm sido preconizados utilizando-se estrogênio sistêmico (MALSCHITZKY et al., 2007).

Lavagens uterinas são, provavelmente, a melhor forma de limpeza física do útero (Ibid.). A lavagem uterina com solução salina isotônica tem sido utilizada na intenção de evacuação mecânica do conteúdo uterino e estímulo ao endométrio no recrutamento de neutrófilos e proteínas séricas (LEBLANC, 2003).

Em lavagens realizadas nas primeiras 12 horas após a cobertura, pode ser retirado material purulento, já que esse período coincide com o pico da inflamação induzida pelo espermatozóide (MALSCHITZKY et al., 2007). Recomenda-se a utilização de soluções tamponadas, ou ringer com lactato, e volume de 2 litros por lavagem, pois este volume é suficiente para obter distensão da parede uterina e permitir o contato da solução infundida com toda a superfície da mucosa. Faz-se pelo menos três a quatro sifonagens, pois foi demonstrado que a maior quantidade de debris é retirada entre a 2ª e 3ª lavagem (MATTOS et al., 1997).

Infusões de antibióticos realizadas antes de 12 horas pós-cobertura não apresentaram vantagens em relação a tratamentos com lavagens uterinas ou a aplicação de ocitocina (MALSCHITZKY et al., 2002).

Segundo Mattos et al. (1997), lavagens uterinas realizadas 24 horas após uma infecção experimental não foram eficientes na eliminação bacteriana, possivelmente devido à aderência bacteriana à parede do endométrio.

2.4.4 Plasma

Segundo Allen (1994), infusão de plasma aumenta a taxa de opsonização de bactérias presentes no útero, porém segundo Noakes et al. (1996), em um experimento com éguas ovariectomizadas submetidas a tratamento com progesterona, a infusão com plasma não foi eficaz na remissão da endometrite. Plasma ou colostro tem sido infundido no útero para promover uma fonte de imunoglobulinas e complemento exógeno (ASBURY, 1984b; GANNES, 1985 apud WATSON, 1988).

Segundo Mattos et al. (1999), houve melhora significativa na taxa de prenhez em éguas falhadas e com potro ao pé, recebendo infusões de plasma enriquecido com leucócitos, 12 a 36 horas após a cobertura. Segundo Castilho et al. (1997 apud MALSCHITZKY et al., 2007), através desta técnica mais de 80% dos leucócitos coletados no sangue são mantidos no plasma, sendo que mais de 95% deles são viáveis. Além dos fatores de opsonização presentes no plasma, um número extra de neutrófilos capazes de realizar fagocitose é adicionado ao ambiente uterino quando se utiliza a infusão de plasma (MALSCHITZKY et al., 2007).

Pascoe (1993) observou que a adição de plasma homólogo à infusão com antibióticos, realizadas 36-48 horas após a cobertura, melhorou a taxa de prenhez e parição das éguas tratadas em relação à observada nas éguas não tratadas ou que receberam somente infusão de

antibióticos. Isto ocorreu devido a uma fagocitose mais eficiente pelos neutrófilos uterinos, auxiliados por componentes do sistema complemento e imunoglobulinas presentes no plasma sanguíneo.

Segundo Asbury (1984b), o tratamento com plasma deve ser feito coletando-se o sangue da égua com endometrite e adicionando 10 unidades de heparina para cada 1 ml de sangue. O plasma deve ser separado por centrifugação e infundido dentro de uma hora da coleta, ou então, congelado para posterior utilização. Após lavagem com solução salina um volume de 100 ml de plasma deve ser infundido no útero da égua e repetido diariamente por cinco dias durante o estro.

2.4.5 Ocitocina e análogos da prostaglandina

Drogas uterotônicas, como a ocitocina (LEBLANC, 1994) ou a prostaglandina F2 α (CADARIO; THATCHER; LEBLANC, 1995) têm sido utilizadas como alternativa a lavagem uterina. Primeiramente reportada por Allen (1991), a ocitocina na dose de 25 UI, administrada por via endovenosa, tem sido extensivamente utilizada para ajudar na eliminação do fluido intra-uterino e drenagem linfática.

Este tratamento é seguro, barato, não invasivo, não irritante e fortalece o sistema de defesa uterino por eliminar fluido do útero. A indicação para o uso de ocitocina é a detecção de fluido uterino livre antes ou após cobertura. A ocitocina deve ser administrada após 4 até 8 horas da inseminação, e repetida nas próximas 24 a 48 horas para eliminar fluido do útero (TROEDSSON, 1997). Segundo Mattos et al. (1999), a ocitocina é utilizada tradicionalmente na dose de 10 a 20 UI, entre 6 e 12 horas após a cobertura.

A concentração de hormônios circulante e local tem uma grande influência no mecanismo de defesa uterino (WATSON, 1988). Estudos demonstram um melhor efeito da ocitocina na evacuação mecânica do útero com doses menores (2,5 a 5UI), enquanto que com doses mais altas, o efeito obtido é de uma contração única e de longa duração, que não resulta na drenagem eficiente do conteúdo uterino (MALSCHITZKY et al., 2007).

A combinação do lavado uterino e a terapia com ocitocina é o tratamento mais utilizado ultimamente nos vários centros (WATSON, 2000). Tem-se proposto que a ocupação dos receptores miometriais de ocitocina estimule diretamente a contração das células miometriais. Os receptores ocupados induzem contração pelo influxo de cálcio na célula (CADARIO; THATCHER; LEBLANC, 1995).

A ocitocina induz a contrações uterinas fortes por 30 a 50 minutos e está associada com rápida limpeza de fluid uterino (LEBLANC, 2003).

As prostaglandinas também têm sido utilizadas para aumentar a atividade miométrial e ajudar na limpeza do lúmen uterino. A prostaglandina F_{2α}, embora resulte em um período mais longo de atividade mioelétrica (TROEDSSON; SCOTT; LIU, 1995) tem um efeito semelhante ao obtido com altas doses de ocitocina (MALSCHITZKY et al., 2007). Segundo Cadario, Thatcher e Leblanc (1995) a prostaglandina e seus análogos aumentam o “clearance” de radiocolóide do trato reprodutivo de éguas normais, mas em uma taxa inferior à ocitocina.

A prostaglandina F_{2α} produz contrações de baixa amplitude que persistem por quatro a cinco horas e promove uma limpeza uterina mais lenta que a da ocitocina. Contrações uterinas prolongadas ajudam na drenagem linfática (LEBLANC, 2003). A dose de 10 mg de PGF_{2α} causa cinco horas de aumento da atividade mioelétrica, ao passo que, 20 UI de ocitocina causa somente 1 hora de atividade aumentada (WATSON, 2000).

Troedsson et al. (1995) realizaram um estudo comparativo entre lavagem uterina com solução salina, PGF_{2α}, ou penicilina 12 horas após a inoculação de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Os resultados obtidos demonstraram que a lavagem uterina com solução salina e a PGF_{2α} foram igualmente eficazes na eliminação de bactérias do útero, assim como os tratamentos com penicilina. Esses resultados sugerem que os antibióticos podem ser desnecessários, mesmo nos casos de contaminação bacteriana se as éguas forem tratadas com lavagens ou drogas uterotônicas em 12 horas após a cobertura.

2.4.6 Imunomoduladores

Em éguas susceptíveis, a administração de imunomoduladores no momento da inseminação, diminuiu a expressão de mRNA para citocinas em resposta a presença de espermatozoides (FUMOSO et al., 2006).

Outros efeitos causados pela administração de glicorticóides, é a menor síntese de óxido nítrico e das enzimas responsáveis pela síntese de prostaglandinas e leucotrienos, além de diminuir a atividade de moléculas de adesão, o que reduz a migração dos leucócitos dos vasos sanguíneos (JANEWAY et al., 1999 apud MALSCHITZKY et al., 2007).

2.4.7 Extratos de plantas

A sistemática de investigar extratos de plantas com atividade anti-bacteriana representa um esforço contínuo em encontrar novos componentes com atividade para agir contra bactérias multi-resistentes (SUFFREDINI et al., 2004). O uso abusivo de antimicrobianos, tendo como um dos principais fatores determinantes a prescrição indevida desses medicamentos pelos profissionais, o que favorece o crescimento de cepas resistentes (NORBY; NORD, 2005).

A busca de plantas com atividade antimicrobiana têm aumentado nas últimas décadas em muitos países devido a sua riqueza de constituintes, a exemplo, os compostos fenólicos como flavonóides, os quais possuem potente ação antibacteriana (NASCIMENTO et al., 2000). Entre as plantas medicinais mais testadas para a atividade antimicrobiana estão os vegetais ricos em polifenóis, flavonoídes e taninos (SUFFREDINI et al., 2004).

Carvalho A., et al. (2002) demonstraram a ação do extrato hidroalcoólico da folha e caule do *Psidium guajava* L. (goiabeira-vermelha) contra bactérias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Shigella* sp., *Proteus* sp., *Salmonella* sp.) através do método de difusão em ágar com disco e a determinação da CIM em meio sólido. Os extratos apresentaram atividade para todas as bactérias testadas, exceto a *Klebsiella* sp.

Lopes et al. (2003) observaram que extratos cetônicos de *Stryphnodendron polyphyllum* (Mart.), tanto pelo método de difusão em ágar com disco como pelo método de diluição em microplaca para determinação da CIM, têm ação inibitória para *Staphylococcus aureus* e não obtiveram atividade frente a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Orlando (2005) relata que a espécie vegetal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, possui grande potencial antimicrobiano, sendo promissora para a elaboração de medicamentos fitoterápicos. Este estudo sugere a necessidade de estudos complementares com a planta.

O uso de plantas pode representar uma alternativa de substituição aos anti-sépticos e desinfetantes sintéticos convencionais, visando evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana a estes compostos, uma vez que metabólitos vegetais atuam por mecanismos variados (BARBOUR et al., 2004; MONTHANA, LINDEQUIST, 2005 apud SOUZA T. et al., 2007).

Segundo Orlando (2005), nos últimos anos, várias plantas medicinais foram testadas a procura de novas drogas com atividade antimicrobiana devido ao aumento da resistência bacteriana e à carência no desenvolvimento de drogas antibacterianas.

Os produtos naturais têm despertado grande interesse como agentes anti-inflamatórios, pelo fato de oferecerem algumas vantagens em relação as drogas anti-inflamatórias clássicas, principalmente pelo fato de não produzirem efeitos colaterais como ulcerogenicidade. Vários taninos têm sido repetidamente descritos, quanto ao fato de possuírem atividade antiflogística, alguns deles apresentaram atividade em testes *in vitro*, envolvendo ciclooxigenase. Os flavonóides possuem atividade inibidora da ciclooxigenase, com alta margem de segurança protegendo contra úlceras gástricas (CARVALHO, J., 2004).

Matos (2000), afirma que a avaliação de novas drogas vegetais através da pesquisa é o caminho para que se possa fazer o correto aproveitamento das plantas medicinais e seus derivados aplicados a fitoterapia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção da Matéria Vegetal

Para estudar a ação de extratos aquosos de plantas contra bactérias causadoras de endometrite em éguas, foram selecionadas três plantas com relatos populares e/ou estudos farmacológicos indicando ação antimicrobiana. As plantas selecionadas para o experimento foram *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), *Kalanchoe pinnata* (Folha da fortuna) e *Kalanchoe brasiliensis* (Saião).

As cascas secas de *Stryphnodendron adstringens* foram adquiridas do lote 11 da empresa Sítio Estrella da Terra Produtos Naturais Ltda, Rio de Janeiro, e encontra-se registrado sob o número 000477, a qual forneceu o laudo de controle de qualidade que não apresentou objeções para a utilização da droga.

As folhas de *Kalanchoe pinnata* e *Kalanchoe brasiliensis* foram obtidas do canteiro experimental da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ. Um exemplar foi coletado para preparo da exsicata e identificado pela equipe de botânicos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. As exsicatas das plantas *Kalanchoe pinnata* e *Kalanchoe brasiliensis* encontram-se depositadas no herbário do Jardim Botânico da cidade do Rio de Janeiro, sob número 304627 e 29709 respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Identificação das espécies vegetais utilizadas e os números de registros das exsicatas depositadas nos herbários do Jardim Botânico (RJ) e Teresópolis (RJ).

Família	Espécie	Nome Popular	Parte usada	Procedência	Nº da Exsicata
Crassulaceae	<i>Kalanchoe pinnata</i>	Folha da fortuna	Folhas	Jardim Botânico	29709
Crassulaceae	<i>Kalanchoe brasiliensis</i>	Saião	Folhas	Jardim Botânico	304627
Mimosácea	<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	Barbatimão	Casca	Teresópolis	000477

As folhas de *Kalanchoe pinnata* e *Kalanchoe brasiliensis* e, cascas de *Stryphnodedron barbatiman* foram coletadas, armazenadas em saco plástico e levadas para o Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais da UFRJ, para serem processadas.

3.1.1 Preparo da matéria vegetal: *Kalanchoe pinnata*, *Kalanchoe brasiliensis* e *Stryphnodedron adstringens*.

As folhas e cascas coletadas foram pesadas e posteriormente lavadas em água corrente e rinsadas com água destilada. Após secagem da água da superfície das folhas e cascas, em temperatura ambiente, estas foram picadas com uma faca de metal inoxidável e trituradas em liquidificador com água suficiente para obter concentração de 20% p/v (20 g de folhas ou cascas para 100 ml de água destilada).

A preparação obtida foi aquecida durante 30 minutos, em temperatura controlada de 50-55°C. O extrato foi obtido por filtração em algodão e por último papel de filtro, até obtenção de uma solução translúcida, que então foi submetida ao processo de liofilização para secagem. O pó obtido foi acondicionado em um frasco de vidro âmbar hermeticamente fechado e identificado, permanecendo até o momento do preparo dos extratos.

3.1.2 Preparo dos extratos aquosos

Os extratos aquosos foram obtidos através de decocção na concentração de 100 g de pó da matéria vegetal para 1000 ml de água destilada, deixando ferver por aproximadamente dois minutos. Depois de fervido, deixou-se esfriar a temperatura ambiente, filtrou-se a solução obtida em filtro de milipore, e então se obteve a solução a 10%, que foi mantida sob refrigeração até o momento do uso. O extrato seco foi diluído em água estéril para obtenção da concentração de 10mg/ml.

3.2 Animais

A utilização de animais neste estudo foi aprovada pela comissão de ética em pesquisa da UFRRJ. Durante o período de Setembro de 2005 a Novembro de 2007 foram avaliadas 135 éguas com idades e raças variadas, de propriedades particulares no Estado do Rio de Janeiro e

do Instituto de Zootecnia da UFRRJ (Anexos A-C). Para seleção dos animais foi utilizado o critério de éguas pertencentes à categoria de éguas susceptíveis (éguas velhas, pluríparas, com histórico de abortamento, parto distócico, histórico reprodutivo de endometrites recorrentes e sub-fertilidade, ausência de prenhes na estação anterior ou mais estações de monta, presença de secreção vaginal e má conformação vulvar).

As éguas foram contidas em um tronco de palpação retal. A cauda foi ligada com atadura, as fezes retiradas do reto com a mão enluvada, e a vulva e região perineal foram lavadas com água e sabão neutro e posteriormente foram higienizadas com solução iodada, e secas com gaze.

3.2.1 Exame ginecológico

A vulva foi inspecionada, observando-se a forma, o tamanho (cm), medido da comissura dorsal a ventral, coaptação dos lábios vulvares para diagnóstico de pneumovagina, presença de secreções, lesões, e outras patologias (Figuras 5; 6).

Com auxílio do espéculo vaginal estéril, foi avaliada a integridade da vagina, observando-se a coloração (pálida, rósea ou hiperêmica), ausência ou presença de secreções, edema e outras patologias (Figura 7). Posteriormente, foi avaliado a cérvix, em relação à abertura (aberta ou fechada), presença ou ausência de edema e de secreção, coloração e integridade (normal ou presença de lesão).

O útero foi examinado pela palpação retal (Figura 8), onde foi caracterizado o tônus uterino ou consistência como: flácido (0), pouco túrgido (1), túrgido (2) e muito túrgido (3), edema (presença ou ausência).

