

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MARCADORES
INFLAMATÓRIOS EM LAVADOS UTERINOS DE ÉGUAS
COM ENDOMETRITE NATURALMENTE ACOMETIDA**

Victor Hugo Mendonça

Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MARCADORES
INFLAMATÓRIOS EM LAVADOS UTERINOS DE ÉGUAS
COM ENDOMETRITE NATURALMENTE ACOMETIDA**

Victor Hugo Mendonça

Orientadora: Profa. Adjunto Juliana R. Peiró

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária
- UNESP, Câmpus de Araçatuba, como parte das
exigências para obtenção do título de Doutor em
Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2016

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

	Mendonça, Victor Hugo
M5234v	Varição da concentração de marcadores inflamatórios em lavados uterinos de éguas com endometrite naturalmente acometida. / Victor Hugo Mendonça. Araçatuba: [s.n], 2016 72 f. il.; CD-ROM Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2016 Orientador: Profa. Adj. Juliana Regina Peiró 1. Citocinas 2. Éguas 3. Endometrite 4. Lavado uterino 5.Útero. I. T. CDD 636.1330898

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Variação da concentração de marcadores inflamatórios em lavados uterinos de éguas com endometrite naturalmente acometida

AUTOR: VICTOR HUGO MENDONÇA

ORIENTADORA: JULIANA REGINA PEIRÓ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP


Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP


Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP


Prof. Dr. JOÃO PESSOA ARAUJO JUNIOR

Departamento de Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP


Dr. DANIEL DE JESUS CARDOSO DE OLIVEIRA

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA / Secretaria da Agricultura, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Araçatuba/SP

Araçatuba, 20 de maio de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VICTOR HUGO MENDONÇA – Campinas – SP, 09 de Julho de 1984. Graduado em Medicina Veterinária, 2008, Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus Araçatuba, São Paulo. Foi bolsista de Iniciação Científica pela FAPESP em 2007. Foi veterinário responsável na área de Clínica e Reprodução Equina, na empresa Central da Mil, desde 2009 até 2012, Araçatuba, São Paulo. Atualmente atua como veterinário responsável na área de Clínica e Reprodução Equina, na empresa Central Araçá, desde 2012, Araçatuba, São Paulo. Foi graduado Mestre em Ciência Animal no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2012 – UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba, São Paulo. Aluno do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal (Doutorado) – UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba, São Paulo desde agosto de 2013.

*“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência,
poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar”
(William Shakespeare)*

DEDICATÓRIA

“A minha noiva Gabriela, por todo o amor, companheirismo, amizade, carinho e compreensão durante mais esta etapa de minha vida. Que possamos continuar sempre juntos durante a bela e misteriosa jornada da vida”

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por sempre estar ao meu lado e por sempre iluminar meus passos e guiar meus atos.

Agradeço a minha mãe Lúcia e minha avó Maria de Lourdes, a quem as amo muito, por sempre estarem comigo em todos os momentos de minha vida, e pela importância que representam para mim.

Agradeço em especial a minha noiva Gabriela por fazer a minha vida ser especial e por se preocupar tanto e sempre comigo.

Agradeço meu irmão Heitor, por estar sempre presente em minha vida e pelo companheirismo desde nossa infância, na qual já triávamos sem sabermos o caminho da veterinária de equídeos.

Agradeço ao meu pai Sebastião Marcos Mendonça (*in memoriam*), pelo pai exemplar que foi e por todo o amor, amizade, carinho e alegria que nos trouxe durante o pouco tempo que passou conosco aqui na Terra, mas que foram momentos muito especiais e que jamais serão apagados de nossas memórias. Foram seus ensinamentos e o modo de lidar com os cavalos que sempre me entusiasmaram a seguir por este caminho.

Agradeço a meus tios Luiz e Eliza, primos Giovanni e Leonardo, que me apoiaram ao longo desses anos, me dando todo o apoio necessário para que eu cumprisse mais esta etapa de minha vida.

Agradeço a dona Hercília por todo o carinho e por me tratar como um filho, sendo verdadeiramente uma segunda mãe para mim.

Agradeço minha avó Benedita (*in memoriam*) pelo carinho.

Agradeço à Professora Adjunto Juliana R. Peiró pela confiança em mim depositada, orientação ao longo destes anos, desde a época da graduação. Agradeço pela paciência e conhecimentos compartilhados, e por estar ao meu lado durante os momentos felizes ou difíceis pelos quais passei.

Agradeço a Priscila Dalmagro, Leonardo Bentin e Tatiana Poló por todo auxílio técnico prestado no transcorrer do projeto, os quais foram fundamentais para a realização do mesmo.

Agradeço a toda equipe Central Araçá Reprodução Animal (Eduardo, Heitor, Luiz Fernando, Rafael, Mônica, Roberto, Alerson, seu João, Limber, estagiários e funcionários antigos) pelo companheirismo, dedicação, apoio e pelos ótimos resultados alcançados ao longo desses anos.

Agradeço ao Médico Veterinário Eduardo Hara por todo o auxílio e companheirismo ao longo desta jornada, e pela amizade incondicional.

Agradeço ao amigo professor Luiz Eduardo Corrêa Fonseca pela grande amizade, confiança em mim depositada e auxílio durante todo o período de graduação e ao longo de minha vida profissional.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba pela estrutura física concedida, assim como o apoio da Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e da Seção de Pós-graduação pela solicitude.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma cooperaram para o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	10
SUMMARY.....	12
CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
Referências	29
CAPÍTULO 2 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM LAVADOS UTERINOS DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE NATURALMENTE ADQUIRIDA	44
Introdução	46
Material e Métodos.....	49
Resultados e Discussão	53
Conclusão	63
Referências	64

**VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS
EM LAVADOS UTERINOS DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE
NATURALMENTE ACOMETIDA**

RESUMO – A endometrite é um dos problemas de maior frequência e relevância na reprodução de éguas. Os objetivos deste trabalho foram determinar o perfil das concentrações de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10 e IL-4 presentes no soro sanguíneo e no lavado uterino de éguas com endometrite naturalmente adquirida e naquelas clinicamente saudáveis, bem como definir o padrão da resposta imune (T_{H1} e T_{H2}); observar se a inflamação local no útero pode gerar inflamação sistêmica; e, verificar se o lavado uterino e o tratamento com enrofloxacina alteram o perfil de concentração das citocinas nestas éguas. Foram utilizadas 12 éguas da raça Quarto de Milha incluídas em programa de transferência de embriões e subdivididas em 2 grupos, com 6 animais cada: GC (animais sadios) e GE (animais com endometrite). Amostras de soro e lavado uterino foram colhidas nos dias 1 (início do cio), 2, 3, 4 e 5 dias após o início do cio. As concentrações de TNF- α , IL-2 e IFN- γ (T_{H1}); IL-4, IL-6, e IL-10 (T_{H2}) foram mensuradas por citometria de fluxo pelo método Cytometric Bead Array (CBA). As diferentes citocinas avaliadas nas amostras de lavado uterino, à exceção da IL-4, apresentaram concentrações mais elevadas em éguas do GE comparadas às do GC no dia 1. A utilização de lavados uterinos seriados associados a antibioticoterapia sistêmica não provocaram alterações significativas nas concentrações de citocinas presentes no útero de éguas do GC. As concentrações séricas de citocinas não diferiram entre os grupos. Nossos resultados estabeleceram o perfil de concentração de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-10 bem como demonstraram que o padrão T_{H1} predominou sobre o T_{H2} no útero de éguas do GE quando comparado ao perfil de animais do GC no dia 1. Como ambas as vias estavam ativadas, sugere-se que o padrão T_{H0} esteja atuante no ambiente uterino de éguas com endometrite naturalmente adquirida. O tratamento com lavagens uterinas seriadas e antibiótico sistêmico

foi eficiente em reduzir a concentração de citocinas no lavado uterino de éguas com endometrite em 72 horas, equiparando-se com os níveis do grupo de éguas saudáveis.

Palavras-chave: cavalos, citocinas, Cytometric Bead Array, endometrite, lavado uterino, útero

VARIATION OF CONCENTRATION INFLAMMATORY MARKERS IN UTERINE FLUID FROM MARES WITH NATURALLY ACQUIRED ENDOMETRITIS

SUMMARY – Endometritis is one of the most frequent and relevant diseases in mares. The goals of this study were to determine the profile concentration of cytokines such as IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10 and IL-4 present in blood serum and uterine lavage of mares with naturally acquired endometritis and those clinically healthy, well as set the pattern of immune response (T_{H1} and T_{H2}); see if local inflammation in the uterus can cause systemic inflammation; and check whether the uterine lavage and the treatment with enrofloxacin alter the concentration profile of cytokines in these mares. Twelve Quarter Horse mares from an embryo transfer program were divided into 2 groups, with 6 animals each: control group (CG, healthy animals) and experimental group (EG, animals with endometritis). Blood serum and uterine lavage samples were collected on days 1 (onset of estrus), 2, 3, 4 and 5 (after onset of estrus). Concentrations of TNF- α , IL-2 and IFN- γ (T_{H1}); IL-4, IL-6, and IL-10 (T_{H2}) were measured by flow cytometry using the Cytometric Bead Array method (CBA). All cytokines, but not IL-4, evaluated in the uterine lavage samples showed higher concentrations in mares with endometritis compared to healthy animals on day 1. The use of serial uterine lavages associated with systemic antibiotic therapy did not cause significant changes in concentrations of cytokines in the uterus of mares without endometritis. Serum concentrations of cytokines did not differ between groups. Our results established the concentration profile of TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 and IL-10 concentrations and showed that the T_{H1} immune response predominated over T_{H2} in the uterus of mares with endometritis when compared to healthy animals on day 1. As both pathways were activated, it is suggested that the T_{H0} immune response is active in the uterine environment of mares with naturally acquired endometritis. Treatment with serial uterine flushings and systemic antibiotic were effective in reducing the concentration of

cytokines in uterine lavage of mares with endometritis in 72 hours, equating to the levels of healthy mares group.

Keywords: cytokines, Cytometric Bead Array, horses, endometritis, uterine lavage, uterus

CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Brasil ganha destaque no cenário mundial como um dos principais investidores em tecnologias capazes de melhorar a eficiência reprodutiva dos equínos em busca de incrementos na produção, sendo considerado o terceiro maior rebanho mundial (REGHINI et al., 2014). Dentre as tecnologias desenvolvidas, a transferência de embriões (TE) gerou um mercado crescente na equideocultura por possibilitar melhor aproveitamento do potencial genético e reprodutivo de animais de alto desempenho (PANZANI et al., 2016).

Atualmente a TE tem sido adotada como método de manejo para obtenção de potros de éguas que apresentam patologias reprodutivas como endometrite crônica persistente, morte embrionária precoce, abortos recorrentes e endometrite persistente induzida pela monta (HURTGEN, 2006). Entretanto, a manipulação do trato reprodutivo quando efetuada de maneira intensa, leva ao comprometimento da fertilidade da égua, reduzindo a taxa de concepção dos animais e prejudicando a sobrevivência embrionária (KRAEMER, 2013). Ao avaliar um programa comercial de transferência de embriões quanto aos fatores que afetam os parâmetros reprodutivos de éguas receptoras, verificou-se uma taxa de perda gestacional significativamente mais elevada nas éguas que receberam embriões de doadoras afetadas por patologias reprodutivas quando comparadas àquelas que receberam embriões de doadoras saudáveis (PANZANI et al., 2016). Estas descobertas não são surpreendentes, considerando que a maioria das éguas doadoras afetadas por problemas reprodutivos apresentavam histórico recorrente de perda precoce de embriões, podendo ser atribuído a defeitos adquiridos nos próprios embriões ou ovócitos, e que não podem ser superados através da transferência para uma égua receptora (PANZANI et al., 2016).

Um aspecto fundamental para a manutenção da gestação nas éguas é a existência de um útero sem alterações anatômicas e histológicas e particularmente um endométrio sadio (KENNEY, 1978). Dentre as patologias

do sistema reprodutor, a endometrite é tida como importante causa de infertilidade na égua (CARD, 1997; DIEL DE AMORIM et al., 2015; MARTH et al., 2015; NIKOLAKOPOULOS; WATSON, 1999; THOMASSIAN, 1996; TROEDSSON, 1999b; WATSON, 1989; WOODWARD et al., 2015), levando à incapacidade de concepção, morte embrionária precoce e encurtamento da fase lútea, exercendo impacto econômico significativo, já que animais afetados apresentam ciclo estral irregular, requerem manejo intensivo e exigem maior número de ciclos estrais para a obtenção de um produto viável, resultando no incremento dos custos de produção (DIEL DE AMORIM et al., 2015). Esta afecção corresponde a uma inflamação local das camadas superficiais do útero (MARTH et al., 2015) em resposta a agentes estranhos como plasma seminal, espermatozoides, proteínas e bactérias do sêmen, geralmente durante a monta natural, inseminação artificial ou infecções bacterianas oportunistas (RIDDLE; LEBLANC; STROMBERG, 2007; WATSON, 2000).

A ocorrência de infecção bacteriana no lúmen uterino da égua, com frequência entre 25% e 60% (FRONTOSO et al., 2008; NIELSEN et al., 2010; RIDDLE; LEBLANC; STROMBERG, 2007) é majoritariamente associada a atuação de dois microorganismos, *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* (*Sc. zooepidemicus*), comumente isolados de éguas com endometrite. Estes, são considerados patógenos oportunistas, sugerindo que a inflamação do útero resultante da infecção, tem como principal fator de ocorrência características particulares relacionadas ao hospedeiro e em menor proporção a virulência dos patógenos (MARTH et al., 2015). Geralmente o sistema imune deficiente associado ao número de bactérias presente, deflagra a ocorrência da afecção, condição também observada em outras espécies como bovinos (GILBERT et al., 2005), suínos (WALLER; BILKEI; CAMERON, 2002), caninos (FONTAINE et al., 2009) e humanos (NEWTON; PRIHODA; GIBBS, 1990).