Os ovários foram examinados com relação ao tamanho (cm), crescimento de folículos e consistência folicular, exemplificado na Tabela 5.

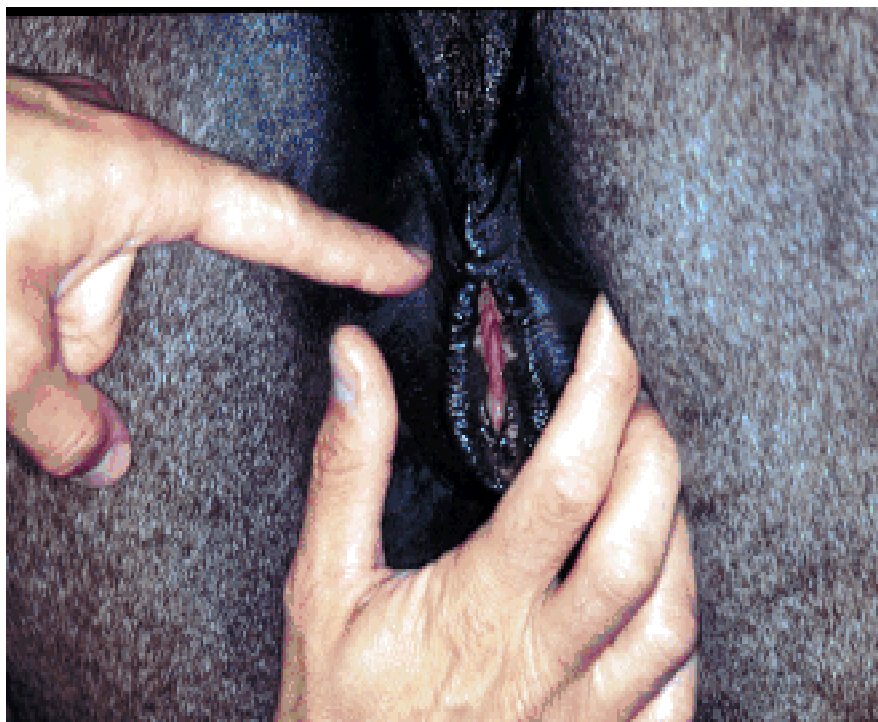


Figura 5. Identificação através da inspeção de má coaptação dos lábios vulvares, determinando um quadro de pneumovagina (Égua 1).



Figura 6. Presença de secreção vulvar muco- purulenta através de inspeção vulvar (Égua 10).

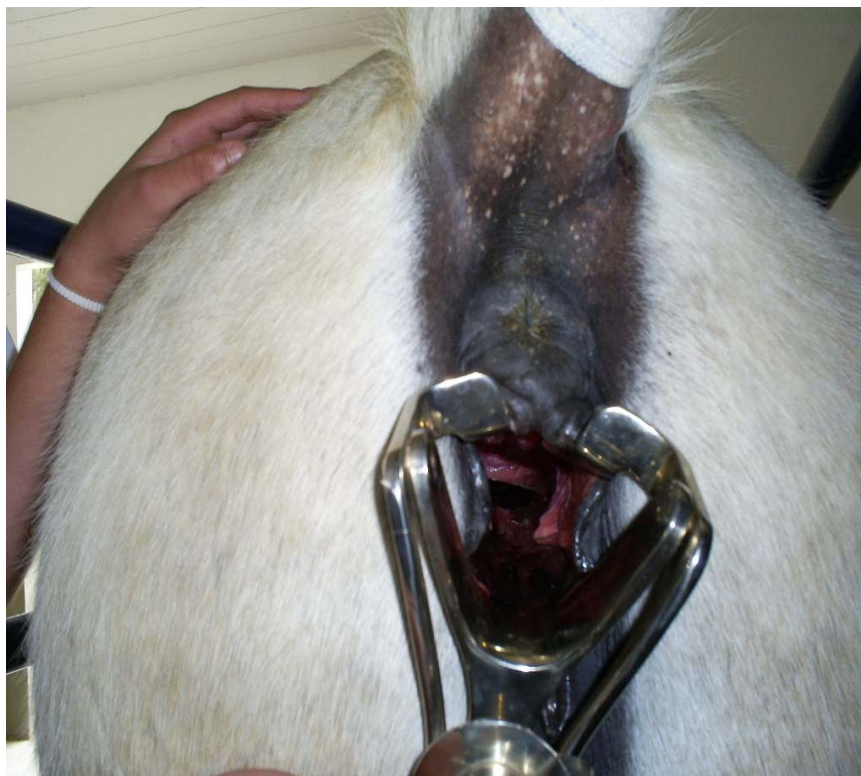


Figura 7. Exame ginecológico através do espéculo vaginal para avaliação da vagina e cérvix (Égua 19).



Figura 8. Exame ginecológico através da palpação retal para avaliação do tônus uterino da égua (Égua 4).

Tabela 5. Escala de avaliação de tamanho ovariano e crescimento folicular através da palpação retal.

Tamanho do ovário	Tamanho do folículo	Flutuação do folículo
A (avelã)	1 – 1 cm de diâmetro	1 – duro
N (noz)	2 – 2 cm de diâmetro	2 – levemente duro
Ga (ovo de galinha)	3 – 3 cm de diâmetro	3 – macio
P (ovo de pata)	4 – 4 cm de diâmetro	4 – bastante macio
G (ovo de gansa)	5 – 5 cm de diâmetro	5 – ovulando

O aparelho de ultra-som utilizado para exame do aparelho reprodutor das éguas foi o Aloka® 500, com transdutor transretal de 5 MHZ de frequência. O transdutor foi protegido com uma luva de palpação retal na qual era adicionado gel. Após a retirada das fezes e palpação retal, o transdutor foi introduzido no reto, observando-se imagens seqüenciais de cervix, e corpo do uterino, seguindo-se pela observação dos cornos uterinos e ovários. Examinando-se minuciosamente todas as estruturas, determinava-se o período do ciclo estral em que as éguas se encontravam (Figura 9) verificando-se também a presença ou não de patologias (Figura 10).

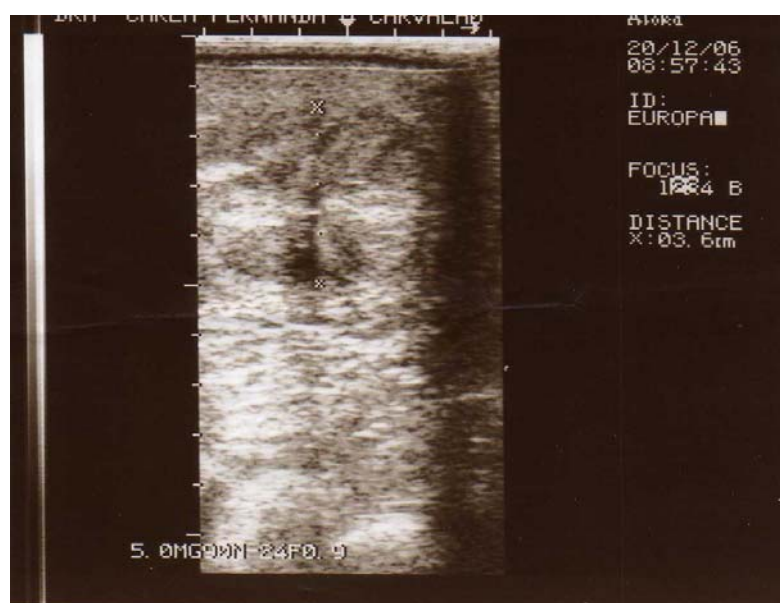


Figura 9. Avaliação ultra-sonográfica do corno uterino no estro com presença de dobras endometriais e fluido anecóico (Égua 8).



Figura 10. Ultra-sonografia do útero de égua com presença de fluido no lúmen uterino (Égua 10).

Através da ultra-sonografia avaliava-se o tamanho dos cornos uterinos (cm). O acúmulo de fluido uterino foi avaliado examinando a profundidade (cm) sendo classificado como 0 (ausência de fluido), + (pouco fluido, até 1cm), ++ (moderada quantidade de fluido, 2 a 3 cm), +++ (severa, > 3 cm) além da ecogenicidade da secreção uterina (fluidos eco densos são associados a neutrófilos e debris) e edema (ausente ou presente).

Os dados obtidos referentes ao exame do aparelho reprodutor das éguas foram anotados em uma ficha individual de exame ginecológico (Anexo A).

3.3 Obtenção das amostras uterinas: análise laboratorial

Foram coletados espécimes uterinos das 21 éguas susceptíveis no período de estro, para as análises bacteriológicas, citológicas e histopatológicas.

3.3.1 Cultura bacteriológica

Para cultura endometrial, o períneo foi lavado com sabão neutro, enxaguado e seco com papel toalha. A cauda foi ligada com atadura e foi aplicada solução iodada na região. Os *swabs* protegidos foram guiados manualmente através do canal cervical pelo dedo indicador até alcançar 5-8 cm no interior do útero. Dentro do lúmen uterino foi feito movimento rotacional durante 15 segundos para coleta de secreção. Os *swabs* com as secreções uterinas coletadas foram acondicionados em caldo BHI e transportados em um período máximo de seis

horas, para o Laboratório de Bactérias Anaeróbias e Cocos do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense.

Os espécimes acondicionados em caldo BHI foram incubados em condição de aerobiose a 37°C por 18-24 horas e posteriormente inoculados nos meios de cultura ágar sangue (AS), ágar manitol salgado (MS) e ágar Teague (EMB) e mantidos sob as mesmas condições de incubação por 18-24 horas. O crescimento bacteriano foi observado e procedeu-se à identificação das espécies, segundo o fluxograma abaixo (Figura 11), de acordo com Murray et al. (1999).

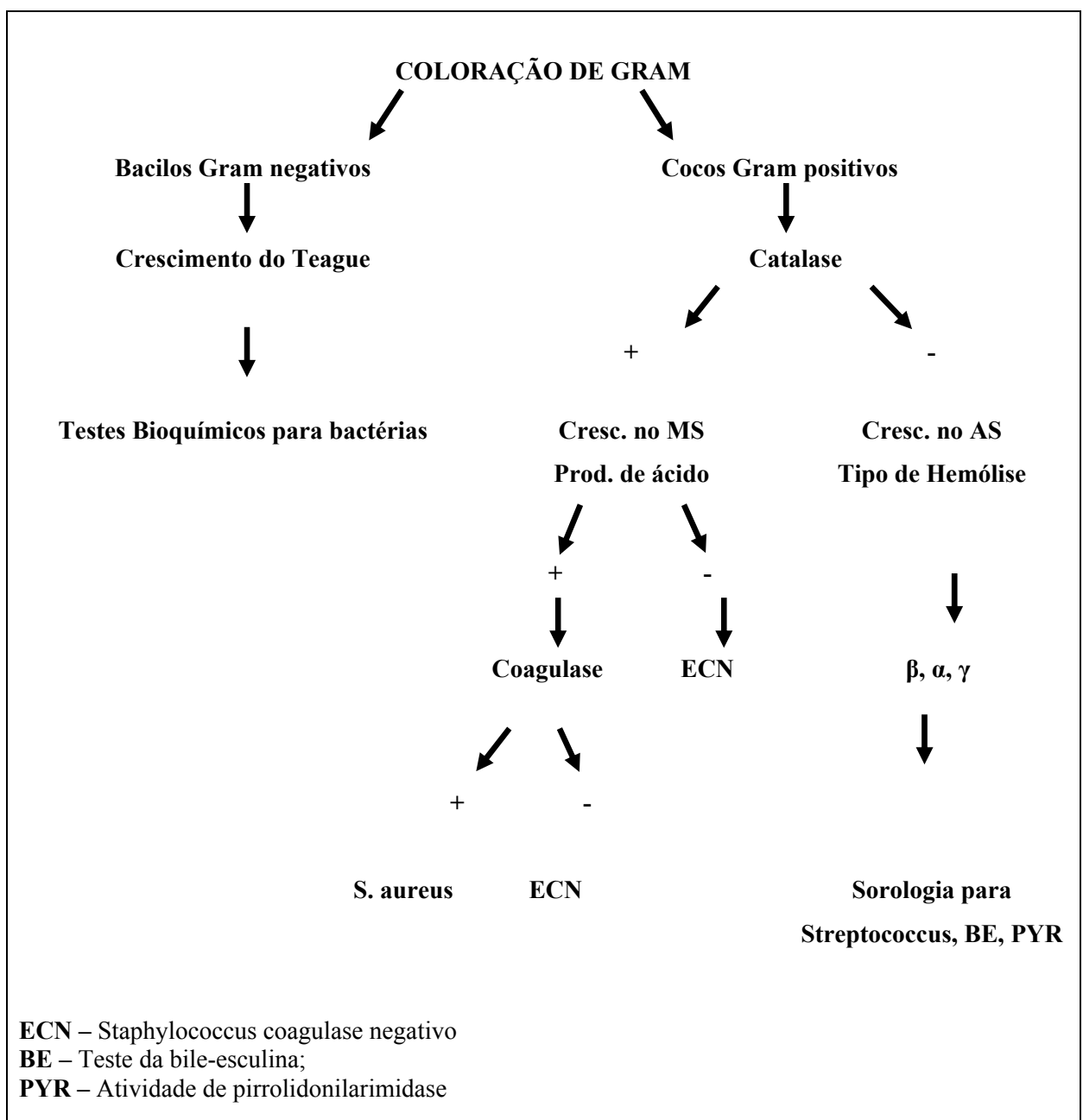


Figura 11. Fluxograma para a identificação laboratorial de bactérias (MURRAY et al.,1999).

3.3.2 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)

As cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* do grupo C, *Enterococcus* sp. e *Escherichia coli* isoladas foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos de acordo com as recomendações do CLSI, 2005 (ANVISA, 2005). Os antimicrobianos testados foram: ampicilina (enterobactérias e enterococos), cefalotina (enterobactérias), eritromicina (estreptococos do grupo C), gentamicina (enterobactérias), penicilina G (estafilococos e estreptococos do grupo C), oxacilina (estafilococos) e vancomicina (enterococos).

Para realização dos testes as amostras foram semeadas em placas de AS e incubadas a 37°C, por 18-24 horas. A partir do crescimento obtido, suspensões bacterianas com turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland foram preparadas em salina a 0,85% esterilizada. Com auxílio de *swabs* esterilizados as suspensões foram semeadas em placas de ágar Müeller-Hinton (Difco) ou ágar Müeller-Hinton contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro (*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*). Sobre a superfície dos meios inoculados foram aplicados os discos (Cecon-São Paulo) contendo os antimicrobianos e as placas foram incubadas a 37°C, por 18-24 horas em atmosfera ambiente ou em atmosfera de 5% de CO₂ (*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*). A leitura e interpretação dos resultados foram feitas de acordo com as recomendações do CLSI, 2005 (ANVISA, 2005).

3.3.3 Determinação de fenótipo de resistência a eritromicina

As amostras de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* cujos testes de difusão em ágar indicaram resistência a eritromicina foram caracterizadas quanto aos seus fenótipos de resistência, através do teste de duplo-disco. Para tal, foram utilizados discos contendo 15µg de eritromicina e 2µg de cindamicina (Cecon).

A técnica foi executada conforme as recomendações de Pérez-Trallero et al. (1998). Discos de eritromicina e cindamicina, dispostos com uma distância de 15-20mm entre si, foram aplicados sobre a superfície do meio de MH-SC, sobre o qual uma suspensão bacteriana com turvação equivalente a escala de 0,5 de McFarland foi previamente semeada. As placas foram incubadas a 37°C, por 18-24 horas em atmosfera de 5% de CO₂.

3.3.4 Testes de sensibilidade aos extratos de plantas: triagem

Inicialmente foi realizada uma triagem utilizando-se extratos liofilizados das seguintes plantas: *Stryphnodendron adstringens*, *Kalanchoe pinnata* e *Kalanchoe brasiliensis* seguindo as recomendações de Suffredini et al. (2004). Todos os extratos liofilizados foram reconstituídos com água destilada estéril a fim de obter uma solução estoque do extrato seco com concentração de 10mg/ml e a seguir as soluções foram filtradas através de membrana de Millipore. O teste de sensibilidade foi realizado em caldo Müeller-Hinton, onde a concentração final do extrato foi de 100µg/ml. As cepas bacterianas testadas foram às recomendadas pelo CLSI, 2005 (ANVISA, 2005), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, na concentração recomendada para os testes de diluição em caldo. Após um período de incubação de 24 horas a 35° C os tubos foram analisados visualmente.