O útero das éguas é mantido livre de contaminantes através de mecanismos físicos, imunológicos e de um sistema imune funcional (MALSCHITZKY et al., 2007). Vulva, vestíbulo, vagina e cérvix constituem as

barreiras físicas que impedem o acesso de micro-organismos ao útero (TROEDSSON, 1999a; WATSON, 2000) e nesta espécie independentemente do método de cobertura utilizado, o sêmen é depositado na luz uterina, ficando as barreiras físicas ultrapassadas. Neste caso, os espermatozoides, proteínas do plasma seminal e bactérias do sêmen e do pênis do garanhão, são responsáveis pela indução de uma resposta inflamatória aguda (TROEDSSON, 1997).

Os mecanismos imunológicos são constituídos por imunoglobulinas produzidas pela mucosa uterina e pelo sistema complemento, em especial os componentes C3 e C5, sendo estes acionados quando em diversas situações o útero é invadido, promovendo a atração e a fagocitose por neutrófilos (MALSCHITZKY, 2007; TROEDSSON, 1997). A inflamação uterina transitória em resposta à monta natural (sêmen e bactérias contaminantes) é uma reação fisiológica normal que auxilia na expulsão de sêmen em excesso e detritos do útero (KOTILAINEN; HUHTINEN; 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 (KOTILAINEN; HUHTINEN; KATILA, 1994), atingindo um pico inflamatório em 12 horas (KATILA, 1995; TROEDSSON, 1997). Éguas que não são bem sucedidas em efetuar a remoção dessa inflamação natural, são classificadas como suscetíveis à endometrite persistente (TROEDSSON, 2006).

A endometrite apresenta diversas classificações, dentre elas: endometrite persistente, aguda, crônica, subclínica, de ocorrência pós-parto, decorrente de infecções bacterianas, fúngicas, virais, induzida pela monta, entre outras (HURTGEN, 2006). Cada uma destas classificações tem validade para descrever as infecções e insultos inflamatórios para o útero, cabendo ao clínico a adequação do caso à sua respectiva classe, muitas vezes adequando-o a mais de uma categoria. Por outro lado, fêmeas equinas apresentando quadros inflamatórios do endométrio, diferem em suas habilidades de modular a inflamação bem como na capacidade de remoção dos produtos inflamatórios nocivos relacionados (TROEDSSON, 1999b). Assim, vários estudos definem

duas categorias de animais, sensíveis e resistentes à endometrite segundo o tempo necessário para o retorno do ambiente uterino ao seu estado normal após a exposição ao agente nocivo, variando de 48 a 96 horas (LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007; TROEDSSON; LIU, 1992; TROEDSSON, 1999b). Mais especificamente, animais sensíveis, são aqueles que apresentam falha no processo de limpeza uterina associada a uma migração exacerbada de polimorfonucleares (PMNs) para o útero, resultando em uma resposta inflamatória exacerbada, com contínua migração de neutrófilos atraídos pela quimiotaxia originada pela presença de um agente externo, desta forma, tornando o ambiente uterino incompatível com o desenvolvimento embrionário (TROEDSSON, 1999b). Características em comum, como idade avançada, histórico de falha reprodutiva em várias temporadas, episódios anteriores de endometrite e perdas gestacionais são frequentemente associadas a estes animais (TROEDSSON, 1997).

O adequado diagnóstico da endometrite é fundamental no tratamento da infertilidade e dentre os métodos mais amplamente difundidos estão o exame clínico, palpação transretal, ultrassonografia do trato reprodutivo, exame vaginal, cultura uterina, citologia e biópsia de endométrio (RIDDLE; LEBLANC; STROMBERG, 2007). Quanto ao exame clínico, sinais como, presença de líquido intrauterino e edema endometrial excessivo ou com padrão incomum ao ultrassom, vaginite, corrimento vaginal, ciclos estrais anormais e cervicite, são frequentemente associados à afecção e diferem quanto a intensidade ou grau dos sinais segundo o tipo de afecção e patógenos envolvidos (DIEL DE AMORIM et al., 2016).

A presença de fluido uterino detectado por meio do método ultrassonográfico durante o período estral, apresentando altura superior a 2 cm é indicador de éguas susceptíveis a endometrite (BRINSKO et al., 2003). Estudos anteriores verificaram que estas acumulam praticamente o dobro da quantidade de líquido no interior do útero quando comparadas às éguas resistentes pós-inseminação artificial, diferentemente daquelas que passaram por um desafio bacteriano as quais apresentaram acúmulo de líquido no útero

6 vezes maior do que as éguas resistentes (TROEDSSON; LIU, 1992), talvez porque esse tipo de desafio seja capaz de provocar uma exsudação mais intensa do que aquela vista em resposta a presença do sêmen (FIORATTI, 2010). A quantidade e a ecogenicidade do líquido uterino observadas e consideradas significantes não estão bem estabelecidas, mas estudos indicam a quantidade desempenha papel mais importante que a natureza ecogênica (LEY, 2006).

O exame citológico do endométrio, importante método auxiliar no controle da saúde genital da égua devido ao seu baixo custo, fácil emprego e rápido diagnóstico de processos inflamatórios (BROOK, 1993). O esfregaço corado a partir do “swab” introduzido na cavidade uterina permite a identificação de leucócitos polimorfonucleares, sempre que houver inflamação do endométrio (COUTO; HUGHES, 1984). Trata-se de uma técnica de exame rápido que permite o diagnóstico objetivo da endometrite, a avaliação terapêutica, e conseqüentemente a decisão sobre cobertura ou não de uma determinada égua durante o cio. Rotineiramente a técnica do “swab” é mais utilizada, porém, há outras técnicas de citologia endometrial, tal como a substituição do “swab” por uma escova ginecológica (ALVARENGA; PASTORELLO, 1994).

Existem vários modos de interpretação das amostras citológicas coletadas do útero e métodos para sua coleta. O primeiro a descrever a técnica para o exame de citologia endometrial foi Knudsen (1964). A presença de neutrófilos no lúmen uterino, detectada pela citologia, é um indicador absoluto de inflamação (ASBURY; GORMAN; FOSTER, 1984; CAUSEY, 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 apresenta ou não endometrite. Esses métodos incluem a contagem de neutrófilos por campo, neutrófilos por lâmina, número de neutrófilos em relação às células epiteliais, ou da percentagem de neutrófilos (AGUILAR et al., 2006). Alguns autores usam o sistema positivo-negativo, enquanto outros quantificam o grau de inflamação (CARD, 2005).

Outros autores gradua a severidade da do quadro segundo o percentual de neutrófilos em relação às células epiteliais, onde 0 a 3% de leucócitos, sem inflamação, 4 a 15%, inflamação leve, 16 a 50%, inflamação moderada e percentuais superiores a 50% indicam inflamação severa (CRICKMAN; PUGH, 1986). Na rotina, esta última metodologia é citada como uma das mais utilizadas (CARD, 2005).

A biópsia endometrial 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 investigação histopatológica do endométrio tem demonstrado importância diagnóstica e prognóstica, tornando a biópsia o método mais preciso para a avaliação da situação morfofuncional do endométrio (DOIG; MCKNIGHT; MILLER, 1981). A biópsia endometrial oferece como vantagens ser uma técnica relativamente fácil, segura (DOIG; MCKNIGHT; MILLER, 1981; KENNEY; DOIG, 1986; RICKETTS, 1975; VAN CAMP, 1988), a qual pode ser realizada com um mínimo de instrumental e não estando associada com dor ou desconforto do animal (RICKETTS, 1975).

O lavado uterino com baixo volume tem sido proposto como alternativa para análises microbiológica e citológica no diagnóstico de endometrite para éguas inférteis ou subférteis (LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007; LIU; TROEDSSON, 2008). A técnica de lavado uterino de baixo volume envolve a infusão de um pequeno volume (60-150 ml) de solução salina estéril para o útero através de um cateter estéril (LEBLANC et al., 2007). O primeiro relato do uso de lavado uterino com baixo volume foi realizado por Ball (1988), que demonstraram a validade da técnica bem como sua inclusão potencial como método mais efetivo para identificação de patógenos bacterianos bem como do nível de resposta inflamatória, com ênfase em éguas inférteis e subférteis. À esta técnica tem-se atribuído sensibilidade e especificidade comparáveis à biópsia do endométrio (CHRISTOFFERSEN et al., 2015) .

Em estudo recente, algumas problemáticas foram levantadas com relação aos métodos diagnósticos descritos anteriormente, como a falta de concordância entre distintos autores quanto aos valores de referência que poderiam indicar a severidade dos casos avaliados, a diferença entre sensibilidade e especificidade entre métodos e mesmo dentro de um mesmo método e a deficiência inerente a cada um, apontando que seu uso de maneira independente, falha em oferecer adequado diagnóstico dos quadros de endometrite (DIEL DE AMORIM et al., 2016).

Tendo em vista o pouco consenso e a importância do diagnóstico da endometrite, diversos estudos vem avaliando novas metodologias, como a mensuração das proteínas de fase aguda sistêmicas (CHRISTOFFERSEN et al., 2010, 2012; MENDONÇA, 2012; NASH et al., 2010) e a expressão gênica das citocinas no endométrio (CHRISTOFFERSEN et al., 2010, 2012; FUMUSO et al., 2003, 2007; GRUYS et al., 2005; HANEDA et al., 2009; NASH et al., 2010; PALM et al., 2008; PORTO et al., 2011).

O aumento significativo da expressão de mRNA de citocinas no endométrio foi observado juntamente com a presença de proteínas de fase aguda em éguas com endometrite bacteriana induzida experimentalmente por inóculos de *E. coli* (CHRISTOFFERSEN et al., 2010). As citocinas têm uma função crucial na modulação da resposta inflamatória local e sistêmica e algumas são de grande importância para a resolução da inflamação induzida (HENDERSON; WILSON, 1996).

Citocinas são polipeptídeos produzidos principalmente por diferentes tipos de células T e atuam como mediadores e reguladores das respostas inflamatórias e imunológica em resposta a microorganismos e outros antígenos. Nas infecções bacterianas sistêmicas, a resposta do hospedeiro inclui produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias. Citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-2, IL-6, IL-17A e IFN- γ) promovem ativação e fagocitose de macrófagos, aumento de imunidade mediada por células e estimulação da síntese de proteínas de fase aguda. As citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) têm função imunorregulatória e no desenvolvimento

da resposta imunológica humoral pela promoção de diferenciação de células B e produção de anticorpos (BURTON et al., 2009).

A maior subdivisão de células auxiliares T CD4⁺ (células T_H) baseia-se no padrão de produção e secreção de suas citocinas (HIRAHARA; NAKAYAMA, 2016; KORN, et al., 2009; MOSMANN; CHERWINSKI, 1986; MOSMANN; COFFMAN, 1989), nas funções e perfil de expressão de fatores de transcrição dos diferentes tipos celulares e são classificadas em quatro linhagens principais, T_H1, T_H2, T_H17 e células T regulatórias (Treg), muito embora possam ainda existir outras linhagens (ZHU; PAUL, 2009). Padrão T_H1 e T_H2 de produção de citocinas foi originalmente descrito em clones de células T-CD4 de ratos (CHERWINSKY et al., 1987; MOSMANN; CHERWINSKI, 1986) e posteriormente em células T de humanos (DEL PRETE et al., 1991). Células T do subconjunto T_H1 sintetizam e secretam IL-2, e IFN- γ e TNF- α e estão envolvidas na imunidade mediada por células, enquanto células do subconjunto T_H2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, e são responsáveis pela estimulação da produção de anticorpos (JUNIOR et al., 2010; MOSMANN; SAD, 1996; SAITO et al., 2010).

Na resposta imunológica a infecções bacterianas, células T_H2 parecem ser mais eficazes contra as bactérias produtoras de toxinas, uma vez que as citocinas T_H2 favorecem a maturação das células B e produção de anticorpos neutralizantes. Em contraste, células T_H1 são normalmente encontradas frente às bactérias intracelulares, as quais produzem citocinas capazes de ativar os macrófagos e células T citotóxicas (D'ELIOS et al., 2011).

Embora as respostas T_H1 e T_H2 estejam muito bem documentadas, estas não são os únicos padrões de respostas possíveis. Existe uma subdivisão de células T que expressam citocinas de ambos os padrões (T_H1 e T_H2) e são denominadas células T_H0 (D'ELIOS et al., 2011; MOSMANN; COFFMAN, 1989; MOSMANN; SAD, 1996; SAITO et al., 1999a, 1999b). As células T_H0 representam uma população heterogênea de células efetoras parcialmente diferenciadas (D'ELIOS et al., 2011; OPENSHAW et al., 1995; SALGAME et al., 1991) e são ativadas quando reconhecem um antígeno em

um órgão linfóide secundário (MARTINEZ-SANCHEZ et al., 2015) secretando diferentes combinações de ambas citocinas T_H1 e T_H2 (D'ELIOS et al., 2011). A diferenciação de células T_H0 para T_H1 ou T_H2 depende de vários fatores de transcrição que atuam em pontos específicos intracelulares em níveis moleculares para regular a expressão gênica das citocinas (CHEN et al., 2016).

Células T_H0 , que secretam uma combinação de citocinas do tipo T_H1 e tipo T_H2 , são apontadas como sendo as melhores células efetoras na resposta imune a bactérias extracelulares, uma vez que os anticorpos (os quais neutralizam a adesão/invasão e opsonizam as bactérias) e fagocitose são ambos necessários. A predominância das respostas T_H1 ou T_H2 em qualquer doença infecciosa é modulada provavelmente tanto pelo agente patogênico quanto o caráter genético do hospedeiro, cuja imunidade inata desempenha um papel fundamental (D'ELIOS et al., 2011; KAUFMANN, 2010).