Não foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM), devido à turvação causada pelo extrato aquoso de barbatimão no meio de cultura utilizado, portanto, uma pequena alíquota do caldo foi semeada em ágar sangue (AS) e incubado nas mesmas condições para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM).

Diante dos resultados preliminares obtidos, foi dada ênfase à avaliação da eficácia do extrato aquoso de barbatimão frente aos cocos Gram positivos, em especial as cepas de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isoladas no estudo. Além da amostra padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, foram também testados isolados clínicos das espécies *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactie*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativo.

3.3.5 Testes de sensibilidade aos extratos de plantas: determinação da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato de barbatimão.

A partir dos resultados obtidos na triagem dos extratos de plantas, cepas da espécie *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* foram submetidas a diferentes diluições do extrato aquoso de barbatimão (25-500µg/ml). A CBM foi determinada através da visualização de crescimento bacteriano em AS, a partir dos tubos com diferentes concentrações do extrato, conforme descrito anteriormente.

3.3.6 Citologia uterina

As amostras para exame citológico foram coletadas das éguas em estro, com *swab* estéril protegido¹, e os critérios de higienização da região perivulvar foram rigorosos a fim de evitar contaminação, da mesma maneira como foi realizado no exame bacteriológico. O *swab* foi introduzido com a mão enluvada através da vagina, atravessou a cérvix e no útero foi rompido o lacre para a coleta do material. O *swab* foi colocado em contato com a parede uterina e foram feitos movimentos de rotação por 15 segundos visando coletar quantidades suficientes de material para citologia endometrial. O *swab* foi novamente protegido e só então retirado do útero. Após a coleta, o material foi depositado por impressão rotacional do *swab* sobre duas lâminas, e imediatamente fixado e corado com Panótico².

O material foi encaminhado ao laboratório de Patologia Clínica do Centro Universitário Plínio Leite (UNIPLI), Itaboraí, Rio de Janeiro, e a leitura do esfregaço foi realizada em microscópio óptico, no aumento de 400x, contando-se no mínimo de 10 campos, quantificando o número relativo de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e outras células inflamatórias e células endometriais.

A severidade da endometrite foi graduada usando a classificação de Riddle, Leblanc e Stromberg (2007), onde 0 a 2 neutrófilos por campo não foi considerado inflamação, 2-5 neutrófilos por campo foi considerada inflamação moderada, >5 neutrófilos por campo foi considerado inflamação severa e, hipocelular, quando há ausência de neutrófilos e escassas células epiteliais. Foi observada também a presença (+) ou ausência (0) de muco.

3.3.7 Biópsia uterina

A coleta do fragmento foi realizada segundo procedimento descrito por Kenney e Doig (1986). Os lábios vulvares foram separados e a pinça de biópsia estéril tipo "boca de jacaré"³ de tamanho 20x4x3mm e comprimento total de 50 cm, foi introduzida junto com a mão enluvada, através da vagina. Atravessou-se o canal cervical até o lúmen uterino e foi retirado um fragmento da porção do corpo uterino (Figura 11). Um fragmento de aproximadamente 1 a 1,5 cm, foi retirado da junção do corpo com o corno direito ou esquerdo, quando não havia nenhuma anormalidade no exame. A pinça foi removida do aparelho reprodutor e o fragmento

¹ Kalajjian, Accu-Culshure, Tieglund

² Laborclin®, Brasil

³ Biotech®, Botucatu

coletado foi colocado em um frasco de vidro com solução de formol a 10% para fixação. O material foi enviado para o Laboratório de Anatomia Patológica UNIPLI, Itaboraí.



Figura 12. Coleta de fragmento endometrial com auxílio da pinça de biópsia para realização de exame histopatológico e categorização do grau da lesão endometrial (Égua 14).

Posteriormente, os fragmentos foram desidratados, submetidos ao clareamento em xilol, impregnação com parafina fundida, inclusão em molde retangular contendo parafina fundida sendo, por fim, corados com hematoxilina e eosina (HE), segundo metodologia descrita por Junqueira e Carneiro (1999). Para a avaliação histopatológica do endométrio foi utilizada a classificação de Kenney e Doig (1986), modificada por Schoon, H., Schoon, D. e Klug (1992).

Esta classificação inclui quatro categorias (I, IIA, IIB e III) que definem padrões, tipos e graus de gravidade das alterações inflamatórias e fibróticas do endométrio. Também correlaciona a categoria e o índice de fertilidade esperado (IFE) da égua.

3.3.8 Teste de eficácia dos extratos *in vivo*: tratamentos

A partir dos resultados obtidos *in vitro* com as plantas testadas, o extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) foi escolhido para ser utilizado no tratamento das éguas. As éguas selecionadas para tratamento foram aquelas que apresentaram ao exame

bacteriológico, o isolamento de cocos Gram positivos das secreções uterinas. Estas éguas foram divididas em três grupos de forma aleatória, de acordo com os diferentes tratamentos.

As éguas do grupo 1 foram tratadas com 20 ml de antibiótico (penicilina e estreptomicina), as do grupo 2 foram tratadas com 20 ml de solução fisiológica (controle), e as do grupo 3 tratadas com 20 ml de extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* a 10% .

O tratamento das éguas foi realizado utilizando-se pipetas de inseminação artificial eqüina⁴ adaptadas a uma seringa de 20 ml com a solução a ser infundida. Após ligadura da cauda e higienização da região perineal com sabão neutro e assepsia com solução iodada, a solução foi infundida no útero. As éguas foram tratadas por quatro dias consecutivos. Após 96 horas da realização da última infusão, foram obtidas amostras para análises bacteriológicas e citológicas do útero de cada égua seguindo a mesma metodologia realizada para categorização uterina preliminar.

As biópsias foram coletadas entre 18 e 21 dias pós-tratamento, quando as fêmeas retornaram ao estro detectados através de rufiação realizada em dias alternados. Os dados referentes ao exame clínico, ultra-sonografia, número de neutrófilos no exame citológico, teste microbiológico e alterações histológicas do endométrio uterino, analisado segundo Kenney e Doig (1986) antes e após o tratamento, foram anotados em ficha individual e avaliados através de testes estatísticos.

3.4. Análise Estatística

Os resultados obtidos através da associação entre duas variáveis foram submetidos à análise estatística pela correlação de Pearson, seguindo o modelo do SAS/STAT (1997). Verificou-se a correlação entre presença de secreção uterina e inflamação detectada pela citologia e o isolamento de bactérias patogênicas e presença de inflamação uterina detectada pela citologia.

⁴ Provar, São Paulo, Brasil

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Exames dos animais e testes *in vitro*

O exame ginecológico associado ao histórico reprodutivo, vaginoscopia, palpação retal e ultra-sonografia do aparelho reprodutor. em 135 éguas, permitiram identificar 21 (15,5%) de éguas susceptíveis.

Os resultados referentes ao exame do aparelho reprodutor realizado nas 21 éguas selecionadas encontram-se no Anexo D.

A seleção das éguas susceptíveis no experimento foi realizada baseada nos estudos de Silva N. et al. (1999), que para isolar bactérias uterinas, utilizaram éguas com histórico de infertilidade, algumas com períodos de até cinco anos sem concepção e sinais clínicos de infecção uterina, detectados após exames ginecológicos.

Em relação ao histórico das éguas examinadas, foram selecionadas quatro fêmeas que estavam vazias há aproximadamente um ano, sete éguas vazias há dois anos, e oito éguas há pelo menos três anos. Duas éguas tinham histórico de abortamento sem o diagnóstico da provável causa.

Das 21 éguas selecionadas, observou-se através da inspeção dos lábios vulvares que existia má coaptação em nove éguas (42,8%), predispondo a pneumovagina. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Ribas (1998) que ao analisar 25 éguas com histórico de problemas reprodutivos, diagnosticou 10 éguas (40%) com conformação vulvar alterada.

As éguas com alterações nos lábios vulvares tinham idade média de 18,5 anos, enquanto as éguas com boa coaptação vulvar tinham média de 17,5 anos. Em seus estudos Grunert et al. (2005), observaram que o distúrbio da função da vulva e vestíbulo, caracterizada por imperfeita oclusão vulvar possibilita a aspiração de ar contaminado do meio ambiente, com possibilidade de penetração de fezes, sujidades e microorganismos para dentro da cavidade vaginal. Troedsson (1997) observou relação entre a idade das éguas e o fechamento vulvar, detectando que a maioria das éguas idosas do experimento apresentavam pneumovagina.

Das nove éguas que apresentaram pneumovagina, em oito (88,8%) foram isoladas bactérias patogênicas.

Foi observada através da ultra-sonografia presença de secreção uterina em nove éguas (42,8%), sendo cinco éguas com secreção leve, três éguas com secreção moderada e uma égua apresentou secreção em quantidade severa. Das nove éguas que apresentaram pneumovagina, em cinco (55,5%) foi detectada secreção no lúmen uterino.

Das 21 éguas selecionadas no experimento, em 12 (57,1%) espécimes uterinos foram obtidos o isolamento de bactérias patogênicas. Foram isoladas cepas de *Escherichia coli* (10, 47,6%), seguidas de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (8, 38%) e *Staphylococcus aureus* (2, 9,5%), além de componentes da microbiota, considerados não patogênicos, como estafilococos coagulase negativos, micrococcos, *Streptococcus* α hemolíticos, bacilos Gram positivos e enterecoccos (Tabela 6). Este estudo se assemelha ao de Silva N. et al. (1999), que observaram como principais microorganismos causadores de endometrite o *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, (25,7%), *Escherichia coli* em (15,1%) das amostras e *Staphylococcus aureus* em 9,2%. Riddle, Leblanc e Stromberg (2007), detectaram *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* em (23%) e *Escherichia coli* em (13%) das amostras coletadas. A ocorrência de *Escherichia coli*, pertencente à família Enterobacteriaceae, têm sido atribuída a determinados fatores predisponentes, incluindo manobras ginecológicas inadequadas, utilização de material contaminado em exames ginecológicos ou defeitos anatômicos (urovagina e pneumovagina), que favorecem a contaminação fecal para o trato reprodutor feminino (GHASEMZADEH-NAVA et al., 2004). No Brasil, Langoni et al. (1994) citaram o *Streptococcus* sp. β -hemolítico como o principal agente envolvido na casuística de infecções do trato genital das éguas. O grande envolvimento deste gênero de microorganismos na gênese da endometrite eqüina provavelmente encontra justificativa no comportamento oportunista dos estreptococos, pois este agente é habitualmente encontrado na pele dos animais e tem sido considerado o microorganismo mais freqüentemente isolado de material cervical de éguas sadias (KRABISCH et al., 1982 apud AGUIAR et al., 2005).

Tabela 6. Resultados referentes aos exames citológicos, microbiológicos e histopatológicos das 21 éguas classificadas como susceptíveis antes do tratamento.

Égua	Citologia (% neutrófilos)	Microbiologia	Biópsia
1	0 - 2	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ; Estafilococos coagulase negativo	III
2	> 5	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>	IIA
3	2 - 5	Bacilo Gram positivo	IIB
4	> 5	Bacilo Gram positivo; <i>Enterococcus</i>	IIA
5	> 5	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> , Bacilo Gram positivo, cocos Gram positivo	IIB
6	0	Estafilococos coagulase negativo; Estreptococos α -hemolítico	IIB
7	0 - 2	<i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ; Estafilococos coagulase negativo	III
8	>5	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	III
9	> 5	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	IIB
10	> 5	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	IIB
11	> 5	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ; Estafilococos coagulase negativo, cocos Gram positivo	IIB
12	0 - 2	Bacilos Gram positivo	IIA
13	0	Estafilococos coagulase negativo; Estreptococos α hemolítico	III
14	0	Estafilococos coagulase negativo; Estreptococos α -hemolítico	IIB
15	>5	<i>Escherichia coli</i>	IIB
16	0 - 2	Estafilococos coagulase negativo	IIA
17	> 5	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> , Estafilococos coagulase negativo	IIA
18	0 - 2	Bacilos Gram negativo	IIB
19	0 - 2	Bacilos Gram positivo, Cocos Gram positivo, Estafilococos coagulase negativo	IIA
20	> 5	<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> ; <i>Escherichia coli</i> ; Bacilo Gram positivo	IIA
21	> 5	<i>Escherichia coli</i> ; Enterococos; Estafilococos coagulase negativo	IIA

Em relação às infecções uterinas produzidas por bactérias do gênero *Staphylococcus*, os resultados dos exames bacteriológicos revelaram que 15,5% das infecções estavam relacionadas a esse gênero bacteriano, frequência semelhante à encontrada por Moreno et al. (1995 apud SILVA N. et al., 1999). Anzai et al. (1996) sugerem que processos infecciosos

cutâneos de garanhões servem como fontes de infecção para o útero, sendo os *Staphylococcus* spp. transmitidos durante o coito.

Neste estudo, das nove éguas em que foi diagnosticada pneumovagina, em apenas uma não foi isolado *Escherichia coli*. Há controvérsias da importância deste microorganismo no quadro de endometrite eqüina. Alguns autores citam que estes diminuem a fertilidade e outros acham ser insignificante, caso não seja acompanhado de histórico de falha reprodutiva ou evidência clínica da doença (Silva N. et al, 1999).

O isolamento de microorganismos bacterianos patogênicos no estudo foi inferior ao encontrado nos experimentos de Silva N. et al. (1999) que detectaram 79,6% de microorganismos causadores de endometrite, porém foi superior aos encontrados por Papa et al. (1993) que obtiveram 47,1% de isolamento microbiano, Fiala (1999) que obteve 30,6%, Albihn, Baverud e Magnusson (2003) que observaram 38% de amostras positivas e Aguiar et al. (2005) que obtiveram 36,5% de microorganismos patogênicos. O resultado superior encontrado por Silva N. et al. (1999) é justificado, pois estes autores utilizaram *swabs* não protegidos para coleta de material bacteriológico e provavelmente coletaram secreções de vagina e cérvix, além das secreções uterinas.

O isolamento de *Escherichia coli*, *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* e *Staphylococcus aureus*, encontra-se em conformidade com os achados de Albihn, Baverud, Magnusson (2003), Asbury (1984a), Fiala (1999), Silva, N. et al. (1999) e Watson (1988), que demonstraram que estes microorganismos são os principais agentes envolvidos na etiologia da endometrite eqüina, sendo a *Escherichia coli* o patógeno predominante nos estudos de Albihn, Baverud, Magnusson (2003) e Ghasemzadeh-Nava et al. (2004) e o *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* nos estudos de de Asbury (1984a), Fiala (1999), Silva, N. et al. (1999) e Watson (1988). Segundo Silva N. et al. (1999), a presença de *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus* está associada aos casos persistentes de endometrites, fato também observado neste experimento através do histórico das éguas com sub e infertilidade e exames ginecológicos realizados.