Durante a gestação, a função T_H1 mediada por células (MOSMANN et al., 1986; MOSMANN; SAD, 1996) fica restrita devido a ação da progesterona, que favorece a diferenciação celular em T_H2 por promover a produção de IL-4 e a expressão de CD30 nas células T_H1 , levando à predominância da função T_H2 em humanos (OLIVEIRA et al., 2013; RAGHUPATHY, 1997; SAITO et al., 1999a; 1999b; WEGMANN et al., 1993) e em camundongos (DELASSUS et al., 1994). Achados sugerem que o perfil padrão de resposta imune em vacas no período pré-implantação que antecede a gestação seja uma tendência a um ambiente de T_H2 , onde os fatores pró-inflamatórios tais como $IFN-\gamma$, IL-1 β , IL-8 e IL-11 foram menores na fase lútea tardia do ciclo, enquanto que a IL-10 aumentou de forma constante (OLIVEIRA et al., 2013). O sucesso na implantação e na manutenção da gestação é um resultado de delicado equilíbrio na interação materno-fetal, e ambas parecem ser dependentes de citocinas do perfil T_H2 que prevalece sobre o T_H1 no endométrio (JIN et al., 2011; TACHIBANA et al., 2013; TORTORELLA et al., 2014). Aumento de células “natural killer” (NK) muda o equilíbrio das citocinas para o perfil T_H1 , com efeitos negativos na implantação e/ou invasão trofoblástica, assim determinando uma alta susceptibilidade a abortos espontâneos em estágios

gestacionais iniciais (JIN et al., 2011; MATTEO et al., 2009; TOTORELLA et al., 2014). Esta alta porcentagem de células T_H1 protege mulheres não-gestantes contra infecção viral e bacteriana no endométrio por meio da resposta imune celular promovida pela liberação de TNF- α , IL-2 e principalmente IFN- γ neste tipo celular (SAITO et al., 1999b).

Recentemente foi proposto um modelo de sistema imune endometrial durante o estágio inicial de prenhez em éguas (TACHIBANA et al., 2013). Durante a migração embrionária, células NK sob efeitos do aumento de expressão de IL-15 proliferam e são ativadas. Entretanto, até o período de implantação por volta do 19º dia, as células NK são suprimidas por TGF- β 1, mantendo a expressão gênica de IFN- γ limitada até esta data. No dia 19, ocorre um aumento da expressão de IFN- γ pelas células NK como resultado da diminuição da TGF- β 1, induzindo a ativação e proliferação de células T_H0 em T_H1 . Se as células T_H1 durante o período de implantação tornarem-se predominantes, pode resultar em perdas gestacionais precoces. Entretanto no dia 25, ocorre a diferenciação de T_H0 pela via de T_H2 induzida por IL-4, que neutraliza a atividade de T_H1 através da produção de suas citocinas, resultando no equilíbrio do ambiente imune do útero gravídico destas éguas (TACHIBANA et al., 2013).

Os fatores responsáveis pela polarização de células T_H em um perfil T_H predominante têm sido amplamente estudados (KAMOGAWA et al., 1993; KORN et al., 2009). Fatores ambientais e genéticos influenciam a diferenciação T_H1 ou T_H2 , determinada principalmente pelo envolvimento de uma "citocina líder" no microambiente da célula T_H responsiva. IL-4 é o estímulo mais potente para a diferenciação em T_H2 , enquanto que IL-12, IL-18 e IFN- γ favorecem o desenvolvimento T_H1 (HSIEH et al., 1993; MANETTI et al., 1993; OKAMURA et al., 1998; PARRONCHI et al., 1992; SWAIN et al., 1990).

O interferon gama (IFN- γ) é membro da classe de interferons do tipo II cuja produção no linfócito é estimulada pela presença de componentes antigênicos atuando contra infecções mediadas por alguns tipos de bactérias, protozoários e vírus (GRAY; GOEDDEL, 1982). Produzido predominantemente

por células exterminadoras naturais (NK) e células exterminadoras naturais T (NKT) como parte da resposta imune inata e uma vez que se desenvolve a resposta antígeno específica, passa a ser produzido por células T efectoras, linfócitos T auxiliares CD4⁺ (T_H1) e linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) de células T efectoras (SCHOENBORN; WILSON, 2007). É importante ativador de macrófagos e indutor da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da Classe II. O IFN- α tipo I possui capacidade de inibir diretamente a replicação viral e o IFN- γ atua ainda como importante estimulante e modulador da resposta imune inibindo a proliferação de células produtoras de interleucinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13), inibindo a resposta mediada por anticorpos (SCHRODER et al., 2004).

Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) está associado à inflamação sistêmica compondo a reação de fase aguda, produzido por diferentes tipos celulares como macrófagos ativados, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, T_H1 e células NK (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001). Sua produção é estimulada por IFN- γ , IL-1, IL-2, GM-CSF, substância P, bradicinina, imunocomplexos, inibidores da cicloxigenase e PAF, sendo que a PGE₂, IL-6 e antagonistas do PAF possuem efeitos contrários aos anteriores (TRACEY; CERAMI, 1993). TNF- α e IL-1 compartilham várias propriedades pró-inflamatórias, como a indução da febre através da estimulação da síntese de PGE₂ pelo endotélio vascular do hipotálamo ou indiretamente por induzir a liberação de IL-1, atuam também promovendo alterações endoteliais reduzindo a coagulação, promovem a atividade quimiotática e estimulam o metabolismo oxidativo de fagócitos (STRIETER; KUNKEL; BONE, 1993). O TNF- α também partilha propriedades inflamatórias com a IL-6 e IL-11 induzindo a produção de proteínas de fase aguda (TRACEY; CERAMI, 1993). A principal atividade biológica do TNF é uma acentuada citólise e citoestase em diferentes linhagens neoplásicas definindo sua ação antitumoral, enquanto que altas concentrações de TNF no sangue de pacientes com septicemia correlacionam-se com a piora do prognóstico e mesmo na ausência de bactérias, levam a quadro semelhante

a sepse, demonstrado pela administração experimental do mesmo, sugerindo ação deletéria quando produzido de maneira excessiva (KUNKEL et al., 1991).

Interleucina-2 (IL-2) é uma glicoproteína originalmente conhecida como fator de crescimento de células T (TCGF), agente proliferativo antígeno inespecífico, cuja secreção se dá principalmente por meio de células T_H1 ativadas e em menor proporção por células B e monócitos (WANO et al., 1984). Alguns parasitas podem estimular sua produção, mas o principal estímulo advém da atividade bacteriana e de seus subprodutos, além de outras citocinas como IFN- γ e IL-1 (NOGUCHI et al., 1993). A IL-2 exerce sua atividade como fator de crescimento e ativador de células T, NK e B, promovendo o desenvolvimento de células exterminadoras ativadas por linfocina (LAK), tendo assim atividade anti-humoral, desempenhando papel crítico na regulação tanto das respostas inflamatórias crônicas celulares e humorais (NELSON; WILLERFORD, 1998). Além da proliferação e diferenciação das células T, a IL-2 também pode regular os fenômenos de sobrevivência e formação de memória imunológica, a qual participa da fase inicial de reconhecimento do antígeno, promove a expansão dos clones, favorece a sobrevivência das células ativadas (MALEK; BAYER, 2004) assim como a morte de algumas células T antígeno-específicas (SCHLUNS; LEFRANÇOIS, 2003). Promove ainda a síntese de IL-1, TNF- α , TNF- β , sendo esta ação mediada pela produção de IFN- γ e sua ligação nos receptores ligados à linfócitos T, leva ao aumento da secreção de linfocina e da expressão de moléculas MHC da Classe II (SAITO et al., 2010; TANIGUCHI, 1992; WANO et al., 1984).

A interleucina-4 (IL-4) é produzida por células T $CD4+$ e induz a diferenciação das células T auxiliares imaturas (T_H0) em células T_H2 , enquanto suprime o desenvolvimento de células T_H1 . As células T_H2 por sua vez promovem a produção de IL-4 estabelecendo assim feedback positivo para a produção da mesma, determinando sua principal atividade, a determinação do perfil da resposta imune em T_H2 (ARAI et al., 1990). Também atua como fator de crescimento para células B, T, e mastócitos e aumenta a expressão de MHC Classe II em células B, favorecendo a ativação de T_H2 . Os efeitos

estimuladores da IL-4 sobre a produção de IgE, IgG1 e na indução do MHC de classe II são regulados negativamente pelo IFN- γ que por sua vez é antagonizado pela ação da IL-4 (LE et al., 1988; TIZARD, 2014). Esta citocina também atua bloqueando ou suprimindo as citocinas derivadas de monócitos como a IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, exibindo assim propriedades anti-inflamatórias (HART et al., 1989). A secreção precoce de IL-4 conduz a polarização da diferenciação de células T_H para células do tipo T_{H2}, que por sua vez secretam IL-4 mantendo a proliferação deste tipo celular por subsequente produção autócrina (ARAI et al., 1990). Além da IL-4, as células T_{H2} também secretam IL-10, que leva à supressão da resposta imune promovida por células T_{H1}, por inibição indireta da diferenciação de células T_H em T_{H1} (ARAI et al., 1990). A IL-4 é o principal agente da resposta promovida por células T_{H2}, promove o recrutamento e a ativação de mastócitos e estimula a produção de anticorpos IgE através da diferenciação de células-B secretoras de IgE e está associada à resposta imune contra patógenos externos e patologias tais como processos alérgicos e atopias (D'ELIOS et al., 2011; KÜHN; RAJEWSKY; MÜLLER, 1991; O'GARRA; VIEIRA, 2007).

Interleucina-6 (IL-6) é produzida por uma variedade de células, incluindo fagócitos mononucleares, células T, e fibroblastos e atua como um fator de crescimento para as células B maduras e induz a sua maturação final em células plasmáticas produtoras de anticorpos, além de estimular a síntese de proteínas de fase aguda no fígado, também está envolvida na ativação e diferenciação de células T, bem como participa na indução de IL-2 e na expressão dos receptores da mesma (HONG et al., 2016; BARTON, 1997). Alguns dos efeitos reguladores da IL-6 envolvem a inibição da produção de TNF promovendo feedback negativo, limitando a resposta inflamatória aguda (HIRANO, 1992; XING et al., 1998), bem como induz a diferenciação de células T_{H17} (MCGEACHY et al., 2007).

A IL-6 tem ação pró-inflamatória quando induzida por lipopolissacarídeos (LPS) juntamente com TNF- α e IL-1, sendo usada como marcador para a ativação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias, mas como outras citocinas, a

IL-6 alberga propriedades tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias, promovendo feedback negativo sobre a síntese de IL-1, IFN- γ e TNF, atenuando a síntese das citocinas pró-inflamatórias, enquanto exerce pouco efeito sobre a síntese de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e fator de crescimento transformador- β (TGF- β) (SCHELLER et al., 2011).

Interleucina-10 (IL-10) é produzida por uma variedade de tipos de celulares, incluindo as células T CD4 +, células T CD8 + ativadas e células B ativadas e seus efeitos incluem a redução da proliferação de células T antígeno específicas, a inibição da indução promovida pela IL-2 para produção de IFN- γ pelas células NK, bem como inibe a ação da IL-4 e do IFN- γ sobre a expressão de MHC da classe II em monócitos (DE WAAL MALEFYT et al., 1992). Uma vez que a IL-10 pode ser produzida por células T_{H2} e inibe a função de T_{H1}, impedindo a produção de citocinas T_{H1} (tais como IFN- γ), esta é considerada um fator transregulador das células T (MOSMANN; MOORE, 1991), atuando também como um fator de codiferenciação para células T citotóxicas e um cofator de crescimento de células T (CHEN; ZLOTNIK, 1991). Em adição à sua atividade como uma citocina linfocitária T_{H2}, é também um potente inibidor da síntese de citocinas pró-inflamatórias produzidas por monócitos e macrófagos (COHEN; COHEN, 1996; KIM et al., 2014; SIEWE et al., 2006), limitando a resposta imune e evitando a propagação de danos teciduais (ZHU; PAUL, 2008).

A resposta inflamatória no endométrio ocorre rapidamente após a cobertura ou à entrada de patógenos no lúmen uterino, resultando na migração de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) para o interior do útero e do líquido intrauterino, os quais contém acúmulos de mediadores inflamatórios (TROEDSSON; LIU, 1992). O início da quimiotaxia de PMN é rápido e a duração de infiltração é relativamente curta, assegurando a remoção dos agentes externos, com subsequente retorno do endométrio a um estado de normalidade, preparando-o para receber o embrião (KATILA, 2012). A avaliação das diferenças inerentes à resposta imune inicial após a inseminação entre dois grupos de éguas, resistentes e susceptíveis à endometrite,

demonstrou que éguas resistentes tiveram maior expressão de mRNA de IL-6, IL-1 e IL-10, enquanto que éguas susceptíveis apresentaram um aumento significativo no número de neutrófilos (WOODWARD et al., 2013).

A infiltração de leucócitos e aumento da síntese de citocinas em resposta à inseminação ou cobertura são necessários ao sucesso reprodutivo, porém uma inflamação prolongada tem consequências contrárias ao mesmo (KOTILAINEN; HUHTINEN; KATILA, 1994; TROEDSSON et al., 2002). Assim, éguas suscetíveis ao desenvolvimento de endometrite persistente tem maior expressão de mRNA endometrial de citocinas pró-inflamatórias e menor nível de citocinas anti-inflamatórias, sustentando assim, elevado número de células em seu endométrio quando comparado às éguas resistentes (FUMUSO et al., 2007). Os mesmos autores encontraram ainda baixos níveis endometriais de IL-10 em éguas susceptíveis à endometrite persistente. Após a inoculação intrauterina com *E. coli*, observou-se estimulação significativa da expressão de TNF- α (CHRISTOFFERSEN et al., 2012a). O TNF- α atua coordenando e estimulando precocemente a síntese de outras citocinas, necessárias como uma primeira linha de defesa contra invasões bacterianas (HERATH et al., 2006).

Em éguas que apresentam endometrite, o perfil das citocinas pró- e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , e IFN- γ) não foram definidas claramente e pouco se sabe sobre sua cinética em casos de ocorrência natural ou mesmo qual o padrão de resposta imune (T_H1 ou T_H2) no ambiente uterino destes animais. Além disso, diferentes parâmetros têm sido utilizados como marcadores da inflamação em estudos realizados “in vivo”, sendo estas proteínas de fase aguda, expressão gênica de citocinas no endométrio e quantificação da celularidade uterina (FUMUSO et al., 2007; KOTILAINEN; HUHTINEN; KATILA, 1994; LIU; TROEDSSON, 2008); e, “in vitro”, tais como a liberação de metabólitos do ácido aracdônico (WATSON, 1989; WATSON et al., 1987).