Foi observado o crescimento de mais de um tipo patogênico em oito espécimes; *Escherichia coli* e *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, seis (28,6%) e *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, duas (9,5%). Silva N. et al. (1999), citam que em 3,4% dos casos, as endometrites estavam associadas a mais de um tipo de bactéria (infecções mistas). Estes mesmos achados já foram descritos anteriormente (MORENO et al., 1972; THRELFALL; IMMEGART, 2000 apud AGUIAR et al., 2005) (Figura 13)

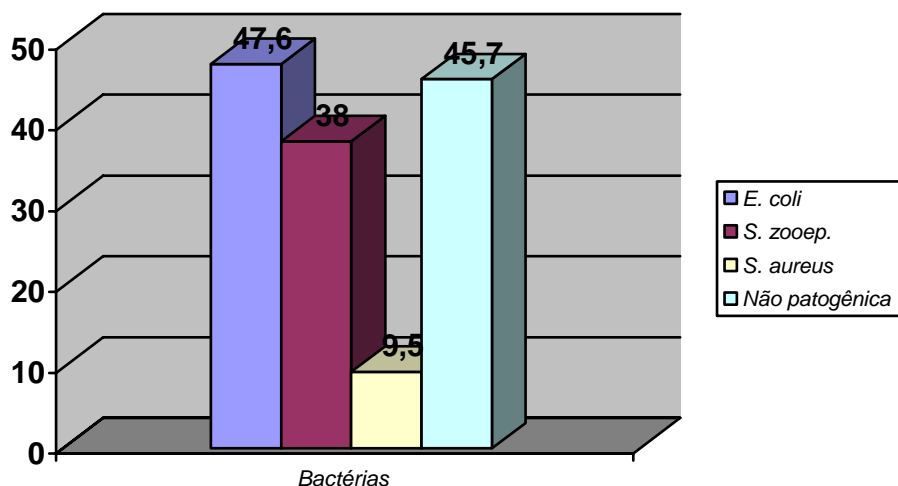


Figura 13. Prevalência de bactérias isoladas de *swabs* obtidos de secreções uterinas de 21 éguas susceptíveis selecionadas através do histórico e exame ginecológico durante os anos de 2005 a 2007.

Das 21 éguas selecionadas pela susceptibilidade a endometrite, nove (42,8%) não apresentaram crescimento de microorganismos patogênicos. Este resultado foi superior ao encontrado por Silva N. et al. (1999), que obtiveram resultados negativos em 20,4% dos espécimes coletados e Albihn, Baverud e Magnusson (2003), que após selecionarem éguas com problemas uterinos observaram que 32% não apresentavam crescimento de bactérias na cultura uterina. Porém, foi inferior ao de Redaelli e Codazza (1977 apud RICKETTS; YOUNG; MEDICI, 1993) que obtiveram 61% de resultados negativos nas culturas, e Papa et al. (1993) que observaram 52,9% de culturas negativas, Albihn, Baverud e Magnusson (2003), que observaram 70% e Aguiar et al. (2005), que diagnosticaram 63,5% de culturas negativas. Esta diferença observada entre os resultados provavelmente ocorreu devido as diferentes metodologias utilizadas nos experimentos. Neste trabalho, foram utilizados *swabs* protegidos para evitar a contaminação de microorganismos oportunistas da cérvix e vagina, o que não ocorreu em todos os estudos. Este resultado ratifica os trabalhos de Nielsen (2005), que indica *swabs* protegidos para obtenção de amostras da superfície endometrial para cultura. Outra explicação se baseia na seleção das éguas dos experimentos. Os autores citados anteriormente, utilizaram éguas sem uma seleção através da idade e do histórico de sub-fertilidade, por este motivo, não se isolou microorganismos patogênicos de uma grande percentagem de éguas. A ausência de isolamento de bactérias patogênicas, especialmente em éguas mais velhas com baixa fertilidade, indica que a infecção bacteriana não é o único fator envolvido na endometrite.

Foi observada a presença de secreção uterina em nove éguas, e em seis (66,6%) destas detectou-se infecção mista de *Escherichia coli* e *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

O perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* demonstrou resistência a eritromicina em um isolado de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (12,5%), resistência intermediária a cefalotina entre isolados de *Escherichia coli* (60%) e sensibilidade das cepas isoladas aos demais antibióticos testados. Esta cepa de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* apresentou fenótipo M de resistência a macrolídeos, expresso devido à presença de bombas de efluxo. Estes resultados foram semelhantes ao de Silva N. et al. (1999), que observaram que todas as amostras de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* foram sensíveis à penicilina e a ampicilina. Estes resultados eram esperados uma vez que antibióticos β -lactâmicos, como penicilina e cefalosporinas, têm alta efetividade contra as bactérias do gênero estreptococos (MCCUE; HUGHES; JANG, 1991).

Os resultados somam-se aos encontrados por Aguiar et al. (2005), que assinalaram a norfloxacina, ampicilina e gentamicina como antibióticos mais efetivos e aos de Langoni et al. (1994) que apontaram as bactérias Gram negativas com sensibilidade a gentamicina e Gram positivas para ampicilina. Também se assemelham aos resultados obtidos por Albiñ, Baverud e Magnusson (2003), que observaram resistência das cepas de *Escherichia coli* a cefalotina, estreptomomicina, sulfa/trimetropin e ampicilina.

A seleção dos antimicrobianos a serem utilizados para os tratamentos deve ser baseada tanto na determinação da prevalência das bactérias causadoras da infecção como no conhecimento da susceptibilidade desses microorganismos diante dos antimicrobianos. Estudos realizados revelaram diferentes prevalências e diferentes resultados de susceptibilidade dos microorganismos isolados em *swabs* cervicais e uterinos de éguas (MCCUE; HUGHES; JANG, 1991; MORENO et al., 1995 apud SILVA N. et al., 1999).

O método proposto para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de plantas foi o método de diluição em tubos, de acordo com Suffredini et al. (2004). A turvação natural do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* sobre o meio de cultura, impediu a visualização de crescimento bacteriano, não sendo possível, portanto a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM). Resultados semelhantes foram observados por Souza T. et al. (2007) que relataram a impossibilidade de visualização da presença de turvação devido à coloração escura do extrato seco da planta. A determinação da concentração bactericida mínima (CBM), foi realizada através da visualização do crescimento bacteriano

em meio sólido (AS) a partir da inoculação de alíquotas com diferentes concentrações do extrato.

Dentre os três extratos aquosos de plantas testados, somente o de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), apresentou atividade bactericida frente à cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC (25923). As cepas de *Escherichia coli* ATCC (25922) e *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC (27853) não foram sensíveis aos extratos aquosos de *Kalanchoe brasiliensis*, *Kalanchoe pinnata* e *Stryphnodendron adstringens*, nas concentrações utilizadas. Resultados diferentes obtiveram Schimitt et al. (2003) que demonstraram através do método de diluição em tubos, que o decocto da folha de *Kalanchoe pinnata* (*Bryophyllum pinnatum*), conhecida popularmente como folha da fortuna, possui ação bactericida sobre bactérias Gram positivas (*Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp.), mas não em bactérias Gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Foram realizados testes para avaliação da eficácia do extrato de Barbatimão na concentração de 100µg/ml frente as seguintes bactérias Gram positivas: *Streptococcus pyogenes* (1 cepa) *Streptococcus agalactiae* (1 cepa), *Staphylococcus aureus* (3 cepas), *Enterococcus* sp. (1 cepa), *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (3 cepas), estafilococos coagulase negativo (3 cepas). Observou-se 100% de inibição frente a cepas de *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* e 33,3% de inibição frente a cepas de estafilococos coagulase negativo e *Staphylococcus aureus*. Não foi observada inibição de *Streptococcus agalactiae* e *Enterococcus* sp.

Devido aos relatos na literatura referirem a bactéria *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* como apresentando maior prevalência nas endometrites eqüina e à eficácia do extrato de barbatimão observado frente às bactérias Gram positivas testadas nos ensaios, todas as oito cepas de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isoladas a partir das secreções uterinas das éguas, foram submetidas ao teste de sensibilidade em diferentes concentrações (25 a 500 ug/ml) do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). A CBM para cada cepa isolada foi determinada conforme a tabela abaixo.

Pode ser observado (tabela 7), que 87,5% das cepas não cresceram nas concentrações de 100-125µg/ml. Somente a cepa de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolada da égua 7 apresentou resistência na concentração de 125 ug/ml de extrato de barbatimão.

Tabela 7. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* frente as oito cepas de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

Nº da Égua - Cepas	Concentração do extrato aquoso de <i>S. adstringens</i> (ug/ml)						CBM
	25	50	100	125	250	500	
1- <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (4)	+	+	-	-	-	-	100
5- <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (5)	+	+	-	-	-	-	100
7- <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (17)	+	+	+	+	-	-	250
8- <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (18)	+	+	+	-	-	-	125
9- <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (19)	+	+	-	-	-	-	100
10- <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (20)	+	+	-	-	-	-	100
11- <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (21)	+	+	+	-	-	-	125
20- <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (31)	+	+	+	-	-	-	125

(+) Crescimento positivo, (-) Ausência de crescimento

Em estudo prévio de avaliação fitoquímica de extrato de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), foi revelada presença de taninos e flavonóides (CARVALHO, J., 2004; VASCONCELOS et al., 2004), podendo estes efeitos observados no presente estudo serem devido à presença desses metabólitos secundários. O resultado obtido neste estudo se assemelha ao de Lopes et al. (2003) que verificaram a atividade bactericida através da avaliação da concentração inibitória mínima, e observaram que o extrato das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) demonstrou atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus* na concentração de 125µg/ml, porém não houve atividade inibitória para *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (CIM > 1000µg/ml). Toledo (2002), observou que o extrato obtido das cascas de *Stryphnodendron adstringens* possui atividade antimicrobiana frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Doze das 21 éguas selecionadas, apresentaram inflamação no exame citológico (acima de 2-5 neutrófilos por campo). Dentre as 12 éguas que apresentaram inflamação, em nove foi diagnosticada inflamação severa (>5 neutrófilos por campo) e em dez éguas (83,3%) foram isoladas bactérias patogênicas das secreções uterinas.

A endometrite diagnosticada através do exame citológico foi observada em 57,1% das éguas do experimento. Riddle, Leblanc e Stromberg (2007) observaram inflamação em 19,9% das éguas através do exame citológico de secreções uterinas, enquanto Wingfield e Ricketts (1982) observaram que 91% das éguas com evidência clínica de endometrite persistente apresentavam inflamação, porém somente 45% apresentavam achados bacteriológicos positivos. Esta diferença percentual entre as pesquisas, provavelmente se deve ao fato da maioria das éguas utilizadas no experimento ser de idade avançada, selecionadas como susceptíveis a endometrite, diferente de Riddle, Leblanc e Stromberg (2007) que trabalharam sem prévia seleção dos animais.

Empregando-se a correlação de Pearson para avaliar a relação entre o isolamento de bactérias patogênicas e inflamação uterina, observou-se uma correlação positiva entre as duas variáveis ($r = 0,94$). Resultado semelhante foi encontrado por Langoni et al. (1994), que reportaram existir uma correlação positiva entre culturas positivas e detecção de inflamação nos exames citológicos.

Nas éguas que apresentaram exames citológicos positivos foram detectadas mais freqüentemente cepas de *Escherichia coli* e *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (Tabela 8). Os mesmos autores observaram que o *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* foi o microorganismo mais associado com inflamação do endométrio aparecendo em 34% das amostras, seguido por *Escherichia coli*, que foi isolada em 17% das amostras. Também detectaram evidências citológicas de inflamação em 65% das culturas de *Streptococcus* β -hemolítico, 80% em culturas de *Klebsiella* sp., 82% em culturas de *Staphylococcus* sp., 55% em culturas de *Escherichia coli* e 52% em culturas de *Pseudomonas* sp.

Foi observado neste estudo que em dois isolados de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* associado a *Escherichia coli* não se detectou inflamação (0-2 neutrófilos por campo). Estes resultados diferem de Riddle, Leblanc e Stromberg (2007), que ao isolarem bactérias das secreções uterinas de éguas reportaram que a presença de dois ou mais organismos sempre está associado com inflamação do endométrio, sendo a inflamação severa mais comumente reportada.

Tabela 8. Relação entre microorganismos patogênicos isolados, presença de secreção e exames citológicos das éguas susceptíveis.

Microrganismos Patogênicos Isolados	Exame clínico		Exame Citológico (número de neutrófilos/campo examinado)			
	Éguas	Presença de secreção	0-2	2-5	>5	% inflamação
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	2	1	0	0	2	2 (20%)
<i>E. coli</i>	2	0	0	1	1	2 (20%)
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> + <i>E. coli</i>	6	5	2	0	4	4 (40%)
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i>	2	1	0	0	2	2 (20%)
Total	12	7	2	1	9	10 (100%)

0-2= normal, 2-5 = inflamação moderada, >5= inflamação severa, hipocelular- ausência de neutrófilos e escassas células epiteliais (RIDDLE; LEBLANC; STROMBERG, 2007).

Das 12 éguas em que foram isoladas bactérias patogênicas, sete apresentaram secreções no lúmen uterino e destas, seis éguas apresentavam inflamação uterina detectada pela citologia (Tabela 9). A detecção de secreção uterina foi correlacionada com a presença de neutrófilos no exame citológico. Observou-se uma correlação positiva entre estas variáveis ($r=0,98$).

Tabela 9. Relação entre número de éguas e achados citológicos e cultura de éguas susceptíveis.

Citologia	Métodos de diagnóstico		Nº de éguas	%
	Isolamento bacteriano			
0-2 neutrófilos	Nenhuma bactéria patogênica isolada		7	33,3
0-2 neutrófilos	Bactérias isoladas		2	9,5
2-5 neutrófilos	Nenhuma bactéria patogênica isolada		1	4,8
2-5 neutrófilos	Bactérias isoladas		1	4,8
>5 neutrófilos	Nenhuma bactéria isolada		1	4,8
>5 neutrófilos	Bactérias isoladas		9	42,8
	Total		21	100

0-2 neutrófilos: Ausência de inflamação, 2-5 neutrófilos: Inflamação moderada e >5 neutrófilos: Inflamação severa.

Na avaliação histopatológica das 21 éguas com histórico de subfertilidade e classificadas como susceptíveis através do histórico e exame ginecológico, 43% das éguas

obtiveram classificação de biópsia endometrial grau IIB, 38% apresentaram grau IIA, e 19% grau III. Nenhuma égua apresentou endométrio I, classificado como sadio. Todas as 21 éguas com histórico de subfertilidade apresentaram alguma alteração histopatológica, mesmo que discreta.

Através da histopatologia podemos verificar que todas as éguas do experimento foram classificadas com grau acima de IIA. Este resultado obtido ratifica o método de seleção utilizado para classificar as éguas como suscetíveis, utilizando o histórico, exames ginecológicos e ultra-som, pois segundo Liu (1988), as éguas suscetíveis apresentam histórico de infecções persistente e endométrio classificado nas categorias II e III de Kenney (1978).

Nas amostras analisadas, observou-se endometrite crônica em 11 éguas (52,3%), sete éguas (33,3%) apresentaram endometrite com resposta crônica e uma reação aguda se sobrepondo e em três éguas (14,3%) foi observada endometrite aguda. O achado histopatológico mais freqüente foi à fibrose e o infiltrado inflamatório de mononucleares. Ricketts (1981), demonstrou que a endometrite aguda, sozinha ou associada com graus de infiltrado de células mononucleares e doença endometrial degenerativa crônica é o achado histopatológico mais comumente encontrado em biópsias endometriais de éguas sub-férteis e inférteis durante exames ginecológicos de rotina. Esta variabilidade provavelmente ocorreu devido a fatores como idade das éguas, anos sem parição e manejo durante a cobertura, pois estes fatores influenciam as categorias IIA e IIB de biópsia uterina (DOIG; MCKNIGHT; MILLER, 1981; WAELCHLI, 1990).

O resultado obtido neste experimento foi semelhante ao de Moreira et al. (2007) que ao avaliarem o útero de 25 éguas doadoras e receptoras com histórico de sub-fertilidade observaram que 48% apresentaram histopatologia grau IIB, 40% foram classificadas como IIA e 12% como III. No mesmo experimento, os autores, avaliaram o endométrio de 11 éguas (doadoras e receptoras) sem histórico de subfertilidade, oito éguas (73%) obtiveram classificação da biópsia endometrial IIA, duas (18%) IIB e uma (9%) foi classificada como III. Rosciani et al. (2000), trabalhando com 29 éguas doadoras de embriões, observaram que 38% delas apresentavam endométrio classificado como grau I, 48,2% como grau IIA, 10,3% classificadas como grau IIB e 3,4% como grau III. Este percentual de éguas classificadas com grau I e IIA se justifica pelo grupo utilizado no experimento ser de éguas doadoras de embriões e que não apresentavam histórico de subfertilidade.

Das doze éguas com diagnóstico citológico positivo para inflamação uterina, seis foram classificadas com endométrio IIA, cinco como IIB e uma como III.

Em estudo realizado por Ribas (1998), com 25 éguas apresentando problemas reprodutivos, e com média de idade de 7,5 anos, uma égua (4%) foi classificada como grau I, 15 éguas (60%) foram classificadas como grau IIA, oito éguas (32%) classificadas como grau IIB e uma égua (4%) como grau III, segundo Kenney e Doig (1986).

As éguas foram divididas em três grupos de acordo com a faixa etária: oito a 15 anos (oito éguas), 16 a 22 anos (sete éguas) e 23 a 30 anos (6 éguas).

No grupo de éguas com oito a 15 anos observamos 38,1% foram classificadas entre os grupos IIA e IIB. Nas éguas com idade entre 16 a 22 anos, 28,6% das éguas encontravam-se classificadas nos grupos IIA e IIB e 4,7% no grupo III. Já nas éguas mais velhas, com idade variando entre 23 a 30 anos 14,3% foram classificadas com endométrio grau IIB e 14,3% como grau III, caracterizado por alterações inflamatórias difusas severas, fibrose periglandular e lacunas linfáticas (Figura 14) (Tabela 10).

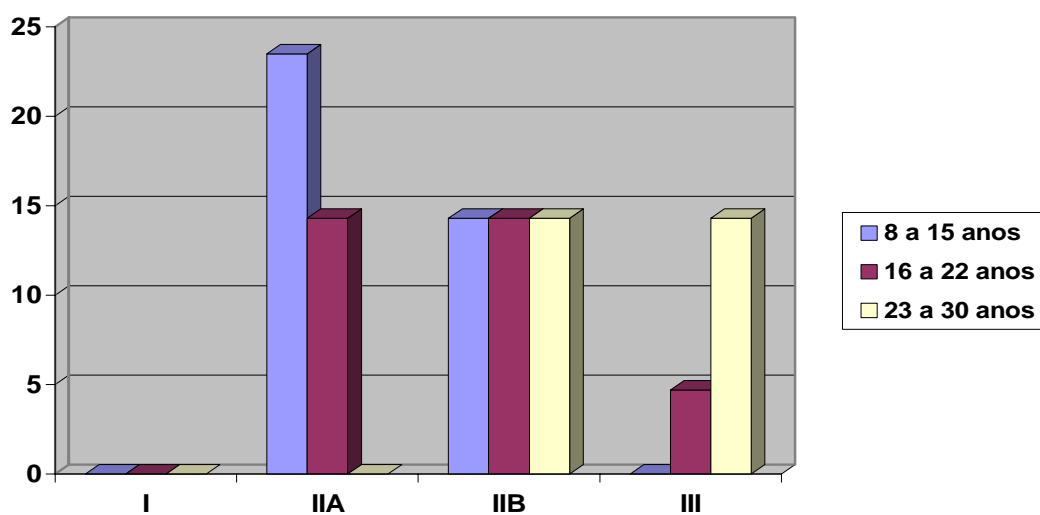


Figura 14. Classificação histopatológica do útero das éguas de acordo com a faixa etária, categorizada segundo Kenney e Doig (1986), modificado por Schoon, H., Shoon, D, e Klug (1992).

Tabela 10. Relação entre a idade e biópsia endometrial das 21 éguas categorizada segundo Kenney e Doig (1986), modificado por Schoon, H., Shoon, D, e Klug (1992).

Idade	I	IIA	IIB	III	Total
8 a 15 anos	0	5	3	0	8
16 a 22 anos	0	3	3	1	7
23 a 30 anos	0	0	3	3	6

Os resultados encontrados no experimento ratificam os relatos da literatura que descrevem relação entre a idade das éguas e alterações endometriais. Carnevale e Ginther (1992) relataram que as éguas mais velhas geralmente apresentam complicações histológicas mais graves do que éguas mais jovens, o que vem de encontro ao observado neste experimento, relacionando a idade das éguas, o histórico de subfertilidade e o grau de comprometimento uterino observado na histopatologia.

Segundo Ginther (1986), a idade da égua é um fator importante considerando que há uma maior perda da gestação com o avançar da idade. Aparentemente, este grupo de animais tem sido caracterizado por alterações degenerativas no endométrio (BALL et al., 1988), o que pode dificultar a atividade dos hormônios circulantes, alterar o aporte de células à luz do útero e dificultar a drenagem linfática (SCHOON, H. A.; SHOON, D.; KLUG, E., 1997). As alterações também incluem endometrioses e alterações vasculares (BALL et al., 1988).

Ricketts e Alonso (1991) relataram que infiltrações de células mononucleares e doença endometrial degenerativa crônica tinham correlação significativa com idade.

No experimento realizado foi observado que das 12 éguas com isolamento de bactérias patogênicas seis apresentaram polimorfonucleares na biópsia e das nove éguas diagnosticadas com cultura negativa, quatro apresentaram polimorfunucleares no exame de biópsia. Resultado diferente foi observado por Waelchli (1990) que estudando 201 éguas e comparando o valor do exame histológico, citológico e bacteriológico em diagnosticar inflamação aguda e infecção, relatou que 43 (21%) dos espécimes de biópsias uterinas e 26 (13%) dos espécimes citológicos apresentavam leucócitos polimorfonucleares, e que estas células estavam presentes em todos os casos onde os resultados da cultura foram considerados significantes.

No presente estudo, observou-se que a presença de grande número de polimorfonucleares na biópsia tem alta correlação com o isolamento de bactérias patogênicas, mas não com aquelas consideradas comensais (Tabela 11).

Tabela 11. Resultados da cultura bacteriológica uterina e biópsia endometrial em 21 éguas susceptíveis a endometrite.

Grupo	Número de Éguas			
	Total	Resultados das Biópsias		
		Inflamação aguda	Inflamação aguda/crônica	Inflamação crônica
Cultura Positiva	12	2	4	6
Cultura Negativa	9	1	3	5

Neste experimento foi possível observar que as lesões inflamatórias do endométrio não são necessariamente associadas com o isolamento de bactérias aeróbicas. A associação entre lesões histológicas e infecção uterina foi baixa em casos de inflamação crônica, já a presença de polimorfonucleares foi mais correlacionada com o isolamento de bactérias. Resultado semelhante ao detectado por Doig, Mcknight e Miller (1981).

Foi observado no experimento que a biópsia uterina é o único método capaz de diagnosticar estados de fibrose, endometrite crônica e endometrite crônica degenerativa. Esta afirmação corrobora com os relatos de Rosciani et al. (2000), que citam que a biópsia endometrial é um método indispensável para avaliar a habilidade do útero em manter a prenhes, pois permite detectar fibrose, endometrite crônica, endometriose, os quais são causa da diminuição de fertilidade e não são diagnosticáveis por outros métodos.

4.2 Tratamentos – Testes *in vivo*

Devido à eficácia do extrato aquoso de barbatimão observada *in vitro* frente às bactérias Gram positivas, testes *in vivo* foram realizados para comparação entre os resultados.

As 12 éguas que foram isoladas bactérias Gram positivas das secreções uterinas através de exames bacteriológicos, foram divididas em três grupos aleatórios. Três éguas foram tratadas com infusões de 20 ml de antibiótico⁵ (Grupo 1), quatro com 20 ml de extrato aquoso de barbatimão a 10% (Grupo 2) e, cinco éguas com 20 ml de soro fisiológico (Grupo 3), durante quatro dias consecutivos.

⁵ Agrovet®, Schering Plough, 10.000.000UI penicilina e estreptomicina

Foi possível observar que o antibiótico utilizado foi eficiente na eliminação de cepas de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* e *Staphylococcus aureus*, porém observou-se crescimento de cepas de *Escherichia coli*. Este resultado era esperado, pois a penicilina é eficiente contra bactérias Gram positivas. É possível que estas cepas de *Escherichia coli* tenham sensibilidade intermediária à estreptomicina ou ainda, que apesar de todo o cuidado tomado durante a coleta das secreções uterinas, realizando rigorosa higienização perineal, utilizando *swabs* protegidos e luvas de palpação retal protegendo o *swab*, tenha ocorrido contaminação durante a coleta de material uterino, pois algumas éguas tratadas apresentavam pneumovagina e também porque enterobactérias estão presentes nas fezes dos animais e na fossa clitoriana. Allen, Newcombe (1979) e Ghasemzadeh-Nava et al. (2004) têm atribuído a ocorrência de enterobactérias a manobras ginecológicas inadequadas, utilização de material contaminado em exames ginecológicos ou defeitos anatômicos (pneumovagina), que favorecem a contaminação fecal do trato reprodutor feminino e usualmente o endométrio é colonizado por coliformes.

Comparando o resultado da biópsia uterina das éguas antes e após o tratamento com antibiótico, foi possível determinar que as éguas apresentaram melhora no infiltrado celular e na infecção. A presença de eosinófilos observado na égua de número um sugere entrada de ar, pois esta égua apresenta pneumovagina, ou então pode ser uma possível presença de fungos.

O tratamento com soro fisiológico (controle) agiu frente às cepas de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Este resultado não era esperado, no entanto, Tunon et al. (2000), reportaram que após manipulação uterina, há um aumento imediato da atividade mioelétrica do útero.

Leblanc (1994), Troedsson, Liu e Thurmond (1993a), descrevem que a contratilidade miometrial é um importante mecanismo para eliminação rápida do agente agressor e dos componentes e subprodutos inflamatórios. Isto pode justificar o resultado encontrado caracterizando a eficiência do estímulo às contrações miometriais e sua importância no mecanismo de defesa uterino. No entanto, Evans et al. (1986) observaram que muitas éguas são capazes de eliminar bactérias por seu próprio mecanismo de defesa após contaminação endometrial.

Nikalokopoulos e Watson (2000) induzindo em éguas sadias uma deficiência na contratilidade miometrial com clenbuterol, observaram que apesar do acúmulo de fluido uterino e presença de neutrófilos ao exame citológico, 60% das éguas não apresentou crescimento de bactérias 48 horas após a cobertura. Estes autores concluíram que mesmo

quando a contratilidade está diminuída, os demais mecanismos de defesa da égua, neutrófilos, sistema complemento e imunoglobulinas, são capazes de eliminar a infecção bacteriana.

Apesar das éguas terem sido selecionadas aleatoriamente, o tratamento com soro fisiológico foi realizado nas éguas do experimento que apresentavam melhor classificação histológica, duas éguas classificadas como IIB e três éguas como IIA, e isto pode ter influenciado no resultado da eficiência deste tratamento.

O tratamento *in vivo* com extrato aquoso de barbatimão a 10% infundido no útero das éguas não se mostrou eficiente na eliminação das cepas de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Apenas uma égua eliminou o microorganismo 96 horas após o tratamento. Os resultados observados diferem dos encontrados *in vitro*, pois o extrato aquoso de barbatimão agiu *in vitro* sobre as cepas de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Porém, cumpre lembrar que os resultados se reportam à atividade de um extrato cuja composição é uma mistura de várias substâncias, assim, as substâncias responsáveis pelo efeito antimicrobiano se encontram provavelmente diluídas.

Portanto, tornam-se necessários estudos complementares no sentido de isolar as substâncias responsáveis pela atividade bacteriana do extrato e determinar a concentração ideal para obtenção de eficiência do extrato da planta *in vivo*. Apesar da verificação da sensibilidade das bactérias Gram positivas frente ao extrato aquoso de barbatimão *in vitro*, sugere-se que novos experimentos sejam realizados para complementação dos estudos com coletas de biópsias seriadas para acompanhamento das alterações no endométrio uterino e evolução do quadro após tratamento (Tabela 12).

Tabela 12. Dados referentes aos exames citológicos, bacteriológicos e histopatológicos das 12 éguas selecionadas, após tratamento com Antibiótico (G1), barbatimão (G2) ou soro fisiológico (G3).

Éguas	Tratamento	Citologia	Bacteriologia	Histologia
1	Antibiótico	(0-2N)	-	III
2	Antibiótico	(0-2N)	<i>E. coli</i> , CGP	IIA
4	Antibiótico	(0-2N)	<i>E. coli</i> ; CGP	IIA*
5	Soro Fisiológico	(2-5N)	<i>E. coli</i>	IIB
7	Barbatimão	>5N	<i>E. coli</i>	III
8	Barbatimão	>5N	<i>E. coli</i> /EGC	III
9	Barbatimão	(2-5N)	<i>E. coli</i> /EGC	IIB*
10	Barbatimão	(2-5N)	EGC	IIB*
11	Soro Fisiológico	>5N	EGC	IIB
17	Soro Fisiológico	>5N	-	IIA
20	Soro Fisiológico	>5N	<i>E. coli</i>	IIA
21	Soro Fisiológico	>2-5N	-	IIA

* Embora não tenha sido modificada a classificação histológica com o uso do tratamento, houve uma melhora na avaliação do quadro do animal.

EGC =Estreptococos do grupo C, CGP= Cocos Gram positivo, (-) não isolamento.

No exame citológico das éguas de número 7, 8, 9 e 10, após o tratamento com extrato aquoso de barbatimão a 10%, observou-se aumento no número de neutrófilos em todas as éguas avaliadas. Resultado semelhante foi observado no exame histopatológico, pois foi possível detectar um aumento de infiltrado de polimorfonucleares, o que sugere uma reação de reagudização intensa do processo inflamatório. Também foi possível detectar a diapedese das células inflamatórias que devido ao grau de fibrose perivascular antes do tratamento, ficavam retidas no leito vascular e diminuição do número de camadas de colágeno ao redor das glândulas endometriais. A lesão do tecido fibroso, degenerado, talvez promova uma reorganização tecidual com diminuição da fibrose, o que seria desejável para um aumento da fertilidade das éguas. Segundo Malschitzky et al (2007) uma reação inflamatória mais intensa favorece a recuperação mais rápida do endométrio.

Talvez nestas éguas com intensa presença de neutrófilos, fosse indicado a utilização de anti-inflamatórios glicocorticóides, que agiriam como imunomoduladores do processo inflamatório. Segundo Fumoso et al. (2006) a administração de imuno-moduladores diminui a transcrição de citocinas nas éguas, diminuindo a inflamação. Nos relatos de Janeway et al. (1999 apud MALSCHITZKY et al., 2007), a administração de glicocorticóides também diminui a síntese de óxido nítrico e das enzimas responsáveis pela síntese de prostaglandinas

e leucotrienos, além de diminuir a atividade das moléculas de adesão, o que reduz a migração dos leucócitos dos vasos sanguíneos.

Foi possível observar uma melhora geral do quadro das éguas 4, 9 e 10, apesar de não ter sido observado mudanças na classificação histológica. Estes achados são desejáveis para a melhora do quadro de fertilidade das éguas como proposto por Kenney (1978).

Segundo Asbury (1984b), na inflamação crônica sem infecção, os anti-sépticos são capazes de mudar o status inflamatório crônico para uma inflamação aguda, porém o uso de substâncias anti-sépticas no útero deve ser utilizado com cautela, pois as éguas são extremamente sensíveis a substâncias irritantes introduzidas no trato reprodutor e podem desenvolver necrose e subseqüentes mudanças fibróticas no endométrio, cérvix e vagina. Malschitzky et al. (2007) relatam que a inflamação aguda pode causar danos ao tecido, e por isso deve ser mantida sob controle.

Como as infusões do extrato aquoso de barbatimão a 10%, reagudizaram o processo inflamatório no útero das éguas testadas, novos experimentos com coletas sucessivas de fragmentos de biópsia e acompanhamento por um período mais prolongado para uma melhor avaliação da evolução histopatológica do endométrio torna-se necessário, pois a agudização do processo é desejável nestes quadros, porém o acompanhamento é fundamental pois a agudização também pode levar a um quadro de fibrose mais severa.