Atualmente, admite-se que nenhum modelo exista para atuar como padrão ou controle no estudo da endometrite (LIU; TROEDSSON, 2008), e em

vista disso, procurou-se estudar se existe diferença de resposta inflamatória uterina local e sistêmica entre éguas com endometrite e naquelas sem endometrite após a realização de lavados uterinos seriados e antibioticoterapia sistêmica.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram determinar o perfil das concentrações de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10 e IL-4 presentes no soro sanguíneo e no lavado uterino de éguas doadoras de embriões com endometrite naturalmente adquirida e naquelas clinicamente saudáveis, bem como definir o padrão da resposta imune, segundo a predominância de citocinas relacionadas ao perfil T_{H1} e T_{H2}; observar se a inflamação local no útero pode gerar inflamação sistêmica; e, verificar se o lavado uterino e o tratamento sistêmico com enrofloxacina alteram o perfil de concentração das citocinas nestas éguas.

Referências

- AGUILAR, J. et al. Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 423–30, 2006.
- ALVARENGA, M. A.; PASTORELLO, M. Comparação entre a eficiência da escova ginecológica e swab de algodão na coleta de material endometrial de éguas. **Ars Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 244, 1994.
- ARAI, K. I. et al. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, p. 783–836, 1990.
- 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**, v. 21, n. 2, p. 375–385, 1984.
- BALL, B. A. Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic

examination of the mare's endometrium. **Theriogenology**, v. 29, n. 6, p. 1269–1283, 1988.

BARTON, B. E. IL-6: insights into novel biological activities. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 85, n. 1, p. 16–20, 1997.

BRINSKO, S. P. et al. ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 49. ,New Orleans, Louisiana, USA, 21-25 November 2003. **Anais...** American Association of Equine Practitioners (AAEP), 2003.

BROOK, D. Uterine cytology. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 246–253.

BURTON, A B. et al. Serum interleukin-6 (IL-6) and IL-10 concentrations in normal and septic neonatal foals. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 132, n. 2-4, p. 122–128, 2009.

CARD, C. Infectious diseases of the puerperal period. In: YOUNGQUIST, R. S. (Ed.). **Current therapy in large animal theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. p. 161–165.

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

CAUSEY, R. C. Making sense of equine uterine infections: the many faces of physical clearance. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 172, n. 3, p. 405–421, 2006.

CHEN, W. F.; ZLOTNIK, A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 147, n. 2, p. 528–34, 1991.

CHEN, X.; WANG, J.; WANG, R.; SU, Q.; JUAN, J.; HUANG, H.; ZHOU, P.; LIU, J.; XU, X. Th1-, Th2-, and Th17-associated cytokine expression in hypopharyngeal carcinoma and clinical significance. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 273, p. 431-438, 2016.

CHERWINSKI, H. M. et al. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal

antibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 166, n. 5, p. 1229–1244, 1987.

CHRISTOFFERSEN, M. et al. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 41, 2012a.

CHRISTOFFERSEN, M. et al. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 991–1004, 2012b.

CHRISTOFFERSEN, M. et al. Diagnostic double-guarded low-volume uterine lavage in mares. **Theriogenology**, v. 83, n. 2, p. 222–7, 2015.

COHEN, M. C.; COHEN, S. Cytokine function: a study in biologic diversity. **American journal of clinical pathology**, v. 105, n. 5, p. 589–598, 1996.

COUTO, M. A.; HUGHES, J. P. Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 4, n. 6, p. 265–273, 1984.

CRICKMAN, J. A.; PUGH, D. G. Equine endometrial cytology: a review of techniques and interpretations. **Veterinary Medicine**, v. 81, p. 650–656, 1986.

DALHOFF, A. Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. **Infection**, v. 33 Suppl 2, p. 55–70, 2005.

D'ELIOS, M. M.; et al. T-Cell Response to Bacterial Agents. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 9, p. 640–645, 2011.

DE WAAL MALEFYT, R. et al. Interleukin-10. **Current opinion in immunology**, v. 4, n. 3, p. 314–20, 1992.

DELASSUS, S. et al. Differential cytokine expression in maternal blood and placenta during murine gestation **Journal Immunology**, v. 152, p. 2411-2421, 1994.

DEL PRETE, G. F. et al. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 1, p. 346–50, 1991.

DIEL DE AMORIM, M. et al. Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low volume lavage, and uterine biopsy, and combinations in the diagnosis of Equine Endometritis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 44, p. 54-61, 2015.

DOIG, P. A.; MCKNIGHT, J. D.; MILLER, R. B. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. **The Canadian Veterinary Journal. La revue vétérinaire canadienne**, v. 22, n. 3, p. 72–6, 1981.

FIORATTI, E. G. **Efeito dos anti-inflamatórios esteróides na reação inflamatória e na fertilidade de éguas normais e susceptíveis à endometrite persistente após inseminação artificial. 2010. (Dissertação) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010.**

FIORENTINO, D. F. et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 11, p. 3815–3822, 1991.

FISCHER, C. et al. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. **Reproduction, fertility, and development**, v. 22, n. 5, p. 818–829, 2010.

FONTAINE, E. et al. Diagnosis of endometritis in the bitch: a new approach. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 44, Suppl 2, p. 196–199, 2009.

FRONTOSO, R. et al. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. **Research in veterinary science**, v. 84, n. 1, p. 1–6, 2008.

FUMUSO, E. et al. Endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis: Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 1-2, p. 31–41, 2003.

FUMUSO, E. A. et al. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, n. 1-2, p. 30–39, 2007.

- GALVÃO, K. N. et al. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 290–299, 2011.
- GHASEMI, F. et al. Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1538–1547, 2012.
- GILBERT, R. O. et al. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p. 1879–1888, 2005.
- GONZÁLEZ, C. et al. Enrofloxacin-based therapeutic strategy for the prevention of endometritis in susceptible mares. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 33, n. 3, p. 287–294, 2010.
- GRAY, P. W.; GOEDDEL, D. V. Structure of the human immune interferon gene. **Nature**, v. 298, n. 5877, p. 859–63, 26 ago. 1982.
- GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University.**, v. 6B, n. 11, p. 1045–1056, 2005.
- HANEDA, S. et al. Interleukin-1 receptor antagonist expression in the equine endometrium during the peri-implantation period. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 36, n. 4, p. 209–218, 2009.
- HART, P. H. et al. Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 10, p. 3803–3807, 1989.
- HENDERSON, B. Cytokine induction by bacteria: beyond lipopolysaccharide. **Cytokine**, v. 8, n. 4, p. 269–282, 1996.
- HERATH, S. et al. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 69, n. 1, p. 13–22, 2006.
- HIRAHARA, K., NAKAYAMA, T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. **International Immunology**, v. 28, n. 4, p. 163–171, 2016.
- HIRANO, T. Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease. **Clinical**

Immunology and Immunopathology, v. 62, n. 1, Pt 2, p. S60–65, 1992.

HONG, L. et al. Effects of interleukin 6 and tumor necrosis factor- α on the proliferation of porcine theca interna cells: Possible role of these cytokines in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 55, p. 183-187, 2016.

HSIEH C.S. et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**, v. 260, p. 547-549, 1993.

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

JIN, L. P.; FAN, D. X.; ZHANG, T.; GUO, P.; LI, D. J. The costimulatory signal upregulation is associated with Th1 bias at the maternal-fetal interface in human miscarriage. **American Journal Reproduction Immunology**, v. 66, p. 270-278, 2011.

JUNIOR, D.M. et al. Sistema Imunitário – Parte II. Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

KAMOGAWA Y. et al. The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. **Cell**, v. 75, p. 985-995, 1993.

KAUFMANN, S.H. Novel tuberculosis vaccination strategies based on understanding the immune response. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 4, p. 337-353, 2010.

KASIMANICKAM, R. K. et al. Associations among serum pro- and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows. **Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E**, v. 11, p. 103, 2013.

KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response in mares after insemination with fresh semen. **Biology of Reproduction Monograph**, n. 1, p. 515–518, 1995.

KATILA, T. Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. Suppl. 5, p. 31–41, 2012.

- KENNEY, R. M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 3, p. 241–262, 1978.
- KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. **Current Therapy in Theriogenology**, v. 2, n. 3, p. 723–729, 1986.
- KIM, I.-H. et al. Inflammatory cytokine concentrations in uterine flush and serum samples from dairy cows with clinical or subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 82, n. 3, p. 427–32, 2014.
- KNUDSEN, O. Partial dilatation of the uterus cause of sterility in the mare. **The Cornell Veterinarian**, v. 54, p. 423–438, 1964.
- KORN T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review Immunology**, v. 27, p. 485-517, 2009.
- KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 629–36, 1994.
- KRAEMER, D. C. A History of equine embryo transfer and related technologies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 5, p. 305–308, 2013.
- KUBY, J. **Immunology**. 6. ed. New York: W. H. Freeman & Company, 1992.
- KÜHN, R.; RAJEWSKY, K.; MÜLLER, W. Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5032, p. 707–10, 1991.
- KUNKEL, S. L. et al. The role of TNF in diverse pathologic processes. **Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)**, v. 3, n. 2, p. 135–141, 1991.
- LE, H. V et al. Isolation and characterization of multiple variants of recombinant human interleukin 4 expressed in mammalian cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 22, p. 10817–10823, 1988.
- LEBLANC, M. M.; MAGSIG, J.; STROMBERG, A. J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 403–412, 2007.
- LEY, W. B. **Reprodução em éguas para veterinários de equinos**. 2nd. ed. São Paulo: Roca, 2006.
- LIN, J. et al. Plasticity of human menstrual blood stem cells derived from the

endometrium. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 12, n. 5, p. 372–380, 2011.

LIU, I. K. M.; TROEDSSON, M. H. T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 415–420, 2008.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487–501, 2001.

LOYI, T. et al. Differential expression of pro-inflammatory cytokines in endometrial tissue of buffaloes with clinical and sub-clinical endometritis. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 2, p. 336–340, 2013.

LOYI, T. et al. Expression of pathogen recognition receptors and pro-inflammatory cytokine transcripts in clinical and sub-clinical endometritis cows. **Animal Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 194–200, 2015.

MALEK, T. R.; BAYER, A L. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. **Nature Reviews/ Immunology**, v. 4, p. 665-674, 2004.

MALSCHITZKY, E. et al. Endometrite na égua, novos conceitos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 17–26, 2007.

MANETTI R., et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **The Journal Experimental Medicine**, v. 177, p. 1199-1204, 1993.

MARTH, C. D. et al. Deep sequencing of the uterine immune response to bacteria during the equine oestrous cycle. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 934, 2015.

MARTINEZ-SANCHEZ, M. E.; MENDOZA, L.; VILLARREAL, C.; ALVAREZ-BUYLLA, E. R. A Minimal Regulatory Network of Extrinsic and Intrinsic Factors Recovers Observed Patterns of CD4+ T Cell Differentiation and Plasticity. **Computational biology**. DOI:10.1371/journal.pcbi.1004324, p. 1-23; 2015.

MATTEO, M. et al. Abnormal pattern of lymphocyte subpopulations in the endometrium of infertile women with chronic endometritis. **American Journal**

of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989), v. 61, n. 5, p. 322–329, 2009.

MCGEACHY, M. J., et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. v. 8, n. 12, p. 1390-1397, 2007.

MCKINNON, A. O. **Reprodução da égua problema** In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 11, 2010. **Anais** Campinas: ABRAVEQ, 2010.

MENDONÇA, V. H. **Quantificação de proteínas de fase aguda em éguas doadoras de embrião da raça quarto de milha**. 2012. (Dissertação) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2012.

MOSMANN, T.; CHERWINSKI, H. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of immunology**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 145–173, 1989.

MOSMANN, T. R.; MOORE, K. W. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. **Immunology Today**, v. 12, n. 3, p. A49–53, 1991.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology Today**, v. 17, n. 3, p. 138–146, 1996.

NASH, D. M. et al. Markers of the uterine innate immune response of the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 119, n. 1-2, p. 31–39, 2010.

NELSON, B. H.; WILLERFORD, D. M. Biology of the interleukin-2 receptor. **Advances in Immunology**, v. 70, p. 1–81, 1998.

NEWTON, E. R.; PRIHODA, T. J.; GIBBS, R. S. A clinical and microbiologic analysis of risk factors for puerperal endometritis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 75, n. 3 Pt 1, p. 402–406, 1990.

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

NIELSEN, J. M. et al. Diagnosis of endometritis in the mare based on

bacteriological and cytological examinations of the endometrium: comparison of results obtained by swabs and biopsies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 1, p. 27–30, 2010.

NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E. D. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. **Theriogenology**, v. 52, n. 99, p. 413–423, 1999.

NOGUCHI, M. et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor. **Science**, v. 262, n. 5141, p. 1877–1880, 1993.

O’GARRA, A.; VIEIRA, P. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 6, p. 425–428, 2007.

OKAMURA H.; KASHIWAMURA S.; TSUTSUI H. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 259-264, 1998.

OLIVEIRA, L. J. et al. Characterization of the Th profile of the bovine endometrium during the oestrus cycle and early pregnancy. **Immune Response to Early Pregnancy in Cattle**, v. 8, n. 10, p. 1-13, 2013.

OPENSHAW P. et al. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 5, p. 1357-1367, 1995.

PALM, F. et al. Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1??, IL-6, TNF-?? and COX-2 mRNA in the equine endometrium. **Theriogenology**, v. 70, n. 5, p. 843–851, 2008.

PANZANI, D. et al. Factors Affecting Recipients’ Pregnancy, Pregnancy Loss, and Foaling Rates in a Commercial Equine Embryo Transfer Program. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 37, p. 17–23, 2016.

PARHAM, P. **The immune system**. 2. ed. New York: Garland, 2005.

PARRONCHI P. et al. IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. **Journal of Immunology**, v. 149, n. 9, p. 2977-2983, 1992.