5 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos podemos chegar às seguintes conclusões:

- Os extratos aquosos das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* e *Kalanchoe pinnata* na concentração de 100µg/ml, não apresentaram atividade *in vitro* frente as bactérias estudadas.
- O extrato aquoso da casca de *Stryphnodendron adstringens* na concentração de 100µg/ml apresentou atividade antibacteriana *in vitro*. frente às cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e outros cocos Gram positivos.
- A combinação dos métodos de diagnóstico: exame ginecológico, cultura bacteriana, citologia e biópsia endometrial permite maior acurácia no diagnóstico da endometrite equina.
- Dentre as plantas testadas o *Stryphnodendron adstringens* mostrou-se o mais eficiente frente às bactérias Gram positivas isoladas do útero de éguas.
- Sugere-se que seja estabelecido uma seqüência de exames onde a citologia deve ser primeiro utilizada para diagnosticar a existência do processo inflamatório, a bacteriologia deve ser utilizada para identificação do processo infeccioso e o agente etiológico e a histopatologia para confirmar ou identificar o grau do processo inflamatório, presença de microorganismos, estabelecer o prognóstico e a taxa de fertilidade.
- Os resultados obtidos sugerem que o barbatimão é uma planta promissora quanto a ação antimicrobiana e anti-inflamatória. Porém, estudos são necessários para melhor avaliação da eficácia da planta.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIFISA. Nosso verde vale ouro. 2002. Disponível em: <www.abifisa.org.br/noticias2.asp>. Acesso em: 22 jul. 2007.

ADAMS, G. P. et al. Effect of uterine inflammation and ultra-sonically detected uterine pathology on fertility in the mare. *J. Reprod. Fertil.*, Oxford, v. 35, p. 445-454, 1987. Suppl.

ADENIKE, K.; ERETAN, O. B. Purification and partial characterization of a lectin from the fresh leaves of *Kalanchoe crenata* (Andr.) Haw. *J. Biochem. Mol. Biol.*, Seoul, v. 37, n. 2, p. 229-233, Mar. 2004.

AGUIAR, D. M. et al. Etiologia e sensibilidade in vitro de microorganismos aeróbicos isolados de endometrite eqüina. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 107-109, jan./mar. 2005.

AGUILAR, J. et al. Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares. *Theriogenology*, Los Altos, n. 66, n. 2, p. 423-430, Jul. 2006.

ALBIHN, A.; BAVERUD, V.; MAGNUSSON, U. Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Vet. Scand.*, London, v. 44, n. 3, p. 121-129, Sep. 2003.

ALGHAMDI, A. et al. Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Am. J. Reprod. Immunol.*, New York, v. 53, n. 5, p. 230-237, May 2005.

ALLEN, W. E.; NEWCOMBE, J. R. Aspects of genital infection and swabbing techniques in the mare. *Vet. Rec.*, London, v. 104, n. 11, p. 228-231, Mar. 1979.

ALLEN, W. E. Investigations into the use of exogenous oxytocin for promoting uterine drainage in mares susceptible to endometritis. *Vet. Rec.*, London, v. 128, n. 25, p. 593-594, Jun. 1991.

ALLEN, W. R.; PYCOCK, J. F. Cyclical accumulation of uterine fluid in mares with lowered resistance to endometritis. *Vet. Rec.*, Londres, v. 122, n. 20, p. 489-490, May 1988.

ALLEN, W. R. Equine endometritis: an up date on recent findings and treatment. In: EQUINE PRACTITIONERS GROUP CONGRESS, 1994, [S. l.]. Proceedings... [S. l.]: [s n.], 1994. Não paginado.

ALVES, T. M. A. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, maio/jun. 2000.

AMARAL, D. et al. Alterações no endométrio detectadas através de técnicas morfológicas e histoquímicas em relação à idade e ao ciclo estral em éguas PSI. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 197-199, jul./set. 1999.

ANVISA. Resolução – RDC n.º17, de 24 de fevereiro de 2000. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17_00rdc.htm>. Acesso em: 08 jun. 2007.

ANVISA. Resolução – RDC n.º48, de 16 de março de 2004. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapicos%20.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2007.

ANVISA. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana: 15º suplemento informativo. 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2007

ANZAI, T. et al. Isolation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from mares with metritis and its zoonoepidemiology. J. Equine Sci., New York, v. 7, n. 1, p. 7-11, 1996.

ASBURY, A. C. Endometritis diagnosis in mares. Equine Vet. Data, v. 5, p.166, 1984a.

ASBURY, A. C. Uterine defense mechanisms in the mare: the use of intrauterine plasma in the management of endometritis. Theriogenology, Los Altos, v. 21, n. 2, p. 387-393, Fev. 1984b.

ASBURY, A. C. et al. Immunoglobulins in uterine secretions of mares with differing resistance to endometritis. Theriogenology, Los Altos, v. 14, n. 4, p. 299-308, Oct. 1980.

ASBURY, A. C. et al. Factors affecting phagocytosis of bacteria by neutrophils in the mare's uterus. J. Reprod. Fertil., Oxford, v. 32, p. 151-159, 1982. Suppl.

ASBURY, A. C.; GORMAN, N. T.; FOSTER, G. W. Uterine defense mechanisms in the mare: serum opsonins affecting phagocytosis of *Streptococcus zooepidemicus* by equine neutrophils. Theriogenology, Los Altos, v. 21, n. 2, p. 375-385, Feb. 1984.

ASBURY, A. C.; LYLE, S. K. Infections causes of infertility. In: MCKINNON , A. O.; VOSS, J. L. Equine Reproduction. Boston: Blackwell, 1993. p. 338-391.

AUDI, E. A. et al. Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. Acta Farm. Bonaerense, Buenos Aires, v. 23, n. 3, p. 328-333, 2004.

BALL, B. A. et al. Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. Theriogenology, Los Altos, v. 29, n. 5, p. 1269-1283, 1988.

BARBOUR, E. K et al. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol., Lausanne, v. 93, n. 1, p. 1-7, Jul. 2004

BARROSO, G. M. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: U. F. Viçosa , 1991. 2 v.

BEACHEY, E. H. Bacterial-adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 143, p. 325-345, 1981.
BLACK, J. G. *Microbiologia: fundamentos e perspectivas*. 4. ed. Rio de Janeiro: G. Koogan, 2002. 856 p.

BRINSKO, S. P. et al. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometrites. In: ANNUAL CONV. AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 49., 2003, Lexington. Proceedings... Lexington: [s. n.], 2003. p. 363-365.

BROOK, D. Uterine cytology. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Boston: Blackwell, 1993. p. 246-253.

CADARIO, M. E.; THATCHER, M. J. D.; LEBLANC, M. M. Relationship between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. *Biol. Reprod. Mono.*, [S. l.], n. 1, p. 495-500, 1995.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 179-189, Feb. 2000.

CAMARGO, M. T. L. A. *Medicina popular*. São Paulo: Almed, 1985. 130 p.

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology*, Los Altos, v. 37, n. 5, p. 1101-1115, May 1992.

CARVALHO, A. A. T. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram- negativas. *Acta Farm. Bonaerense*, Buenos Aires, v. 21, n. 4, p. 225-228, 2002.

CARVALHO, J. C. T. *Fitoterápicos Anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480 p.

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

CAUSEY, R. C. et al. The equine immune response to *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* during uterine infection. *Vet. J.*, London, v. 172, n. 2, p. 248-257, Sep. 2006.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1988.1998.

CHEUNG, A. T. et al. Phagocytic and killing capacities of uterine-derived polymorphonuclear leukocytes from mares resistant and susceptible to chronic endometritis. *Am. J. Vet. Res.*, Chicago, v. 46, n. 9, p. 1938-1940, Sep. 1985.

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science*, Washington, v. 257, n. 5073, p. 1050-1055, Aug. 1992.

CORRÊA, A. D. et al. *Plantas medicinais do cultivo à terapêutica*. 6. ed. Petrópolis: Vozes, 2003. 247 p.

CORRÊA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Nacional, 1926-1975. 3 v.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, Oct. 1999.

CRICKMAN, J. A.; PUGH, D. G. Equine endometrial cytology: a review of techniques and interpretations. *Vet. Med.*, Iowa, v. 81, p. 650-656, 1986.

CURNOW, E. M. Ultrasonography of the mares uterus. *Equine Vet. Educ.*, Suffolk, v. 3, n. 4, p. 333-339, 1991.

DASCANIO, J.; LEY, W. B.; BOWEN, J. B. How to perform and interpret uterine cytology. 1997. Disponível em: < <http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/1997/Dascanio.pdf>>. Acesso em 08 jun. 2007.

DIAS, B. S. F. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campinas: A. Tosello, 1996. 10 p.

DIGBY, N. J. The technique and clinical application of endometrial cytology in mares. *Equine Vet. J.*, London, v. 10, n. 3, p. 67-70, Jul. 1978.

DIMOCK, W. W.; EDWARDS, P. R. The pathology and bacteriology of the reproductive organs of mares in relation to sterility. *KY Agric. Exper. Stat. Bulletin*, n. 286, p. 157-237, 1928.

DOIG, P. A.; MCKNIGHT, J. D.; MILLER, R. B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Can. Vet. J.*, Guelph, v. 22, n. 3, p. 72-76, Mar. 1981.

DOIG, P. A.; WAELCHLI, R. O. Endometrial biopsy. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. p. 225-233.

EVANS, M. J. et al. Clearance of bacteria and non antigenic markers following intra uterine inoculation into maiden mares: effect of steroid hormone environment, *Theriogenology*, Los Altos, v. 26, n. 1, p. 37-50, Jul. 1986.

FERNANDES, C. A. C. Ultra-sonografia na reprodução animal. *O Embrião*, [S. l.], jul./set. 2003. Não paginado.

FERNANDES, T. M. *Plantas medicinais: memória da ciência no Brasil*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2004. 260 p.

FERREIRA, J. B. P. et al. Incidência e caracterização ultra-sonográfica da morte embrionária em éguas da raça Campolina. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 202-203, jul./set. 1999.

FIALA, S. M. E. Endometrite em éguas da raça Crioula. 1999. 96 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1999.

FIALA, S. M. et al. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. Theriogenology, Los Altos, v. 67, n. 3, p. 556-562, Feb. 2007.

FUMOSO, E. et al. Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. Anim. Reprod. Sci., Amsterdam, v. 94, p.282-285, 2006.

GASTAL, E. L.; HENRY, M.; NASCIMENTO, E. F. Influência das alterações uterinas e tubáricas na taxa de fertilização de éguas. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.13, p.171, 1989.

GHASEMZADEH-NAVA, H. et al. A review of mare endometritis in Iran. J. Equine Vet. Sci., New York, v. 24, n. 5, p. 188-192, 2004.

GHOST, H. Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). 2008. 1 fotografia, color. Disponível em: < <http://protegerorio.blogspot.com/2008/03/barbatimo-stryphnodendron-adstringens.html>>. Acesso em: 08 fev. 2006.

GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. 3. ed. [S. l.]: Madison, 1986. 378 p.

GLAND, K. N.; GUPTA, R. L. Phenolic components from the leave of *Kalanchoe pinnata*. Planta Med. v. 23, n. 2, p. 149-153, jul. 1973.

GRUNERT, E. et al. Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia. São Paulo: Varela, 2005. 551 p.

HAINES, G. R. et al. Serum concentrations and pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intragastric administration to mares. Can. J. Vet. Res., Ottawa, v. 64, n. 3, p. 171-177, Jul. 2000.

HASSLER, S. O. Endometritis and the susceptible mare. 2002. Disponível em: <<http://www.foalnet.ca/SUSCEPTIBLE-MARE.html>>. Acesso em: 08 mar. 2007.

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

ITO, T. et al. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist. Updat., Endinburgh, v. 6, n. 1, p. 41-52, Feb. 2003.

JACOB, J. C. F. et al. Susceptibilidade antimicrobiana de swab uterino e da fossa clitoriana de éguas com subfertilidade. Rev. Univ. Rural Ser. Ciênc. da Vida, Seropédica, v. 22, n. 2, p. 109-114, 2002. Suplemento.

JACOB, J. C. F. et al. Citologia x bacteriologia uterina: métodos complementares para diagnóstico da endometrite eqüina. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v. 7, n. 3, p.572-574, 2003.

JONSSON, H., LINKMARK, H.; GUSS, B. A protein G-related cell surface protein in *Streptococcus zooepidemicus*. Infect. Immun., v. 63, n. 8, p. 2968-2975, Aug. 1995.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 9. ed. Rio de Janeiro: G. Koogan, 1999. 540 p.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response in mares after insemination with fresh semen. Biol. Reprod. Mono., [S. l.], n. 1, p. 515-518, 1995.

KATILA, T.; SANKARI, S.; MÄKELÄ, O. Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of the mares. J. Reprod. Fert., [S. l.], v.56, p.571-578, 2000. Suppl.

KATILA, T. Sperm- uterine interations: a review. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v. 68, p. 267-172, 2001.

KELLER, A. et al. Exame histopatológico do endométrio da égua após infecções experimentais repetidas e cinco diferentes tratamentos: aspectos inflamatórios. Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, v. 32, n. 3, p. 215-223, 2004.

KENNEY, R. M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. J. Am. Vet. Med. Assoc., Ithaca, v. 172, n. 3, p. 241-262, Feb. 1978.

KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. In: _____. Current therapy in theriogenology. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 723-729.

KENNEY, R. M. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. Proc. Am. Ass. Eq. Pract., [S. l.], v. 21, p. 227 – 336, 1975.

KNUDSEN, O. A combined cytologic and bacteriologic endometrial examination in the mare. Proc. Am. Assoc. Equine Pract., [S. l.], v. 28, p. 431-433, 1982.

KOATZ, V. L. G. O uso do *Kalanchoe brasiliensis* (saião) como tratamento antitumoral. 2007. Disponível em: <<http://www.bioqmed.ufrj.br/onco/corpo/programa/grupos/grupo24.html>>. Acesso em: 20 jan. 2008.

KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. Theriogenology, Los Altos, v. 41, n. 3, p. 629-636, Feb. 1994.

LANGONI, H. et al. Estudo microbiológico e citológico do trato genital de éguas. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 46, n. 6, p. 623-636, dez. 1994.

LANGONI, H. P. et al. Participação de bactérias aeróbicas, microaerófilas e aneróbicas na endometrite eqüina. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v. 23, n. 1, p. 44-51, 1999.

LEBLANC, M. M. Oxytocin: the new gonder drug for treatment of endometritis. Equine Veterinary Education, [S. l.], v. 6, p. 39-43, 1994.

LEBLANC, M. M. Effects of oxytocin, prostaglandin and phenylbutazone on uterine clearance of radiocolloid. Pferdeheilkunde, Stuttgart, v. 13, n.5, p. 483-485, 1997.

LEBLANC, M. M. Persistent mating induced endometritis in mare: pathogenesis, diagnosis and treatment. 2003. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Reproduction_Ball/leblanc/chapter_frm.asp?LA=1>. Acesso em: 08 Jun. 2007.

LEBLANC, M. M.; ASBURY, A. C.; LYLE, S. K. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. J. Am. Vet. Med. Assoc., Ithaca, v. 50, n. 6, p. 864-867, Jun. 1989.

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

LEBLANC, M. M. et al. Lymphatic clarence of india ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. Biol. Reprod. Mono., [S. l.], n. 1, p. 501-506, 1995.

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

LEY, W. B. Reprodução em éguas para veterinários de eqüinos. São Paulo: Roca, 2006. p. 211.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA JR., P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. Phytother. Res., London, v. 12, n. 3, p. 218-220, Dec. 1998.

LISBOA, L. M.; FERREIRA, S. M; SILVA, M. S. Uso de plantas medicinais para tratar úlceras e gastrites pela comunidade do povoado de Vila Capim, município de Arapiraca, AL., Nordeste do Brasil. Setientibus Série Ciências Biológicas (Etnobiologia), [S. l.], v. 6, p. 13-20, 2006.

LIU, I. K. M. Uterine defence mechanisms in the mare. Vet. Clin. North Am. Equine Prac., Philadelphia, v. 4, n. 2, p. 221- 228, Aug. 1988.

LIU, I. K. M. et al. Comparison of peripheral blood and uterine-derived polymorphonuclear leucocytes from mares resistant and susceptible to endometritis: chemotactic and cell elastimetry analysis. Am. J. Vet. Res., Chicago, n. 46, p. 917-920, 1985.

LOQUÉRCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* L. Skells), *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, mar./abr. 2005.

LOPES, G. C. et al. Estudo físico-químico, químico e biológico de extrato das cascas de *Stryphnodendron poiyphyllum* Mart. (Leguminosae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, João Pessoa, v. 14, p. 24-27, 2003. Suplemento.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa: I. Plantarum, 2000. 2 v.

LYLE, S. K. et al. Pathogenesis of equine endometrites: proposed interaction between streptococcal immunoglobulin-binding proteins and other uterine pathogens. *J. Reprod. Fertil.*, Chicago, v. 44, p. 741, 1991. Suppl.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. *Rev. Bras. Farmacogn.*, João Pessoa, v. 14, n. 1, p. 40-44, 2004.

MACKAY, R. J. Inflammation in horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Prac.*, Philadelphia, v. 16, n. 1, p. 15-27, Apr. 2000.

MALSCHITZKY, E. et al. Effect of intra-uterine fluid accumulation during and after foal-heat and different management techniques on the postpartum fertility of thoroughbred mares. *Theriogenology*, Los Altos, v. 58, n. 2, p. 495-498, Aug. 2002.

MALSCHITZKY, E. et al. Endometrite na égua, novos conceitos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 31, n.1, p. 17-26, jan./mar. 2007.

MATOS, F. J. A. Plantas da medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas. Fortaleza: UFC, 1999. 80 p.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2. ed. Fortaleza: UFC, 2000. 346 p.

MATTOS, R. C. et al. Citologia endometrial na égua como método de diagnóstico auxiliar e complementar. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 8, n. 2, p. 83-90, 1984.

MATTOS, R. C. et al. Monta natural e inseminação artificial com sêmen fresco diluído em éguas árabes. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v.24, n. 2, p.57-64, 1996.

MATTOS, R. C. et al. Uterine lavage with saline in mares as treatment for endometritis. *Pferdeheilkunde*, Stuttgart, v. 13, p. 521-524, 1997.

MATTOS, R. C. et al. Treatment of endometritis of experimentally infected mares I: effect of lavage, plasma and leukocytes on uterine bacterial clearance. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 49-60, 1999.

MCCUE, P. M.; HUGHES, J. P.; JANG, S. S. Antimicrobial susceptibility patterns for equine endometrial isolates. *Calif. Vet.*, [S. l.], v. 1-2, p.23-26, 1991.

MCKINNON , A . O. et al. Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: effect of involution and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory cycles. J. Am. Vet. Med. Assoc., Ithaca, v. 192, n. 3, p. 350-353, Feb. 1988.

MCKINNON , A. O.; VOSS, J. L. Equine Reproduction. Boston: Blackwell, 1993. 1137 p.

MELO, J. O. et al. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. Braz. J. Pharmac. Sci., v. 43, n. 3, p. 465-469, Jul./Set. 2007.

METCALF, E. S. The effect of post-insemination endometritis on fertility of frozen stallion semen. Proc. Am. Assoc. Equine Pract., [S. l.], v. 46, p. 330-331, 2000.

MOREIRA, R. R. D. et al. Avaliação da atividade antiséptica do extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo esse extrato. Rev. Bras. Farmacogn., João Pessoa, v. 17, n. 1, jan./mar. 2007

MORENO, G. et al. Infecções genitais de éguas puro sangue inglês: inquérito bacteriológico. Biológico, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 8-12, 1972.

MOURÃO, R. H. V. et al. Antiinflammatory activity and acute toxicity (LD50) of the juice of *Kalanchoe brasiliensis* (Comb.) leaves picked before and during blooming. Phytother. Res., v. 13, n. 4, p. 352-354, Jun. 1999.

MURRAY, P. R. et al. Manual of clinical microbiology. 7. ed. Washington: A.S. Microbiology, 1999. 1773 p.

MURRAY, P. R. et al. Microbiologia Médica. 4. ed. Rio de Janeiro: G. Koogan, 2002. 604 p.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Braz. J. microbial., [S. l.], v. 31, p. 247-256, 2000.

NEELY, D. P.; LIU, I. K. M.; HILLMAN, R. B. Equine Reproduction. New Jersey: H. La Roche, 1983. 166 p.

NEELY, D. P.; LIU, I. K. M.; HILLMAN, R. B. Evaluación y terapia de las enfermedades genitales em la yegua. En: Reproducción Equina. Montevideo: H. Sur, 1991. p.61-94.

NIELSEN, J. M. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. Theriogenology, Los Altos, v. 64, n. 3, p. 510-518, Aug. 2005.

NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E. D. Effect of infusion volume and sperm numbers on persistence of uterine inflammation in mares. Equine Vet. J., London, v. 32, n. 2, p. 164-166, Mar. 2000.

NOAKES, D. E. et al. Arthur's Veterinary reproduction and obstetrics. 7. ed. England: Saunders, 1996. 864 p.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre: UFSC, 2000, cap. 1, p. 11-24.

NORBY, S. R.; NORD, C. E. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threst to public health. *Lancet Infect. Dis.*, New York, v. 5, p. 115-119, Feb. 2005.

NUNES, G. P. et al. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Rev. Bras. Farmacogn.*, João Pessoa, v. 13, n. 2, p. 83-92, 2003.
OLIVEIRA, R. A. G.; SILVA, M. S. H. Plantas medicinais na atenção primaria à saúde. João Pessoa: UFPB, 1994. 64p.

OLSON, M. E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.*, Ottawa, v. 66, n. 2, p. 86-92, Apr. 2002.

ORLANDO, S. C. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato alcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron barbatiman* (Martius) Coville (barbatimão). 2005. 89 f. Dissertação (Mestrado Promoção de Saúde), Universidade de Franca, Franca, 2005.

PANIZZA, S. et al. *Stryphnodendron barbatiman* (Vellozo) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. *Rev. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v. 10, p. 101-106, 1988.

PAPA, F. O. et al. Morte embrionária precoce em éguas: aspectos cito-microbiológicos. In: Anais do 5º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5., 1993, Luso. Anais... Luso: [s. n.]1993. p. 348-353.

PARKINS, M. D.; CERI, H.; STOREY, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* Gaca, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v. 40, n. 5, p. 1215-1226, Jun. 2001.

PASCOE, D. R. Incidence and significance of pneumovagina, foal heat mating and other management factors on the occurrence of uterine susceptibility. *Equine Vet. J.*, London, v. 25, p. 187, 1993.

PENNA, A. Notas sobre plantas brasileiras. 2. ed. Rio de Janeiro: [s. n.], 1930. 513 p.

PLATT, H.; ATHERTON, J. G.; ORSKOV, I. Klebsiella and enterobacter organisms isolated from horses. *J. Hyg.*, London, n. 77, n. 3, p. 401-408, Dec. 1977.

PYCOCK, J. F. Management of the problem breeding mare. In: SAMPER, J. C. Equine breeding management and artificial insemination. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p. 195-228.

PYCOCK, J. F. Inflammatory cells: neutrophils. 2003. Disponível em: <<http://www.equine-reproduction.com/articles/cytology.shtml>>. Acesso em: 18 ago. 2007.

PYCOCK, J. F.; ALLEN, W. E. Inflammatory components in uterine fluid from mares with experimentally induced bacterial endometritis. *Equine Vet. J.*, London, v. 22, n. 6, p. 422-425, Nov. 1990.

QUEIROZ, F. J. R. Biópsia endometrial como método auxiliar de diagnóstico da subfertilidade e da infertilidade da égua (*Equus caballus*, L.1721). 1991. 75 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução) – Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1991.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. *Toxicon*, Oxford, v. 39, n. 5, p. 603-613, May 2001.

REBECCA, M. A. et al. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 83, n. 1, p. 101-104, Nov. 2002.

REITZENSTEIN, M. et al. Aberrations in uterine contractile patterns in mares with delayed uterine clearance after administration of detomidine and oxytocin. *Theriogenology*, Los Altos, v. 58, n. 5, p. 887-898, Sep. 2002.

RIBAS, J. A. S. Incidência de endometrites fúngicas em éguas (*Equus caballus*) no Estado do Rio de Janeiro. 1998. 80 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1998.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Rev. Bras. Farmacogn.*, João Pessoa, v. 15, n. 1, p. 65-70, jan./mar. 2005.

RICKETTS, S. W. Bacteriological examinations of the mare's cervix: techniques and interpretation of results. *Vet. Rec.*, London, v. 108, p. 46-51, 1981.

RICKETTS, S. W. The treatment of equine endometritis in studfarm practice. *Pferdeheilkunde*, Stuttgart, v. 6, p. 588-593, 1999.

RICKETTS, S. W.; ALONSO, S. Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. *Equine Vet. J.*, London, v. 23, n. 3, p. 185-188, May 1991.

RICKETTS, S. W.; MACKINTOSH, M. E. Role of anaerobic bacteria in equine endometritis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, Oxford, v. 35, p. 343-351, 1987.

RICKETTS, S. W.; YOUNG, A.; MEDICI, E. B. Uterine and clitoral cultures. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Boston: Blackwell, 1993. p.234-245.

RIDDLE, W. T. et al. Relationships between pregnancy rates, uterine cytology, and culture results in a thoroughbred practice in central Kentucky. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 51., 2005, Seattle. , 2005. Proceedings... Seattle: [s. n.], 2005. Não paginado.

RIDDLE, W. T.; LEBLANC, M. M.; STROMBERG, A. J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*, Los Altos, v. 68, n. 3, p. 395-402, 2007.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V. Inflammation and repair. In: _____. *Pathologic basis of disease*. 3. ed. London: Saunders, 1984, p. 40-61.

ROHEN, F. J.; SANTOS, M. R. C.; SANTOS, A. Avaliação pré-cobertura para diagnóstico de fertilidade em éguas do Rio de Janeiro. Rev. Bras. Med. Vet., Rio de Janeiro, v. 25, n.5/6, p. 192-195, 2003.

ROSCIANI, A. S. et al. Correlación de muestras citológicas y biopsias de endometrio de yeguas, como herramientas para el diagnóstico de aptitud reproductiva: resultados preliminares. 2000. Disponível em: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt/2000/4_veterinarias/v_pdf/v_015.pdf>. Acesso em 20 fev. 2006.

ROSSDALE, P. D.; RICKETTS, S. W. Equine studfarm medicine. 2. ed. London: B. Tindall, 1980. 464 p.

ROSZEL, J. F.; FREEMAN, K. P. Equine Endometrial cytology. Vet. Clin. North Am. Large Animal Pract., Philadelphia, v. 4, n. 247, p.262, 1988.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000. p. 517-544.

SANTOS, S. C. et al. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. Rev. Bras. Farmacogn., João Pessoa, v. 16, n. 4, p. 552-556, Oct./Dec. 2006.

SAS/STAT. General Linear Models Procedure of Statistical analysis System. In: _____. User's Guide release 6.03. Cary: SAS Institute, 1997, p. 9-640.

SCHIMITT, A. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro da planta *Bryophyllum pinnatum* Kurz ("Folha-da-fortuna") colhida em Várzea Grande, Mato grosso, Brasil. Acta Sci. Vet., Porto Alegre, v. 31, n.1, p. 55-58, 2003.

SCHOON, H. A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Uterusbiopsien als Hilfsmittel für diagnose und prognose von fertilitätsstörungen der stute. Pferdeheilkunde, Stuttgart, v. 8, p. 355-362, 1992.

SCHOON, H. A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Vascular lesions in the equine endometrium. Pferdeheilkunde, Stuttgart, v. 13, n.5, p. 546, 1997.

SCOTT, M. A.; LIU, I. K. M.; OVERSTREET, J. W. Sperm transport to the oviducts; Abnormalities and their clinical implications. Proc. Am. Assoc. Equine Pract., [S. l.], v. 41, p. 1-2, 1995.

SELLNOW, L. Immunotherapy in broodmares. 2007. Disponível em: <<http://www.thehorse.com/ViewArticle.aspx?ID=8814>>. Acesso em: 08 jun. 2007

SILVA, J. G. Avaliação do potencial farmacológico de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007a.

SILVA, J. G. Representação das folhas de *Kalanchoe brasiliensis*. 2007b. 1 fotografia, color. 9,41 x 13,2 cm.

SILVA, N. et al. Isolamento e teste de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias em infecções uterinas de éguas. Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec., Belo Horizonte, v. 51, n. 3, p. 1-8, jun. 1999.

SILVA, G. S.; ASSIS, M. B.; BARBOSA, W. L. R. Investigação fitoquímica e microbiológica da espécie *Ananas erectifolius* (Curauá). 2001. Disponível em: <http://www2.ufpa.br/rcientifica/ed_anteriores/pdf/ed_01_gss.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2008.

SILVEIRA, A. L.; RODRIGUES, M. C.; PAULO, M. Q. Estudos toxicológicos e microbiológicos de *Kalanchoe pinnata*. [200?]. Disponível em: <http://www.prac.ufpb.br/anais/Icbeu_anais/anais/saude/kalanchoe.pdf>. Acesso em 20 maio 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, 1986. 174 p.

SMITH, H. Reaction to strangles vaccination. Aust. Vet. J., Sydney, v. 71, n. 8, p. 257-258, Aug. 1994.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. Acta Bot. Bras., São Paulo, v. 20, n. 1, p. 135-142, jan./mar. 2006.

SOUZA, T. M. et al. Avaliação da atividade anti-séptica do extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. Rev. Bras. Farmacogn., João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 71-75, jan./mar. 2007.

SOUZA, V.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseada em APOII. Nova Odessa: Plantarum, 2005. 640 p.

STARR, F.; STARR, K. Plants of Hawaii: *Kalanchoe braziliensis*. 2002. 1 fotografia, color. Disponível em: <http://www.hear.org/starr/hiplants/images/thumbnails/html/kalanchoe_pinnata.htm>. Acesso em: 24 jan. 2008.

STEVENS, J. F. et al. Distribution of alcaloides and tanins in the crassulaceae. Biochem. Syst. Ecol, Oxford, v. 23, n. 2, p. 157-165, 1995.

SUFFREDINI, I. B. et al. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. Braz. J. Med. Biol. Res., São Paulo, v. 37, n. 3, p. 379-384, Mar. 2004.

TOLEDO, C. E. M. Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae). 2002. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

TREVISAN, M. T. S. et al. Larvicides and acetylcholinesterase inhibitors from *Kalanchoe* species. Química Nova, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 415-418, May/Jun. 2006.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine response to semen deposition in the mare. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1995, San Antonio. Proceedings... San Antonio: [s. n.], 1995. p. 130-134.

TROEDSSON, M. H. T. Treatment strategies in mares with endometrites. In: SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, MARE REPRODUCTION SYMPOSIUM, 1996, Kansas. Proceedings... Kansas, 1996. p. 40-50.

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

TROEDSSON, M. H. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, Los Altos, v. 52, n.3, p. 461-471, Aug. 1999.

TROEDSSON, M. H. Breeding-induced endometritis in mares. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, Philadelphia, v. 22, n. 3, p. 705-712, Dec. 2006.

TROEDSSON, M. H. et al. Effect of periovulatory prostaglandin F2 α on pregnancy rates and luteal function in the mare. *Theriogenology*, Los Altos, v. 55, n. 9, p. 1891-1899, Jun. 2001.

TROEDSSON, M. H. et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v. 89, n. 1/4, p. 171-186, 2005.

TROEDSSON, M. H. T.; LIU, I. K. M.; THURMOND, M. Immunoglobulin (IgG and IgA) and complement (C3) concentrations in uterine secretion following an intrauterine challenge of *Streptococcus zooepidemicus* in mares susceptible to versus resistant to chronic uterine infection. *Biol. Reprod.*, New York, v. 49, n. 3, p. 502-506, Sep. 1993a.

TROEDSSON, M. H.; LIU, I. K. M.; THURMOND, M. Function of uterine and blood-derived polymorphonuclear neutrophils in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection: phagocytosis and chemotaxis. *Biol. Reprod.*, New York, v. 49, n. 3, p. 507-514, Sep. 1993b.

TROEDSSON, M. H.; SOTT, M. A.; LIU, I. K. M. Pathogenesis and treatment of uterine infection. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, [S. 1.], p. 357-359, 1995.

TUNON, A. M. et al. T-cell distribution in two different segments of the equine endometrium 6 and 8 hours after insemination. *Theriogenology*, Los Altos, v. 54, n. 6, p. 835-841, 2000.