- PAUL, W. E.; SEDER, R. A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 241–51, 1994.
- PIQUÉ, M. et al. A combinatorial code for CPE-mediated translational control. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 434–448, 2008.
- PORTO, C. D. et al. Expressão de MMP-2 e MMP-9 no endométrio de éguas saudáveis e portadoras de endometrite crônica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 12–19, 2011.
- QUEIROZ, F. J. R. **Biópsia endometrial como método auxiliar de diagnóstico da subfertilidade e da infertilidade na égua. 1991. (Dissertação)** - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 1991.
- RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology**, v. 18, p. 478-482, 1997.
- REGHINI, M. F. S. et al. Resposta inflamatória uterina após inseminação artificial em éguas resistentes e susceptíveis à endometrite. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 2, p. 314–323, 2014.
- RICKETTS, S. W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, n. 23, p. 341–345, 1975.
- RIDDLE, W. T.; LEBLANC, M. M.; STROMBERG, A. J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 395–402, 2007.
- RIESBECK, K. Immunomodulating activity of quinolones: review. **Journal of chemotherapy (Florence, Italy)**, v. 14, n. 1, p. 3–12, 2002.
- RIESBECK, K. Immunomodulation by fluoroquinolones and other antibacterial agents. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 36, n. 10, p. 671–673, 2006.
- SAITO, S. et al. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. **Clinical and experimental immunology**, v. 117, n. 3, p. 550–555, 1999a.
- SAITO, S. et al. Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 Cell Ratios in Human Peripheral and Endometrial T Cells. **American Journal of**

- Reproductive Immunology**, v. 42, n. 4, p. 240–245, 1999b.
- SAITO, S. et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 63, n. 6, p. 601–610, 2010.
- SALGAME P. et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. **Science**, v. 254, p. 279-282, 1991.
- SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011.
- SCHLUNS, K.S.; LEFRANÇOIS, L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. **Nature Reviews/ Immunology**, v. 3, p. 269-279, 2003.
- SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Advances in Immunology**, v. 96, p. 41–101, 2007.
- SCHRODER, K. et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163–189, 2004.
- SEDER, R. A. et al. Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 7, p. 2835–2839, 1991.
- SIEWE, L. et al. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 12, p. 3248–3255, 2006.
- STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L.; BONE, R. C. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. **Critical Care Medicine**, v. 21, n. 10 Suppl, p. S447–463, 1993.
- SWAIN S.L.; WEINBERG A.D.; ENGLISH M. CD4+ T cell subsets. Lymphokine secretion of memory cells and of effector cells that develop from precursors in vitro. **Journal of Immunology**, v. 144, p. 1788-1799, 1990.
- TACHIBANA, Y. et al. Expression of endometrial immune-related genes possibly functioning during early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and**

Development, v. 59, n. 1, p. 85-91, 2013.

TANIGUCHI, T. Structure and function of IL-2 and IL-2 receptors. **Behring Institute Mitteilungen**, n. 91, p. 87–95, 1992.

THOMASSIAN, A. **Enfermidade dos eqüinos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 1996.

TIZARD, I. **Imunologia veterinária**. São Paulo: Elsevier editora. 9ª ed. p. 380, 2014.

TORTORELLA, C. et al. Interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor α in menstrual effluents as biomarkers of chronic endometritis. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 1, p. 242–247, 2014.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. **Critical Care Medicine**, v. 21, n. 10 Suppl, p. S415–22, 1993.

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

TROEDSSON, M. H.; LIU, I. K. Measurement of total volume and protein concentration of intrauterine secretion after intrauterine inoculation of bacteria in mares that were either resistant or susceptible to chronic uterine infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 9, p. 1641–1644, 1992.

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

TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, n. 93, p. 461–471, 1999b.

TROEDSSON, M. H. T. Breeding-induced endometritis in mares. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 22, n. 3, p. 705–712, 2006.

VAN CAMP, S. D. Endometrial biopsy of the mare. A review and update. **The Veterinary Clinics of North America. Equine practice**, v. 4, n. 2, p. 229–245, 1988.

VELDHOEN, M. et al. Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. **Nature Immunology**, v. 9, n. 12, p. 1341–1346, 2008.

WALLER, C. M.; BILKEI, G.; CAMERON, R. D. A. Effect of periparturient

diseases accompanied by excessive vulval discharge and weaning to mating interval on sow reproductive performance. **Australian Veterinary Journal**, v. 80, n. 9, p. 545–549, 2002.

WANO, Y. et al. Characterization of human interleukin 2 receptor (Tac antigen) in normal and leukemic T cells: co-expression of normal and aberrant receptors on Hut-102 cells. **Journal of Immunology**, v. 132, n. 6, p. 3005–3010, 1984.

WATSON, E. D. et al. Effect of ovarian hormones on promotion of bactericidal activity by uterine secretions of ovariectomized mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 79, n. 2, p. 531–537, 1987.

WATSON, E. D. Release of immunoreactive arachidonate metabolites by equine endometrium in vitro. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 8, p. 1207–1209, 1989.

WATSON, E. D. Post-breeding endometritis in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 221–232, 2000.

WEGMANN, T.G.; LIN, H.; GUILBERT, L.; MOSMANN, T. R. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? **Immunology**, v. 14, p. 353-356, 1993.

WOODWARD, E. J.; TROEDSSON, M. Inflammatory mechanisms of endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 4, p. 1–19, 2014.

WOODWARD, E. M. et al. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. **Reproduction**, v. 145, n. 3, p. 289–296, 2013.

WOODWARD, E. M. et al. The effect of treatment with immune modulators on endometrial cytokine expression in mares susceptible to persistent breeding-induced endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 2, p. 235–239, 2015.

XING, Z. et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 2, p. 311–320, 1998.

YOSHIMOTO, T.; PAUL, W. E. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. **The Journal of**

Experimental Medicine, v. 179, n. 4, p. 1285–1295, 1994.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: Fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557–1569, 2008.

ZHU, J.; PAUL, W. E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 4–12, 2009.

CAPÍTULO 2 – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM LAVADOS UTERINOS DE ÉGUAS COM ENDOMETRITE NATURALMENTE ADQUIRIDA

RESUMO – A endometrite é um dos problemas de maior frequência e relevância na reprodução de éguas. Os objetivos deste trabalho foram determinar o perfil das concentrações de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10 e IL-4 presentes no soro sanguíneo e no lavado uterino de éguas com endometrite naturalmente adquirida e naquelas clinicamente saudáveis, bem como definir o padrão da resposta imune (T_{H1} e T_{H2}); observar se a inflamação local no útero pode gerar inflamação sistêmica; e, verificar se o lavado uterino e o tratamento com enrofloxacina alteram o perfil de concentração das citocinas nestas éguas. Foram utilizadas 12 éguas da raça Quarto de Milha incluídas em programa de transferência de embriões e subdivididas em 2 grupos, com 6 animais cada: GC (animais sadios) e GE (animais com endometrite). Amostras de soro e lavado uterino foram colhidas nos dias 1 (início do cio), 2, 3, 4 e 5 dias após o início do cio. As concentrações de TNF- α , IL-2 e IFN- γ (T_{H1}); IL-4, IL-6, e IL-10 (T_{H2}) foram mensuradas por citometria de fluxo pelo método Cytometric Bead Array (CBA). As diferentes citocinas avaliadas nas amostras de lavado uterino, à exceção da IL-4, apresentaram concentrações mais elevadas em éguas do GE comparadas às do GC no dia 1. A utilização de lavados uterinos seriados associados a antibioticoterapia sistêmica não provocaram alterações significativas nas concentrações de citocinas presentes no útero de éguas do GC. As concentrações séricas de citocinas não diferiram entre os grupos. Nossos resultados estabeleceram o perfil de concentração de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 e IL-10 bem como demonstraram que o padrão T_{H1} predominou sobre o T_{H2} no útero de éguas do GE quando comparado ao perfil de animais do GC no dia 1. Como ambas as vias estavam ativadas, sugere-se que o padrão T_{H0} esteja atuante no ambiente uterino de éguas com endometrite naturalmente adquirida. O tratamento com lavagens uterinas seriadas e antibiótico sistêmico

foi eficiente em reduzir a concentração de citocinas no lavado uterino de éguas com endometrite em 72 horas, equiparando-se com os níveis do grupo de éguas saudáveis.

Palavras-chave: cavalos, citocinas, Cytometric Bead Array, endometrite, lavado uterino, útero

Introdução

Com o terceiro maior rebanho mundial de equídeos, o Brasil ganha destaque como um dos principais investidores em tecnologias capazes de melhorar a eficiência reprodutiva dos animais em busca de incrementos na produção (REGHINI et al., 2014). Dentre as tecnologias desenvolvidas, a transferência de embriões tem sido bastante difundida, porém a manipulação do trato reprodutivo quando efetuada de maneira intensa, leva ao comprometimento da fertilidade da égua, reduzindo a taxa de concepção dos animais e prejudicando a sobrevivência embrionária (KRAEMER, 2013). Além dos problemas associados à técnica, a espécie geralmente apresenta baixa eficiência reprodutiva, com taxas de prenhez e nascimento por ciclo estral variando de 55-65% e 43-45%, respectivamente (ALLEN et al., 2007).

A endometrite, condição que envolve a inflamação do endométrio das éguas e por vezes, em decorrência de um processo infeccioso, é uma das causas mais frequentes e relevantes de problemas reprodutivos de equinos (CARD, 1997; NIKOLAKOPOULOS; WATSON, 1999; THOMASSIAN, 1996; TROEDSSON, 1999; WATSON, 1989). Estes animais diferem em suas habilidades de resolver a inflamação e os produtos inflamatórios nocivos relacionados devido a variações na ativação do sistema imune inato (TROEDSSON, 1999). As razões para estas diferenças na habilidade em resolver a inflamação são desconhecidas, mas tem-se atribuído a uma resposta imune inata defeituosa ou inadequada. Assim, as éguas susceptíveis à endometrite apresentam falha no processo de limpeza uterina associada a uma migração exacerbada de polimorfonucleares (PMNs) para o útero, resultando em uma resposta inflamatória exacerbada, com contínua migração de neutrófilos atraídos pela quimiotaxia originada pela presença de um agente externo, desta forma, tornando o ambiente uterino incompatível com o desenvolvimento embrionário (TROEDSSON, 1999). De modo geral, éguas susceptíveis à endometrite apresentam características em comum, como idade

avançada, histórico de falha reprodutiva em várias temporadas, episódios anteriores de endometrite e perdas gestacionais (TROEDSSON, 1997).

O aumento significativo da expressão de mRNA de citocinas pró- e anti-inflamatórias no endométrio (IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-10) foi observado juntamente com a presença de proteínas de fase aguda em éguas com endometrite bacteriana induzida experimentalmente por inóculos de *E. coli* (CHRISTOFFERSEN et al., 2010). As citocinas têm função crucial na modulação da resposta inflamatória local e sistêmica e algumas são de grande importância para a resolução da inflamação induzida (HENDERSON; WILSON, 1996).

A maior subdivisão de células auxiliares T CD4+ (células T_H) baseia-se no padrão de produção e secreção de suas citocinas (HIRAHARA; NAKAYAMA, 2016; MOSMANN; CHERWINSKI, 1986). Células T do subconjunto T_H1 sintetizam e secretam IL-2, e IFN- γ e TNF- α e estão envolvidas na imunidade mediada por células, enquanto células do subconjunto T_H2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, e são responsáveis pela estimulação da produção de anticorpos (MOSMANN; SAD, 1996; SAITO et al., 2010).

Rapidamente após a cobertura ou à entrada de patógenos no lúmen uterino, neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) migram para o interior deste órgão e do líquido intrauterino contendo acúmulos de mediadores inflamatórios (TROEDSSON; LIU, 1992). O início da quimiotaxia de PMNs é rápido e a duração de infiltração é relativamente curta, assegurando a remoção dos agentes externos, com subsequente retorno do endométrio a um estado de normalidade, preparando-o para receber o embrião (KATILA, 2012). Após a inoculação intrauterina com *E. coli*, observou-se estimulação significativa da expressão de TNF- α (CHRISTOFFERSEN et al., 2012a), que atua coordenando e estimulando precocemente a síntese de outras citocinas, necessárias como uma primeira linha de defesa contra invasões bacterianas (HERATH et al., 2006).

A avaliação das diferenças inerentes à resposta imune inicial após a inseminação entre dois grupos de éguas, resistentes e susceptíveis à

endometrite, demonstrou que éguas resistentes tiveram maior expressão de mRNA de IL-6, IL-1 e IL-10 do que as éguas susceptíveis, sendo que estas apresentaram um aumento significativo no número de neutrófilos durante todos os momentos do estudo em relação às éguas resistentes (WOODWARD et al., 2013). A infiltração de leucócitos e aumento da síntese de citocinas em resposta à inseminação ou cobertura são necessários ao sucesso reprodutivo, porém uma inflamação prolongada tem consequências contrárias ao mesmo (KOTILAINEN et al., 1994; TROEDSSON et al., 2002). Assim, éguas suscetíveis ao desenvolvimento de endometrite persistente têm maior expressão de mRNA endometrial de citocinas pró-inflamatórias e menor nível de citocinas anti-inflamatórias, sustentando assim, elevado número de células em seu endométrio quando comparado às éguas resistentes (FUMUSO et al., 2007). Os mesmos autores encontraram ainda baixos níveis de IL-10 em éguas susceptíveis à endometrite persistente.

Em éguas que apresentam endometrite, o perfil das citocinas pró- e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , e IFN- γ) não foram definidas claramente e pouco se sabe sobre sua cinética em casos de ocorrência natural ou mesmo qual o padrão de resposta imune (T_H1 ou T_H2) no ambiente uterino destes animais. Além disso, diferentes parâmetros têm sido utilizados como marcadores da inflamação em estudos realizados “in vivo”, sendo estas proteínas de fase aguda, expressão gênica de citocinas no endométrio e quantificação da celularidade uterina (FUMUSO et al., 2007; KOTILAINEN; HUHTINEN; KATILA, 1994; LIU; TROEDSSON, 2008); e, “in vitro”, tais como a liberação de metabólitos do ácido aracdônico (WATSON, 1989; WATSON et al., 1987).

Atualmente, admite-se que nenhum modelo exista para atuar como padrão ou controle no estudo da endometrite (LIU; TROEDSSON, 2008), e em vista disso, procurou-se estudar se existe diferença de resposta inflamatória uterina local e sistêmica entre éguas com endometrite e naquelas sem endometrite após a realização de lavados uterinos seriados e antibioticoterapia sistêmica.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram determinar o perfil das concentrações de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10 e IL-4 presentes no soro sanguíneo e no lavado uterino de éguas doadoras de embriões com endometrite naturalmente adquirida e naquelas clinicamente saudáveis, bem como definir o padrão da resposta imune, segundo a predominância de citocinas relacionadas ao perfil T_H1 e T_H2; observar se a inflamação local no útero pode gerar inflamação sistêmica; e, verificar se o lavado uterino e o tratamento sistêmico com enrofloxacina alteram o perfil de concentração das citocinas nestas éguas.

Material e Métodos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) local.

Foram utilizadas 12 éguas da raça Quarto de Milha em programa de transferência de embriões por no mínimo duas estações de monta consecutivas em uma mesma central de reprodução (Araçatuba, SP, Brasil), com idade variando entre 10 e 25 anos ($15,9 \pm 4,4$ anos), divididas em dois grupos com seis animais cada.

O Grupo Controle (GC) foi composto por seis animais ($14,3 \pm 3,6$ anos) considerados reprodutivamente normais, sem histórico de endometrite, apresentando taxas de recuperação embrionária superior a 70% por no mínimo duas estações de monta anteriores, com resultados de exames ginecológicos, citológicos, e hematológicos normais.

O Grupo Endometrite (GE) foi composto por seis animais ($15,5 \pm 5,4$ anos) com histórico reprodutivo insatisfatório, apresentando taxas de recuperação embrionária inferior a 50%, achados ultrassonográficos compatíveis de endometrite com acúmulo de líquido intrauterino (volume > 2cm referente à altura da coluna de líquido) ao estro (LEY, 2006), confirmadas por

citologia associado à cultura e antibiograma. Todas as éguas do GE apresentavam inflamação aguda com porcentagem de neutrófilos superior a 4% nas amostras de citologia endometrial (MENDONÇA, 2012), conforme descrito por Brook (1993). Os exames hematológicos dos animais do GE apresentaram padrão de normalidade.

A caracterização dos grupos foi realizada em estudo prévio (MENDONÇA, 2012) e as amostras séricas e de líquido uterino armazenadas a -80°C foram utilizadas para a realização deste estudo. Brevemente, as éguas foram avaliadas diariamente por palpação transretal e exame ultrassonográfico utilizando-se transdutor linear retal de 5,0 MHz¹ para detecção do estro, determinado pela presença de edema uterino, tônus cervical, ausência de corpos lúteos e mensuração dos folículos dominantes (> 28mm e < 33 mm de diâmetro), bem como a avaliação de presença de líquido intrauterino. Uma vez detectada a fase estrogênica do ciclo estral, as éguas foram avaliadas quanto a presença de células inflamatórias através da citologia uterina e presença de microrganismos através de cultura microbiológica e antibiograma, conforme descrito previamente (MENDONÇA, 2012).

Todas as éguas receberam alimentação à base de ração comercial² aproximadamente 1% do peso vivo e pastagem de Tifton de boa qualidade, além de água e sal mineral³ *ad libitum*. Todos os animais foram vermifugados⁴ a cada sessenta dias. Enrofloxacin⁵ foi administrada a todos os animais (5 mg/kg, IM, SID) do 1º até o 7º dia após o início da colheita das amostras. Por se tratar de animais de alto valor econômico alojados em uma central de reprodução, optou-se pela realização da antibioticoterapia em todos animais com a finalidade de evitar possíveis contaminações uterinas devido ao excesso de manipulação uterina destes animais.

¹ Ultrassom DP 3300 VET, Mindray®, Shenzhen, Guangdong, China.

² Fertilité, Socil®, Descalvado, SP, Brasil.

³ Mineral ADE, Socil®, Descalvado, SP, Brasil.

⁴ Ivermectina Gel Composto, Ourofino Saúde Animal®, Cravinhos, SP, Brasil.

⁵ Zelotril 10%, Agener União Saúde Animal®, Pouso Alegre, MG, Brasil.

As amostras de soro sanguíneo e lavado uterino foram colhidas nos dias 1 (início do cio), 2, 3, 4 e 5 (após o início do cio). As amostras de soro (5 mL) foram obtidas a partir do sangue venoso colhido da veia jugular⁶ das éguas concomitantemente às lavagens uterinas. As amostras de lavado uterino foram obtidas após a higienização da região perineal e transposição da cérvix com o dedo indicador e o posicionamento da sonda uterina modelo bivona estéril⁷, cujo balonete foi inflado com 40 mL de ar e tracionado caudalmente até obstruir o óstio cervical interno. Foram infundidos primeiramente 120 mL de solução isotônica de Ringer com lactato⁸ aquecida a 38°C no lúmen uterino, seguido de sifonagem e recuperação do líquido em copo coletor estéril. Do líquido uterino recuperado (no mínimo 60 mL para éguas de ambos os grupos), foram separados 20 mL para posterior concentração em colunas de ultrafiltração de 10 kDa⁹, conforme normas do fabricante, e quantificação de citocinas. As amostras séricas e de líquido uterino foram processadas entre 30 a 40 minutos após as colheitas e posteriormente armazenadas congeladas em freezer a -80°C até o momento das dosagens. Enquanto as amostras eram aliquotadas por outro colaborador, infundiu-se 1 litro de solução isotônica Ringer com Lactato aquecida a 38°C, para a lavagem uterina e completa remoção de debris celulares e do material acumulado, sendo este desprezado. O procedimento foi repetido por mais duas vezes (MENDONÇA, 2012).

As concentrações de TNF- α , IL-2 e IFN- γ (T_H1); IL-4, IL-6, e IL-10 (T_H2) foram mensuradas no soro e no líquido uterino recuperado por citometria de fluxo pelo método Cytometric Bead Array (CBA)¹⁰, que emprega uma mistura de esferas de poliestireno de intensidades de fluorescência distintas, recobertas com anticorpos específicos para o painel de citocinas humanas (kit para T_H1 e T_H2)¹¹. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de

⁶ Vacutainer, Becton-Dickinson®, Plymouth, UK.

⁷ Bioniche Animal Health®, Belleville, Ontario, Canadá.

⁸ JP Indústria Farmacêutica®, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

⁹ EMD Millipore Amicon™ Ultra-4 Centrifugal Filter, EMD Millipore Corporation®, Billerica, MA, USA.

¹⁰ BD Accuri™ C6 Flow Cytometer, BD Becton, Dickinson and Company Biosciences®, San Jose, CA, USA.

¹¹ BD Cytometric Bead Array (CBA)™ - Human Th1/Th2/TH17 Cytokine Kit™, BD Becton, Dickinson and Company Biosciences®, San Jose, CA, USA.

diversas citocinas no mesmo ensaio, empregando volumes pequenos de amostra. Brevemente, foram utilizadas alíquotas de 25 µL do líquido uterino, soro sanguíneo e dos padrões de citocinas foram submetidas à diluição seriada com diluente (5.000 pg/mL, 1:2 – 2.500 pg/mL, 1:4 – 1.250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL) e 25 µL de diluente sem esferas marcadas (controle negativo) foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL. Em cada tubo foram adicionados 15 µL da mistura de esferas de captura conjugadas com anticorpos monoclonais anti-TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ , com subsequente incubação por 90 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 µL de tampão de lavagem, centrifugadas a 200 x g por sete minutos a 18°C e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram reincubadas em 20 µL de uma solução de anticorpos monoclonais anticitocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) por 90 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram mais uma vez lavadas com 500 µL de tampão de lavagem, centrifugadas a 200 x g por sete minutos a 18°C e o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em 250 µL de reagente F e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo.

O limite de detecção para cada citocina usando o Kit de Citocinas Humanas TH1/TH2/TH17¹¹ é definido como a concentração correspondente a dois desvios padrão acima da fluorescência média de 30 repetições do controle negativo (0 pg/mL). O valor limite de detecção fornecido pelo fabricante é 3,7 pg/mL para IFN- γ ; 3,8 pg/mL para TNF- α ; 4,5 pg/mL para IL-10; 2,4 pg/mL para IL-6; 4,9 pg/mL para IL-4; e, 2,6 pg/mL para IL-2. A aquisição dos dados (2500 eventos) foi realizada no citômetro de fluxo Accuri C6¹² a 488 nm.

O volume de líquido recuperado do útero das éguas variou, assim como em outros estudos realizados em mulheres para detecção de citocinas pelo

¹² FCAP Array™ Software Version 3.0, Soft Flow Hungary Ltd. para BD Becton, Dickinson and Company Biosciences®, San Jose, CA, USA.

método de ELISA (LÉDÉE-BATAILLE et al., 2002), bem como o fez para outros ensaios (LI et al., 1993; MACKENNA et al., 1993). Portanto, como esses autores, consideramos apenas a concentração de citocinas, mas não a quantidade de citocina colhida. Os resultados estão expressos como concentração de citocinas (pg/mL) e não a quantidade total colhida (BOLLEN et al., 2008; DEZZUTTI et al., 2011; HWANG et al., 2012; LÉDÉE-BATAILLE et al., 2002; LÉDÉE-BATAILLE et al., 2004).

As citocinas produzidas pelos equinos apresentam homologia estrutural terciária à citocinas humanas superior a 60% (SCHEERLINCK, 1999). A homologia entre as espécies equina (*Equus caballus*) e humana (*Homo sapiens*) foi obtida através da plataforma BLAST®¹³, com sua respectiva identificação e número de acesso FASTA: similaridade de 66% para IFN- γ (NC_009149.2); 89% para TNF- α (NC_009163.2); 73% para IL-10 (NC_009148.2); 65% para IL-6 (NC_009147.2); 69% para IL-4 (NC_009157.2); e, 73% para IL-2 (NC_009145.2).

Os dados obtidos para cada parâmetro estudado, nos diferentes grupos experimentais, foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas no tempo (Two-Way ANOVA) seguida da comparação entre as médias pelo teste de Tukey. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os dados foram considerados significativos com valor de $P < 0,05$ para os diferentes momentos.

Resultados e Discussão

A infecção bacteriana do lúmen uterino é uma das maiores causas de infertilidade em éguas (CHRISTOFFERSEN et al., 2010), e sendo assim, a resposta imune, a qual está associada à liberação de várias citocinas pró- e

¹³ BLAST®, National Center for Biotechnology Information – NCBI®, Rockville Pike, Bethesda, Maryland, USA.

anti-inflamatórias seguidas pela mobilização de neutrófilos, é essencial para o sucesso reprodutivo destes animais. O presente estudo demonstrou que altas concentrações de citocinas pró- e anti-inflamatórias estão presentes no lavado uterino de éguas com endometrite (GE) comparadas com os animais saudáveis (GC) no primeiro dia de cio. Este trabalho é o pioneiro a determinar o perfil das concentrações de citocinas pró- e anti-inflamatórias no lavado uterino de éguas acometidas por endometrite por citometria de fluxo, além de determinar o padrão T_H1 ou T_H2 da resposta imune durante a endometrite no período de estro.

As concentrações das diferentes citocinas avaliadas nas amostras de lavado uterino diferiram entre os grupos e entre os momentos de colheita. Os resultados obtidos revelam que, antes do início do processo de lavagem uterina por dias consecutivos (dia 1), IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-2 foram encontrados em maior concentração em éguas com endometrite. As concentrações de IL-4 foram semelhantes em ambos os grupos avaliados (Tabela 1).

A expressão de mRNA de citocinas inflamatórias no tecido uterino foi determinado em éguas (CHRISTOFFERSEN et al., 2010; 2012a; WOODWARD et al., 2013), vacas (GALVÃO et al., 2011; GHASEMI et al., 2012) e búfalas (LOYI et al., 2013). Aumento da expressão gênica de IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-10 foi detectado no endométrio de todas as éguas após inoculação intrauterina com *E. coli* (CHRISTOFFERSEN et al., 2010), apresentando padrão similar aos achados do presente estudo, no qual todas as éguas com endometrite bacteriana confirmada por cultura microbiológica também apresentaram níveis elevados de citocinas pró- e anti-inflamatórias, sendo estas através dos lavados uterinos para mensuração dos níveis destes marcadores inflamatórios. Elevados níveis de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (mRNA de TNF- α , IL-1 β e IL-6) também foram demonstrados no tecido uterino de búfalas com endometrite quando comparado com búfalas normais (LOYI et al., 2015). Em fêmeas bovinas leiteiras com endometrite entre 5 e 7 semanas pós-parto, diagnosticadas através de citologia uterina, foram observados maiores níveis

de expressão gênica para as citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-8 do que em vacas sem endometrite (GALVÃO et al., 2011). Similar a estes resultados, vacas leiteiras com endometrite expressaram maiores níveis de mRNA para TNF- α , IL-6 e IL-8 quando comparado às vacas saudáveis (GHASEMI et al., 2012). O perfil de expressão gênica de citocinas no tecido uterino está associado com a gravidade e persistência da inflamação uterina (LOYI et al., 2013), entretanto parece haver algumas divergências quanto aos resultados apresentados para algumas citocinas. Esta discrepância de valores parece estar associada às diferenças existentes entre as quantificações de mRNA de citocinas pró-inflamatórias no tecido uterino e a de citocinas (proteínas) no lavado uterino (KIM et al., 2014).

O trabalho pioneiro a mensurar níveis de citocinas inflamatórias no lavado uterino de vacas leiteiras com endometrite pelo método de ELISA demonstrou aumento das concentrações de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (citocinas pró-inflamatórias), IL-8 (quimiocina primária regulatória da atividade neutrofílica) e IL-10 (citocina anti-inflamatória) comparado a vacas sadias (KIM et al., 2014). Os resultados mencionados apresentam padrão semelhante ao observado no presente estudo, pois as concentrações de IL-6, TNF- α e IL-10 no lavado uterino de éguas com endometrite no momento inicial foram mais elevados quando comparado às éguas sem endometrite. Desta forma, estes achados indicam que os níveis mais elevados de citocinas inflamatórias nos lavados uterinos, bem como o aumento da expressão gênica de citocinas inflamatórias nos tecidos uterinos são indicativos de endometrite (KIM et al., 2014).

A partir do 4^o dia do tratamento, as concentrações de todas as citocinas avaliadas no líquido uterino diminuíram em relação ao momento inicial (dia 1) nas éguas com endometrite (GE), enquanto nas éguas sadias (GC) estas concentrações permaneceram constantes (Tabela 1). Estes achados podem estar associados à influência dos lavados uterinos consecutivos, os quais atuaram promovendo a limpeza física do útero e reduziram a carga microbiológica local (MCKINNON, 2010; MENDONÇA, 2012).