UNITINS. Árvores do cerrado: Barbatimão: *Stryphnodendron adstringens*. 2005. 1 fotografia, color. Disponível em: <<http://www.unitins.br/ates/arquivos/Meio%20Ambiente/%C3%81rvores%20do%20Cerrado/Barbatim%C3%A3o%20-%20Stryphnodendron%20adstringens%202.JPG>>. Acesso em 08 jun. 2008.

VAN CAMP, S. D. Endometrial biopsy of the mare: a review and update. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, Philadelphia, v. 4, n. 2, p. 229-145, Aug. 1988.

VASCONCELOS, M. C. A. et al. Avaliação de atividades biológicas das sementes de *Stryphnodendron abouatum* Benth (Leguminosae). *Rev. Bra. Farmacogn.*, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 121-127, 2004.

VERDE, G. M. V.; PAULA, J. R.; CARNEIRO, D. M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado, utilizadas pela população de mossâmedes (GO). Rev. Bra. Farmacogn., São Paulo, v. 13, p. 64-66, 2003. Suplemento.

VIKSVEEN, P. Antibiotics and the development of resistant microorganisms: can homeopathy be an alternative? Homeopathy, Edinburgh, v. 92, n. 2, p. 99-107, Apr. 2003.

VITAL, B. R. et al. Adesivos a base de taninos das cascas de duas espécies de eucaliptos para produção de chapas de flocos. Revista Árvore, Viçosa, v. 28, n. 4, jul./ago. 2004.

WAELECHLI, R. O. Endometrial biopsy in mares under nonuniform breeding management conditions: prognostic value and relationship with age. Can. Vet. J., Guelph, v. 31, n. 5, p. 379-384, May 1990.

WATSON, E. D. Uterine defence mechanisms in mares resistant and susceptible to persistent endometritis: a review. Equine Vet. J., London, v. 20, n. 6, p. 397-400, Nov. 1988.

WATSON, E. D. Post-breeding endometritis in the mare. Anim. Reprod. Sci., Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 221-232, Jul. 2000.

WATSON, E. D.; STOKES, C. R. Effect of susceptibility to endometritis on specific antibody in the endometria of mares. Theriogenology, Los Altos, v. 34, n. 1, p. 39-45, Jul. 1990.

WINGFIELD, D. N. J.; RICKETTS, S. W. Results concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981. J. Reprod. Fert., Oxford, v. 32, p. 181-185, 1982. Suppl.

WOOLCOCK, J. B. Equine bacterial endometritis. Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract., Philadelphia, v. 2, n. 2, p. 241-251, Nov. 1980.

ZINGHER, A. C. Effects of immunostimulation with *Propionibacterium acnis* (EqStim®) in mares cytologically positive for endometritis. J. Equine Vet. Sci., New York, v. 16, p. 100-103, 1996.

ANEXOS

Anexo A Ficha ginecológica para avaliação das éguas

Égua:	RG:	Data:
Local:	Idade:	Raça:
Exame Clínico:		
Histórico e Anamnese:		
Exame Específico do Aparelho Reprodutor:		
Vulva		
Vagina		
Cérvix		
Palpação Retal		
Útero		
Ovários		
Ultra-sonografia		
Útero		
Ovários		
Conclusão		
Coleta de Material		
Citologia		
Bacteriologia		
Biópsia		

Anexo B Ficha de Exame Citológico

Égua:	RG:	Data da colteta:
Local:	Idade:	Raça:
Histórico:		
Data da Leitura da Lâmina: __/__/__		
Descrição da Lâmina:		
Classificação:		

Anexo C Ficha de Biópsia endometrial.

Égua:	RG:	Data da coleta:
Local:	Idade:	Raça:
Histórico e Anamnese:		
Data do Exame Histopatológico: __/__/__		
Descrição da Lâmina:		
Epitélio Luminal:		
Estrato Compacto:		
Estrato Esponjoso:		
Grau:		
Classificação/ Prognóstico:		

Anexo D Resultados referentes ao histórico, exames ginecológicos e ultra-sonografia do útero das 21 éguas examinadas.

Égua	Idade (anos)	Histórico (Sem parição)	Pneumo -vagina	Útero (cm) (CE; CD)	Tônus uterino	Secreção
1	23	2 anos	+	3,6; 3,8	1	+
2	22	Aborto	-	3,6; 3,2	1	+
3	23	3 anos	+	4,2; 4,3	1	-
4	18	Aborto	-	4,2;4,0	1	++
5	22	2 anos	-	3,7;3,8	1	-
6	23	> 3 anos	-	3,4;3,4	1	-
7	28	>3 anos	+	4,1;4,2	2	+
8	30	> 3 anos	+	4,5;4,7	1	+
9	19	3 anos	+	3,8;3,9	0	++
10	16	> 3 anos	-	3,6;3,8	1	+++
11	29	> 3 anos	-	3,5; 3,8	1	+
12	10	1 ano	-	4,0;4,3	0	-
13	20	2 anos	-	3,9;3,7	0	-
14	12	2 anos	-	4,5;4,7	0	-
15	11	3 anos	+	4,0;4,2	0	-
16	11	1 ano	-	3,9;3,7	1	-
17	8	1 ano	+	4,0.3,8	1	-
18	10	2 anos	-	3,9;3,8	1	-
19	16	1 ano	-	4,6;4,9	2	-
20	10	2 anos	+	4,8;5,3	1	++
21	15	2 anos	+	5,5;5,7	1	-
Média	17,9		9			9

Pneumovagina: (+) Presença (-) Ausência

Tônus uterino: (0) útero relaxado, (1) Pouco tônus, (2) Tônus moderado (3) Tônus consistente.

Anexo E Classificação histológica do endométrio das 21 éguas susceptíveis, segundo Kenney e Doig, (1986). Continua.

Égua	Idade	Classificação		Alterações histológicas observadas
		Inflamação	Histológica	
1	23	Crônica degenerativa	III	Epitélio colunar hiperplásico. Infiltrado difuso moderado com predomínio de linfócitos. Moderada quantidade de glândulas com dilatação cística. Fibrose moderada a severa de ramos individuais. Formação de mais de 4 ninhos glandulares fibrosados por campos de 5,5 cm. Vasos congestos. Fibrose perivascular moderada. Linfangiectasia moderada. Lacunas linfáticas.
2	22	Aguda/crônica	IIA	Epitélio colunar com hiperplasia multifocal e degeneração vacuolar. Poucas glândulas com dilatação cística. Infiltrado focal formado por neutrófilos e mononucleares nos estratos compacto e esponjoso. Fibrose discreta difusa de ramo individual de glândulas. Congestão dos vasos. Linfangiectasia discreta.
3	23	Aguda/crônica	IIB	Epitélio cubóide. Moderada quantidade de glândulas com dilatação cística. Infiltrado neutrofilico periglandular e intraglandular. Inflamação discreta difusa com predomínio de linfócitos no estrato compacto e neutrófilos no estrato esponjoso. Fibrose perivascular discreta. Perivasculite eosinofílica.
4	18	Aguda	IIA	Epitélio colunar baixo. Poucas dilatações císticas. Infiltrado inflamatório moderado a severo difuso formado por linfócitos, neutrófilos e eosinófilos no estrato compacto. Raros ninhos glandulares fibrosados. Fibrose discreta de ramos individuais das glândulas. Congestão. Linfangiectasia severa.
5	22	Crônica	IIB	Epitélio cubóide. Infiltrado inflamatório discreto difuso com predomínio de linfócios no estrato compacto e neutrófilos no estrato esponjoso. Moderada quantidade de glândulas com dilatação cística. Fibrose perivascular discreta. Infiltrado neutrofilico periglandular.
6	23	Crônica degenerativa	IIB	Epitélio colunar com hiperplasia e vacuolização. Dilatações glandulares císticas frequentes. Raros eosinófilos (1-2 por campo). Infiltrado de mononucleares. Formação de 2 a 4 ninhos glandulares fibrosados por campos de 5,5 cm. Congestão vascular. Linfangiectasia acentuada. Fibrose periglandular de ramos individuais moderada.

7	28	Crônica degenerativa	III	Epitélio colunar com hiperplasia. Infiltrado inflamatório discreto difuso com focos moderados formado predominantemente por mononucleares e plasmócitos. Hemorragia difusa no estrato compacto e esponjoso. Glândulas com dilatação cística severa. Formação de 6 ou mais ninhos glandulares por campos de 5,5 cm. Fibrose severa dos ramos individuais das glândulas endometriais. Lacunas linfáticas. Vasos congestos. Fibrose perivascular severa. Hemociderófagos.
8	30	Crônica degenerativa	III	Epitélio colunar hiperplásico. Infiltrado inflamatório severo difuso formado por linfócitos e neutrófilos. Mais de 4 ninhos glandulares fibrosados.

Anexo E. Continuação.

9	19	Aguda/crônica	IIB	Epitélio colunar. Infiltrado inflamatório discreto difuso no estrato esponjoso formado por linfócitos e neutrófilos. Infiltrado severo difuso formado principalmente por linfócitos, monócitos e raros eosinófilos no estrato compacto. Congestão vascular.
10	16	Crônica	IIB	Epitélio colunar baixo. Infiltrado inflamatório moderado difuso composto principalmente por células mononucleares no estrato compacto. Infiltrado focal moderado formado por eosinófilos. Formação de poucos ninhos glandulares fibrosados.
11	29	Crônica	IIB	Epitélio colunar baixo. Infiltrado moderado difuso formado por mononucleares. Glândulas císticas, ruptura de glândulas. Infiltrado de polimorfonucleares no estrato esponjoso e compacto. Formação de menos de 1 ninho glandular fibrosado por campos de 5,5 cm. Fibrose discreta de ramos individuais de glândulas. Linfangiectasia moderada.
12	10	Aguda/crônica	IIA	Epitélio cubóide. Infiltrado inflamatório difuso misto. Presença de eosinófilos, hemosiderófagos. Fibrose discreta de ramos individuais. Linfangiectasia discreta.
13	20	Crônica degenerativa	III	Epitélio cubóide. Infiltrado intraglandular. Infiltrado inflamatório moderado difuso composto principalmente por células mononucleares no estrato compacto e focal no estrato esponjoso. Distensão glandular severa. Presença de 4 a 5 ninhos glandulares fibrosados por campos de 5,5 cm. Fibrose perivascular moderada.
14	12	Crônica degenerativa	IIB	Infiltrado inflamatório de mononucleares difuso. Dilatação glandular cística leve. Eosinófilos intraluminais e secreção. Um ninho fibrosado por campo. Fibrose periglandular.
15	11	Aguda	IIB	Epitélio cubóide baixo. Infiltrado inflamatório difuso moderado formado predominantemente por neutrófilos e eosinófilos. Presença de linfócitos. Dilatação glandular cística. Fibrose moderada de ramos individuais. Formação de 2 a 4 ninhos glandulares fibrosados por campos de 5,5 cm. Vasos congestos com neutrófilos e eosinófilos no interior. Linfangiectasia severa.
16	11	Aguda/crônica	IIA	Epitélio colunar baixo. Infiltrado misto discreto difuso. Presença de poucas glândulas com dilatação cística. Fibrose discreta de ramos individuais

glandulares. Linfangiectasia acentuada.

17	8	Aguda/crônica	IIA	Epitélio cubóide. Infiltrado inflamatório misto difuso moderado. Presença de eosinófilos. Raras glândulas com dilatação. Formação de um ninho glandular fibrosado por campos de 5,5 cm. Fibrose discreta. Linfangiectasia discreta.
18	10	Crônica degenerativa	IIB	Epitélio cubóide. Hiperplasia multifocal. Infiltrado inflamatório focal discreto misto. Presença discreta de hemácias e eosinófilos. Dilatação glandular cística discreta. Fibrose moderada de ramos individuais. Formação de quatro ninhos glandulares fibrosados por campo. Fibrose perivascular discreta.
19	16	Crônica degenerativa	IIA	Epitélio cubóide. Edema moderado. Infiltrado inflamatório misto difuso moderado fibrose moderada de ramos individuais das glândulas, glândulas com dilatação cística, formação de dois ninhos glandulares fibrosados por campos de 5,5 cm.

Anexo E. Continuação.

20	10	Aguda/crônica	IIA	Epitélio cubóide. Fibrose discreta de ramos individuais das glândulas, poucas dilatações glandulares císticas, formação de dois ninhos glandulares por campo. Infiltrado inflamatório misto moderado difuso no estrato compacto.
21	15	Aguda	IIA	Epitélio cubóide. Fibrose discreta de ramos individuais das glândulas, dilatação glandular discreta, poucas glândulas císticas, formação de menos de dois ninhos glandulares fibrosados por campos de 5,5 cm. Infiltrado inflamatório discreto difuso formado predominantemente por mononucleares no estrato compacto.

Anexo F Classificação histológica do endométrio de éguas susceptíveis, segundo Kenney e Doig, (1986), após os tratamentos com antibiótico, soro fisiológico e extrato aquoso de barbatimão a 10%.

Égua	Idade	Classificação Histológica	Alterações histológicas observadas
1	23	III	Epitélio colunar com hiperplasia. Infiltrado de eosinófilos no estrato compacto e esponjoso. Infiltrado discreto difuso de mononucleares no estrato compacto. Fibrose de mais de 4 ninhos glandulares por campos de 5,5 cm. Lacunas linfáticas. Linfangiectasia discreta.
2	22	IIA	Epitélio colunar com hiperplasia Dilatação glandular discreta. Infiltrado focal de neutrófilos no estrato compacto e infiltrado mononuclear nos estratos compacto e esponjoso. Fibrose difusa. discreta de ramo individual. Linfangiectasia discreta.
4	18	IIA	Infiltrado inflamatório difuso discreto formado predominantemente por neutrófilos e eosinófilos. Presença de linfócitos. Dilatação glandular cística discreta. Fibrose moderada de ramos individuais. Formação de um ninho glandular fibrosado por campo. Dilatação vascular.
5	22	IIB	Moderada quantidade de glândulas com dilatação cística. Fibrose perivascular discreta. Infiltrado neutrofilico periglandular. Inflamação discreta difusa com predomínio de linfócios no estrato compacto e neutrófilos no estrato esponjoso.
7	28	III	Hiperplasia epitelial. Infiltrado inflamatório difuso severo de neutrófilos no estrato compacto e esponjoso. Infiltrado difuso de linfócitos e plasmócitos. Hemorragia difusa no estrato compacto. Lacunas linfáticas Fibrose perivascular discreta. Diminuição da fibrose ao redor dos ninhos glandulares.
8	30	III	Infiltrado inflamatório severo difuso formado por linfócitos e neutrófilos. Presença de poucos ninhos glandulares.
9	19	IIB	Infiltrado inflamatório severo difuso misto formado predominantemente por polimorfonucleares no estrato compacto e esponjoso. Edema discreto. Presença discreta de eosinófilos. Congestão vascular. Presença de polimorfonucleares intravascular.
10	16	IIB	Infiltrado inflamatório severo difuso formado predominantemente por polimorfonucleares no estrato compacto e esponjoso. Presença discreta de linfócitos. Congestão vascular. Presença maciça de polimorfonucleares intravascular.
11	29	IIB	Infiltrado moderado difuso de linfócitos, Moderada quantidade de glândulas císticas. Infiltrado inflamatório moderado difuso composto principalmente por células mononucleares no estrato compacto. Presença de polimorfonucleares no estrato esponjoso e compacto. Congestão vascular.
17	8	IIA	Infiltrado inflamatório misto difuso moderado. Presença discreta de eosinófilos. Raras glândulas com dilatação. Presença de secreção. Formação de um ninho glandular fibrosado por campo. Fibrose discreta.

20	10	IIB*	Infiltrado inflamatório misto difuso no estrato compacto e focal no estrato esponjoso formado por mononucleares. Edema discreto. Fibrose moderada de ramos individuais das glândulas, formação de dois ninhos glandulares fibrosados por campo.
21	15	IIA	Infiltrado inflamatório moderado difuso formado predominantemente por mononucleares no estrato compacto. Edema moderado. Fibrose moderada de ramos individuais das glândulas, cistos glandulares frequentes. Secreção glandular.