Tabela 1 - Concentrações de citocinas (pg/mL) em lavado uterino (120 mL de Ringer com lactato) de éguas com (GE) ou sem endometrite (GC) após o 1º dia do cio e submetidas a lavagens uterinas diárias (1.000 mL de Ringer com lactato, repetida 3 vezes) e antibioticoterapia (enrofloxacina a 5 mg/kg). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão

Citocinas	Momentos (dias após início do cio)	GE		GC	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
INF- γ	1	11,95 \pm 2,33	Aa	8,42 \pm 0,89	B
	2	10,78 \pm 2,45	ab	8,66 \pm 0,92	
	3	10,04 \pm 1,86	ab	8,93 \pm 0,54	
	4	8,60 \pm 0,73	b	8,77 \pm 2,27	
	5	9,05 \pm 0,70	b	8,64 \pm 1,02	
TNF- α	1	10,99 \pm 1,84	Aa	7,88 \pm 0,49	B
	2	10,01 \pm 1,89	ab	8,01 \pm 0,83	
	3	9,51 \pm 2,57	ab	7,92 \pm 0,77	
	4	8,03 \pm 0,60	b	7,86 \pm 1,01	
	5	8,49 \pm 0,88	b	8,33 \pm 1,34	
IL-10	1	10,30 \pm 1,57	Aa	7,56 \pm 0,54	B
	2	9,52 \pm 1,64	ab	8,02 \pm 0,50	
	3	8,97 \pm 1,11	ab	7,76 \pm 0,38	
	4	8,22 \pm 0,84	b	7,96 \pm 0,50	
	5	8,39 \pm 0,43	b	8,01 \pm 0,50	
IL-6	1	9,70 \pm 1,23	Aa	7,99 \pm 0,40	B
	2	9,47 \pm 1,68	ab	7,89 \pm 0,41	
	3	8,80 \pm 1,01	ab	8,00 \pm 0,45	
	4	8,21 \pm 0,54	b	7,75 \pm 0,38	
	5	8,32 \pm 0,36	ab	8,02 \pm 0,22	
IL-4	1	9,25 \pm 1,66	a	7,47 \pm 0,29	
	2	8,81 \pm 1,74	ab	7,33 \pm 0,37	
	3	8,18 \pm 1,50	ab	7,51 \pm 0,37	
	4	7,52 \pm 0,44	b	7,13 \pm 0,51	
	5	7,43 \pm 0,33	b	7,40 \pm 0,24	
IL-2	1	10,30 \pm 1,39	Aa	8,65 \pm 0,72	B
	2	9,86 \pm 1,56	ab	8,75 \pm 0,53	
	3	9,34 \pm 0,97	ab	8,67 \pm 0,49	
	4	8,64 \pm 0,18	b	8,62 \pm 0,72	
	5	8,65 \pm 0,27	b	8,83 \pm 0,57	

Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Perfil T_{H1} (TNF- α , INF- γ e IL-2); perfil T_{H2} (IL-4, IL-6 e IL-10).

A utilização da antibioticoterapia à base de enrofloxacin também levam à diminuição da carga bacteriana nas éguas acometidas por endometrite, consequentemente levando a diminuição do estímulo antigênico e da resposta inflamatória, como relatado em estudo prévio utilizando estes mesmos animais (MENDONÇA, 2012). Em humanos, a utilização de ciprofloxacina (metabólito da enrofloxacin) e outros derivados de fluorquinolonas em concentrações inibitórias mínimas iguais ou superiores a 5 µg/mL apresentaram significativa inibição na liberação de várias citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1β e TNF-α) induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) (RIESBECK, 2006). Efeitos imunomodulatórios similares da ciprofloxacina também têm sido relatados em outros modelos animais (DALHOFF, 2005; RIESBECK, 2002). A dose utilizada nos animais do presente estudo foi de 5mg/kg IM, sendo a mesma relatada na literatura (GONZÁLEZ et al., 2010). A concentração média de enrofloxacin e ciprofloxacina no tecido endometrial é de 7,38 µg/g para a dose utilizada, apresentando ainda CIM (concentração inibitória mínima) para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas detectáveis no útero acima de 36-48 e 22-43 horas, respectivamente. Esta combinação de sua atividade bactericida e seus efeitos anti-inflamatórios fazem da enrofloxacin uma alternativa para prevenção de endometrite em éguas em programas de transferência de embriões susceptíveis (GONZÁLEZ et al., 2010).

A utilização de lavados uterinos seriados associados a antibioticoterapia sistêmica não provocaram aumento significativo nas concentrações de citocinas no útero de éguas sem endometrite (GC), que poderiam ser considerados níveis endometriais basais para animais clinicamente saudáveis.

Os resultados do presente estudo demonstram que as concentrações de citocinas no líquido uterino apresentaram comportamento semelhante aos achados do perfil de expressão gênica de algumas citocinas no tecido endometrial (IL-1, TNF-α, IL-8 e IL-10) após a inoculação experimental do útero de éguas sadias por *E. coli* (CHRISTOFFERSEN et al., 2010), caracterizado por um pico de expressão gênica destas 3 horas após a infecção e subsequente decaimento a níveis basais após 72h. Em outro estudo, o perfil de

expressão das citocinas no endométrio obtido por qPCR e avaliado após a inseminação artificial de éguas resistentes e susceptíveis à endometrite, revelou aumento da expressão das mesmas entre 2 e 12 horas após a inseminação (WOODWARD et al., 2013). Embora a resposta imune seja variável em relação ao perfil de expressão gênica das citocinas conforme o tipo de desafio ao qual o útero é submetido (infeccioso ou após a cobertura), a resposta inflamatória é imediata, elevando os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias nas primeiras horas após o desafio (WOODWARD; TROEDSSON, 2014; WOODWARD et al., 2015). Em bovinos, o perfil de citocinas no tecido uterino está associado à gravidade e à persistência da inflamação em tal órgão (LOYI et al., 2013). A importância de se avaliar a duração da permanência destes mediadores está relacionada à capacidade imune particular de cada animal em debelar o processo inflamatório e preparar o ambiente uterino ao desenvolvimento embrionário, capacitando-o a levar uma gestação a termo (KATILA, 2012).

As concentrações de IL-10 no lavado uterino do GE foram mais elevadas do que as encontradas nas éguas sadias (GC) antes do início do processo de lavagem uterina por dias consecutivos, sendo similar ao encontrado em vacas leiteiras com endometrite pós-parto (KIM et al., 2014). A IL-10 atua durante uma inflamação aguda como uma potente citocina anti-inflamatória, amenizando assim a resposta inflamatória aos patógenos pela limitação da expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (FIORENTINO et al., 1991; FISCHER et al., 2010; KIM et al., 2014; PIQUÉ et al., 2008; SIEWE et al., 2006).

As concentrações séricas de citocinas não diferiram entre os dois grupos ou ao longo do tempo dentro de cada grupo (Tabela 2). Este resultado é semelhante ao obtido em estudo anterior (CHRISTOFFERSEN et al., 2012a), no qual a infecção experimental do endométrio equino por *E. coli* não promoveu alterações dos níveis séricos de citocinas ou em casos clínicos de vacas com endometrite (KIM et al., 2014). Contrariamente, altas concentrações séricas de TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram detectadas em vacas com endometrite

clínica em relação a vacas saudáveis (KASIMANICKAM et al., 2013), indicando variação dos resultados encontrados na espécie bovina. As razões para estas variações ainda não estão bem definidas na literatura. Entretanto, parece haver relação entre o aumento da carga bacteriana e o aumento detectável dos níveis da proteína amiloide A sérica modulados pela ação de citocinas no útero de éguas, assim como a exacerbação dos sinais clínicos sistêmicos (WOODWARD; TROEDSSON, 2014; WOODWARD et al., 2015), mas os mecanismos pelos quais a imunomodulação do ambiente uterino ocorrem ainda não foram descritos (CHRISTOFFERSEN et al., 2012b).

O aumento de expressão de citocinas pró- e anti-inflamatórias no tecido endometrial de éguas tem sido ligado à propensão para o desenvolvimento de endometrite persistente (CHRISTOFFERSEN et al., 2010). Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram que altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) estão presentes no lavado uterino de éguas que apresentam endometrite naturalmente adquirida, porém não no soro sanguíneo. Estes achados se assemelham aos obtidos em vacas leiteiras com endometrite clínica ou subclínica, quando comparadas a vacas saudáveis (KIM et al., 2014). Os resultados obtidos no presente estudo, associados à não detecção de alterações nas concentrações séricas de citocinas, destacam ainda a manutenção da resposta imune no ambiente uterino sugerindo uma compartimentalização da resposta inflamatória em tal órgão.

Tabela 2 - Concentrações sérias de citocinas (pg/mL) de éguas com (GE) ou sem endometrite (GC) após o 1º dia do cio e submetidas a lavagens uterinas diárias (1.000 mL de Ringer com lactato, repetida 3 vezes) e antibioticoterapia (enrofloxacina a 5 mg/kg). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão

Citocinas	Momentos (dias após início do cio)	GE	GC
INF-γ	1	8,71 \pm 0,49	8,97 \pm 0,80
	2	8,57 \pm 0,52	8,84 \pm 0,31
	3	9,12 \pm 1,12	8,71 \pm 1,50
	4	9,54 \pm 0,78	8,61 \pm 0,54
	5	8,90 \pm 1,06	8,87 \pm 0,80
TNF-α	1	7,93 \pm 0,75	8,68 \pm 0,88
	2	8,32 \pm 0,45	8,04 \pm 0,42
	3	8,43 \pm 0,94	8,23 \pm 1,15
	4	8,44 \pm 0,85	7,77 \pm 0,43
	5	8,07 \pm 1,22	8,29 \pm 0,25
IL-10	1	7,87 \pm 0,43	8,36 \pm 0,64
	2	8,11 \pm 0,74	7,91 \pm 0,44
	3	8,32 \pm 1,11	7,94 \pm 1,35
	4	8,44 \pm 0,58	7,75 \pm 0,48
	5	8,40 \pm 0,65	8,02 \pm 0,46
IL-6	1	7,97 \pm 0,21	8,04 \pm 0,30
	2	8,09 \pm 0,35	7,71 \pm 0,16
	3	8,24 \pm 0,66	7,94 \pm 0,64
	4	8,26 \pm 0,42	7,85 \pm 0,28
	5	8,13 \pm 0,57	7,94 \pm 0,32
IL-4	1	7,13 \pm 0,30	7,94 \pm 0,93
	2	7,36 \pm 0,47	7,01 \pm 0,43
	3	7,62 \pm 0,70	7,52 \pm 0,71
	4	7,62 \pm 0,58	7,23 \pm 0,41
	5	7,14 \pm 0,85	7,32 \pm 0,27
IL-2	1	8,37 \pm 0,32	8,70 \pm 0,36
	2	8,32 \pm 0,41	8,36 \pm 0,28
	3	8,82 \pm 0,70	8,56 \pm 0,63
	4	8,68 \pm 0,43	8,35 \pm 0,28
	5	8,55 \pm 0,57	8,44 \pm 0,31

Não existe diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Não existe diferença significativa entre os momentos ($p > 0,05$). Perfil T_{H1} (TNF- α , IFN- γ e IL-2); perfil T_{H2} (IL-4, IL-6 e IL-10).

A concentração de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-2, IL-6 e IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-10), à exceção de IL-4, apresentaram-se elevadas no GE quando comparadas ao GC no momento inicial (dia 1). Sabe-se que estas citocinas são produzidas principalmente por células T_{H1} e T_{H2}. Sabe-se que a classificação quanto ao padrão T_H de resposta imune se aplica a vários estudos em equinos, tais como em potros neonatos para determinação de sua imunidade inata (WAGNER et al., 2010), que mostra a presença do perfil T_{H1}, sendo detectados níveis de IFN- γ nos 3 primeiros dias de vida (PERKINS et al., 2015), bem como expressão de citocinas IL-4 (padrão T_{H2}) e IL-17 (padrão T_{H17}) em potros saudáveis nas três primeiras semanas de vida, contribuindo assim para melhor entendimento da polarização da resposta imune (LIU et al., 2011). Equinos com doenças inflamatórias aéreas apresentam tendência em polarização de resposta imune no padrão T_{H1} comparado ao T_{H2} (RICHARD et al., 2014). Éguas em estágio de prenhez inicial apresentam tendência de polarização ao padrão T_{H2} a partir da diferenciação de células T_{H0}, na qual a IL-4 suprime a atividade de IFN- γ (T_{H1}) por volta do 25º dia de gestação (TACHIBANA et al., 2013), ao contrário do que ocorre em mulheres não gestantes que apresentam alta porcentagem de células T_{H1} frente a infecções virais e bacterianas (SAITO et al., 1999b), similar aos achados do presente estudo que demonstram uma tendência a polarização de resposta T_{H1} nas éguas com endometrite adquirida.

No presente estudo, observou-se a predominância de resposta com perfil T_{H1} nos primeiros 3 dias, na qual há um predomínio de respostas mediadas por células, principalmente através de aumentos de IL-2, TNF- α e IFN- γ , sendo este último também responsável pelo efeito negativo sobre a resposta imune T_{H2}. Associado a isto, a citologia uterina destes animais (MENDONÇA, 2012) demonstrou um aumento significativo de polimorfonucleares nos animais do GE quando comparados aos do GC no momento inicial (dia 1), reforçando a presença da resposta imune T_{H1}.

Nota-se ainda que a IL-4 foi a única citocina cujas concentrações não estavam elevadas no tempo inicial (dia 1) em éguas com endometrite. Sabe-se

que esta é uma citocina anti-inflamatória e que estimula a diferenciação da resposta imune para o padrão T_H2 , sendo produzida principalmente por mastócitos, células B e basófilos (SEDER et al., 1991; YOSHIMOTO; PAUL, 1994), enquanto que o IFN- γ favorece o desenvolvimento da T_H1 (SEDER et al., 1994). Sendo assim, os achados do presente estudo demonstram que o perfil preferencial de resposta imune em éguas com endometrite seja T_H1 , à semelhança de mulheres com endometrite crônica, com recrutamento e ativação de macrófagos e aumento de liberação de IL-1, TNF- α e desencadeamento de liberação de IL-6 (TORTORELLA et al., 2014).

Entretanto, nota-se que o perfil T_H2 também está ativado em éguas com endometrite no momento inicial (dia 1), caracterizado pelas concentrações aumentadas de IL-6 e IL-10 no líquido uterino. Embora as respostas T_H1 e T_H2 estejam muito bem documentadas, estas não são os únicos padrões de respostas possíveis. Existe uma subdivisão de células T que expressam citocinas de ambos os padrões (T_H1 e T_H2) e são denominadas células T_H0 (D'ELIOS et al., 2011; MOSMANN; COFFMAN, 1989; MOSMANN; SAD, 1996; SAITO et al., 1999a, 1999b). Os resultados do presente estudo sugerem que ambos os padrões T_H1 e T_H2 de resposta imune estejam ativados, sendo um indicativo de que o padrão T_H0 (D'ELIOS et al., 2011; MOSMANN; SAD, 1996) esteja presente no ambiente uterino de éguas acometidas por endometrite.

O uso de imunoenaios comerciais têm sido questionadas em fluidos de origem animal, pois os anticorpos são criados contra mediadores humanos recombinantes (BERTONE et al., 2001). Imunoenaios de citocinas comerciais contendo citocinas humanas recombinantes e anticorpos criados contra citocinas humanas recombinantes quantificam com precisão o produto humano recombinante e natural. As citocinas produzidas pelos equinos apresentam homologia estrutural terciária à citocinas humanas superior a 60% (SCHEERLINCK, 1999), com homologia conservadas entre essas espécies e propriedades funcionais que não são espécie-específicas, sendo sugerido por alguns autores alta reatividade cruzada entre estas espécies e representam no

geral valores relativos altamente confiáveis por serem testes altamente sensíveis e específicos (BERTONE et al., 2001).

A compreensão dos mecanismos pelos quais ocorre a modulação da resposta inflamatória na espécie equina são de grande valia na determinação e desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, permitindo ainda a identificação e possível controle dos eventos que levam à infertilidade nestes animais. Ressalta-se ainda que este estudo é pioneiro a quantificar níveis de citocinas inflamatórias por citometria de fluxo no lavado uterino de éguas acometidas por endometrite. Os dados na literatura ainda são escassos e mais estudos são necessários para melhor elucidar o perfil das citocinas no ambiente uterino e o padrão de resposta imune para estes animais.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que éguas com endometrite naturalmente adquirida apresentaram concentrações mais elevadas de citocinas pró- (TNF- α , IL-6, IL-2 e IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-10) em seus respectivos lavados uterinos quando comparadas com os animais saudáveis no primeiro dia do estro (antes do procedimento de lavagens uterinas seriadas e a antibioticoterapia).

São necessárias maiores investigações com relação ao papel da IL-4 nos quadros de endometrite, mas em vista dos resultados, em endometrites leves a moderadas, as concentrações basais são suficientes para auxiliar a IL-10 no controle da resposta inflamatória local.

A utilização de lavados uterinos seriados associados a antibioticoterapia sistêmica à base de enrofloxacin não provocaram alterações significativas nas concentrações de citocinas presentes no útero de éguas sem endometrite, podendo ser considerados níveis endometriais basais para animais clinicamente saudáveis.

O tratamento com lavagens uterinas seriadas e antibiótico sistêmico foi eficiente em reduzir a concentração de citocinas no lavado uterino de éguas com endometrite após 72 horas, equiparando-se com os níveis do grupo de éguas saudáveis.

Demonstrou-se também que o padrão de resposta T_H1 predominou sobre a resposta T_H2 no útero de éguas afetadas quando contrastado ao perfil de animais sadios no primeiro dia do cio. Como ambos os perfis estavam ativados, sugere-se um equilíbrio entre os dois padrões de tipos celulares ou mesmo uma resposta transiente associada às condições de estimulação destas linhagens celulares. Estes achados sugerem ainda ser um indicativo de que o padrão T_H0 esteja atuante no ambiente uterino destas éguas.

Além disso, a resposta inflamatória ficou compartimentalizada no útero, uma vez que as concentrações séricas das citocinas permaneceram inalteradas.

Referências

- ALLEN, W. R. et al. Reproductive efficiency of Flatrace and National Hunt Thoroughbred mares and stallions in England. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 5, p. 438–445, 2007.
- BERTONE, A. L.; PALMER, J. L.; JONES, J. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. **Veterinary Surgery**, v. 30, n. 6, p. 528-538, 2001.
- BOLLEN, L. J. et al. No increase in cervicovaginal proinflammatory cytokines after Carraguard use in a placebo-controlled randomized clinical trial. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 47, n. 2, p. 253-257, 2008.
- BROOK, D. Uterine cytology. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 246–253.
- BURTON, A. B. et al. Serum interleukin-6 (IL-6) and IL-10 concentrations in

normal and septic neonatal foals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, n. 2-4, p. 122–128, 2009.

CARD, C. Infectious diseases of the puerperal period. In: YOUNGQUIST, R. S. (Ed.). **Current therapy in large animal theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. p. 161–165.

CHEN, X. et al. Th1-, Th2-, and Th17-associated cytokine expression in hypopharyngeal carcinoma and clinical significance. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 273, n. 2, p. 431-438, 2016.

CHERWINSKI, H. M. et al. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 166, n. 5, p. 1229–1244, 1987.

CHRISTOFFERSEN, M. et al. Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally induced endometritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 138, n. 1-2, p. 95–105, 2010.

CHRISTOFFERSEN, M. et al. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 41, 2012a.

CHRISTOFFERSEN, M. et al. Effect of immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. **Theriogenology**, v. 78, n. 5, p. 991–1004, 2012b.

D'ELIOS, M. M. et al. T-Cell Response to Bacterial Agents. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 9, p. 640–645, 2011.

DALHOFF, A. Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. **Infection**, v. 33, Suppl 2, p. 55–70, 2005.

DELASSUS, S. et al. Differential cytokine expression in maternal blood and placenta during murine gestation **Journal Immunology**, v. 152, p. 2411-2421, 1994.

DEL PRETE, G. F. et al. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 1, p. 346–350, 1991.

DEZZUTTI, C.S.; et al. Performance of swabs, lavage, and diluents to quantify biomarkers of female genital tract soluble mucosal mediators. 2011, **PLoS ONE** v. 6, n. 8, p. e23136, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0023136

FIORENTINO, D. F. et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 11, p. 3815–3822, 1991.

FISCHER, C. et al. Selected pro-Inflammatory Factor Transcripts in Bovine Endometrial Epithelial Cells Are Regulated during the Oestrous Cycle and Elevated in Case of Subclinical or Clinical Endometritis. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 22, n. 5, p. 818–29, 2010.

FUMUSO, E. A. et al. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, n. 1-2, p. 30–39, 2007.

GALVÃO, K. N. et al. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 290–299, 2011.

GHASEMI, F. et al. Proinflammatory cytokine gene expression in endometrial cytobrush samples harvested from cows with and without subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1538–1547, 2012.

GONZÁLEZ, C. et al. Enrofloxacin-based therapeutic strategy for the prevention of endometritis in susceptible mares. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 33, n. 3, p. 287–294, 2010.

HENDERSON, B. Cytokine induction by bacteria: beyond lipopolysaccharide. **Cytokine**, v. 8, n. 4, p. 269–282, 1996.

HERATH, S. et al. M. Use of the cow as a large animal model of uterine infection and immunity. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 69, n. 1, p. 13–22, 2006.

- HIRAHARA, K., NAKAYAMA, T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. **International Immunology**, v. 28, n. 4, p. 163-171, 2016.
- JIN, L. P. et al. The costimulatory signal upregulation is associated with Th1 bias at the maternal-fetal interface in human miscarriage. **American Journal Reproduction Immunology**, v. 66, p. 270-278, 2011.
- KASIMANICKAM, R. K. et al. Associations among serum pro- and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows. **Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E**, v. 11, p. 103, 2013.
- KATILA, T. Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. Suppl. 5, p. 31–41, 2012.
- KIM, I.-H. et al. Inflammatory cytokine concentrations in uterine flush and serum samples from dairy cows with clinical or subclinical endometritis. **Theriogenology**, v. 82, n. 3, p. 427–432, 2014.
- KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 629–636, 1994.
- KRAEMER, D. C. A History of equine embryo transfer and related technologies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 5, p. 305–308, 2013.
- LÉDÉE-BATAILLE, N. et al. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. **Human Reproduction**, v. 17, n. 1, p. 213-218, 2002.
- LÉDÉE-BATAILLE, N. et al. Detectable levels of interleukin-18 in uterine luminal secretions at oocyte retrieval predict failure of the embryo transfer **Human Reproduction**, v. 19, n. 9, p. 1968-1973, 2004.
- LEY, W. B. **Reprodução em éguas para veterinários de equinos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2006.
- LI, T. C.; LING, E.; DALTON, C. Concentration of endometrial protein PP14 in uterine flushings throughout the menstrual cycle in normal, fertile women. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 100, n. 5, p. 460-464, 1993.

- LIU, M. et al. Gene expression of innate Th1-, Th2-, and Th17-type cytokines during early life of neonatal foals in response to *Rhodococcus equi*. **Cytokine**, v. 56, n. 2, p. 356-364, 2011.
- LIU, I. K. M.; TROEDSSON, M. H. T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 415–420, 2008.
- LOYI, T. et al. Differential expression of pro-inflammatory cytokines in endometrial tissue of buffaloes with clinical and sub-clinical endometritis. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 2, p. 336–340, 2013.
- LOYI, T. et al. Expression of pathogen recognition receptors and pro-inflammatory cytokine transcripts in clinical and sub-clinical endometritis cows. **Animal Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 194–200, 2015.
- MACKENNA, A. et al. Placental protein 14 levels in uterine flushing and plasma of women with unexplained infertility. **Fertility and Sterility**, v. 59, p. 577-582, 1993.
- MARTINEZ-SANCHEZ, M. E. et al. A minimal regulatory network of extrinsic and intrinsic factors recovers observed patterns of CD4+ T cell differentiation and plasticity. **Computational Biology**, DOI:10.1371/journal.pcbi.1004324, p. 1-23; 2015.
- MATTEO, M. et al. Abnormal pattern of lymphocyte subpopulations in the endometrium of infertile women with chronic endometritis. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 61, n. 5, p. 322–329, 2009.
- MCKINNON, A. O. **Reprodução da égua problema** In: CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 11, 2010. **Anais** Campinas: ABRAVEQ, 2010.
- MENDONÇA, V. H. **Quantificação de proteínas de fase aguda em éguas doadoras de embrião da raça quarto de milha**. 2012. (Dissertação) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2012.
- MOSMANN, T.; CHERWINSKI, H. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.

- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 145–173, 1989.
- MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunology today**, v. 17, n. 3, p. 138–146, 1996.
- NIKOLAKOPOULOS, E.; WATSON, E. D. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. **Theriogenology**, v. 52, n. 99, p. 413–423, 1999.
- OLIVEIRA, L. J. et al. Characterization of the Th profile of the bovine endometrium during the oestrus cycle and early pregnancy. **Immune Response to Early Pregnancy in Cattle**, v. 8, n. 10, p. 1-13, 2013.
- PERKINS, G. A.; WAGNER, B. The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. **Equine Veterinary Journal**. v. 47, p. 267-274, 2015.
- PIQUÉ, M. et al. A combinatorial code for CPE-mediated translational control. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 434–448, 2008.
- RAGHUPATHY, R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. **Immunology**, v. 18, p. 478-482, 1997.
- REGHINI, M. F. S. et al. Resposta inflamatória uterina após inseminação artificial em éguas resistentes e susceptíveis à endometrite. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 2, p. 314–323, 2014.
- RICHARD, E. A. et al. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid from horses with neutrophilic inflammatory airway disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 6, p. 1838-1844, 2014.
- RIESBECK, K. Immunomodulating activity of quinolones: review. **Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)**, v. 14, n. 1, p. 3–12, 2002.
- RIESBECK, K. Immunomodulation by fluoroquinolones and other antibacterial agents. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 36, n. 10, p. 671–673, 2006.
- SAITO, S. et al. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. **Clinical**

and Experimental Immunology, v. 117, n. 3, p. 550–555, 1999a.

SAITO, S. et al. Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 42, n. 4, p. 240–245, 1999b.

SAITO, S. et al. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 63, n. 6, p. 601–610, 2010.

SCHEERLINCK, J.Y. Functional and structural comparison of cytokines in different species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 72, p. 39–44, 1999.

SEDER, R. A. et al. Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 7, p. 2835–2839, 1991.

SIEWE, L. et al. Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 12, p. 3248–3255, 2006.

TACHIBANA, Y. et al. Expression of endometrial immune-related genes possibly functioning during early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 1, p. 85-91, 2013.

THOMASSIAN, A. **Enfermidade dos eqüinos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 1996.

TORTORELLA, C. et al. Interleukin-6, interleukin-1 β , and tumor necrosis factor α in menstrual effluents as biomarkers of chronic endometritis. **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 1, p. 242–247, 2014.

TROEDSSON, M. H.; LIU, I. K. Measurement of total volume and protein concentration of intrauterine secretion after intrauterine inoculation of bacteria in mares that were either resistant or susceptible to chronic uterine infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 9, p. 1641–1644, 1992.

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

TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent

endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, n. 3, p. 461–471, 1999.

WAGNER, B.; BURTON, A.; AINSWORTH, D. Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. **Veterinary Research**, v. 41, 14p, 2010.

WATSON, E. D. et al. Effect of ovarian hormones on promotion of bactericidal activity by uterine secretions of ovariectomized mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 79, n. 2, p. 531–537, 1987.

WATSON, E. D. Release of immunoreactive arachidonate metabolites by equine endometrium in vitro. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 8, p. 1207–1209, 1989.

WEGMANN, T.G. et al. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? **Immunology**, v. 14, p. 353-356, 1993.

WOODWARD, E. J.; TROEDSSON, M. Inflammatory mechanisms of endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 4, p. 1–19, 2014.

WOODWARD, E. M. et al. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis. **Reproduction**, v. 145, n. 3, p. 289–296, 2013.

WOODWARD, E. M. et al. The effect of treatment with immune modulators on endometrial cytokine expression in mares susceptible to persistent breeding-induced endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 2, p. 235–239, 2015.

YOSHIMOTO, T.; PAUL, W. E. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 4, p. 1285–1295, 1994.